

## **6 Untersuchungen zu pharmakologischen Eigenschaften von Dendrimeren**

Das starke DNA-Targeting des Dendrimer-Platinkomplex-Konjugats macht Dendrimere zu hoch interessanten Transportvehikeln. Jedoch zeigt der geringe antiproliferative Effekt die Notwendigkeit der Freisetzung des Platinkomplexes in der Zelle bzw. im Zellkern. Das kann z.B. durch eine hydrolyselabile Schnittstelle erfolgen. Die definierte Synthese von Dendrimeren, die neben hydrolyselablen Anbindungsstellen für Platinverbindungen auch eine zweite Funktionalität z.B. für die Visualisierung der Biodistribution, für die Erhöhung der Tumorselektivität oder die Vermittlung der Löslichkeit bereithalten, ist mit dem bisher verwendeten DAB-PPI-Dendrimer nicht möglich.<sup>[129]</sup> Daher wurde für die weiteren pharmakologischen Untersuchungen ein PAMAM-Dendrimerensystem genutzt, das in der Arbeitsgruppe Schlüter entwickelt wurde. Die hier verwendete Synthesestrategie erlaubt die Herstellung polyfunktionaler Dendrimere mit definierter Struktur.<sup>[109,244]</sup> Die Amidbindungen in diesem Dendrimertyp lassen eine hydrolytische Spaltung zu, was zur Freisetzung eines Wirkstoffs genutzt werden könnte. Da bisher für diese Dendrimere keine Daten zur hydrolytischen Stabilität bekannt sind, sollte diese sowohl für den Grundkörper als auch für die Oberflächenmodifikationen bestimmt werden. Zur Oberflächenmodifikation wurden 1,1,3-Propantricarbonsäure und Aminosäuren wie Methionin, Asparaginsäure und 2,3-Diaminopropionsäure zur Anbindung von Platinwirkstoffen genutzt. Ferner wurden die Aminosäure Phenylalanin zum Studium des Einflusses hydrophober Gruppen in der Peripherie, Dansylgruppen zur Fluoreszenzmarkierung und PEG-Gruppen zur Solubilisierung verwendet. Den Einfluss dieser Modifikationen auf die Zytotoxizität zu kennen, ist wichtig um antiproliferative Effekte der Dendrimere nicht den Dendrimer-Zytostatika-Konjugaten zuzuordnen. Bevor eine Platinierung erfolgte, war es Ziel, die Zellakkumulationscharakteristika der Trägermoleküle in Abhängigkeit der Oberflächenmodifikation zu kennen.

## 6.1 Stabilität von Dendrimeren gegenüber enzymatischer und nicht enzymatischer Hydrolyse

Untersuchungen zur hydrolytischen Freisetzung von peptidisch gebundenen Substanzen wurden bisher nur an linearen Makromolekülen durchgeführt. Hier bedarf es eines großen Abstandes zum Grundpolymer für den Enzymangriff. So wird eine Abspaltung von Phenylalanin erst bei einem Abstand von 3 Aminosäuren vom Grundgerüst aus beobachtet.<sup>[104]</sup> Es stellte sich die Frage, inwiefern das auf globuläre polymere Systeme übertragbar war. Dazu wurden aminterminierte Dendrimere mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen (s. Abb. 6.1 und 6.2) mit den Standardenzymen Papain, Chymotrypsin, Trypsin und Pepsin inkubiert. Für die Wahl dieser Enzyme sprachen folgende Gründe:

Papain ist eine Cystein-Protease, d.h. sie hat im aktiven Zentrum einen Cystein-Rest, der für die proteolytische Spaltung verantwortlich ist. Dieser Teil ist bei allen Sulfhydrylproteasen evolutiv stark konserviert. Die Spezifität der Enzyme wird durch verschiedene Ausgestaltungen der Seitentaschen beim aktiven Zentrum bestimmt. Diese „erkennen“ über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und/oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen die Aminosäuren vor denen bzw. hinter denen die peptidische Bindung gespalten wird. Das Papain zeichnet sich durch eine geringe Spezifität aus, d.h. sie spaltet zwar bevorzugt nach Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Histidin, Glycin und Tyrosin, aber bei längerer Einwirkdauer werden so gut wie alle peptidischen Bindungen in Proteinen hydrolysiert. Deswegen wird Papain in der Peptidanalytik auch zur Totalhydrolyse von Proteinen eingesetzt.<sup>[245]</sup> Außerdem ist Papain besonders geeignet für das Modellieren von lysosomalen Proteasen, da es wie die meisten Cathepsine eine Cystein-Protease ist. In ihren Hauptaktivitäten weist sie Ähnlichkeit mit dem Hauptvertreter der lysosomalen Proteasen, dem Cathepsin B, auf.<sup>[101]</sup> Aufgrund ihrer leichteren Handhabbarkeit, der besseren Verfügbarkeit und dem damit verbundenen geringeren Anschaffungskosten, wird Papain allgemein als Modellprotease für Cathepsin B benutzt. Cathepsin B ist von besonderem Interesse, da dieses Enzym häufig in Tumoren überexprimiert und an der Tumorinvasion und Metastasierung beteiligt ist.<sup>[102]</sup>

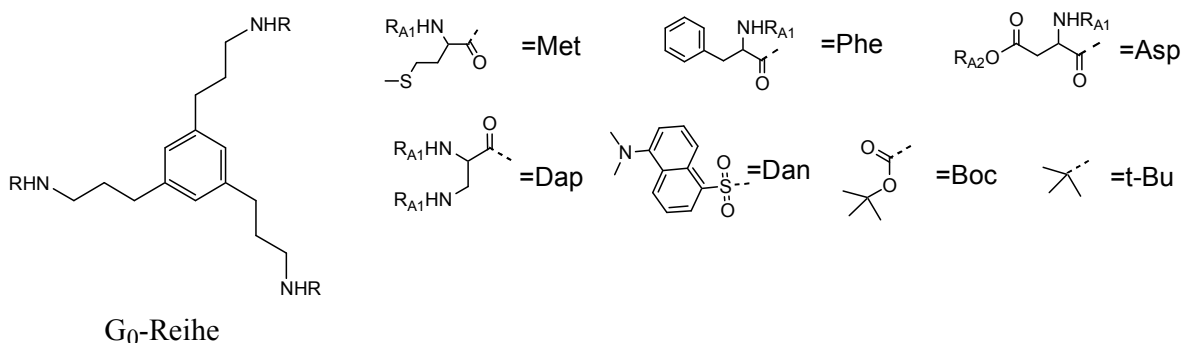
Die Aspartatprotease Pepsin zeichnet sich durch einen Aspartatrest im aktiven Zentrum aus. Das Aktivitätsoptimum dieser Hydrolasenklasse liegt im sauren pH-Wert-Bereich (2-4). In der Zelle spielen Aspartathydrolasen eine eher untergeordnete Rolle. Als einzige literaturbekannte Aspartatprotease mit hervorzuhobender Bedeutung ist das Cathepsin D zu nennen. Cathepsin D ist eine lysosomale Protease. Eine Überexpression dieser Protease in Tumoren ist ein Hinweis auf hohe Invasivität und bedingt daher eine schlechte Prognose.<sup>[101,102,246]</sup> Cathepsin D schneidet C-terminal bevorzugt zwischen zwei Phenylalaninresten.<sup>[247,248]</sup> Damit hat sie ein ähnliches Schneideverhalten wie das Pepsin. Dieses schneidet zwischen Phenylalanin, Methionin, Leucin bzw. Tryptophan und einem anderen hydrophoben Rest.<sup>[245]</sup> Daher kann Pepsin aus den oben beschriebenen Gründen als Modellenzym für das Cathepsin D genutzt werden.

Chymotrypsin und Trypsin sind Vertreter der Klasse der Serinproteasen. Diese spielen in der endosomalen Transportroute in der Zelle so gut wie keine Rolle, da ihr pH-Optimum im basischen pH-Wert-Bereich liegt. Als Membranenzyme sind Serinproteasen jedoch von großer Bedeutung. Die Proteasen Plasminogen und der Plasminogenaktivator haben große Bedeutung für die Tumorinvasivität.<sup>[101,249-251]</sup> Für sie wird eine ähnliche Selektivität wie für Trypsin berichtet. Trypsin schneidet nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Dagegen bevorzugt Chymotrypsin die hydrophoben Seitenketten Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, wobei aber auch mit geringerer Aktivität hinter Leucin, Methionin, Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure gespalten wird.<sup>[245]</sup>

Als vierte Proteasengruppe sind die Metalloproteasen zu nennen. Auch sie liegen häufig in Tumoren überexprimiert vor und begünstigen so die Invasivität des Tumors, da sie maßgeblich für den Abbau der Extrazellulärmatrux verantwortlich sind.<sup>[249,252,253]</sup> Aufgrund fehlender Modellenzyme wurden diese Proteasen nicht in diese Arbeit mit einbezogen.

Auch beim Einsatz von Peptidketten, die zur selektiven enzymatischen Spaltung konzipiert wurden, lässt sich die lysosomale Aktivität nicht durch das jeweilige isolierte Enzym allein abbilden. So werden bei Verwendung eines Zytosol von SW480-Kolon-

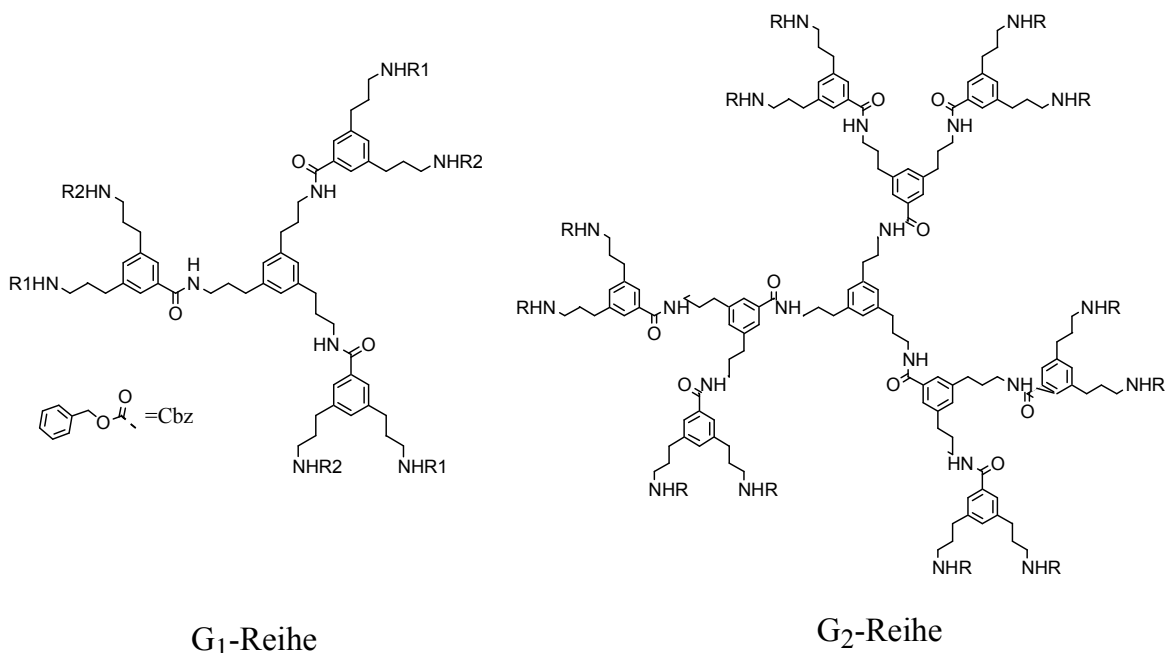
karzinomzellen für die Freisetzung von 5-Fuorouracil von einem HPMA-Polymer nicht unbedeutende Nebenaktivitäten gefunden, die nicht von den beiden Zielenzymen Cathepsinen B und H herrühren.<sup>[105]</sup> Daher wurde ein ähnliches zellbasiertes Verdauungssystem entwickelt. Dazu wurde das Zytosol von MCF-7-Zellen isoliert, lyophilisiert und in einem Puffer aufgelöst, der die optimale lysosomale Aktivität gewährleisten sollte.<sup>[104]</sup>



<b>G<sub>0</sub>-Reihe</b>			
Verbindung	R	R <sub>A1</sub>	R <sub>A2</sub>
<b>G<sub>0</sub></b>	H	---	---
<b>G<sub>0</sub>(Boc)<sub>3</sub></b>	Boc	---	---
<b>G<sub>0</sub>(Met)<sub>3</sub></b>	Met	H	---
<b>G<sub>0</sub>(MetBoc)<sub>3</sub></b>	Met	Boc	---
<b>G<sub>0</sub>(Phe)<sub>3</sub></b>	Phe	H	---
<b>G<sub>0</sub>(PheBoc)<sub>3</sub></b>	Phe	Boc	---
<b>G<sub>0</sub>(Asp)<sub>3</sub></b>	Asp	H	H
<b>G<sub>0</sub>(AspBoc)<sub>3</sub></b>	Asp	Boc	t-Bu
<b>G<sub>0</sub>(Dap)<sub>3</sub></b>	Dap	H	---
<b>G<sub>0</sub>(DapBoc)<sub>3</sub></b>	Dap	Boc	---
<b>G<sub>0</sub>(Dan)<sub>3</sub></b>	Dan	---	---

**Abb. 6.1** Untersuchte Dendrimerstrukturen der G<sub>0</sub>-Reihe des „Fuchs-Types“

Um die Stabilität der Dendrimere (siehe Abb. 6.1 und Abb. 6.2) verfolgen zu können, wurden verschiedene elektrophoretische Systeme erstellt. Für schwache Säuren und Basen hat der pH-Wert großen Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität, da dadurch die Ladung  $q$  des Ions maßgeblich bedingt wird.<sup>[135]</sup> Da die Amine in den Dendrimeren schwache Basen darstellen, musste ein pH-Wert gewählt werden, bei dem die Analyten definiert und einheitlich geladen sind. Für eine ähnliche Dendrimerklasse war schon ein System publiziert worden, das als Ausgangspunkt gewählt wurde.<sup>[130,131]</sup> Die hochmobi-



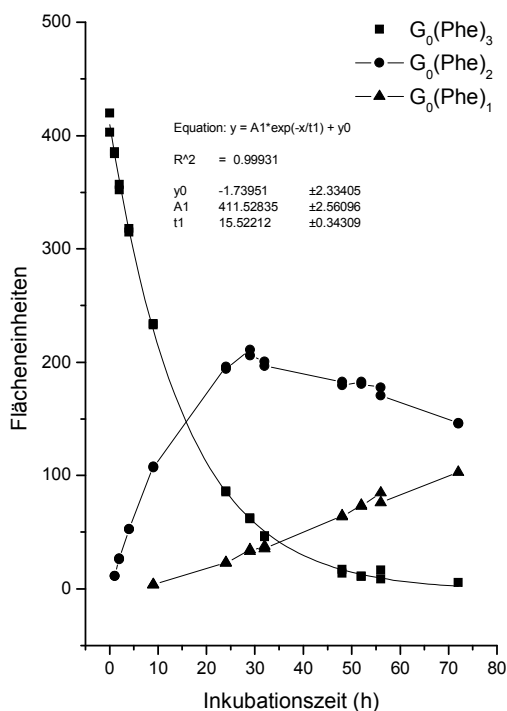
<b>G<sub>1</sub>-Reihe</b>				
Verbindung	R1	R2	R <sub>A1</sub>	R <sub>A2</sub>
<b>G<sub>1</sub></b>	H	H	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Boc)<sub>6</sub></b>	Boc	Boc	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub></b>	Met	Met	H	---
<b>G<sub>1</sub>(MetBoc)<sub>6</sub></b>	Met	Met	Boc	---
<b>G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub></b>	Phe	Phe	H	---
<b>G<sub>1</sub>(PheBoc)<sub>6</sub></b>	Phe	Phe	Boc	---
<b>G<sub>1</sub>(Asp)<sub>6</sub></b>	Asp	Asp	H	H
<b>G<sub>1</sub>(AspBoc)<sub>6</sub></b>	Asp	Asp	Boc	t-Bu
<b>G<sub>1</sub>(Dap)<sub>6</sub></b>	Dap	Dap	H	---
<b>G<sub>1</sub>(DapBoc)<sub>6</sub></b>	Dap	Dap	Boc	---
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>6</sub></b>	Dan	Dan	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub></b>	Dan	H	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Cbz)<sub>3</sub></b>	Dan	Cbz	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Boc)<sub>3</sub></b>	Dan	Boc	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub></b>	Dan	Dap	---	---
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(DapBoc)<sub>3</sub></b>	Dan	Dap	Boc	---

<b>G<sub>2</sub>-Reihe</b>	
Verbindung	R
<b>G<sub>2</sub></b>	H
<b>G<sub>2</sub>(Boc)<sub>12</sub></b>	Boc
<b>G<sub>2</sub>(Dan)<sub>12</sub></b>	Dan

Abb. 6.2 Untersuchte Strukturen der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Reihe der Dendrimeren des „Fuchs-Typs“

len aminterminierten Dendrimere wurden dazu beim Puffer-pH-Wert von 2,7 untersucht, so dass die Amine protoniert vorliegen. Es wurde auch eine hohe Ionenstärke (0,1M) im Phosphatpuffer gewählt, um die Analyten durch den dichten Strom der Gegenionen abzubremsen und so eine bessere Trennung auch bei geringen Mobilitätsunterschieden zu gewährleisten.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurden mit den Standardproteinen BSA und Casein Verdauexperimente durchgeführt. Danach sollte anhand des Produktspektrums die qualitative Beurteilung erfolgen. Daher wurde zur Auftrennung der Verdauprodukte mittels Kapillarelektrophorese der Verdauansatz mit einem Boratpuffer auf einen pH-Wert von 9,6 eingestellt. Hier lagen diese Analyten negativ geladen vor und wanderten zur Anode. Da dieses System aber einen starken EOF in Richtung Kathode aufwies, dessen Geschwindigkeit höher als die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten war, wurden sie dennoch kathodenseitig detektiert.



**Abb. 6.3** Kinetischer Verlauf des Verdau von  $G_0(\text{Phe})_3$  durch Chymotrypsin (Gesamtfläche durch Abspaltung von Phenylalanin verringert sich, da dieses ebenfalls eine starke Absorption bei 200nm hat)

Zur Untersuchung der Dendrimerstabilitäten wurden zu bestimmten Zeitpunkten dem Inkubationsansatz Proben entnommen und durch Zugabe von 0,1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf einen pH-Wert von 2,7 gebracht. Durch kapillarelektrophoretische Trennung ließen sich die Eduktmenge und die Menge eventuell entstehender Produkte gut verfolgen. Für die Verbindungen, bei denen ein Abbau festzustellen war (siehe Tab 6.1), ließ sich dieser sehr gut exponentiell analog einer pseudo-1.Ordnung Reaktion anpassen (siehe Abb. 6.3).

	Papain	Chymotrypsin	MCF-7 Cytosol
<b>G<sub>0</sub>(Met)<sub>3</sub></b>	-0,0763	-0,0054	-0,0112
<b>G<sub>0</sub>(Phe)<sub>3</sub></b>	-0,0604	-0,0647	-0,0071
<b>G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub></b>	-0,1646	-0,072	-0,0208
<b>G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub></b>	n.b.	n.b.	-0,0024

n.b. nicht bestimmbar

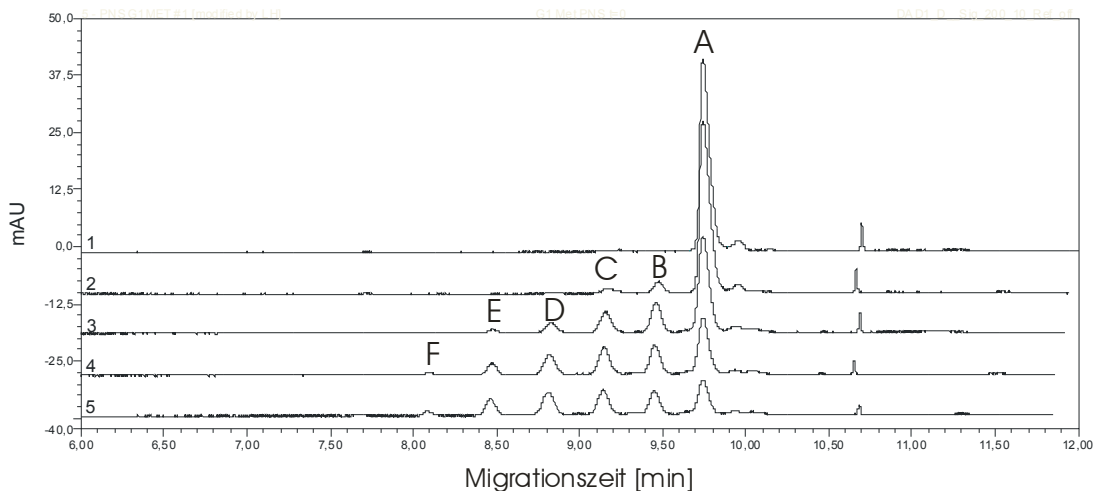
**Tab. 6.1** Geschwindigkeitskonstanten für den Abbau der Ausgangsdendrimere (Es sind nur Dendrimere aufgeführt, bei denen ein Abbau feststellbar war.)

Die Tab. 6.1. zeigt die Geschwindigkeitskonstanten für die von den Modellenzymen hydrolysierbaren Verbindungen. Als einzige Enzyme verursachten Papain und Chymotrypsin eine messbare hydrolytische Spaltung des Dendrimerkörpers. Hierbei beschränkte sich die Aktivität auf die Abspaltung von Phenylalanin (Phe) und Methionin (Met). Die Peptidbindungen der inneren Dendrimerstruktur und die Oberflächenmodifikationen Diaminopropionsäure (Dap), Asparaginsäure (Asp) und die Dansylgruppe (Dan) zeigten keine Degradationserscheinungen.

Papain zeigte hierbei eine leichte Präferenz für die Abspaltung von Methionin gegenüber Phenylalanin. Mit jeder Generation verdoppelt sich die Anzahl der Oberflächenmodifikationen. Dadurch verdoppelt sich ebenfalls die Wahrscheinlichkeit eines Enzymangriffs pro Molekül. Deshalb ist bei einem generationsunabhängigen Verdau eine Verdoppelung der Geschwindigkeitskonstanten zu erwarten. Dies war für die methionin-terminierten Dendrimere der Fall. Für das **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** ließ sich keine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten durchführen, da die Löslichkeit dieser Verbindung bei einem pH-Wert von 6,6 zu niedrig war. Trotz der schlechten Löslichkeit findet trotzdem

ein Verdau statt, so dass die besser löslichen Verdauprodukte sehr gut detektiert werden konnten.

Chymotrypsin hingegen hatte bei den  $G_0$ -Molekülen eine 10mal höhere Präferenz zur Abspaltung von Phenylalanin als von Methionin. Der Absolutwert für  $G_0(\text{Phe})_3$  mit Chymotrypsin lag in demselben Bereich wie beim Papain. Beim Übergang zu den  $G_1$ -Molekülen wurde ein deutlicher Generationseffekt gesehen. So verzehnfachte sich die Geschwindigkeit beim Übergang von  $G_0(\text{Met})_3$  zu  $G_1(\text{Met})_6$ . Hier schien die höhere Flexibilität des Dendrimers den Zugang zum aktiven Zentrum deutlich zu erleichtern. Das  $G_1(\text{Phe})_6$  wurde deutlich besser umgesetzt als durch Papain. Am Ende der Inkubationszeit (72h) wurde das  $G_1(\text{Phe})_1$  detektiert, während für Papain nur das  $G_1(\text{Phe})_4$  gefunden wurde. Das war ein Indiz dafür, dass auch bei der Abspaltung von Phenylalanin von Dendrimeren ein starker Generationseffekt für das Chymotrypsin vorlag.



**Abb. 6.4** Überlagerung des Verdauens von  $G_1(\text{Met})_6$  mit MCF-7-Zytosol (Peak A  $G_1(\text{Met})_6$ , der Methioningehalt nimmt mit aufsteigenden Alphabet ab)

Elektropherogramm 1	Zeitpunkt Start
2	4 Stunden Inkubation
3	25 Stunden Inkubation
4	50 Stunden Inkubation
5	70 Stunden Inkubation

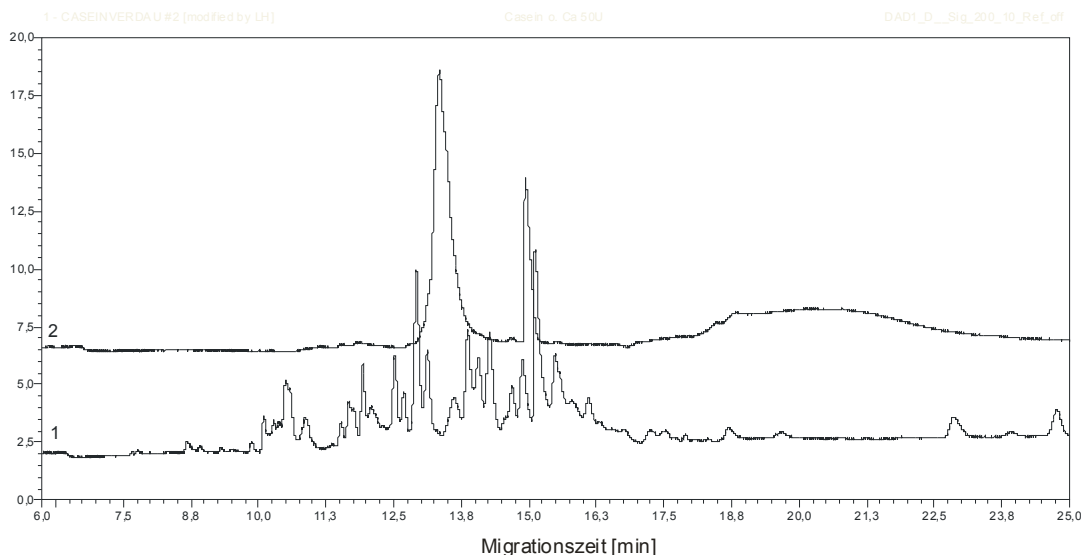
Die zytosolische Zubereitung der MCF-7-Zellen zeigte eine stärkere Präferenz zur Abspaltung von Methioninoberflächenfunktionalitäten als Papain. Die Geschwindigkeitskonstanten der Generation 0 und 1 Moleküle unterschieden sich wie beim Papain ebenfalls um den Faktor 2. Die Löslichkeit des  $G_1(\text{Phe})_6$  war deutlich erhöht



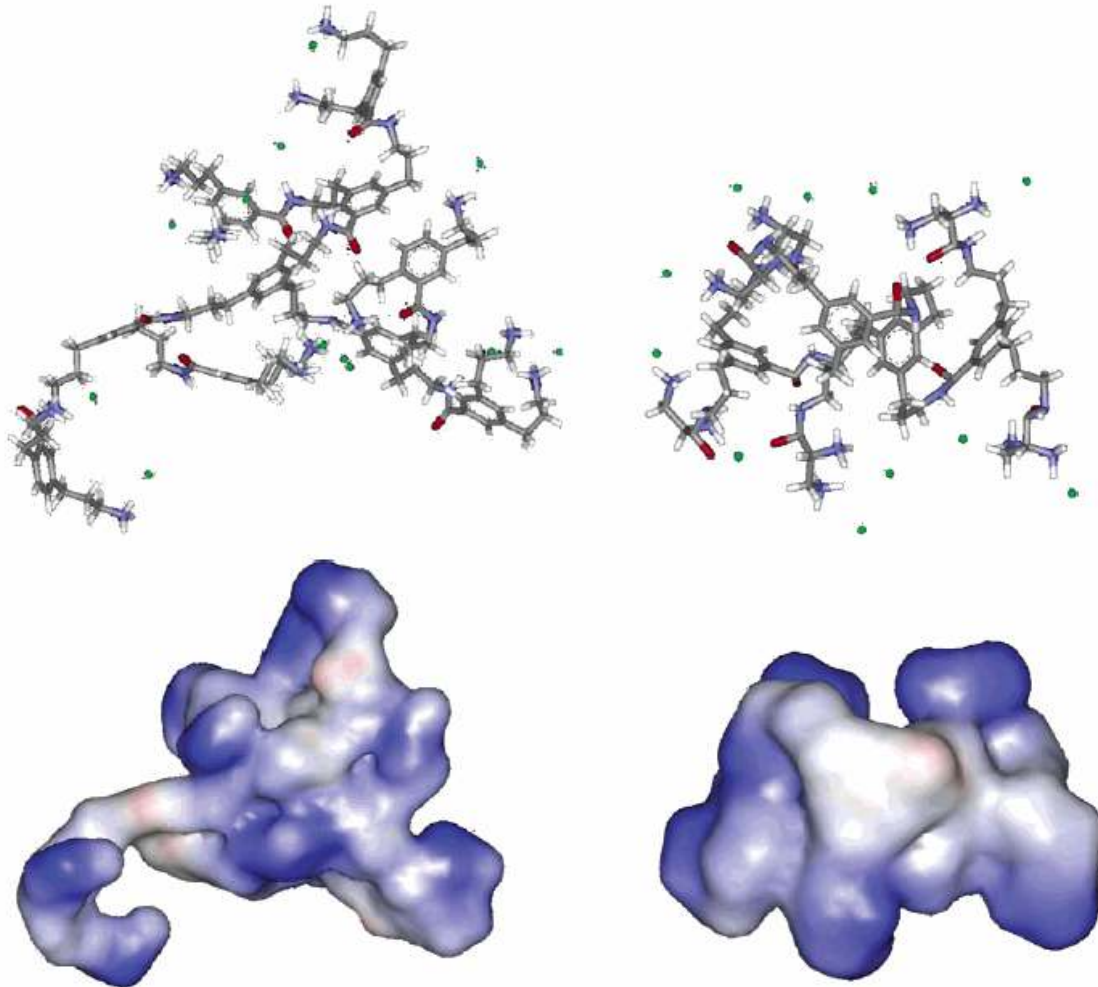
(>0,75mg/ml). Das lag höchstwahrscheinlich an der Proteinbindung an zytosolische Bestandteile. Dieses erklärte auch die stark erniedrigte Geschwindigkeitskonstante. Die Aktivität lag in der Regel niedriger als bei Papain und Chymotrypsin. Da die Proteasen nicht aufgereinigt vorlagen, war zum einen die Konzentration in den Ansätzen nicht definiert und zum anderen sorgten zytosolische Hemmstoffe<sup>[102]</sup> für eine Reduktion der Enzymaktivität.

Pepsin und Trypsin zeigten keine messbare Aktivität an den untersuchten peptidischen Bindungen. Dennoch wurde für Trypsin eine interessante Nebenaktivität gefunden. Das **G<sub>0</sub>(Dap)<sub>3</sub>** wies eine 2%ige Verunreinigung durch Moleküle mit einer Boc-Schutzgruppe auf. Diese Verunreinigung wurde in Gegenwart von Trypsin innerhalb von vier Stunden zum Hauptprodukt umgesetzt. Das Zytosol zeigte diese Aktivität ebenfalls.

Dass alle Enzyme unter den Inkubationsbedingungen aktiv waren, wurde durch den Verdau von Standardproteinen (BSA/Casein) gezeigt. Auch nach 24stündiger Inkubation mit den Dendrimeren war die Enzymaktivität mit der eines frisch aufgelösten Enzyms vergleichbar, so dass durch die Dendrimere auch keine Hemmung der proteolytischen Aktivität zu beobachten war (siehe Abb. 6.5).



**Abb. 6.5** Aktivitätskontrolle von Trypsin nach Inkubation mit **G<sub>1</sub>(Dap)<sub>6</sub>** durch 30min. Verdau von Casein. Elektropherogramm 1 Verdauprodukte  
2 Casein Standard



**Abb. 6.6** Molecular Modeling von  $G_2$  (links) und  $G_1(\text{Dap})_6$  (rechts) (entnommen aus [254])

Die trotz der vorhandenen Spezifität (Trypsin/Papain und Chymotrypsin) nicht stattfindende Hydrolyse an asparaginsäure- und diaminopropionsäureterminierten Dendrimeren kann mit konformellen Unterschieden erklärt werden. Für die hier untersuchten Dendrimere sind Molecular Modeling Untersuchungen durchgeführt worden. Die Dendrimere  $G_x(\text{Asp})_{(x+1)*3}$  und  $G_x(\text{Dap})_{(x+1)*3}$  werden durch eine gedrungene, dichte globuläre Struktur mit glatter Oberfläche charakterisiert (siehe Abb. 6.6). Dadurch sind die Oberflächenmodifikationen den Enzymen schlecht zugänglich. Das Gegenteil ist für phenylalanin- und methionintragenden Dendrimere der Fall, so dass diese Oberflächenmodifikationen weit herausragen und damit den Enzymen gut präsentiert werden.<sup>[254]</sup>

Wie bei den Verdauexperimenten wurde die Stabilität bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Hierbei konnten nach Inkubation im pH-Wertbereich von 2,7 bis 8,1 nach kapillarelektrophoretischer Trennung keine Abbauprodukte gefunden werden. Daher können diese Strukturen als hydrolysestabil bei physiologischen pH-Werten angesehen werden.

## **6.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Dendrimeren in Zellkultur**

Eine Substanz sollte eine möglichst geringe Beeinträchtigung des Zellwachstums hervorrufen, um als Trägermolekül für Zytostatika und andere Wirkstoffe einsetzbar zu sein. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass  $\text{NH}_2$ -terminierte Dendrimere eine deutlich höhere Toxizität als  $\text{CO}_2^-$ - und  $\text{OH}$ -terminierte aufweisen.<sup>[83,146,147]</sup> Inzwischen sind weitere Untersuchungen zur Zytotoxizität von  $\text{NH}_2$ -terminierten Dendrimeren mit anderen Kern- und Verzweigungseinheiten publiziert worden. Hierbei scheint die Toxizität immer generationsabhängig, d.h. von der Anzahl der primären Amine abhängig zu sein. Hierbei gilt je mehr primäre Amine d.h. je höher die Generation, desto zytotoxischer ist das Dendrimer.<sup>[115,118,147,255,256]</sup> Aber auch die innere Struktur scheint eine nicht untergeordnete Rolle zu spielen, weil PEI trotz ähnlicher Anzahl an primären Aminen eine höhere Toxizität als PAMAM-Dendrimere aufweisen.<sup>[146,257]</sup>

### **6.2.1 Zytotoxizität von Dendrimeren an adhärenen Zelllinien**

Da in der Arbeitsgruppe Gust der Forschungsschwerpunkt vornehmlich in der Therapie des Mammakarzinoms liegt, wurde für die Untersuchungen auf zwei verschiedene humane Mammakarzinomzelllinien, die hormonabhängige MCF-7 und die hormonunabhängige MDA-MB-231-Zelllinie, zurückgegriffen.<sup>[258]</sup> Durch Benutzung beider Zelllinien sollte unselektive Toxizität erkannt werden. Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde der in der Arbeitsgruppe etablierte Chemosensitivitätstest angewendet. Bei diesem Testsystem wurde die Zellmasse unter Dauerexposition der jeweiligen Testsubstanz über mehrere Tage (bis zu 225h) verfolgt. Zytotoxizität einer Substanz wurde im Folgenden als negativer Einfluss auf das Zellwachstum aufgefasst. Untoxische Substanzen beeinflussten das Zellwachstum nicht oder kaum, so dass im Vergleich zur Lösungsmittelkon-

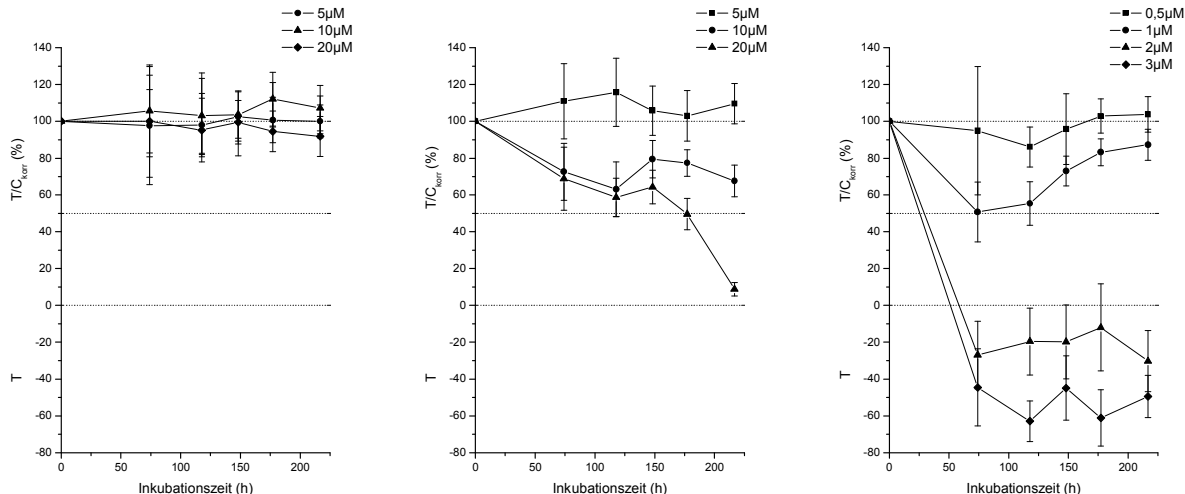
trolle ein Reduktion der Zellmasse von maximal 20% gesehen wurde. Bei Reduktion der Zellmasse um über 20% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle wurde die Substanz als antiproliferativ, bei Reduktion über 80% als zytostatisch eingestuft. Bei der Reduktion der zum Startzeitpunkt vorhandenen Zellmasse wurde eine Substanz als zytozide bezeichnet.

## 6.2.1.1 Zytotoxizität an MCF-7-Zellen

### 6.2.1.1.1 Zytotoxizität der Dendrimere des Basissatzes

Als erstes sollte untersucht werden, ob die Dendrimere, die im Arbeitskreis Schlüter von Frau Fuchs („Fuchs-Typ“) synthetisiert wurden, auf MCF-7 Zellen eine ähnliche wie in der Literatur für andere Zelllinien beschriebene zytotoxische Wirkung haben.<sup>[115,146,256]</sup> Die kommerziell erhältlichen Dendrimere des Polyimin-Typs dienen hierbei als Referenz.

#### 6.2.1.1.1.1 Zytotoxizität der Basisdendrimere des „Fuchs Typs“

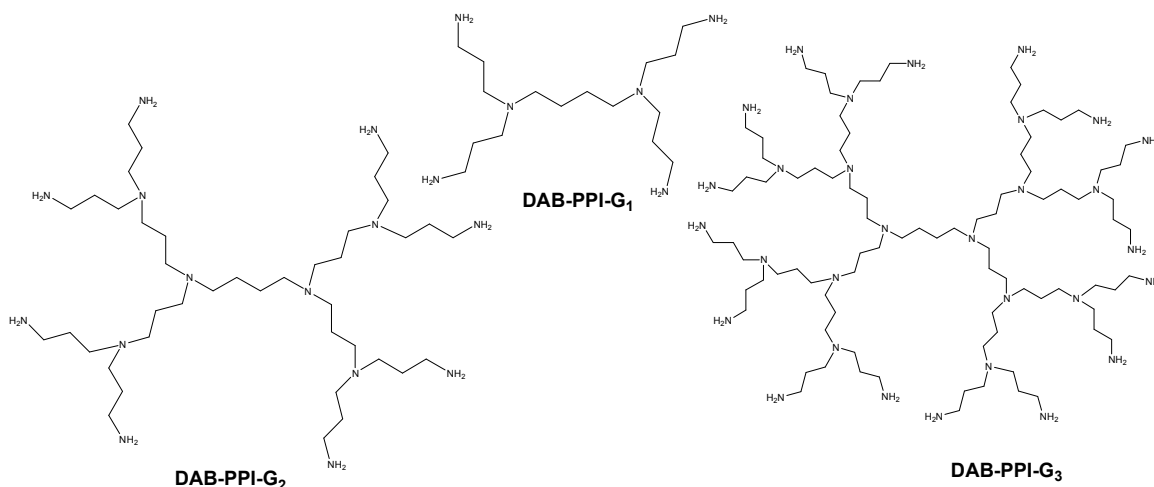


**Abb. 6.7** Antiproliferativer Effekt der Dendrimere des Basissatzes des „Fuchs Typs“ an MCF-7-Zellen: links G<sub>0</sub>, Mitte G<sub>1</sub> und rechts G<sub>2</sub> (n=16)

Die Dendrimere G<sub>0</sub> bis G<sub>2</sub> sowie die korrespondierenden Dendrimere mit Boc-Schutzgruppen G<sub>0</sub>(Boc)<sub>3</sub>-G<sub>2</sub>(Boc)<sub>12</sub> wurden auf ihre Zytotoxizität untersucht. Für die Boc-geschützten Dendrimere konnte bis 10 μM keine Abweichung von der Kontrollgruppe gesehen werden (Diagramme nicht dargestellt). Die Dendrimere mit freien Aminen

zeigten jedoch eine deutliche Zytotoxizität, die sowohl konzentrations- als auch generationsabhängig war (siehe Abb. 6.7). So zeigte das **G<sub>0</sub>** bei 20µM keine Effekte auf das Zellwachstum. Dagegen hemmte das **G<sub>1</sub>** das Zellwachstum um bis zu 80% im Maximum, das reproduzierbar erst nach 225h erreicht wurde. Wurde hingegen das **G<sub>2</sub>** verwendet, so wurde die Toxizität noch einmal deutlich gesteigert. So minderte 1µM das Wachstum schon um die Hälfte und 3µM der Substanz waren dermaßen zytozide, dass keine lebenden Zellen lichtmikroskopisch zu erkennen waren. Die Wirkung war schon nach 72h maximal und eine langsame Erholung der Zellpopulation wurde lediglich nach Applikation von 1µM Substanz beobachtet.

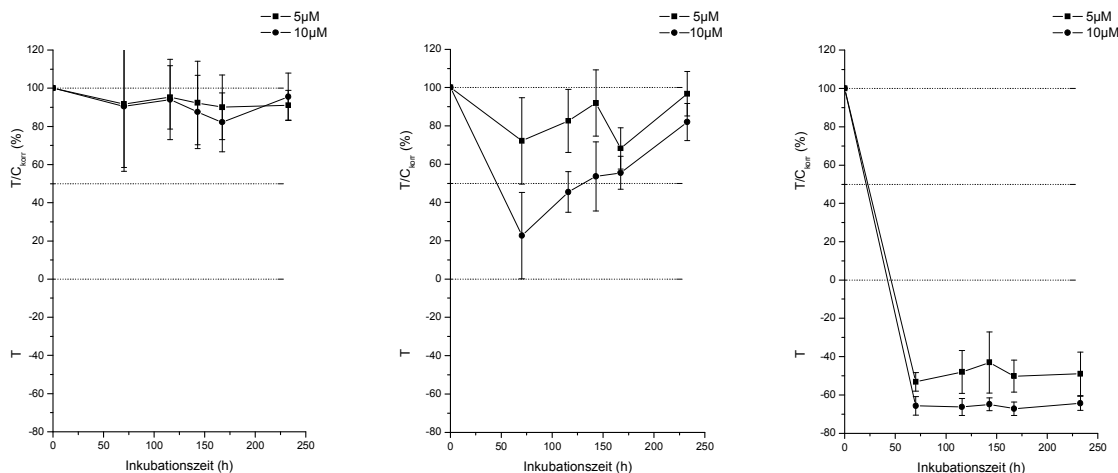
#### 6.2.1.1.2 Zytotoxizität der Polypropylenimin-Dendrimere



**Abb. 6.8** Untersuchte Strukturen von DAB-PPI-Dendrimeren

Auch bei diesem Dendrimertyp (siehe Abb. 6.8) zeigte sich eine ähnliche generationsabhängige Zytotoxizität (siehe Abb. 6.9). Generation 1 mit 4 primären Aminen zeigte keine Abweichung von der Kontrollgruppe, während das Generation 2-Molekül mit 8 primären Aminen bei einer Konzentration von 10µM das Zellwachstum um 80% hemmte. Dieser Effekt war nach 72 Stunden am stärksten, danach setzte allmähliche Erholung der Zellpopulation ein. Die darauf folgenden Generationen (**DAB-PPI-G<sub>3</sub>** und **DAB-PPI-G<sub>4</sub>** (Struktur und Daten für **DAB-PPI-G<sub>4</sub>** nicht dargestellt)) waren beide in einer Konzentration von 5µM dermaßen zytozide, dass keine überlebenden Zellen beobachtet wurden. (Für weitere Testungen dieser Substanzen in geringeren

Konzentrationen stand leider keine Substanz mehr zur Verfügung.) Somit zeigten sich starke Parallelen zur Zytotoxizität der Dendrimere des „Fuchs-Typs“, wobei allerdings ein später Wirkeintritt wie für  $G_1$  nicht beobachtet wurde.



**Abb. 6.9** Antiproliferativer Effekt von den DAB-PPI-Dendrimeren **DAB-PPI- $G_1$**  (links), **DAB-PPI- $G_2$**  (Mitte) und **DAB-PPI- $G_3$**  (rechts) an MCF-7-Zellen (n=16)

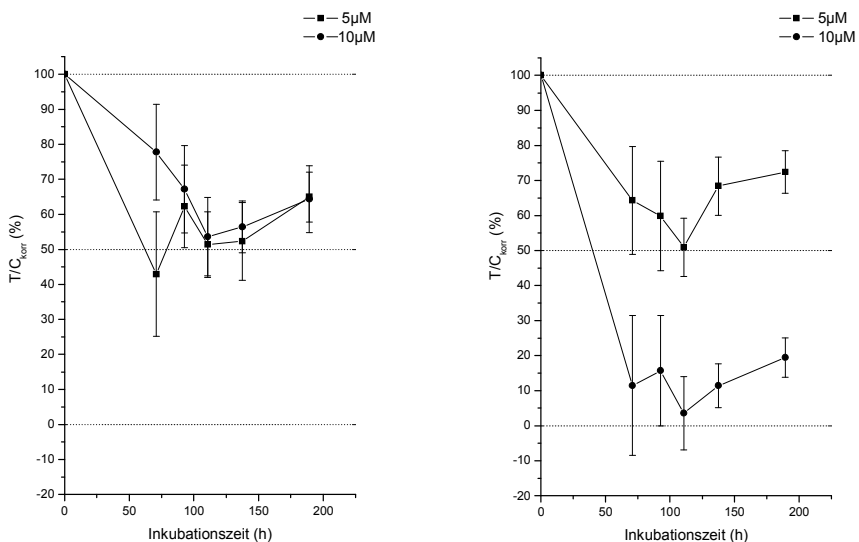
### 6.2.1.1.2 Zytotoxizität der oberflächenfunktionalisierten Dendrimere

#### 6.2.1.1.2.1 Oberflächenmodifikation mit Aminosäuren

Die hohe Toxizität der Basisdendrimere warf die Frage auf, inwiefern die Modifikation durch verschiedene Aminosäuren (siehe Abb. 6.1 und 6.2) die Zytotoxizität beeinflusste. Alle Modifikationen wurden sowohl als freies Amin als auch mit Boc-Schutzgruppe getestet. Aufgrund einer zu erwartenden schlechteren Löslichkeit der Boc-geschützten Verbindungen wurde als Höchstkonzentration im Test 10  $\mu$ M gewählt, während für die Verbindungen ohne Schutzgruppen auch 20  $\mu$ M eingesetzt wurden.

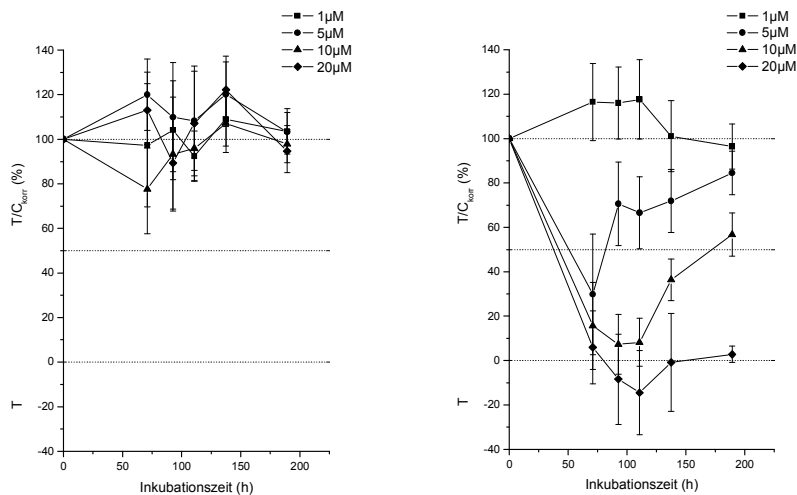
Der Zytotoxizitätstest mit den aminosäuremodifizierten Generation-0-Molekülen zeigte für die Asparaginsäure und die Diaminopropionsäure-Derivate sowohl mit freien Aminen als auch mit Boc-Schutzgruppen keine Abweichung von den Kontrollgruppen (Abbildungen nicht gezeigt). Bei den Modifikationen Methionin und Phenylalanin hingegen zeigte sich bei den Boc-geschützten Molekülen eine deutliche Wachstumshemmung (siehe Abb. 6.10).  $G_0(\text{MetBoc})_3$  zeigte in den Konzentrationen 5 und 10  $\mu$ M denselben Hemmeffekt

auf das Wachstum, was auf eine verminderte Löslichkeit hindeutet, so dass effektiv in Lösung nicht mehr als 5  $\mu\text{M}$  gelöst vorlagen.



**Abb. 6.10** Antiproliferativer Effekt von  $G_0(\text{MetBoc})_3$  (links) und  $G_0(\text{PheBoc})_3$  (rechts) auf MCF-7-Zellen (n=16)

Dagegen bewirkten die entschützten Moleküle gegensätzliche Effekte (siehe Abb. 6.11). Während das  $G_0(\text{Met})_3$  keinen nachteiligen Effekt auf das Zellwachstum zeigte, sah man bei dem  $G_0(\text{Phe})_3$  eine ähnliche Toxizität wie für das  $G_0(\text{PheBoc})_3$ . Bei der für  $G_0(\text{PheBoc})_3$  nicht untersuchten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  wurde dann noch eine kleine Steigerung der Zytotoxizität beobachtet. Hierbei wurde eine anschließende Erholung der Zellpopulation, wie sie für die niedrigeren Konzentrationen gefunden wurde, in dieser Gruppe nicht gesehen. Für diese Erholung der Zellpopulation kann im Prinzip die Detoxifizierung durch proteolytischen Verdau zum Basisdendrimer  $G_0$  als untoxischem Endprodukt angesehen werden (siehe Kap. 6.1). Der in diesen Versuchen beobachtete deutlich schnellere Abbau des  $G_0(\text{Met})_3$  könnte auch für die extrem geringe Toxizität verantwortlich sein.



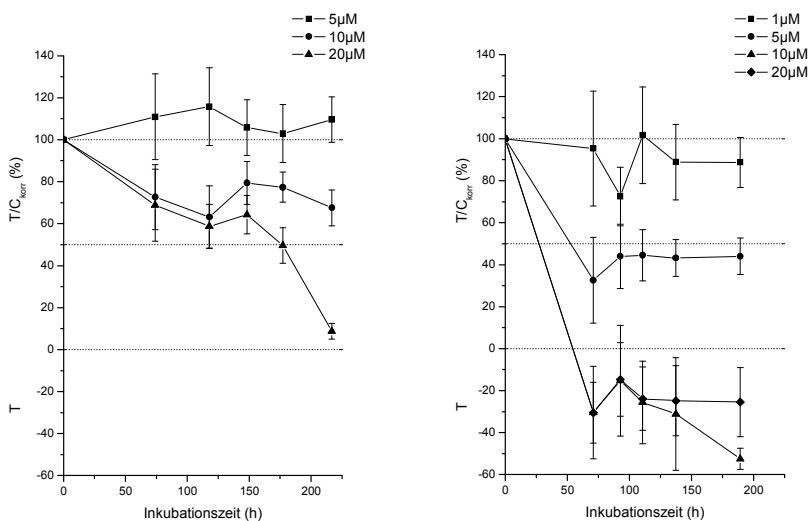
**Abb. 6.11** Antiproliferativer Effekt von **G<sub>0</sub>(Met)<sub>3</sub>** (links) und **G<sub>0</sub>(Phe)<sub>3</sub>** (rechts) an MCF-7-Zellen (n=16)

Bei den Generation-1-Molekülen fiel die Zytotoxizität der Boc-geschützten Verbindungen vollkommen weg (Diagramme nicht dargestellt). Dies dürfte zum Teil auf eine deutlich schlechtere Verfügbarkeit durch eine schlechte Wasserlöslichkeit zurückzuführen sein. So wurden bei der Verbindung **G<sub>1</sub>(PheBoc)<sub>6</sub>** schon bei einer Konzentration von 10 μM im Mikroskop Präzipitate gesehen.

Für die Verbindungen ohne Schutzgruppen zeigte sich dagegen ein sehr differenziertes Bild (siehe Abb. 6.12): Für die Verbindung **G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub>** wurde derselbe Kurvenverlauf mit charakteristischem spätem Wirkmaximum wie für das Basisdendrimer **G<sub>1</sub>** gefunden. Das kann auf den schnellen proteolytischen Abbau der Methionin-Modifikationen auf zellulärer Ebene zurückzuführen sein. (Siehe Kap. 6.1). Die Verbindung **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** wurde zwar ebenfalls, wenn auch langsam, zu dem Basisdendrimer **G<sub>1</sub>** abgebaut, trotzdem zeigte diese Verbindung analog zum **G<sub>0</sub>(Phe)<sub>3</sub>** eine deutlich stärkere Toxizität als das Basisdendrimer. Bei diesen Verbindungen kann man daher davon ausgehen, dass sie ihre Toxizität als intakte Moleküle ausübten. Dafür sprach auch der schnelle Wirkeintritt (<72h). Eine signifikante Detoxifizierung durch den proteolytischen Abbau war hier nicht zu erwarten, da das Abbauprodukt in nicht unbedeutendem Maße das Zellwachstum hemmte (siehe Abb. 6.7). Wie es zu den toxischen Auswirkungen kommt, lässt sich nur vermuten. Es konnte von einer verstärkten Interaktion mit den Zellmembranen ausgegangen werden, weil neben den elektrostatischen Wechselwirkungen des kationischen



Dendrimeren mit der überwiegend anionischen Zellmembran auch starke lipophile Wechselwirkungen ermöglicht wurden. Dieser Effekt wird mit phenylalaninterminierten PAMAM-Dendrimeren auch ausgenutzt, um die Transfektionseffizienz von Dendrimeren deutlich zu erhöhen.<sup>[119]</sup> Die Auswirkungen einer solchen Makromolekül-Zellmembran-Interaktion werden als „membrane-bending-model“ beschrieben. Bei den dazu grundlegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass PAMAM-Dendrimere im Gegensatz zu linearen Polykationen besonders effektiv Membranvesikel zu zerstören vermögen.<sup>[259-261]</sup>



**Abb. 6.12** Antiproliferativer Effekt von **G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub>** (links) und **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** (rechts) an MCF-7-Zellen (n=16)

Das asparaginsäureterminierte G<sub>1</sub>-Dendrimer zeigte keine Abweichungen von den Kontrollgruppen (Diagramme nicht abgebildet). Da neben protonierten Aminen ebenfalls deprotonierte Carboxylat-Gruppen in der Peripherie vorhanden sind, war eine eher schwache Wechselwirkung mit Zellmembranen zu erwarten.

Die Modifikation mit der 2,3-Diaminopropionsäure führte sowohl in der 0. als auch in der 1. Generation zu untoxischen Substanzen (Diagramme nicht abgebildet). Dieses stellte die erste bekannte Reduktion der Toxizität durch Erhöhung der potentiell kationischen Ladungen dar.

Ein Erklärungsansatz bietet die Berechnung der Molekülkonformation. Die untoxischen Vertreter (**G<sub>1</sub>(Asp)<sub>6</sub>** und **G<sub>1</sub>(Dap)<sub>6</sub>**) zeichnen sich durch eine kompakte, dichte, globuläre,

eine glatte Oberfläche aufweisende Struktur aus, die daher starke Wechselwirkungen mit den Membranen unwahrscheinlich macht. Die toxischen Vertreter (**G<sub>2</sub>** und **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>**) dagegen richten ihre Endgruppen sehr weit in die Lösung heraus, so dass elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen wahrscheinlicher sind (siehe Abb. 6.6).<sup>[254]</sup>

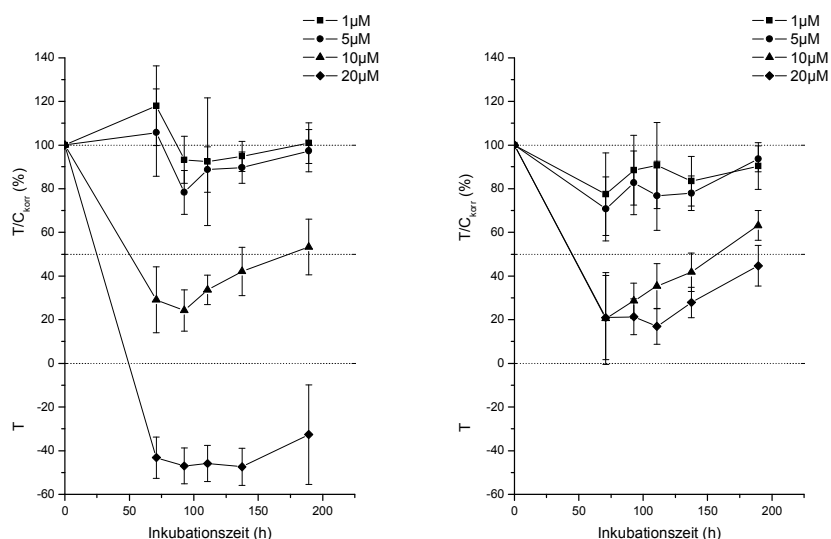
#### 6.2.1.1.2.2 Oberflächenmodifikation mit dem Dansylmarker

Zur fluorimetrischen Detektion von Dendrimeren und Dendrimer-Zytostatika-Konjugaten wurde der Dansylmarker in die Moleküle eingefügt.<sup>[109]</sup> Die Dansylgruppe wurde zwar schon in einige Polymere für biomedizinische Zwecke eingebaut,<sup>[122]</sup> aber eine Evaluation bezüglich der Biokompatibilität wurde bisher nicht durchgeführt.

Für diese Untersuchungen wurden die Amine der Basisdendrimere vollständig mit Dansylchlorid derivatisiert, so dass relativ apolare Verbindungen entstanden.<sup>[109]</sup> Diese wurden dann analog den Boc-Verbindungen wegen der zu erwartenden reduzierten Wasserlöslichkeit nur bis zu einer Konzentration von maximal 10µM zum Test eingesetzt. Zur Löslichkeitsvermittlung oder zur Anbindung von Zytostatika sollte die Hälfte der Amine frei bleiben, daher wurde über eine orthogonale Schutzgruppensynthese Dendrimere hergestellt, die definiert zur Hälfte mit Dansylgruppen belegt waren.<sup>[109]</sup> Auch hier wurden die schutzgruppentragenden Verbindungen nur bis 10µM getestet, während die freien amintragenden Verbindungen bis zu 20µM zum Test eingesetzt wurden.

Alle vollständig dansylierten und alle schutzgruppentragenden partiell dansylierten Dendrimere hatten keinen Effekt auf die Zellproliferation (Diagramme nicht dargestellt). Allerdings musste man auch hier bei einigen Verbindungen davon ausgehen, dass sie im Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10µM nicht löslich waren. So fand man im Fluoreszenzmikroskop (siehe Kap. 6.3.3) bei den Verbindungen **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>6</sub>** und **G<sub>2</sub>(Dan)<sub>12</sub>** kleine Aggregate. Bei der Verbindung **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(DapBoc)<sub>3</sub>** konnten auch lichtmikroskopisch bei einer eingesetzten Konzentration von 10µM Präzipitate im Chemosensitivitätstest festgestellt werden.

Die wasserlöslichen Dendrimere  $G_1(\text{Dan})_3$  und  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  zeigten dagegen ein überraschendes Bild. Beide zeigten einen starken Einfluss auf die Zellproliferation (siehe Abb. 6.13), der bei  $G_1(\text{Dan})_3$  bei einer Konzentration von  $20\mu\text{M}$  sogar stark zytozide war. Das  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  zeigte kaum eine Konzentrationsabhängigkeit. Vielmehr wies  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  in einer Konzentration von  $20\mu\text{M}$  nur einen marginal stärkeren antiproliferativen Effekt als in einer  $10\mu\text{M}$  Lösung auf. Hier überstieg im Kulturmedium die bioverfügbare Konzentration also kaum  $10\mu\text{M}$ . So sah man lichtmikroskopisch bei einer Konzentration von  $20\mu\text{M}$  auch Aggregate in der Lösung.

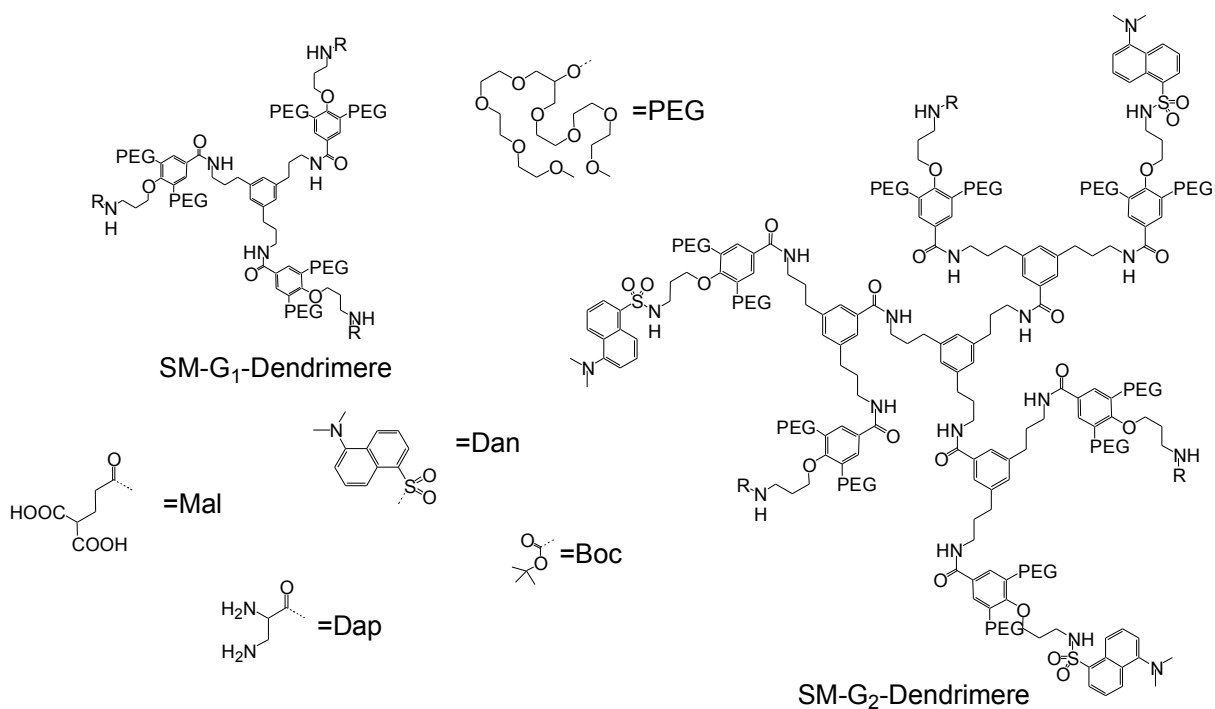


**Abb. 6.13** Antiproliferativer Effekt der partiell dansylierten Verbindungen  $G_1(\text{Dan})_3$  (links) und  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  (rechts) an MCF-7-Zellen

Die beobachtete Toxizität überstieg die Toxizität der „sortenreinen“ Oberflächenmodifikationen (Dansyl/Amin und Dap) beträchtlich. Das lässt sich ähnlich wie die gesteigerte Toxizität der Phenylalaninmodifikation gegenüber den Basisdendrimeren erklären. Molecular Modelling-Ergebnisse zeigen für diese Moleküle ähnliche Eigenschaften, wie sie für das  $G_1(\text{Phe})_6$  und das  $G_2$  gefunden werden.<sup>[254]</sup> Die räumliche Nähe der lipophilen Dansylgruppe zum potentiell kationischen Amin schien die Interaktion mit der Zellmembran zu steigern. Dieser Effekt wird ebenfalls für partiell mit Oregon Green 488 belegten PAMAM-Dendrimeren beobachtet. Auch hier wird eine erhöhte Zytotoxizität und damit einhergehend eine bessere Transfektionseffizienz beobachtet.<sup>[114]</sup>

### 6.2.1.1.3 Zytoxizität von PEGilierten Dendrimeren

Es wurden von Herrn Müller im Arbeitskreis Schlüter Generation-1-Moleküle hergestellt, die auf den drei freien Oberflächenfunktionalitäten entweder Dansylgruppen zur Fluoreszenzmarkierung oder Malonsäure- bzw. Ethylendiamingruppen zur Anbindung von Platinverbindungen tragen. Daneben haben diese Moleküle sechs PEG-Gruppen, die die Toxizität mindern und die Löslichkeit der Dendrimeren verbessern sollen (siehe Abb. 6.14).<sup>[244]</sup> Zusätzlich kommt man durch die Verwendung von PEG-Gruppen sehr schnell in höhere Molekularmassenbereiche, so dass sowohl der EPR-Effekt als auch die verminderte renale Ausscheidung dann zum Tragen kommen können.

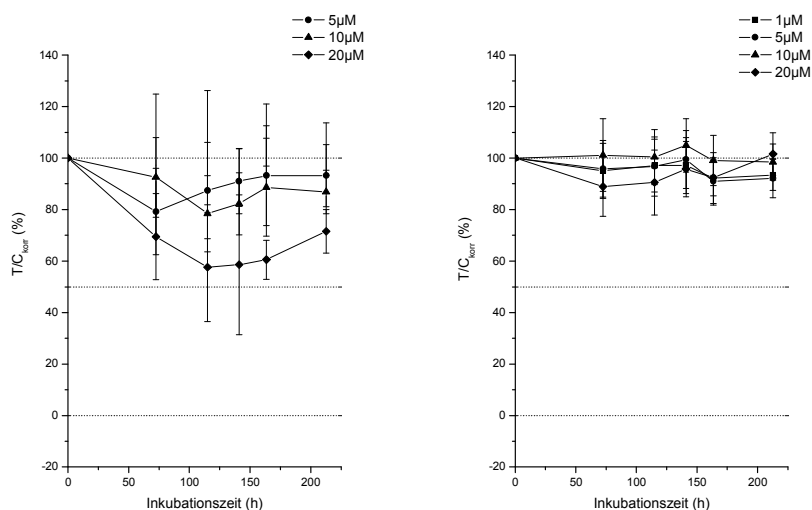


SM-G <sub>1</sub> -Dendrimere		SM-G <sub>2</sub> -Dendrimere	
Verbindung	R	Verbindung	R
<b>SM-G<sub>1</sub>-(Boc)<sub>3</sub></b>	Boc	<b>SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(Boc)<sub>3</sub></b>	Boc
<b>SM-G<sub>1</sub>-(Dan)<sub>3</sub></b>	Dan	<b>SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub></b>	H
<b>SM-G<sub>1</sub>-(Dap)<sub>3</sub></b>	Dap	<b>SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub></b>	Dap
<b>SM-G<sub>1</sub>-(Mal)<sub>3</sub></b>	Mal	<b>SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(Mal)<sub>3</sub></b>	Mal

Abb. 6.14 Untersuchte Strukturen des „Müller-Typs“

In der Generation 2 wurden nur mischfunktionalisierte Dendrimere hergestellt, die neben 12 PEG-Einheiten immer zur Hälfte den Dansylmarker tragen. Die drei anderen Funktionalitäten wurden mit Boc-geschütztem Amin, mit freiem Amin, mit 1,1,3-Propantricarbonsäure und mit 2,3-Diaminopropionsäure (siehe Abb. 6.14) als freier Endgruppe hergestellt<sup>[244]</sup> und auf ihre Zytotoxizität getestet.

Lediglich **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** beeinträchtigte das Zellwachstum in signifikanter Weise (siehe Abb. 6.15). Hierbei rief eine Konzentration von 20µM lediglich eine Hemmung um 40% hervor. Dieselbe Konzentration der analogen nicht PEGilierten Struktur des „Fuchs-Typs“ **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>** führte hingegen zu einer starken zytoziden Wirkung. Auch im Vergleich zum **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub>** wurde für **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub>** eine starke Reduktion der Toxizität beobachtet. Rief die Verbindung des „Fuchs-Typs“ ohne PEG-Einheiten eine bis zu 80%ige Reduktion des Zellwachstums hervor (siehe 6.13), so wurde für das PEG-tragende Molekül keine signifikante Abweichung von der Kontrolle beobachtet (siehe Abb. 6.15).

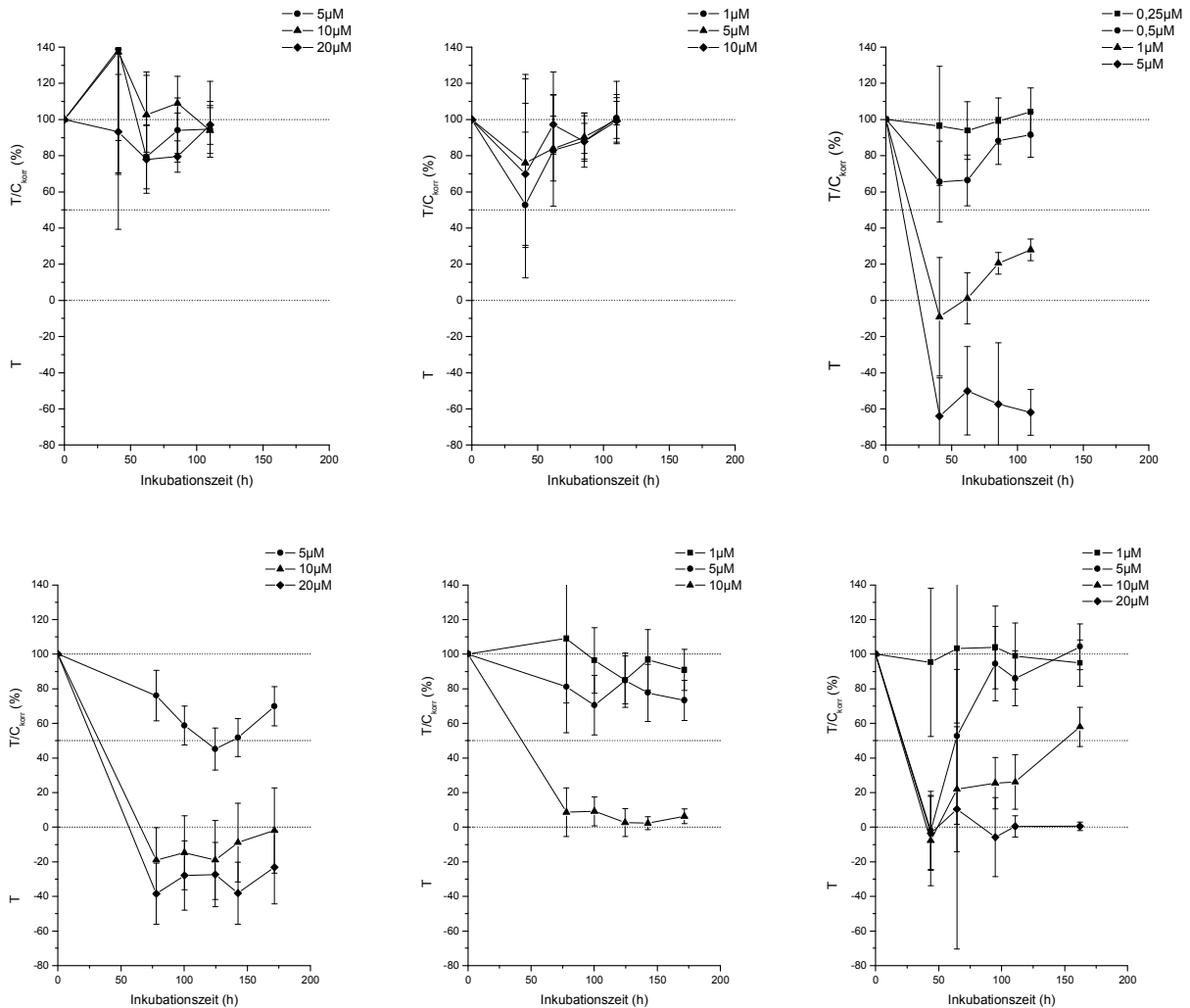


**Abb. 6.15** Antiproliferativer Effekt von **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** (links) und **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub>** (rechts) auf MCF-7-Zellen

Die Detoxifikation dieser Strukturen musste daher den PEG-Gruppen zugeschrieben werden, obwohl auch der Radius, auf dem diese Oberflächenfunktionalitäten angebracht sind, sich beträchtlich vergrößert hat. Untersuchungen an teilweise mit PEG-Gruppen belegten PAMAM-Dendrimeren zeigen, dass bei Belegung von 14 der 128 Amingruppen

mit PEG-Einheiten 25% der restlichen freien Amine der Ninhydrin-Reaktion nicht zugänglich sind. Es wird angenommen, dass die PEG-Einheiten die protonierten Amingruppen abschirmen und so die elektrostatischen Interaktionen mit der DNA bei Transfektionsexperimenten und den Zellmembranen in Zellkultur schwächen, so dass daraus eine niedrigere Zytotoxizität resultiert.<sup>[116,117]</sup>

### 6.2.1.2 Zytotoxizität an MDA-MB-231-Zellen



**Abb. 6.16** Antiproliferativer Effekt von Dendrimeren auf MDA-MB-231-Zellen: obere Reihe **G<sub>0</sub>** (links), **G<sub>1</sub>** (Mitte) und **G<sub>2</sub>** (rechts); untere Reihe: **G<sub>0</sub>(Phe)<sub>3</sub>** (links), **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** (Mitte) und **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>** (rechts)

Es wurden an MDA-MB-231-Zellen ebenfalls Chemosensitivitätstests vorgenommen, um auszuschließen, dass es sich bei den MCF-7-Zellen um besonders sensitiv auf

Dendrimere reagierende Zellen handelt. Hierbei wurden an MCF-7-Zellen besonders zytotoxische Verbindungen ausgewählt.

Es zeigte sich eine ähnliche Tendenz, wie sie für die MCF-7-Zellen gefunden wurde. Auch hier wurde eine konzentrations- und generationsabhängige Toxizität im ähnlichen Konzentrationsrahmen gefunden (siehe Abb. 6.16). Dabei schien die MDA-MB-231-Zelllinie etwas empfindlicher auf die Basisdendrimere zu reagieren. So reduzierte die Verbindung **G<sub>1</sub>** das Wachstum schon in einer Konzentration von 10µM um 50% nach 48 Stunden. Im Gegensatz zur MCF-7-Zelllinie wurde dieser Effekt mit der Zeit überwunden, so dass am Ende der Inkubationszeit (nach 110h) für keine Konzentration eine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe festzustellen war. Auch auf die Verbindung **G<sub>2</sub>** reagierte diese Zelllinie deutlicher stärker. Hier führte schon eine Konzentration von 1µM zur vollständigen Wachstumshemmung, die bei der MCF-7-Zelllinie lediglich eine 50%ige Hemmung hervorrief. Bei den phenylalaninterminierten Dendrimeren zeigte die MDA-MB-231-Zelllinie eine ungewöhnliche Reaktion. Sie reagierte hier deutlich empfindlicher auf das **G<sub>0</sub>**-Molekül als auf das **G<sub>1</sub>**-Molekül.

Auch für **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>** wurde eine starke Zytotoxizität beobachtet, die aber deutlich schwächer als bei den MCF-7-Zellen ausgeprägt war. So war die bei den MCF-7-Zellen stark zytotoxische Konzentration von 20µM bei den MDA-MB-231-Zellen lediglich zytostatisch über die gesamte Zeit.

### 6.2.2 Untersuchungen an humanen Leukämiezelllinien

Vier ausgewählte Dendrimere (**G<sub>2</sub>**, **DAB-PPI-G<sub>3</sub>**, **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** und **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>**) mit ausgeprägter Toxizität an adhärenenten Zelllinien wurden zur Testung an den folgenden vier Leukämiezelllinien eingesetzt:

- LAMA-84 (Humane chronische myeloide Leukämie)
- K562 (Humane chronische myeloide Leukämie)
- SD-1 (Lymphoblastische Leukämie)
- SUP-B15 (chronische myeloische Leukämie)

Hierbei handelt es sich um Suspensionskulturen, die daher andere Eigenschaften als die in Monolayern adhärent wachsenden Zellen aufweisen. Die Reaktion solcher Zellen auf diese Substanzen ist wegen der Ähnlichkeit mit Zellbestandteilen des Blutes interessant. Für die Interaktion mit Blutzellen werden in der Regel Rote Blutkörperchen als Screening-Verfahren genutzt, um Biokompatibilität von Polymeren zu untersuchen. Diese Zelltypen würden bei einer Infusion, der einzigen geeigneten Applikationsform von makromolekularen Trägern für systemische Wirkung, als erstes und mit der höchsten Konzentration konfrontiert.

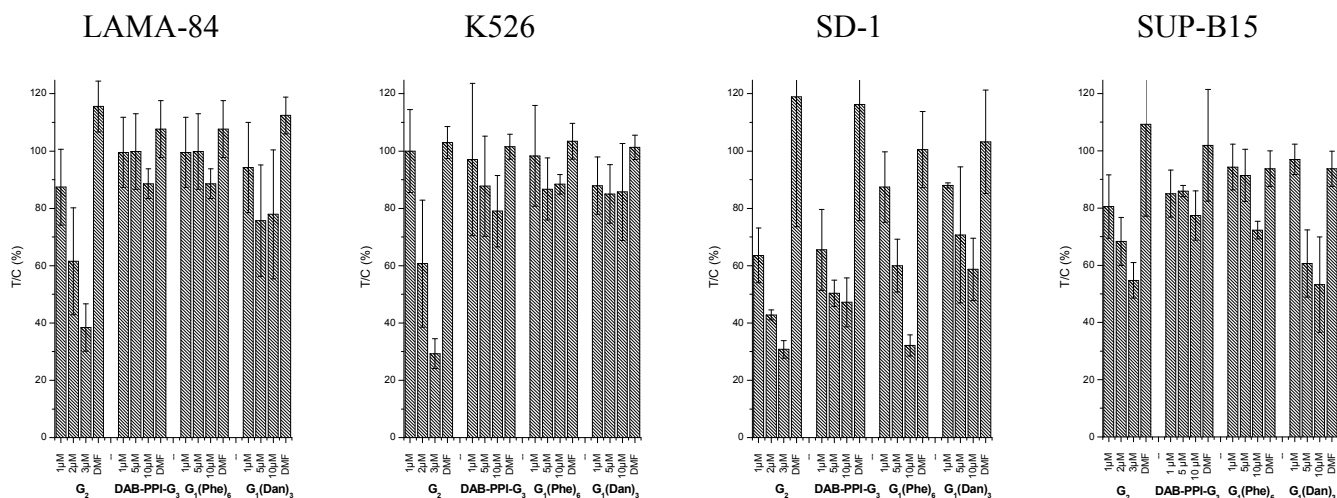
Die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden mit einem abgewandelten MTT-Test der Firma Biomedica durchgeführt.<sup>[262]</sup> Dabei werden die Zellen im Konzentrationsrahmen inkubiert, bei dem die MCF-7-Zellen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation erfahren haben. Da an den MCF-7-Zellen der maximale Effekt für diese Substanzen nach 72 Stunden erreicht war, wurde auch für die Leukämiezellen die mitochondriale Aktivität an diesem Zeitpunkt bestimmt.

Dabei wird ein Tetrazolium Salz durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem Formazan-Derivat reduziert. Dieses ist unlöslich und bildet farbige Kristalle. Nach Aufschluss der Zellen und Auflösen der Kristalle kann die Extinktion als Maß für die Menge an vitalen Zellen photometrisch bestimmt werden.

Die Leukämiezelllinien reagierten generell deutlich weniger empfindlich als die adhärent wachsenden Zellen (siehe Abb. 6.17). Das Basisdendrimer  $G_2$  war an allen Zelllinien deutlich zytotoxisch. So wurde der Anteil an vitalen Zellen durch  $3\mu\text{M}$  Substanzkonzentration bei den SD-1- und K562-Zellen auf rund 30% der Kontrolle reduziert. Der Effekt war aber immer noch schwächer als bei beiden untersuchten adhärent wachsenden Brustkrebszellen ausgeprägt, wo diese Konzentration zum Tod aller im Test befindlichen Zellen führte. Die restlichen drei Dendrimere zeigten mit einer Ausnahme ( $G_1(\text{Phe})_6$  an SD-1-Zellen) maximal eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität auf 50% der Kontrolle bzw. teilweise keinen Effekt. Als besonders sensitiv auf Dendrimereinwirkung zeigte sich die SD-1-Zelllinie, die bei allen getesteten Substanzen die maximale Reduktion in Mitochondrienaktivität aufwies. Als am unsensitivsten stellte sich die



LAMA-84-Zelllinie heraus, an der außer nach Einwirken der Verbindung  $G_2$  kaum ein antiproliferativer Effekt zu beobachten war.



**Abb. 6.17** Antiproliferativer Effekt von  $G_2$ , DAB-PPI- $G_3$ ,  $G_1(\text{Phe})_6$  und  $G_1(\text{Dan})_3$  an LAMA-84, K562, SD-1 und SUP-B15-Zellen (n=9)

## 6.2.3 Untersuchungen zum Toxizitätsmechanismus

### 6.2.3.1 Veränderung der Zellmorphologie unter Dendrimerwirkung

Zum Einfluss von Makromolekülen auf Zellmembranen wird häufig die Freisetzung von Hämoglobin aus roten Blutkörperchen herangezogen. Dieses wird bei der Schädigung der Zellen freigesetzt und kann dann photometrisch bestimmt werden. Für Dendrimere wurden dazu schon Untersuchungen durchgeführt.<sup>[146,257,263]</sup> Daneben wurde auch die Zellmorphologie lichtmikroskopisch<sup>[263]</sup> oder elektronenmikroskopisch<sup>[146]</sup> nach einer Substanzeinwirkung aufgenommen. Hierbei werden für zytotoxische Moleküle in der Regel deutliche Veränderungen der äußeren Zellmembran gefunden, die auf Oberflächenaktivität der untersuchten Moleküle schließen lassen.<sup>[146]</sup>

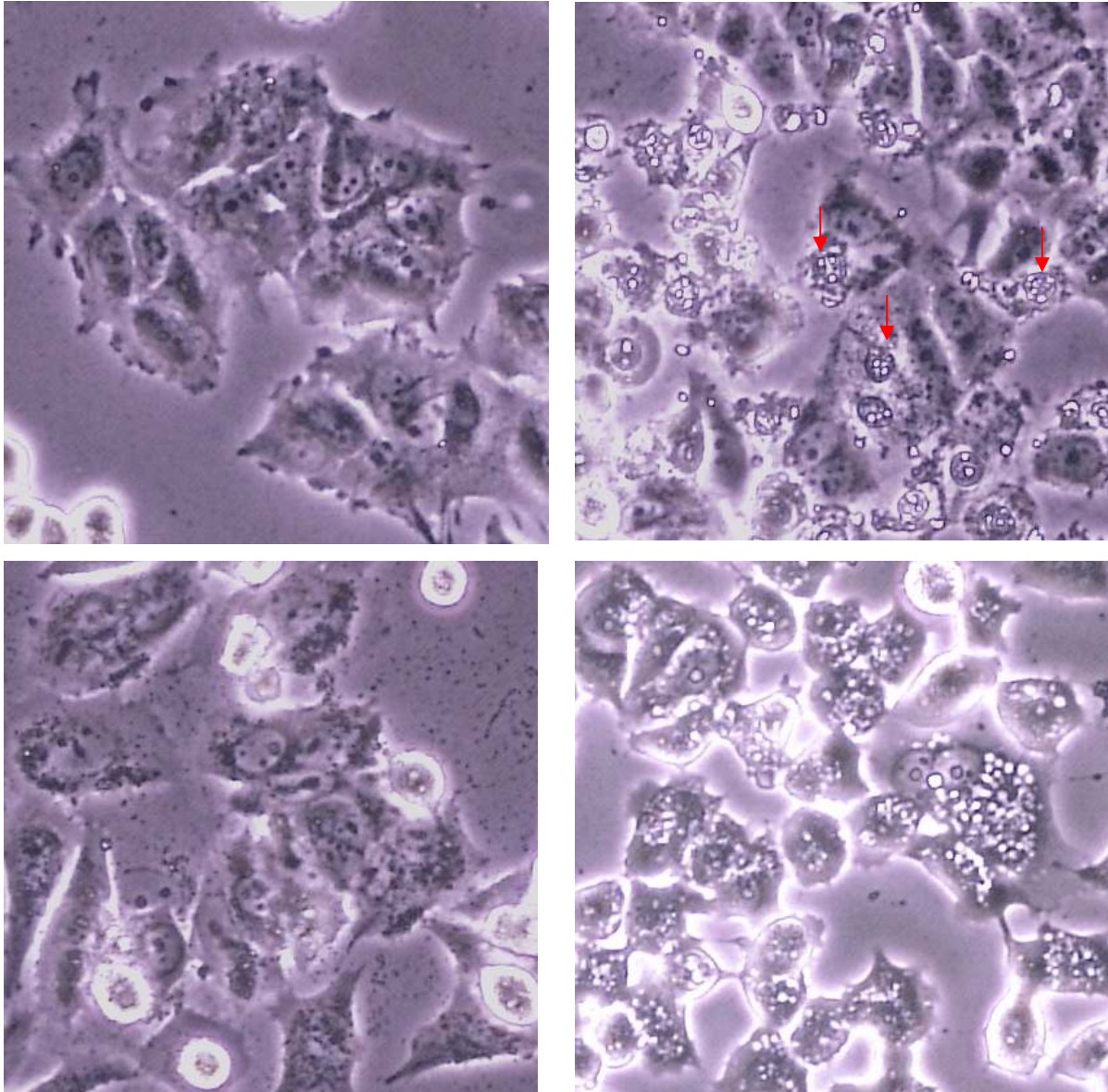
Exemplarisch wurden an der MCF-7-Zelllinie lichtmikroskopische Untersuchungen mit dem  $G_2$  und  $G_1(\text{Phe})_6$  in den stark zytotoxischen Konzentrationen von  $3\mu\text{M}$  ( $G_2$ ) bzw.  $20\mu\text{M}$  ( $G_1(\text{Phe})_6$ ) durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Toxizität, die aus der Oberflächenaktivität resultiert, wurde das kationische Tensid Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) gewählt.

Bei **G<sub>2</sub>** wurde ein schnell eintretender Effekt gesehen. So erkannte man nach kurzer Zeit (1h) bei vielen Zellen, dass sich von ihnen große, durchscheinende Vesikel abschnürten. Nach wenigen Stunden (<4h) lösten sich viele Zellen vom Boden und schwammen als Vesikelhaufen im Medium (siehe Abb. 6.18).

Die Reaktion der Zellen auf das **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** lief langsamer ab. Nach acht Stunden war eine beginnende Auflösung der Zellen zu beobachten. Hierbei bildeten sich viele kleine dunkel erscheinende Vesikel in bzw. an den Zellen. Nach längerer Zeit (>24h) sah man dann wenige abgelöste Zellen im Medium schwimmen, die klar durchscheinend waren. Die Zellverbände waren stark ausgedünnt und es wurden viele Zelltrümmer beobachtet. Von den verbleibenden Zellen wiesen nur wenige klare intrazelluläre Strukturen wie Zellkerne und Kernkörperchen auf (siehe Abb. 6.18).

Die Einwirkung des kationischen Tensids CTAB rief hell durchscheinende Blasen in den Zellen hervor, die aber nicht zu einem Abschnüren von Vesikelbläschen führten. Daneben kam es zu ähnlichen Veränderungen im zytosolischen Bereich wie beim **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** beobachtet. Auch wurden nach längerer Einwirkung verstärkt Zelltrümmer im Zellkulturgefäß gesehen (siehe Abb. 6.18).

Die morphologischen Unterschiede beim Sterben der Zellen deuteten auf verschiedene Ereignisse hin, die zum Zelltod führten. Wegen der schnellen Reaktion auf die Substanzen konnte die Toxizität aufgrund einer Oberflächenaktivität dieser Dendrimere, wie sie durch das „membrane bending-model“ beschrieben wird, nicht ausgeschlossen werden. Hierbei wies die von **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** verursachte Zellmorphologie am ehesten Ähnlichkeit mit der des Kationentensids auf. Auffällig war hingegen die bei **G<sub>2</sub>** beobachtete Vesikelhaufenbildung. Diese wies eine gewisse Ähnlichkeit mit dem „Bubbling“ als Endereignis von apoptotischen Zellen auf.



**Abb. 6.18** Zellmorphologien von MCF-7-Zellen (oben links Kontrolle), nach Inkubation mit den Dendrimeren  $G_2$  (oben rechts 2h mit  $3\mu\text{M}$  rote Pfeile deuten auf ablösende vesikuläre Strukturen),  $G_1(\text{Phe})_6$  (unten links 24h mit  $20\mu\text{M}$ ) und dem Kationentensid CTAB (unten rechts 8h mit  $16\mu\text{M}$ ) (mit 200facher Vergrößerung aufgenommen)

### 6.2.3.2 Untersuchung auf Apoptose

Apoptose ist eine physiologisch und morphologisch distinkte Form des programmierten Zelltodes. Hiermit beseitigen mehrzellige Organismen geschädigte, infizierte, potentiell schädliche und für die Entwicklung störende, überflüssige Zellen. Die Auslösung erfolgt auf viele verschiedene intrinsische und extrinsische Signale und ist ein aktiver Prozess,

der Energie benötigt. Am Ende entstehen dabei aus der sterbenden Zelle so genannte apoptotische Körper, vesikuläre Strukturen, die so beschaffen sind, dass sie sehr gut von benachbarten Zellen aufgenommen und verdaut werden können. Die dabei ablaufenden Prozesse sind sehr komplex und noch lange nicht vollständig verstanden.<sup>[265,265]</sup>

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose charakterisiert durch Anschwellen der Zellen, Desintegration des Kernes und Platzen der Plasmamembran. Dieser Prozess ist passiv d.h. er benötigt keine Energie.<sup>[266]</sup>

Die Untersuchungen wurden sowohl an MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen als auch an den oben genannten vier Leukämiezelllinien (siehe Kap. 6.2.2) durchgeführt.

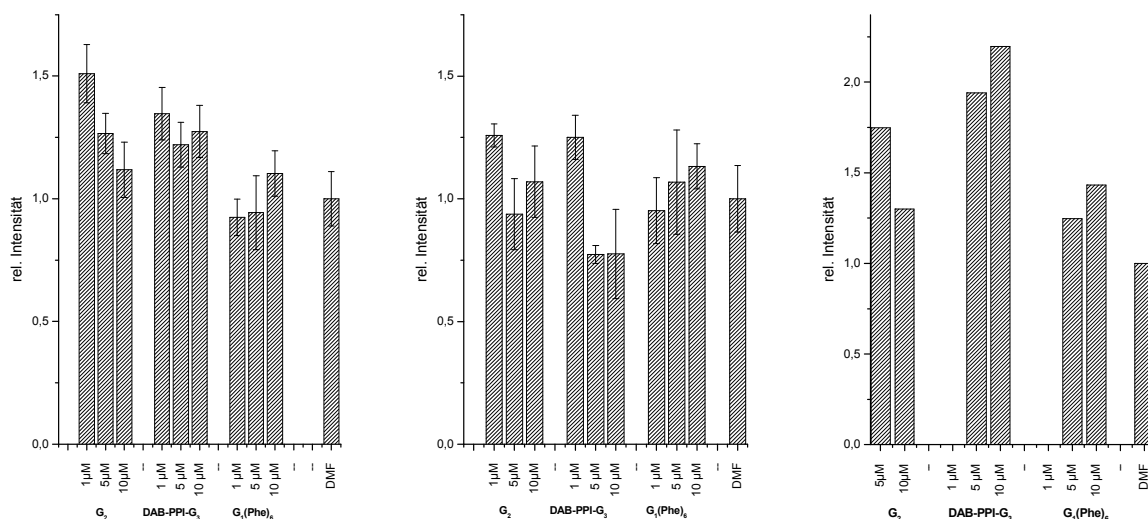
Es wurden zwei verschiedene Testsysteme zur Detektion der Apoptose verwendet. Zum einem wurde die Revertierung von Phosphatidylserin von der Membraninnenseite zur Außenseite detektiert. Dieses stellt ein frühes Ereignis der Apoptose dar. Durch Bindung eines fluoreszenzmarkierten Proteins (Annexin V), das eine hohe Affinität zum Phosphatidylserin hat, werden die apoptotischen Zellen markiert und in einen Durchflusszytometer detektiert. Da es im Laufe der Apoptose auch zur Degeneration der Zelle kommt und damit die Membran auch für das Annexin V durchlässig wird, wird zum Ausschluss einer Detektion der permeabilisierten Zellen eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Vitalfärbung, bei der der Farbstoff von lebenden Zellen ausgeschlossen wird. Erst bei Verlust der Membranintegrität findet eine Färbung statt. Auch dieser Farbstoff kann über seine Fluoreszenz detektiert werden. So werden Zellen, die nur die Annexinfluoreszenz zeigen, als frühapoptotisch bzw. diejenigen, die nur die Propidiumiodidfluoreszenz zeigen, als nekrotisch erkannt. Zellen, die beide Fluoreszenzen zeigen, werden sowohl der späten Apoptose als auch der Nekrose zugeordnet, wobei eine eindeutige Zuordnung schwierig ist.<sup>[267]</sup>

Der zweite Test basiert darauf, dass sich die DNA aus apoptotischen Zellen im Gegensatz zu DNA aus nekrotischen Zellen selektiv durch Formamid denaturieren lässt. Die dabei entstehende Einzelstrang-DNA (ssDNA) lässt sich dann mit einem Antikörper detektieren. Die Selektivität beruht weniger auf den eher unspezifischen DNA-Strang-

brüchen als vielmehr auf der apoptosespezifischen Chromatinkondensation.<sup>[268]</sup> Hierbei handelt es sich um ein spätes Ereignis im Verlauf der Apoptose.

Wenn also in beiden Testsystemen ein positiver Befund erhalten wurde, konnte von einem Durchlaufen der gesamten Apoptose ausgegangen werden.

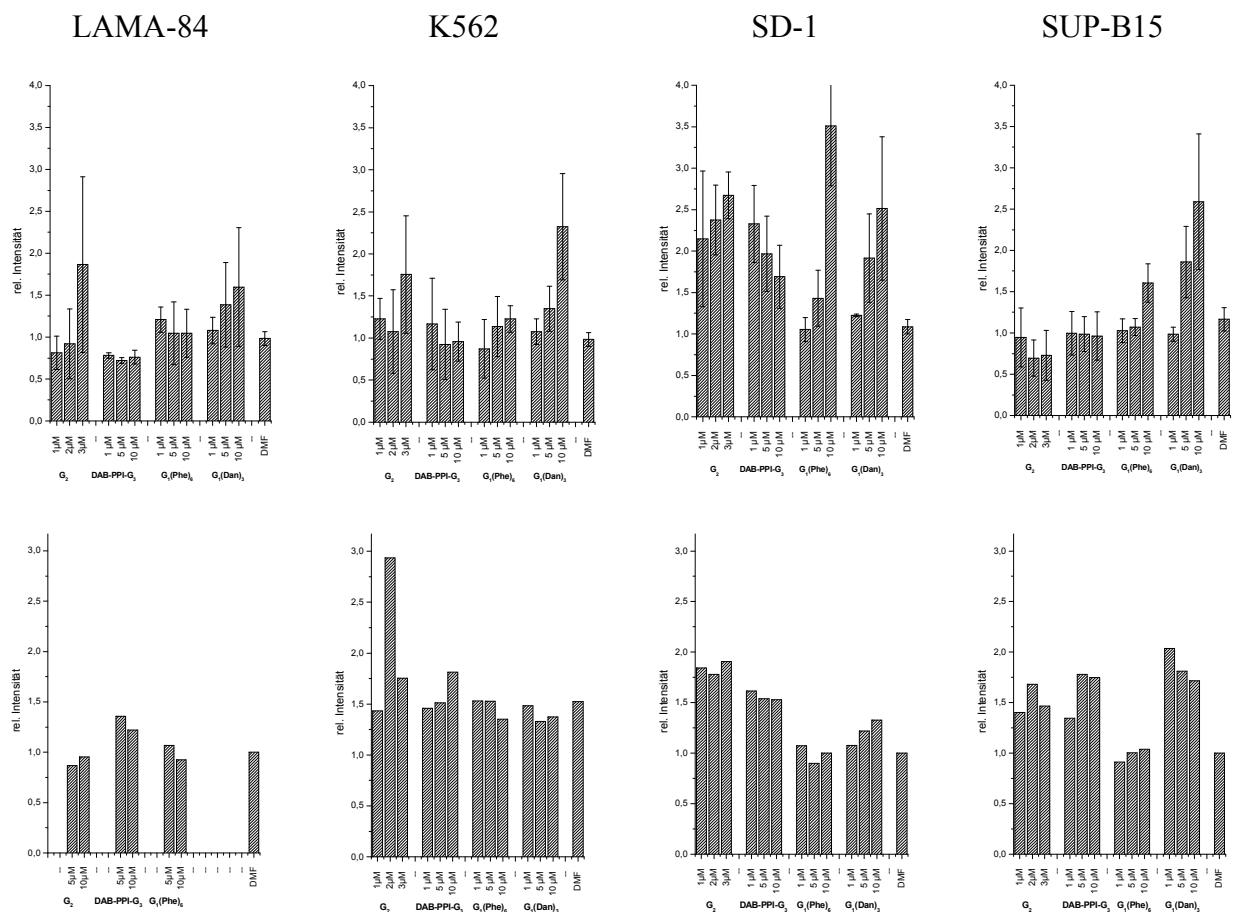
Für die adhärent wachsenden Zellen wurde für **G<sub>2</sub>** und **DAB-PPI-G<sub>3</sub>** sowohl bei den MDA-MB-231 als auch bei den MCF-7-Zellen die erhöhte Auslösung von Apoptose gefunden (siehe Abb. 6.19). Das konnte mit beiden Methoden gezeigt werden. Für die **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** war kein klarer Trend zu sehen, da bei der Trypsinierung im Zuge der Probenvorbereitung der Zellen ein hoher Anteil von apoptotischen Zellen im Negativvergleich erzeugt wurde.



**Abb. 6.19** Apoptoseuntersuchungen an MCF-7-Zellen über ssDNA Bildung (links) und an MDA-MB-231-Zellen über ssDNA-Bildung (Mitte)(n=3) und Annexin-Bindung (rechts)(n=1)

Für die Leukämiezellen zeichnete sich ein uneinheitlicher Trend ab (siehe Abb. 6.20). Hier schien es Zelllinien zu geben, die verstärkt auf die Dendrimereinwirkung mit Apoptose reagierten. Das war für die SD-1-Zelllinie der Fall, die bei Exposition mit Dendrimeren deutlich verstärkt (mind. zweifach) eine Bildung von apoptotischer DNA zeigte. Im Annexin-Propidiumiodid-Versuch konnte dies außer für **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** bestätigt

werden. Für diese Substanz mit geringer Toxizität an dieser Zelllinie könnte allerdings die Einwirkdauer von 2h zu gering gewesen sein.



**Abb. 6.20** Apoptoseuntersuchungen an den Leukämiezelllinien LAMA-84, K562, SD-1 und SUP-B15 (von links nach rechts): Oben Quantifizierung über ssDNA (n=9) unten Quantifizierung über Annexinbindung (n=1)

Auf der anderen Seite gab es Zellen wie die LAMA-84-Zelllinie, die auf die Dendrimer-einwirkung kaum mit Apoptose reagierten. Für diese Zelllinie konnte keine erhöhte Auslösung von Apoptose gefunden werden. Die K562-Zelllinie zeigte unter Dendrimer-einwirkung ebenfalls keine Apoptose. Allenfalls für das  $G_1(\text{Dan})_3$ -Molekül konnte ein deutlicher Trend zur Bildung von apoptotischer DNA gefunden werden, was aber Annexin-Bindungsversuche nach 2h aufgrund geringer Toxizität nicht bestätigt werden konnte. An der SUP-B15-Zelllinie konnte trotz hoher Annexin-Bindung für die Verbindungen  $G_2$ ,  $\text{DAB-PPI-G}_3$  und  $G_1(\text{Dan})_3$  nur für das  $G_1(\text{Dan})_3$  der Nachweis von apoptotisch veränderter DNA geführt werden.

Es zeigte sich, dass die zytotoxischen Dendrimere teilweise auch über eine Auslösung von Apoptose zum Zelltod führten. Als Hauptmechanismus scheidet dieser Weg hingegen aus, da dafür deutlich höhere Werte an ssDNA (rel. Intensität 7-15) zu erwarten sind.<sup>[269]</sup> Da kaum etwas für ein Ansprechen von Todesrezeptoren als Bindungsort für apoptoseauslösende Liganden oder eine spezifische Proteininteraktion sprach, war eine Induktion von Apoptose durch Dendrimere für unwahrscheinlich gehalten worden. Für die vermehrte Apoptoseauslösung gibt es zwei Erklärungsansätze. Eine starke Interaktion von dem Polykation Dendrimer und dem Polyanion DNA ist zwar nicht von der Hand zu weisen,<sup>[270]</sup> aber da es nur wenige Berichte über eine Kernlokalisierung von Dendrimeren (und wenn dann nur nach mehreren Stunden Inkubationszeit) gibt,<sup>[111,113-115,124-126,271]</sup> erschien diese Möglichkeit als unwahrscheinlich. Da eine Anreicherung von verschiedenen Dendrimerensystemen in zytoplasmatischen Kompartimenten u.a. in den Lysosomen gefunden wird,<sup>[111,113,115,124,125,271]</sup> war eine Apoptoseauslösung über die Lysosomen wahrscheinlicher. In einem frühen Stadium der Apoptose werden unter anderen auch die Lysosomen permeabilisiert, so dass es zum Austritt von Cathepsinen kommt, die die Apoptosekette fortführen können.<sup>[264,265]</sup> Dieser Weg wird für die Auslösung von Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug<sup>[272,273]</sup>, nach Ansprechen der TNF-Rezeptoren<sup>[273-275]</sup>, eisenkatalysiertem oxidativen Stress nach Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[273,274,276]</sup> und nach Exposition mit lysotrophen Photosensitizern<sup>[125,277,278]</sup> vermutet. Dabei ist es offensichtlich wichtig, wie stark die Permeabilisierung der Membran erfolgt. Nach zu starker Permeabilisierung werden die Zellen sehr schnell nekrotisch.

Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Beobachtung, dass bei den MCF-7- und den MDA-MB-231-Zellen nur eine niedrige Konzentration verstärkte Apoptose hervorrief, während eine Steigerung der Konzentration eine Senkung der Apoptoserate bewirkte. Dieser Effekt muss nicht nur auf die zu hohe Permeabilisierung der Lysosomen, sondern kann auch auf eine direkte Interaktion mit der Außenmembran zurückzuführen sein. Auch hier wurde schon die Lochbildung in Zellaußenmembranen nach Dendrimerwirkung beobachtet.<sup>[259]</sup> Ein solcher Prozess würde ebenfalls zu einem unkoordinierten Zelltod führen.

Bisher wurde die Auslösung von Apoptose nach Polymereinwirkung kaum untersucht. Die einzige Untersuchung mit PAMAM und DAB-PEI-Dendrimere findet eine Abhängigkeit von der Zelllinie. So wird in einer murinen Makrophagenzelllinie eine Apoptoseauslösung beobachtet, während das bei murinen Fibroblasten- und Leberzelllinien nicht der Fall ist.<sup>[279]</sup>

### 6.2.4 Vergleich mit Literaturwerten

Bemerkenswert war der recht große Toxizitätsunterschied an den Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu den Leukämiezelllinien. Auch für adhärent wachsende Zelllinien zeigten die Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu literaturbekannten Werten eine ungewöhnlich hohe Empfindlichkeit für alle getesteten Dendrimere. So wird für andere adhärent wachsende Zelllinien wie HeLa-Zellen, Fibroblasten und B16F10-Zellen für die kommerziellen PAMAM-Dendrimere ab Generation 4 trotz höherer Anzahl Aminogruppen auf der Oberfläche der Eintritt der Toxizität bei deutlich höheren Konzentrationen gefunden. Aus der Abbildung 6.7 konnte man eine halbmaximale Wirkkonzentration ( $IC_{50}$ ) von  $1\mu\text{M}$  für das Basisdendrimer  $G_2$  an MCF-7-Zellen interpolieren. Im Vergleich dazu werden mit anderen PAMAM-Dendrimer-Typen in höheren Generationen an HeLa-Zellen eine  $IC_{50}$  von  $236\mu\text{M}$  ( $G_5$ )<sup>[118]</sup>, bzw.  $100\mu\text{M}$  ( $G_4$ ) an CaCo-2-Zellen<sup>[147]</sup> und  $18\mu\text{M}$  ( $G_4$ ) an B16F10-Zellen<sup>[146]</sup> gefunden. Eine andere Untersuchung findet keinen Effekt bis  $0,5\mu\text{M}$  ( $G_5$ ) an Rat2- und KB-Zellen.<sup>[259]</sup> Diese Unterschiede in der Zytotoxizität konnten sowohl auf den Zelltypus als auch auf die deutlich längere Expositionsdauer in unserem Testsystem zurückgeführt werden. Für die Interpretation, dass der Zelltypus eine wichtige Rolle spielte, sprach das deutlich schwächere Ansprechen der Leukämiezellen unter Dauerexposition. Andererseits ist die Expositionsdauer ebenfalls sehr einflussreich. Bei den Vergleichswerten ist eine Expositionsdauer von vier Stunden üblich. Hierbei wird nach der Exposition mit einem PAMAM-Dendrimer ( $G_5$ ) in der Nachinkubationszeit eine Rückbildung von Zellschäden beobachtet.<sup>[259]</sup> Eine gegenüber anderen Dendrimerensystemen erhöhte Toxizität lässt sich für das hier neu untersuchte Dendrimerensystem ausschließen, da die MCF-7-Zellen ebenfalls sehr stark auf die Dendrimere des PPI-Typs reagierten. Testungen an anderen adhärent wachsenden Ziellinien (A431/ B16F10) zeigen auch für diesen Dendrimerertyp deutlich geringere Toxizitäten ( $IC_{50}$  an MCF-7-Zellen



$\ll 5\mu\text{M}$  für **DAB-PPI-G<sub>3</sub>** (siehe Abb. 6.9) versus  $14\mu\text{M}$  an B16F10-Zellen<sup>[146]</sup>, bzw.  $30\mu\text{M}$  an A431-Zellen<sup>[115,256]</sup>).

### 6.3 Fluoreszenzcharakterisierung und Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Dendrimeren

Bei den Ansätzen zur makromolekularen Therapie ist die Kontrolle der Aufnahme in das Tumorgewebe und aus dem Interzellulärraum in die Tumorzellen ein wichtiger Parameter. Hierbei wurden in die Träger verschiedene Markierungen eingeführt, die der Spurenanalyse zugänglich sind. Dazu gehören radioaktive Markierungen wie zum Beispiel  $^{125}\text{I}$ <sup>[80,84,86,90,146]</sup>,  $^{51}\text{Cr}$ <sup>[280]</sup> und  $^{111}\text{In}$ <sup>[99,100,106]</sup>, die besonders einfach *in vivo* nachgewiesen werden können, ohne dass eine Präparation des Tumors nötig ist. Alternativ ist die Einführung einer Fluoreszenzmarkierung wie Rhodamin<sup>[82]</sup>, Fluorescein<sup>[86,127,271,281]</sup> und Oregon Green<sup>[111,114]</sup> möglich. Aufgrund der hohen räumlichen Auflösung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist bei Fluoreszenzmarkierungen eine Bestimmung der subzellulären Verteilung möglich. Allerdings haben solche Markierungen den Nachteil, dass die markierten Moleküle teilweise nicht dieselben Eigenschaften wie das nicht markierte Molekül aufweisen. So ist ein mit Oregon Green teilmarkiertes Dendrimer deutlich zytotoxischer und weist eine höhere Transfektionseffizienz auf als das unmarkierte Dendrimer.<sup>[114]</sup> Ein  $^{125}\text{I}$  markiertes Polyesterdendrimer zeigt eine starke Anreicherung in der Leber, die ohne diese Markierung nicht gefunden wird.<sup>[90]</sup> Daher ist es wünschenswert, wenn das therapeutische Molekül die Markierung bereits enthält, wie bei den inhärent fluoreszierenden Anthrazyklinen Adriamycin/Doxorubicin<sup>[86,89]</sup> und Daunomycin<sup>[91]</sup>, den atomabsorptionsspektroskopisch gut erfassbaren Platinzytostatika<sup>[93-95]</sup> oder dem elektronenspektroskopisch lokalisierbaren Bor für die Bor-Neutroneneinfangtherapie<sup>[124]</sup>. Für die reinen Trägermoleküle ist zweifellos eine Isotopenmarkierung mit  $^{14}\text{C}$ <sup>[255]</sup> und  $^3\text{H}$ <sup>[81]</sup> die aussagekräftigste Variante für die Bestimmung der Biodistribution.

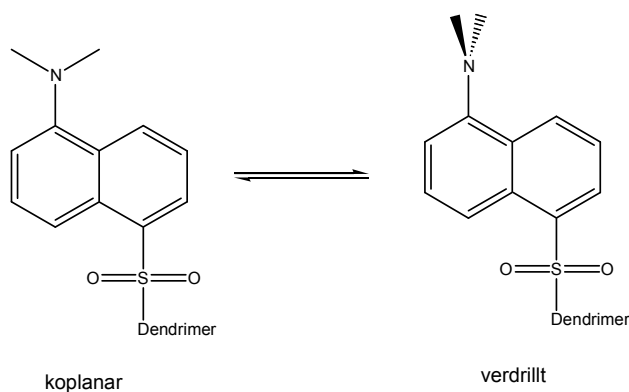
Dass die Aufnahme in die Zellen für Makromoleküle durch passive Diffusion geschieht, kann aufgrund hoher Molekulargewichte und hoher Polarität für sehr unwahrscheinlich erachtet werden. Damit bleiben zur Aufnahme nur die endozytotischen Prozesse. Hierbei kann die erhöhte Endozytoserate der Tumorzellen ausgenutzt werden. So werden die durch den EPR-Effekt im Tumor angereicherten Makromoleküle unspezifisch aufgenommen. Für kationische Verbindungen geschieht das nach unspezifischer Bindung an negative Oberflächenladungen (adsorptive Endozytose). Verbindungen ohne Affinität zur Zellmembran werden bei der Endozytose mit dem Extrazellulärmedium zusammen aufgenommen („*fluid-phase*“ Endozytose). Das wird durch die Hemmung der Transfektion beim Einsatz verschiedener Endozytosehemmstoffe bestätigt.<sup>[232,236]</sup> Auch liegen verschiedene fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen vor, die diesen Aufnahmeweg bestärken.<sup>[111,112,114,124]</sup> Dem entgegen steht die Beobachtung, dass Dendrimere hoher Generation (>5) Löcher in der Zellmembran erzeugen, durch die Makromoleküle in und aus der Zelle diffundieren.<sup>[259]</sup>

Die endozytotische Aufnahme kann jedoch auch forciert werden, indem tumoradressierte Antikörper verwendet werden.<sup>[81,106]</sup> Auch über eher tumorunspezifische membranständige Transportproteine (Folatrezeptor/natriumabhängige Multivitamintransporter) kann eine Adressierung mittels des kovalent an das Makromolekül gebundenen Liganden (z.B. Folsäure bzw. Biotin) erfolgen.<sup>[92,127,282,283]</sup> Hierbei wird eine verstärkte Endozytose beobachtet. Es besteht jedoch die Gefahr einer zu starken Bindung des Makromoleküls an den Rezeptor. Hierbei gelangt dieses nicht in die therapeutisch interessanten Kompartimente, sondern wird bei dem Rezeptorrecycling wieder mittels Exozytose aus der Zelle geschleust. So übertrifft ein nicht folsäureadressiertes PEG-Carboplatin-Addukt ein folsäurehaltiges Addukt sowohl in der Platinbindung an die DNA als auch in der Zytotoxizität.<sup>[282]</sup>

Im Folgenden sollte die Fluorophoreigenschaften von dansylierten Dendrimeren insbesondere in physiologisch relevanten Medien charakterisiert werden. Die Kenntnis dieser Eigenschaften sollte zur Optimierung der Durchführung der Zellaufnahmeversuche genutzt werden.

### 6.3.1 Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften dansylierter Dendrimere in biologischen Medien

Um die Zellaufnahme der Dendrimere mit bildgebenden Verfahren verfolgen zu können, wurden im Arbeitskreis Schlüter Dansylreste in die Dendrimere eingeführt. Dansylmarkierungen wurden in der Literatur hin und wieder als bildgebende Funktion vorgeschlagen,<sup>[122]</sup> eine Anwendung dieses Fluorophors im biologischen Bereich fehlte bis heute in der Literatur.



**Abb. 6.21** Konformationen der Dansylgruppe

Das Fluorophor der Dansylgruppe reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen in seiner Mikroumgebung. So hat die Polarität des Lösungsmittels einen großen Einfluß auf die Konformation. Während in apolaren Lösungsmitteln (z.B. n-Hexan, Diethylether) die Dimethylamingruppe koplanar zum Naphtylring steht, liegt sie in polaren Lösungsmitteln (z.B. Acetonitril, Ethanol, Wasser) um 90° zum Ringsystem verdrillt vor (siehe Abb. 6.21). Letztere Konformation erlaubt die Bildung eines „*twisted intramolecular charge transfer*“ (TICT) nach Anregung durch Licht. So genannte TICT-Fluorophore zeichnen sich im Gegensatz zu ihren koplanaren Konformeren dadurch aus, dass sie mit deutlich langwelligerem Licht angeregt werden und sehr langwellige Emissionsbanden besitzen. So zeigt die verdrillte Molekülkonformation eine Emissionsbande bei maximal 550nm (in Wasser), während die koplanare Konformation 430nm als maximale Emissionswellenlänge aufweist. Auch die Fluoreszenzcharakteristika der Dansylgruppe in der verdrillten Konformation sind stark abhängig von der Polarität des Lösungsmittels. So wird in

Wasser als Solvenz die niedrigste Intensität und die langwelligste Emission gefunden.<sup>[284]</sup>

Einen starken Einfluß auf die Elektronendichte des Dansylfluorophors hat die Protonierung, so dass der intramolekulare Ladungstransfer unterbunden wird. Hier wird dann eine Verschiebung der Emissionsbande zu kürzeren Wellenlängen (514nm→338nm) beobachtet.<sup>[285,286]</sup>

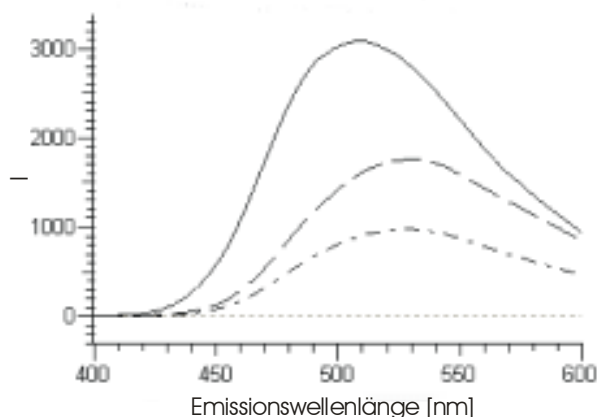
Eine Anbindung der Dansylgruppe an Dendrimere hat teilweise ebenfalls massive Veränderungen der Fluorophorcharakteristika zur Folge, die sowohl aus der inneren Struktur des Dendrimers als auch aus der hohen Dichte an Oberflächenfunktionalitäten resultieren.<sup>[285-288]</sup>

Schwermetalle können ebenfalls einen gravierenden Effekt auf die Fluoreszenz haben. Zu der Dansylgruppe ist diesbezüglich verhältnismäßig wenig bekannt. Für dieses Fluorophor ist dazu bisher nur eine Untersuchung publiziert worden, bei der ein im Dendrimer koordiniertes Nickel- oder Kobaltion zur Fluoreszenzlöschung von 9 Dansyleinheiten führt. Zinkionen hingegen beeinträchtigen die Fluoreszenz nicht.<sup>[285]</sup>

Vor diesem Hintergrund wurde zu Beginn der hier beschriebenen Versuche eine Charakterisierung des Fluorophors angestrebt. Dazu wurden die fluoreszenzmarkierten Dendrimere zuerst in Ethanol mit einer Konzentration von 0,5µM vermessen. Wenn es die Löslichkeiten zuließen, wurde ebenfalls diese Konzentration in reinem Wasser, in DNA-Lösung (1mg/ml), in HSA-Lösung (1mg/ml) und in Zelllysaten vermessen. Um eine möglichst störungsfreie Messung zu gewährleisten, wurde ein Puffer (TET) speziell für die Bestimmung von dansylierten Verbindungen in Zelllysaten erstellt. Dieser beinhaltete EDTA zur Komplexierung möglicherweise störender Metallkationen, das Detergenz Triton-X-100 zur Solubilisierung von Membranen und einen TRIS-Puffer, der den pH-Wert bei 8 stabilisierte und damit die Protonierung des Dendrimers und der Dansylgruppe verhinderte.

Für die vollständig dansylierten Dendrimere wurde folgendes gefunden: Während alle Dendrimere eine ähnliche Anregungswellenlänge von 340nm aufwiesen und die

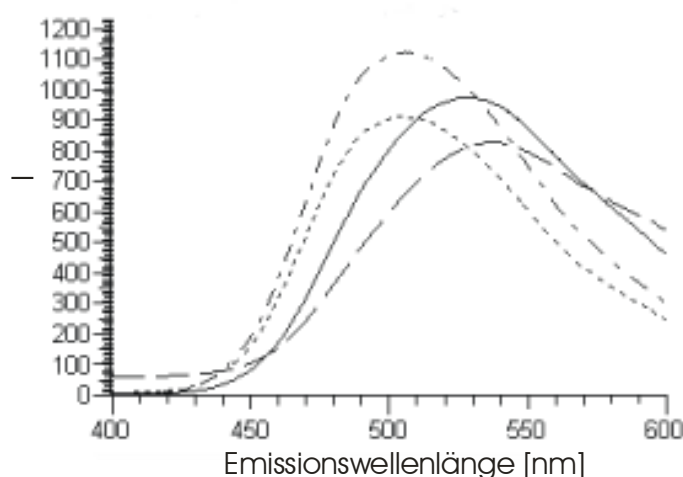
Emissionsintensitäten ungefähr proportional der Anzahl der Dansylgruppen im Molekül waren, zeigten sich bei der Emissionwellenlänge Unterschiede (siehe Abb. 6.22). **G<sub>0</sub>(Dan)<sub>3</sub>** und **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>6</sub>** zeigten ein Emissionsmaximum bei 530nm, während **G<sub>2</sub>(Dan)<sub>12</sub>** ein stark zu kürzeren Wellenlängen (hypsochrom) verschobenes Maximum von 508nm aufwies. Für diesen Effekt kam folgender Erklärungsansatz in Betracht: Eine beginnende Aggregation der Dendrimere konnte für eine Lipophilisierung der Mikroumgebung der Dansylreste sorgen. Indem sich mehrere Dansylreste zusammenlagerten, erfuhren eine Großzahl der Dansylgruppen eine lipophilere Umgebungspolarität, so dass die Emission zu 508nm verschoben wurde. Daneben blieben aber viele Dansylgruppen auch der ethanolischen Umgebung ausgesetzt, so dass eine ungewöhnlich breite Bandenform resultierte. Für vollständig dansylierte PAMAM-Dendrimere wird die Bildung vesikulärer Strukturen in Wasser beobachtet. Aus der Zusammenlagerung von mehreren Dansylgruppen resultiert eine Erniedrigung der Emissionswellenlänge auf 512nm.<sup>[288]</sup>



**Abb. 6.22** Fluoreszenzmissionsspektren nach Anregung bei 340nm für die volldansylierten Dendrimere (0,5µM) in EtOH: — **G<sub>2</sub>(Dan)<sub>12</sub>**, — — **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>6</sub>**, — — — **G<sub>0</sub>(Dan)<sub>3</sub>** (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

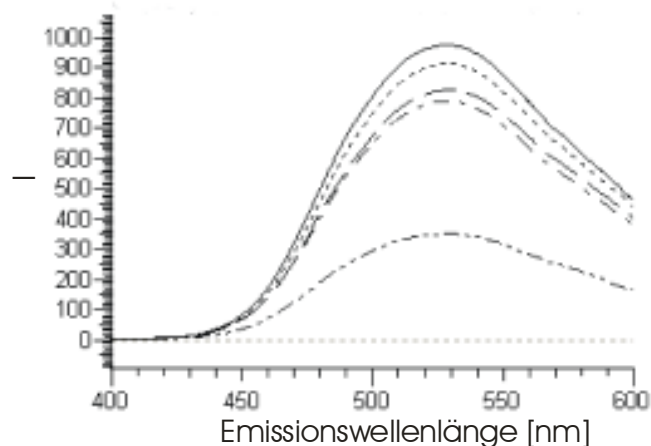
Mit dem am besten im wässrigen Medium löslichen Vertreter **G<sub>0</sub>(Dan)<sub>3</sub>** wurde eine Lösungsmittelvariation durchgeführt (siehe Abb. 6.23). Dabei wurde beim Lösen in reinem Wasser sowohl eine Steigerung der Fluoreszenzintensität als auch eine hypsochrome Verschiebung zu 506nm beobachtet. Das war ein Zeichen für Aggregation in der Lösung, wie das schon für **G<sub>2</sub>(Dan)<sub>12</sub>** in Ethanol gefunden wurde (s.o.). In der DNA-Lösung zeigte sich ebenfalls ein deutlicher hypsochromer Shift, der darauf hindeutet, dass die Dansylgruppen in oder an der DNA ebenfalls eine hydrophobere Umgebung

antreffen. Die Intensität wurde hierbei aber kaum berührt, so dass die Interaktion mit der DNA zu keinen Fluoreszenzlöschungseffekten führte, wie sie für andere Verbindungen (z.B. Anthrachinone) beobachtet wurde.<sup>[60]</sup> Lediglich im Zelllysats wurde eine Intensitätsminderung um 15% und eine Verschiebung zu höherer Wellenlänge (bathochrom) nach 538nm beobachtet. Das deutet auf eine deutlich polarere Mikroumgebung für das Fluorophor hin. Dies bedeutete auch, dass die Verbindung im Zelllysats als echte Lösung vorlag.



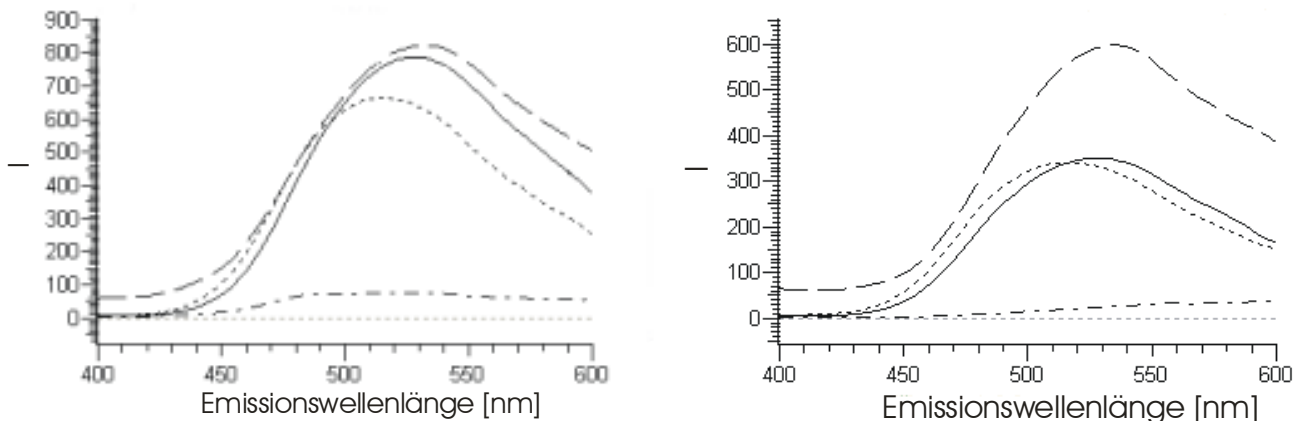
**Abb. 6.23** Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm für  $G_0(\text{Dan})_3$  (0,5  $\mu\text{M}$ ) in verschiedenen Lösungen: — — — Wasser, ——— Ethanol, - - - - DNA-Lösung, — — — Zelllysats (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

Als nächstes wurden die Dendrimere verglichen, die jeweils drei Dansylgruppen im Molekül enthalten. Als Maximum der Emissionsbande in Ethanol hatten alle Verbindungen 528-530nm gemeinsam. Aber in der Intensität zeigten sich deutliche Unterschiede (siehe Abb. 6.24). Die größte Intensität wies das  $G_0(\text{Dan})_3$  auf. Die partiell dansylierten und schutzgruppentragenden Dendrimere  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Cbz})_3$  und  $G_1(\text{Dan})_3(\text{DapBoc})_3$  wiesen noch 94 bzw. 85% dieser Fluoreszenzintensität auf. Bei den Molekülen ohne Schutzgruppen wurde dann ein deutlicher Abfall der Intensität beobachtet. Während vom  $G_1(\text{Dan})_3$  Molekül noch eine Intensität von 81% erreicht wurde, zeigte  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  lediglich eine Intensität von 36% zusammen. Das zeigte den großen Einfluss der primären Amingruppen in der Nachbarschaft zu den Dansylgruppen.

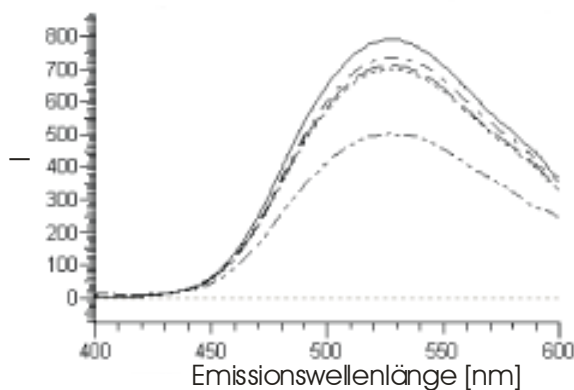


**Abb. 6.24** Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm in Ethanol für: —  $G_0(\text{Dan})_3$ , - - -  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Cbz})_3$ , — —  $G_1(\text{Dan})_3(\text{DapBoc})_3$ , — - -  $G_1(\text{Dan})_3$ , — - -  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  (alle  $0,5\mu\text{M}$ ) (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

Auch bei den beiden gut wasserlöslichen Dendrimeren  $G_1(\text{Dan})_3$  und  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  wurde der Matrixeinfluss getestet (siehe Abb. 6.25). Hier wurden für beide Verbindungen sehr ähnliche Charakteristika gefunden: Sie zeigten beide im Wässrigen lediglich 10% der Fluoreszenzintensität, die bei der Lösung in Ethanol gefunden wurde. Hierbei war ein echtes Maximum kaum zu erfassen. Das ist überraschend, da die Quantenausbeute beim Übergang von Ethanol zu Wasser als Lösungsmittel für die Dansylsulfonsäure sich nur um 20% reduzieren sollte.<sup>[289]</sup> Dieses konnte auf die Protonierung der primären Amine in der Nachbarschaft der Dansylgruppen zurückgeführt werden. Eine Protonierung von tertiären Aminen in Polypropylenimininen und Amidinen in Polylysindendrimeren führt ebenfalls zu einer partiellen Fluoreszenzlösung.<sup>[285,286]</sup> Offensichtlich waren die Auswirkungen von den leichter protonierbaren primären Aminen in Nachbarschaft zu den Dansylgruppen im Wässrigen deutlich gravierender als bei den oben zitierten Versuchen. Ähnlich wie bei  $G_0(\text{Dan})_3$  wurde in einer DNA-Lösung eine hypsochrome Verschiebung unter nur schwacher Intensitätsminderung beobachtet, so dass es auch hier offensichtlich zu Wechselwirkungen der Dansylgruppe und der DNA kam. Im Zelllysat hingegen konnte neben einer leichten bathochromen Verschiebung der Emissionsbande eine leichte ( $G_1(\text{Dan})_3$  +5% gegenüber der Lösung in Ethanol) bis gravierende ( $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  +71% gegenüber der Lösung in Ethanol) Intensitätssteigerung beobachtet werden. Das war sicherlich zu einem nicht unerheblichen Teil auf die Pufferung auf pH8 zurückzuführen.



**Abb. 6.25** Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm für  $G_1(\text{Dan})_3$  (links) und  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  (rechts) in verschiedenen Lösungen (alle  $0,5\mu\text{M}$ ): — — Zellysate, — — Ethanol, - - - - DNA-Lösung, — - — Wasser (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

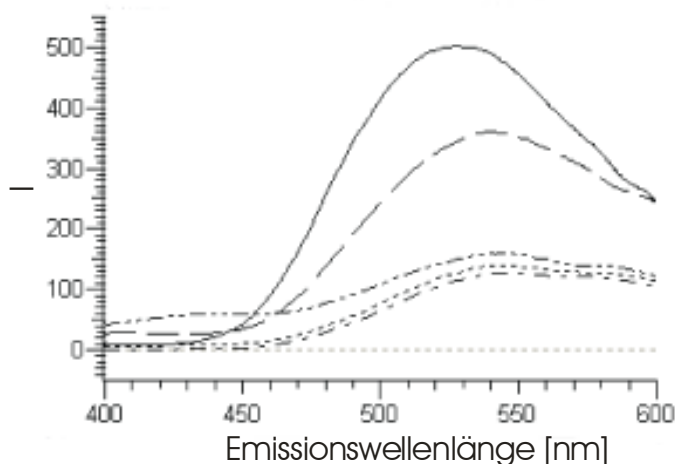


**Abb. 6.26** Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm in Ethanol für verschiedene Dendrimere des „Müller Typs“ (alle  $0,5\mu\text{M}$ ): — —  $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal})_3$ , — — —  $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$ , — — —  $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Boc})_3$ , - - - -  $\text{SM-G}_1(\text{Dan})_3$ , — - —  $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{NH}_2)_3$  (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

Bei den Dendrimeren mit PEG-Seitenketten fand man eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz in Ethanol im Vergleich zu den ebenfalls drei Dansylgruppen enthaltenden  $G_0(\text{Dan})_3$  des „Fuchs-Typs“ (siehe Abb. 6.26). Das deutete auf eine Erhöhung der Polarität durch die Polyethylenglykol-Einheiten in der Umgebung des Dansylrestes hin. Ein Einfluss der dritten Funktionalität bei den Generation-2-Molekülen konnte kaum gesehen werden. So haben alle Verbindungen ihr Anregungsmaximum bei 340nm und ihr Emissionsmaximum bei 530nm. Lediglich die Intensität des  $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{NH}_2)_3$  war deutlich gegenüber den anderen Dendrimeren reduziert.



Beim Übergang zu Wasser als Lösungsmittel wurde die Intensität des emittierten Lichts bei allen Dendrimeren diesen Typs auf ein Drittel reduziert und das Maximum der Emissionsbande nach 350nm verschoben, dem theoretischen Wert für Dansylamin in Wasser.<sup>[287]</sup> Ein Einfluss der benachbarten polaren Gruppen war auch hier kaum zu beobachten. Ein Lösen im TET-Puffer hatte eine Signalreduktion und eine Verschiebung des Maximums zur Folge, die jeweils zwischen den Werten in Ethanol und in Wasser lagen. In der HSA-Lösung erfuhr das Emissionsmaximum eine bathochrome Verschiebung, wie sie im Wässrigen beobachtet wurde. Auch in der DNA-Lösung wurden dieselben spektralen Eigenschaften wie im Wässrigen beobachtet (siehe Abb. 6.27). Eine Verschiebung der Emissionsbande zu kürzeren Wellenlängen, wie für die nicht PEGilierten Dendrimere zu beobachten war, konnte nicht gefunden werden. Somit unterbanden die PEG-Gruppen eine stärkere Interaktion mit den Biomolekülen. Das stand in gutem Einklang mit der niedrigen Zytotoxizität in den Chemosensitivitätstests an MCF-7-Zellen (siehe Kap. 6.2.1.1.3) und verschiedenen Transfektionsversuchen.<sup>[116]</sup>



**Abb. 6.27** Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm für **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** (0,5μM) in verschiedenen Lösungen: — Ethanol, — — TET-Puffer, — — — HSA-Lösung, - - - -DNA-Lösung, — - — Wasser (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

### 6.3.2 Bestimmung der Löslichkeit der dansylierten Dendrimere

Aufgrund der geringen Löslichkeit der dansylierten Dendrimere des „Fuchs-Typs“ (siehe Kap. 6.2.1.1.2.2) bestand die Gefahr, dass sich bei den Versuchen zur Zellakkumulation

auch große, nicht zellassoziierte Präzipitate im Zellpellet bzw. auf dem Objektträger wieder fanden. Daher wurde das Basalmedium (EMEM-Medium ohne Zusätze für MCF-7-Zellen) mit der betreffenden Substanz versetzt, um nach sanfter Ultraschallbehandlung eine gesättigte Lösung zu erhalten. Dann wurde die Lösung über Nacht bei 4°C gelagert und die Präzipitate abzentrifugiert. Mit den erhaltenen Lösungen wurden die Inkubationen durchgeführt. Die Konzentrationen der so erhaltenen Lösungen wurden gegen eine Kalibrierung gemessen.

Verbindung	Löslichkeit in Basalmedium [nM]
<b>G<sub>0</sub>(Dan)<sub>3</sub></b>	939
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>6</sub></b>	370
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Cbz)<sub>3</sub></b>	578
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(DapBoc)<sub>3</sub></b>	340
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub></b>	106
<b>G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub></b>	57
<b>G<sub>2</sub>(Dan)<sub>12</sub></b>	183

**Tab. 6.2** Sättigungskonzentrationen der dansylierten Dendrimeren des „Fuchs-Typs“ in Basalmedium

Die Löslichkeit der vollständig dansylierten Dendrimere nahm mit steigender Molekülgröße ab (siehe Tab. 6.2). So ließ bei dem G<sub>0</sub>-Dendrimer **G<sub>0</sub>(Dan)<sub>3</sub>** die innere Struktur mit den Wasserstoffbrückenausbildenden Peptidbindungen noch eine recht große Löslichkeit von gut 1µM zu, während bei höherer Generation die unpolaren Oberflächenmodifikationen zunehmend die Löslichkeit bestimmten.

Am gravierendsten fiel die schlechte Löslichkeit der G<sub>1</sub>-Dendrimere ohne Schutzgruppen **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>** und **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub>** auf (siehe Tab. 6.2). Im Gegensatz zu den geschützten Verbindungen fiel die Löslichkeit um den Faktor 5-6 nach der Entschützung ab. Es handelte sich hierbei vermutlich um eine Präzipitation unter Salzeinfluss. Waren diese Verbindungen in reinem Wasser noch recht gut (>20mM) löslich, so sank die Löslichkeit mit einem steigenden Salzüberschuss beim Verdünnen mit PBS. Dieser Effekt wird auch für andere Dendrimertypen beobachtet, die sowohl kationische Amine als auch große

hydrophobe Gruppen an der Oberfläche tragen.<sup>[129,290]</sup> Wenn man die Chemosensitivitäts-testdaten (siehe Kap. 6.2.1.1.2.2) für diese beiden Verbindungen betrachtete, wurde hier die löslichkeitsvermittelnde Wirkung der Proteine des fetalen Kälberserums deutlich. So fand man bei **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Dap)<sub>3</sub>** eine Löslichkeit, die 10µM nicht überstieg, während bei **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>** die Löslichkeit deutlich höher lag.

### 6.3.3 Qualitative Bestimmung der Zellaufnahme über die Fluoreszenzmikroskopie

Um die intrazelluläre Verteilung der Dendrimere zu ermitteln und so Hinweise auf den Aufnahmeweg und die immensen Toxizitätsunterschiede zu erhalten, sollten Untersuchungen zur Lokalisation in den Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden auf Deckgläsern angewachsene MCF-7-Zellen sowohl mit den vollständig dansylierten Dendrimer **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>6</sub>** als auch mit den teildansylierten Dendrimeren **G<sub>1</sub>(Dan)<sub>3</sub>** und **SM-G<sub>2</sub>(Dan)<sub>3</sub>(Boc)<sub>3</sub>** inkubiert. Die Zellen wurden danach fixiert und mittels Epifluoreszenz analysiert. Ausgewählte Objekte wurden dann am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop (Arbeitsgruppe Priv. Doz. Dr. Schäfer) untersucht. Bei diesem Gerät ist durch die Steuerung des anregenden Laserstrahls und des Objekts eine schnittweise Emissionsmessung in der Zelle möglich, wodurch eine nähere Lokalisierung der Substanzen, insbesondere nach Gegenfärbung, möglich ist.

Aus der Literatur sind zwei verschiedene Verteilungsmuster bekannt. Für fast alle dendrimergebundenen Fluorophore wird eine Verteilung von klumpigen Strukturen im perinuklearen Bereich des Zytoplasmas beobachtet.<sup>[112,114,125,126,271]</sup> Dabei werden starke Indizien für einen endozytotischen Aufnahmeweg gefunden.<sup>[111,112,124]</sup> Im scheinbaren Gegensatz dazu stehen Literaturstellen zu ähnlichen Dendrimerensystemen, die in der Regel bei Transfektionsversuchen von einer sehr starken Kernfärbung berichten.<sup>[111,114]</sup> Vereinbar sind diese gegensätzlichen Positionen durch Untersuchungen, die sowohl eine perinukleare als auch eine starke Kernfluoreszenz finden. Dabei ist die Kernfluoreszenz nur in maximal 10% der Zellen zu finden, denen gemeinsam ist, dass sie sich gerade in der mitotischen Phase befinden.<sup>[113]</sup>

Bei den Versuchen mit HeLa-Zellen wird eine Zellaufnahme beobachtet, die sich durch Lokalisation im perinuklearen Bereich manifestiert.<sup>[183]</sup> Daher wurde die dort angewandte Technologie auf MCF-7-Zellen übertragen. Da MCF-7-Zellen im Vorversuch gut auf unbehandelten Deckgläschen anwuchsen, wurde zunächst auf eine Beschichtung verzichtet. Bei den Untersuchungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurde in keinem Fall eine Fluoreszenz im Kernbereich gefunden. Sondern bei allen untersuchten Dendrimeren wurden fluoreszierende Bereiche im perinuklearen Raum beobachtet. Dabei unterschieden sich die Dendrimere  $G_1(\text{Dan})_3$  und  $G_1(\text{Dan})_6$  wie bei den Versuchen mit den HeLa-Zellen sehr deutlich.<sup>[183]</sup> Bei dem teildansylierten Dendrimer sah man großflächige perinukleare Fluoreszenzen, die teilweise mit lichtmikroskopisch sichtbaren, für gesunde Zellen untypischen Strukturen übereinstimmten (siehe Abb. 6.28 Bild **A** und **D**). Das Auftreten von auffälligen lichtmikroskopischen Strukturen war bei dem volldansylierten Dendrimer  $G_1(\text{Dan})_6$  ebenfalls stark erhöht. Diese bröckigen Strukturen zeigten dann auch starke punktuelle Fluoreszenz (siehe Abb. 6.28 Bild **B** und **E**).

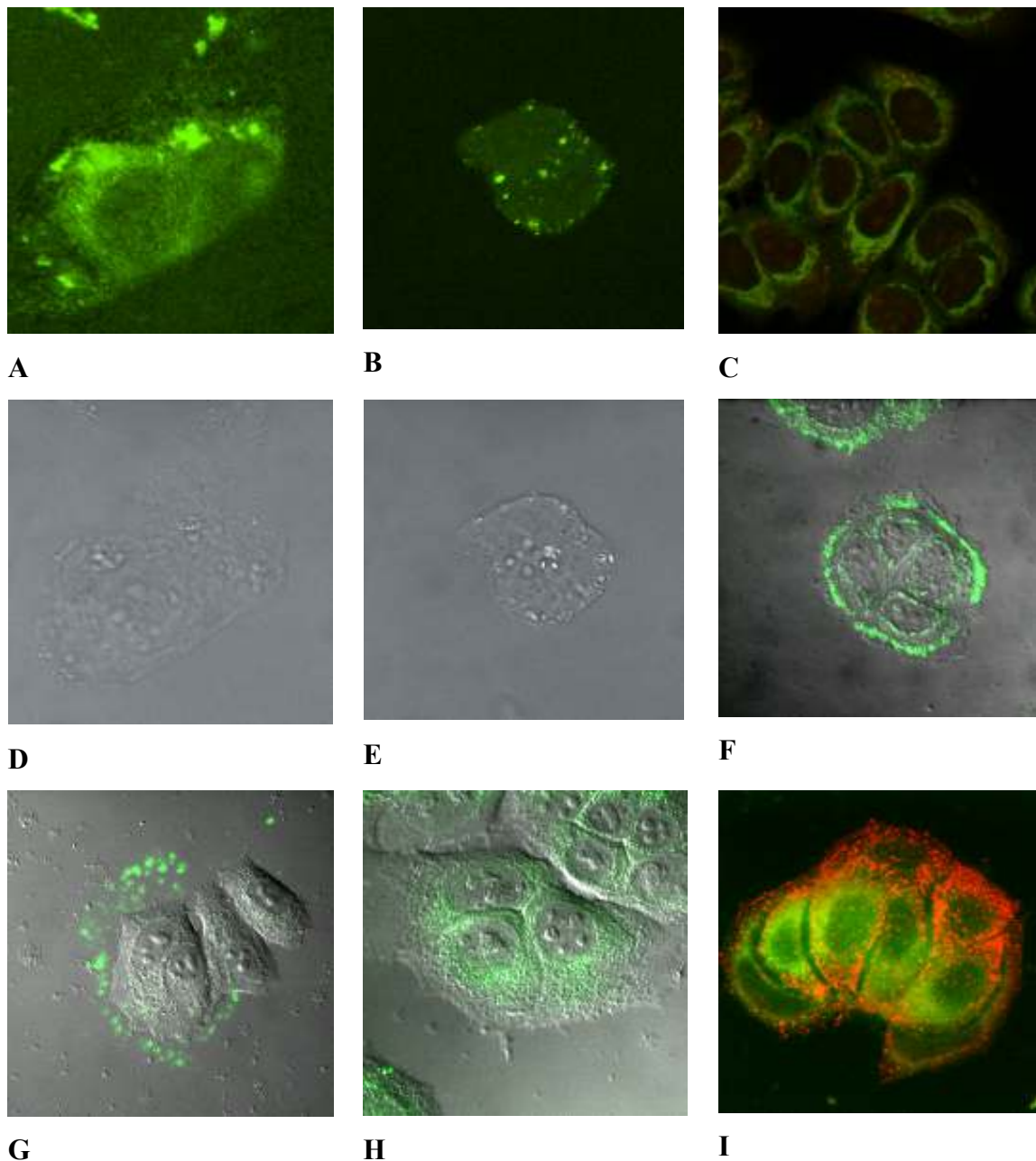
Leider reagierten die Zellen auf die zugegebenen Substanzen mit dem Verlust der typischen Zellmorphologie und der sukzessiven Ablösung vom Objektträger, auch wenn diese im Chemosensitivitätstest als untoxisch bewertet wurden. Daher wurden Beschichtungsversuche durchgeführt. Dabei wurde das Zellwachstum auf Glas nach Beschichtung mit Polylysin, bovinen Serumalbumin (BSA) und mit fetalen Kälberserum (FCS) beobachtet. Diese Reagenzien sollten die negativen Oberflächenladungen der Silikatoberfläche maskieren und durch positive Oberflächenladungen der verwendeten Reagenzien ersetzen. Damit wird die Adhäsion der negativ geladenen Zellmembranen erleichtert. Dabei stellte sich das FCS als überlegen gegenüber BSA und Polylysin heraus. Die in den folgenden Versuchen erhaltenen Zellmorphologien sahen deutlich gesünder d.h. arttypischer aus.

Die vorherigen Versuche wurden mit alten Objekten durchgeführt, bei denen man Trocknungsartefakte durch die Dehydratisierung der Zellen nicht ausschließen konnte. Da man solche Artefakte bei ähnlichen Versuchen beobachtet,<sup>[115]</sup> wurden Versuche mit lebenden Zellen und frisch fixierten Zellen durchgeführt. Dabei ließen sich die vorher erhaltenen Ergebnisse nicht reproduzieren. Um die in die Zellen aufgenommenen

Dendrimere zu visualisieren, mussten deutlich höhere Laserenergien auf die Zellen gebracht werden, was die Hintergrundfluoreszenz der Zellen kräftig verstärkte (Abb. 6.28 Bild F). In mit  $G_1(\text{Dan})_3$  behandelten Zellen zeigte sich erst nach vier Stunden Inkubation eine auswertbare diffuse Fluoreszenz, die teilweise im perinuklearen Bereich verstärkt auftrat (Abb. 6.28 Bild H). Bei dem Dendrimer  $G_1(\text{Dan})_6$  wurde keine intrazelluläre Verstärkung der Fluoreszenz beobachtet. Lediglich um die Zellen herum wurde eine Häufung von Präzipitaten gefunden, was sich aber nicht plausibel erklären ließ (Abb. 6.28 Bild G).

Der Trend zu höheren Fluoreszenzlichtausbeuten mit stärker strukturierter Fluoreszenz bei dehydratisierten Objekten wurde auch für die Verbindung  $\text{SM-G}_2\text{-(Dan)}_3\text{(Boc)}_3$  gefunden. Hier zeigten die fixierten Zellen nach längerer Lagerung eine starke, dicht gepunktete Färbung über das Zytosol verteilt (Abb. 6.28 Bild C), während bei frischen Zellen auch bei hoher Laserenergie keine auswertbare Fluoreszenz gefunden wurde. Diese Beobachtung stand mit der Charakterisierung der Fluorophore (Kap 6.3.1) in Übereinstimmung, wo eine wässrige Umgebung eine starke Fluoreszenzlöschung verursachte. Ein leicht angesäuertes Milieu, wie in Endosomen und Lysosomen vorhanden, sollte diesen Trend noch weiter verstärken.

Um eine Lokalisierung in den Zellen zu präzisieren, wurde versucht, die Zellorganellen Endosomen, Lysosomen und den Golgiapparat mit ebenfalls fluoreszierenden Farbstoffen mit Affinität zu den jeweiligen Organellen gegenzufärben. Für die Lysosomen und den Golgi-Apparat ließen sich die Versuchsbedingungen in Bezug auf die Inkubationszeiten und -konzentrationen sowie die nachfolgende Fixierung nicht optimieren. Lediglich für die Endosomen wurden selektive Färbungen erhalten. Hierbei wurde nur für das Dendrimer  $G_1(\text{Dan})_3$  eine geringe Kolo-kalisation gezeigt, die durch die Überlagerung der grünen (Dendrimer) und der roten (Endosomenmarker) Farbe als gelbe Färbung gekennzeichnet ist (Abb. 6.28 Bild I). Bei den anderen Dendrimeren konnte das Dendrimer nicht in der Zelle visualisiert werden bzw. die unspezifische Autofluoreszenz überstrahlte die Dendrimerfluoreszenz. Überhaupt schien neben der starken Fluoreszenzlöschung im wässrigen Milieu die Autofluoreszenz die stärkste Interferenz für die Bestimmung im zellulären Kontext darzustellen.



**Abb. 6.28** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MCF-7-Zellen. Bild **A** (Fluoreszenz) und **D** (Phasenkontrast):  $G_1(\text{Dan})_3$  nach 1h Inkubation fixiert und gelagert; Bild **B** (Fluoreszenz) und **E** (Phasenkontrast):  $G_1(\text{Dan})_6$  nach 24h Inkubation fixiert und gelagert; Bild **C**:  $\text{SM-G}_2\text{-(Dan)}_3(\text{Boc})_3$  nach 4h Inkubation fixiert und gelagert; Bild **F**: Autofluoreszenz; Bild **G**:  $G_1(\text{Dan})_6$  nach 24h Inkubation fixiert und frisch vermessen; Bild **H**  $G_1(\text{Dan})_3$  nach 4h Inkubation fixiert und frisch vermessen (Überlagerung mit Phasenkontrast) und **I** (Überlagerung mit Endosomengefärbung (rote Färbung)):

Zusammenfassend konnte die Akkumulation der fluoreszenzmarkierten Dendrimere in zytosolischen Kompartimenten gezeigt werden. Eine präzise Aussage über den Akkumu-

lationsort konnte jedoch nicht gemacht werden. Es wurde aber ein anderes Verhalten auf zellulärer Ebene für die untoxischen volldansylierten Dendrimere als für die toxischen teildansylierten Dendrimere des „Fuchs-Typs“ gefunden. Das Verteilungsmuster der untoxischen PEG-seitenkettenträgenden Dendrimere unterschied sich von den ersten beiden augenscheinlich.

### **6.3.4 Quantitative Bestimmung der Zellaufnahme über die Fluorimetrie**

#### **6.3.4.1 Methodenoptimierung zur Bestimmung der Zellaufnahme dansylmarkierter Dendrimere**

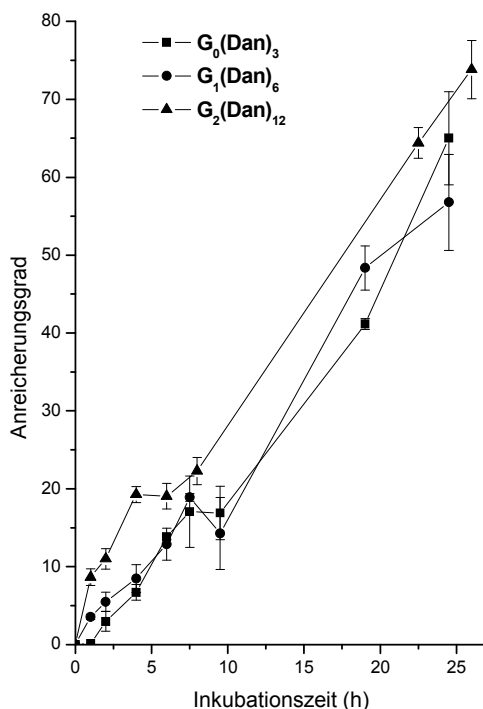
Die in den Fluoreszenzbildern zu sehenden Fluoreszenzen ließen nur schwer eine Quantifizierung der eigentlich in die Zelle aufgenommenen Substanzmenge zu. In der Regel war die Intensität zu schwach und der Zellhintergrund zu stark ausgeprägt. Zudem waren, wie schon ausgeführt, die unmittelbaren Umgebungsbedingungen für die Fluoreszenzintensität entscheidend. Da es im zellulären Rahmen sehr unterschiedliche Kompartimente gibt und der Alterungszustand (=Austrocknungsgrad) zwischen den Proben differieren kann, ist eine Standardisierung so gut wie unmöglich.<sup>[106]</sup> Auch war bei den Objekten schwer zu ermitteln, wie viel Anregungslichtintensität bei der Suche nach geeigneten Messobjekten schon auf die jeweilige Probe gefallen ist. Da die intensive Strahlung ein schnelles Bleichen (=Zerstörung) des Fluorophors zur Folge hat, war die Bestrahlungsdauer ebenfalls ein kritischer Parameter.

Aus diesen Gründen wurde eine Methode entwickelt, die zur Bestimmung einer Zellakkumulationskinetik geeignet war. Dazu konnte auf die Erfahrungen zurückgegriffen werden, die bei der Bestimmung der Zellaufnahme von Platinverbindungen gemacht wurden (siehe Kap. 3.3). So wurden die Zellkulturbedingungen komplett übernommen. Zur Fluorophor- und Proteinbestimmung wurden die Zellen in dem oben besprochenen TET-Puffer homogenisiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenz stand ein Anregungsfilter mit relativ breiter Bandweite (360nm±20nm) zur Verfügung. Für die Emission konnte auf zwei verschiedene Filter zurückgegriffen werden: 535nm±20nm und 500±10nm. Obwohl der erste Filter das Maximum der Emission am besten erfasste,

wirkte sich die deutlich größere Bandbreite in einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis aus, so dass schlecht reproduzierbare Werte erhalten wurden. Der 500nm Filter zeigte aufgrund der geringeren Bandbreite deutlich kleinere Signalwerte, die ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zeigten. Daher wurde auf der Emissionsseite dieser Filter eingesetzt.

Die resultierende Methode zeigte eine gute Empfindlichkeit. Für  $G_1(\text{Dan})_3$  betrug die Nachweisgrenze in Medium bzw. Zelllysat 18 bzw. 14nmol/l. Die Bestimmungsgrenze lag bei 33 bzw. 32nmol/l. Wenn man die minimale Verdünnung während der Aufarbeitung der Zellen berücksichtigte, war diese Methode geeignet, eine zelluläre Konzentration in MCF-7-Zellen von ca. 1,6 $\mu\text{M}$  nachzuweisen. Die Kalibrierung war bis zur höchsten eingesetzten Konzentration (1 $\mu\text{M}$ ) hoch linear.

#### 6.3.4.2 Zellaufnahmekinetiken der dansylmarkierten Verbindungen

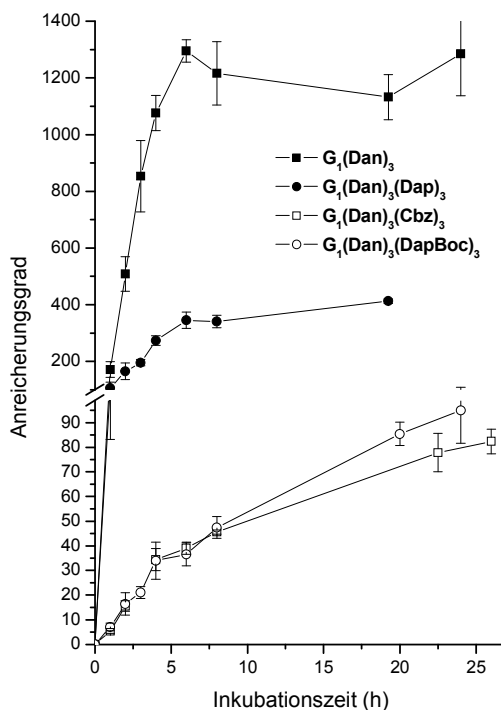


**Abb. 6.29** Zellakkumulation der vollständig dansylierten Dendrimere des „Fuchs Typs“ in MCF-7-Zellen



Bei den Zellakkumulationskinetiken an MCF-7-Zellen konnte man die fluoreszenzmarkierten Verbindungen anhand ihrer Charakteristika in drei Gruppen einteilen: die vollständig dansylierten, die teildansylierten und die PEG-gruppentragenden Dendrimere.

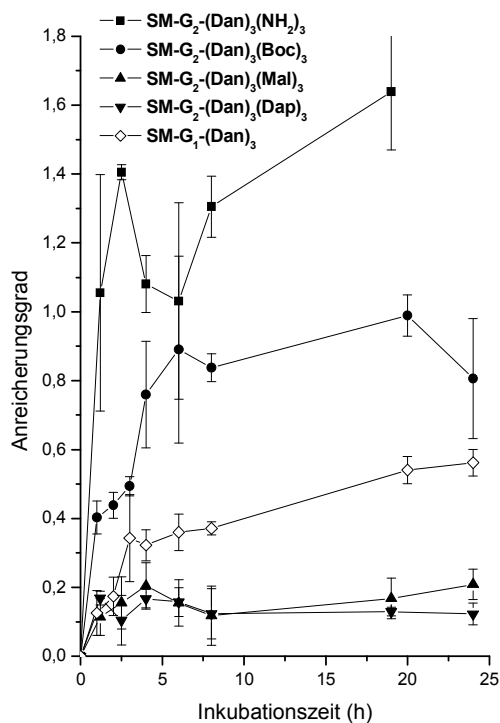
Die vollständig dansylierten Dendrimere zeichneten sich durch eine lineare Zunahme der Dendrimerkonzentration über die Zeit aus, die auch nach 24 Stunden nicht gesättigt war (siehe Abb. 6.29). Das deckte sich mit den fluoreszenzmikroskopischen Befunden, nach denen eine Präzipitation auf zellulärer Ebene stattfand. Obwohl sich die Absolutkonzentrationen von Generation zu Generation sehr deutlich unterschieden, sah man aufgrund der unterschiedlichen Sättigungskonzentrationen im Medium bei Errechnung des Akkumulationsgrades keine generationsabhängigen Effekte. So erreichten alle drei Verbindungen nach 24 Stunden eine ca. 57-74fache Akkumulation gegenüber dem Außenmedium.



**Abb. 6.30** Zellakkumulationskinetiken der partiell dansylierten  $G_1$ -Dendrimere des „Fuchs-Typs“ an der MCF-7-Zelllinie

Die teildansylierten Dendrimere zeigten eine schnellere und höhere Anreicherung in den Zellen (siehe Abb. 6.30). Dabei wurde für die Verbindungen ohne Schutzgruppen nach

6h eine Sättigung erreicht, während bei den geschützten Verbindungen nach 24h eine beginnende Sättigung zu verzeichnen war. Dabei wurde für die beiden geschützten Verbindungen  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Cbz})_3$  und  $G_1(\text{Dan})_3(\text{DapBoc})_3$  ungefähr bei 80-90facher Anreicherung gegenüber dem Medium gefunden, d.h. die strukturellen Unterschiede wirkten sich kaum aus. Bei den Verbindungen ohne Schutzgruppen traten diese deutlich gravierender hervor. Während  $G_1(\text{Dan})_3$  mit einem Anreicherungsgrad in der Sättigung von ca. 1200 einen immensen Gehalt aufwies, brachte die Verbindung  $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$  es auf das deutlich niedrigere, wenn auch immer noch sehr hohe Anreicherungs-niveau von 300 gegenüber dem Außenmedium.



**Abb. 6.31** Zellakkumulationskinetiken von dansylierten Dendrimeren des „Müller-Typs“

Eine vollkommen andere Charakteristik wiesen die Dendrimere mit PEG-Seitenketten auf (siehe Abb. 6.31). Sie wiesen trotz hoher Mediumkonzentrationen nur wenig Fluoreszenz im Zelllysate auf. Ein Plateau der Zellaufnahme wurde in der Regel sehr schnell erreicht. Hierbei hatte die dritte Funktionalisierung neben den PEG-Ketten und den Dansylgruppen eine entscheidende Auswirkung auf die erreichte zelluläre Konzentration. Sehr polare Seitenketten wie Dicarbonsäuren und Ethylendiamine führten zu einem

Anreicherungsgrad von ca. 0,15, der schon nach einer Stunde erreicht war. Bemerkenswerterweise machte es hierbei offensichtlich kaum einen Unterschied, welche potentielle Ladung das Dendrimer trug. Denn bei der Protonierung der Amine sollte eine höhere Affinität für die mehrheitlich anionische Zellmembran resultieren, während die Deprotonierung der Carbonsäuren das Gegenteil hervorrufen sollte. Das ungeladene Molekül mit Boc-Schutzgruppen **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(Boc)<sub>3</sub>** dagegen erreichte einen Anreicherungsgrad von ca. 0,9, wobei das Maximum erst nach 4h erreicht wurde. Das Vorhandensein freier Amine steigerte den zellulären Gehalt nochmals, so dass **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** die einzige Verbindung aus dieser Reihe war, deren zellulärer Gehalt den Gehalt im Medium überstieg.

Nicht zur Reihe direkt gehörend und daher auch etwas abweichend verhielt sich das G<sub>1</sub>-Molekül **SM-G<sub>1</sub>-(Dan)<sub>3</sub>**, das die Hälfte der PEG-Seitenketten und keine weitere Funktionalität aufwies. Dieses erfuhr über den gesamten Inkubationszeitraum einen Konzentrationszuwachs in den Zellen, wobei nach schnellem Anstieg in den ersten drei Stunden ein sehr gemächlicher Anstieg erfolgte. Hierbei erreichte es einen maximalen Anreicherungsgrad von 0,6 im Beobachtungszeitraum.

Zusammenfassend war die Korrelation der Zytotoxizität mit der Zellaufnahme zumindest innerhalb der drei beschriebenen Reihen gut zu erkennen. Die biologisch inaktiven Verbindungen schienen auf zellulärer Ebene entweder Aggregate zu bilden oder wurden kaum in die Zellen aufgenommen. Dagegen zeigten die toxischen partiell dansylierten Dendrimere eine schnelle und starke Aufnahme in die Zellen. Auch das leicht zytotoxische **SM-G<sub>2</sub>-(Dan)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** war das am stärksten angereicherte Molekül in seiner Reihe, obwohl seine Anreicherung gegenüber den nicht PEGilierten Molekülen immens niedriger war.

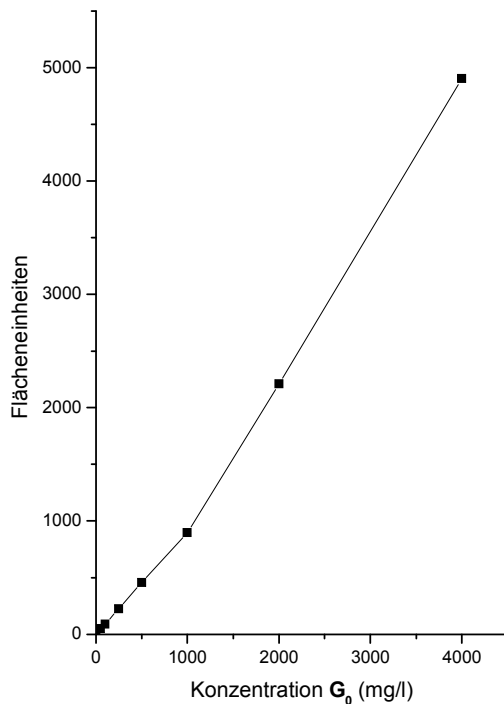
## 6.4 Zellaufnahme von nicht markierten Dendrimeren

Die Modifikation der Dendrimeroberfläche mit fluoreszierender Gruppen ist in der Lage, die Zellaufnahme stark zu verändern.<sup>[114]</sup> Daher sollte für die Dendrimere ohne besondere Markierung die Zellaufnahme bestimmt werden. Dies könnte Aufschluss über den Zusammenhang von der Zellakkumulation und der unterschiedlichen Toxizität verschiedener Oberflächenmodifikationen und Generationen der Dendrimere. Andererseits sollte geklärt werden, ob sich der in Kap.6.1 beschriebene proteolytische Abbau auch auf zellulärer Ebene nachweisen ließ.

Da diese Moleküle keine der Spurenanalytik zugänglichen Marker enthielten, war die einzige herausragende Eigenschaft ihre UV-Absorption. Diese resultierte aus den Aromaten im Kern bzw. in den Verzweigungseinheiten. Für eine direkte Messung im Zelllysate störten die Proteine und Nukleinsäuren, die in diesem Bereich ebenfalls eine deutliche Absorption aufweisen. Daher musste eine Auftrennung erfolgen. Das konnte sehr gut mit der Kapillarelektrophorese geschehen, da die Dendrimere mit ihrer hohen Ladungsdichte gegenüber den Proteinen eine wesentlich höhere Mobilität aufweisen. Hierzu konnte die in Kap. 6.1 zur Beobachtung der Dendrimerhydrolyse beschriebene Methode genutzt werden.

### 6.4.1 Direkte Bestimmung nach Festphasenextraktion

In Vorversuchen wurden Kalibrierkurven mit der Verbindung  $G_0$  als Standard in Zelllysate von MCF-7-Zellen (1mg/ml Zellprotein) aufgenommen. Bei steigender Konzentration von  $G_0$  nahm das Signal überproportional zu (siehe Abb. 6.32). Das deutete auf eine Signalsuppression durch Matrixbestandteile z.B. DNA hin, die sich bei niedrigen Gehalten besonders gravierend auswirkte.



**Abb. 6.32** Kalibrierung für  $G_0$  in Zelllysate

Daher musste vor der kapillarelektrophoretischen Trennung eine Aufreinigung zur Entfernung der Matrix vorgelagert werden. Hierfür bot sich die Festphasenextraktion (SPE von „*solid phase extraction*“) an, wobei es prinzipiell verschiedene Möglichkeiten gab. Da die zu untersuchenden Verbindungen sowohl neutral (im Basischen) als auch kationisch (im Sauren) sind, konnte sowohl ein lipophiles Extraktionsmaterial (analog „*reversed phase*“ in der HPLC) als auch ein Kationenaustauscher verwendet werden. Weil zur Elution des Analyten von einem Kationenaustauscher relativ hohe Salzmengen erforderlich sind, wurde auf ein „*reversed phase*“-Material zurückgegriffen. Bei dieser Methode war die Auftragung der Probe auf das Material im moderat Basischen vorteilhaft, da hier elektrostatische Bindungen zur Matrix eine untergeordnete Rolle spielten. Es wurde je nach Analyt (siehe Tab. 6.3) mit verschiedenen Wasser-Methanol-Mischungen eluiert, die einen sauren pH-Wert aufwiesen. Hier konnte bequemerweise der Laufpuffer der Elektrophorese eingesetzt werden, so dass die resultierenden Proben bis zu einem Methanolgehalt von 50% sofort ohne weitere Vorbereitung in die Kapillarelektrophorese injiziert werden konnten.

Analyt	Wiederfindung	Wiederfindung	Elutionsgemisch [ <sup>v</sup> / <sub>v</sub> Phosphatpuffer:Methanol]
	ohne Matrix [%]	mit Zellmatrix [%]	
<b>G<sub>0</sub></b>	104±3	90±1	100:0
<b>G<sub>0</sub>(Met)<sub>3</sub></b>	87±8	94±15	50:50
<b>G<sub>0</sub>(Phe)<sub>3</sub></b>	91±4	81±3	50:50
<b>G<sub>0</sub>(Asp)<sub>3</sub></b>	72±11	65±4	50:50
<b>G<sub>0</sub>(Dap)<sub>3</sub></b>	87±8	72±2	100:0
<b>G<sub>1</sub></b>	88±6	n.b.	50:50
<b>G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub></b>	59±3	n.b.	10:90
<b>G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub></b>	64±7	n.b.	10:90
<b>G<sub>1</sub>(Asp)<sub>6</sub></b>	81±3	n.b.	50:50
<b>G<sub>2</sub></b>	71±5	n.b.	50:50

n.b. nicht bestimmt

**Tab. 6.3** Wiederfindung von Dendrimeren (65mg/l bei einem Auftragevolumen von 4ml) des „Fuchs-Typs“ von SPE-Kartuschen mit und ohne Zellmatrix (n=3)

Um die Eignung der Methode zu überprüfen, wurden die Wiederfindungen bestimmt (siehe Tab. 6.3). Die bestimmten Wiederfindungen bewegten sich in einem Bereich zwischen befriedigenden 60% und sehr guten 100%. Hierbei erkennt man einige Gesetzmäßigkeiten: So sank im Allgemeinen die Wiederfindung mit steigender Generation. Außerdem wurde mit steigender Generation ein höherer Methanolgehalt zur Elution benötigt. Innerhalb einer Generation zeigten die apolareren Oberflächenmodifikationen (Phe/Met) eine schlechtere Wiederfindung und benötigten einen höheren Methanolanteil zur Elution als die polareren (Asp/Dap). Beim Vergleich von Wiederfindung ohne und mit Zellmatrix wurde in der Regel eine Reduktion beobachtet, die sich in einem Rahmen um 10% bewegte.

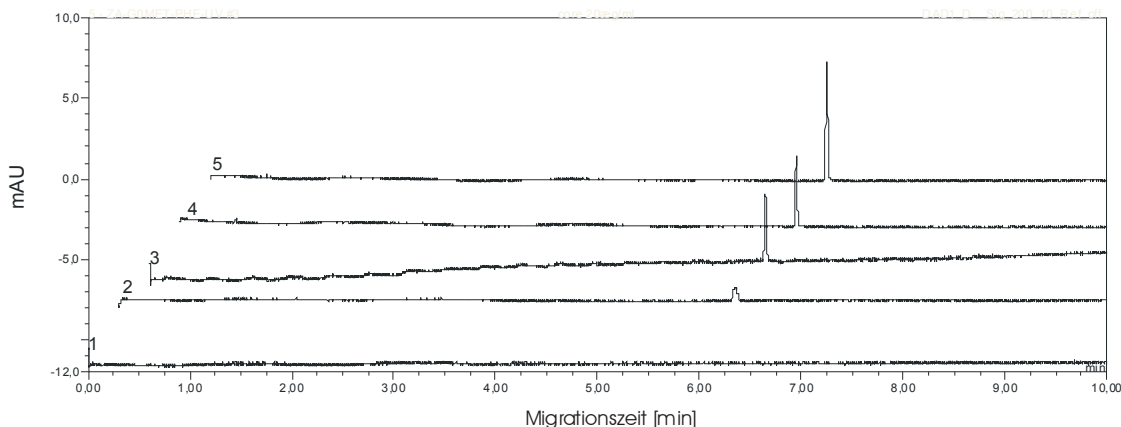
In Vorversuchen wurden so geringe Gehalte gefunden, dass im Gegensatz zu den markierten Verbindungen eine größere Zellpopulation benötigt wurde. Daher wurden die Inkubationen anstatt in 6-Loch-Platten in Zellkulturflaschen durchgeführt. Auch durch die Festphasenextraktion wurde sowohl der zeitliche als auch der finanzielle Aufwand

stark erhöht. So wurde auf eine Aufnahme von Akkumulationskinetiken verzichtet und eine Messung nach 24-stündiger Inkubation durchgeführt.

In den Vorversuchen mit dem Basisdendrimer  $G_0$  wurde ersichtlich, dass die Konzentration im Medium äußerst hoch sein musste, um eine über Kapillarelektrophorese nachweisbare Analytmenge in den Zellen aufzufinden. Für  $G_0$  lag diese Konzentration bei ungefähr  $100\mu\text{M}$ . Wenn man die Zytotoxizitätsprofile (siehe Kap. 6.2) berücksichtigte, war diese Konzentration für viele Dendrimere aber deutlich zu hoch. So konnte  $G_0(\text{Phe})_3$  lediglich in einer Konzentration von  $20\mu\text{M}$  eingesetzt werden. Dadurch bedingt konnte für viele Dendrimere noch nicht einmal der Nachweis der Zellaufnahme, geschweige denn eine Quantifizierung erfolgen.

Für  $G_0(\text{Dap})_3$  und alle Dendrimere der 1. und 2. Generation gelang kein kapillarelektrophoretischer Nachweis im Zellysat. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze für Peaks von ca. einer Flächeneinheit konnte eine Abschätzung der maximal vorhandenen Konzentration in den Zellen getroffen werden. Für die untoxischen Dendrimere  $G_0(\text{Dap})_3$ ,  $G_1(\text{Dap})_6$  und  $G_1(\text{Asp})_6$  bei einer Mediumkonzentration von  $100\mu\text{M}$  lag diese unter  $20\mu\text{M}$  bzw. einem Anreicherungsgrad von 0,2. Bei  $G_0(\text{Asp})_3$  wurde die Ausgangsverbindung ebenfalls nicht nachgewiesen. Aber es wurde ein Peak mit höherer Mobilität als die der Ausgangsverbindung nachgewiesen. Dessen Migrationszeit ließ sich jedoch mit keinem vorhandenen Standard in Übereinstimmung bringen.

Gut quantifizierbare Peaks wurden lediglich nach Inkubation mit den Verbindungen  $G_0$ ,  $G_0(\text{Met})_3$  und  $G_0(\text{Phe})_3$  gefunden. Das überraschende Ergebnis war, dass für alle drei Substanzen ein Peak mit derselben Migrationszeit gefunden wurde (siehe Abb. 6.33). Dieser Peak komigrierte mit dem Standard für das Basisdendrimer  $G_0$ . Dieses Ergebnis sprach für einen schnellen Abbau entweder in den Zellen oder im Medium.



**Abb. 6.33** Elektropherogramme der SPE-Eluate der Zellaufnahmen von  $G_0$  (Elektropherogramm 2),  $G_0(\text{Met})_3$  (Elektropherogramm 3) und  $G_0(\text{Phe})_3$  (Elektropherogramm 4). Zum Vergleich sind SPE-Blindwert (Elektropherogramm 1) und ein  $G_0$ -Standard (20 $\mu\text{g/ml}$ ) (Elektropherogramm 5) dargestellt.

Setzte man die erhaltene Kernmolekülkonzentration im Zellinnern in Verhältnis zu der Außenkonzentration der jeweiligen Substanz, so erhielt man den besser zu vergleichenden Anreicherungsgrad, wie er in Kapitel 3.3 beschrieben ist (siehe Tab. 6.4).

eingesetzter Analyt	Anreicherungsgrad $G_0$
$G_0$	1,2 $\pm$ 0,1
$G_0(\text{Met})_3$	3,6 $\pm$ 0,2
$G_0(\text{Phe})_3$	9,6 $\pm$ 0,7

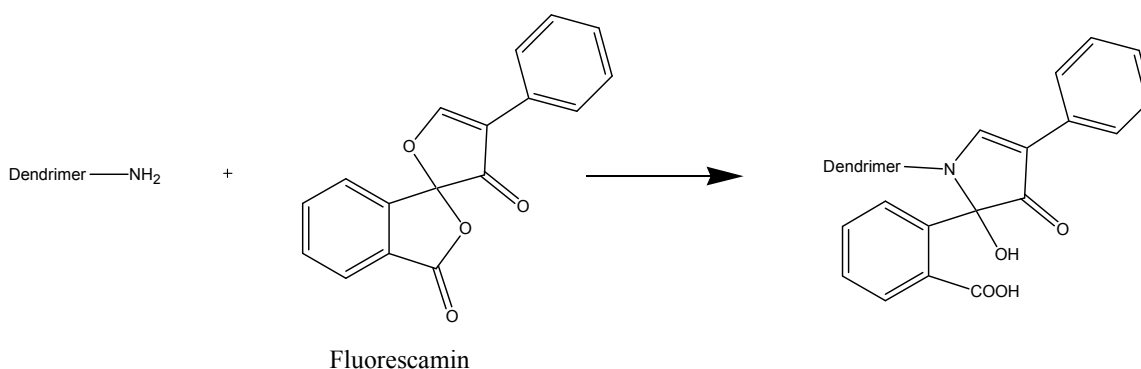
**Tab. 6.4** Anreicherungsgrade für  $G_0$  in MCF-7-Zellen bei Einsatz verschiedener Vorläufermoleküle im Medium (n=3)

Die in Tab. 6.4. aufgeführten Anreicherungsgrade zeigten, dass die Zellakkumulation stark von der Oberflächenmodifikation abhängig war (Phe $\gg$ Met $\gg$ unmodifiziert). Hierbei zeichnete sich eine Abhängigkeit von der Lipophilie der Modifikation ab, die aber weiterer Untersuchung bedarf. Diese Abhängigkeit fand sich auch in den Zytotoxizitätsdaten (siehe Kap. 6.2.1.1) wieder. So hemmte  $G_0(\text{Phe})_3$  die Zellproliferation der MCF-7-Zellen stark, während  $G_0$  und  $G_0(\text{Met})_3$  das Zellwachstum in den untersuchten Konzentrationen kaum beeinträchtigten.



Um auszuschließen, dass die Dendrimere möglicherweise im Medium durch extrazelluläre Proteasen abgebaut werden, wurde das über den Zellen stehende Inkubationsmedium nach 24h Inkubation untersucht. Hier waren zwar alle Abbauprodukte nachweisbar, aber die Ausgangsverbindung und das erste Hydrolyseprodukt bildeten die Hauptverbindungen. Das war neben der beschriebenen Abhängigkeit der Zellanreicherung von der Oberflächenmodifikation ein Indiz für die Zellaufnahme der Verbindungen als intakte Moleküle, die von den Proteasen im nativen Kontext sehr schnell umgesetzt wurden.

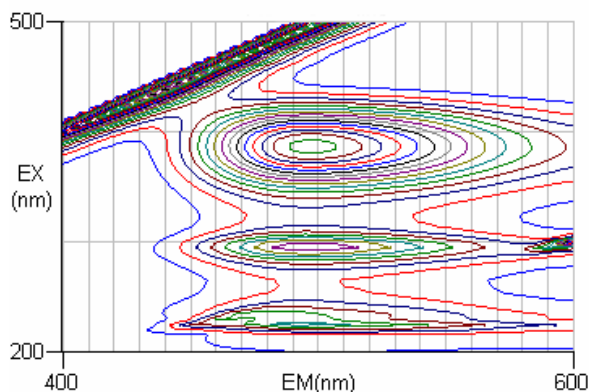
### 6.4.2 Bestimmung der Zellaufnahme nach Derivatisierung mit Fluorescamin



**Abb. 6.34** Reaktion von Fluorescamin mit Aminen<sup>[291]</sup>

Die schlechte Detektierbarkeit der nichtmarkierten Dendrimere in zellulären Systemen warf die Frage auf, ob eine Derivatisierung eine Verbesserung der Detektion bringt. Eine Derivatisierung der Amine macht die Verbindungen der Fluoreszenzdetektion zugänglich. Trotz fehlendem Fluoreszenzdetektor machte eine Fluoreszenzmarkierung Sinn, da eine massive Einführung von Chromophoren eine deutliche Verbesserung der Detektierbarkeit auch durch UV-Vis-Detektoren zur Folge hat. Die meisten Derivatisierungen führen zu ungeladenen Molekülen, die dann in der Kapillarelektrophorese im MEKC-Modus anhand ihrer Polarität getrennt werden. Um die Überlegenheit der Kapillarelektrophorese in der Dendrimeranalytik zu nutzen, sollte das Derivat ebenfalls eine Ladung tragen. Daher fiel die Wahl auf die Derivatisierung mit Fluorescamin, das im Basischen stabile Derivate mit primären Aminen bildet und deprotonierte Carboxylatgruppen trägt (siehe Abb. 6.34).<sup>[291,292]</sup> Das Fluorophor wird bei

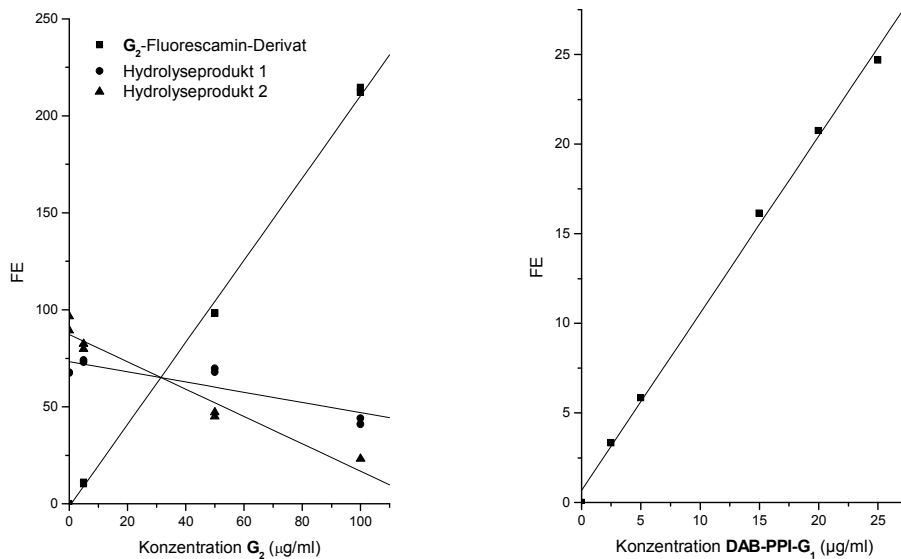
405nm (Nebenmaxima 210nm und 300nm) angeregt und emittiert bei 500nm (siehe Abb. 6.35). Durch die Derivatisierung werden zwei aromatische Systeme pro derivatisierten Amin in das Molekül eingebracht, die die vorhandene UV-Absorption noch deutlich verstärken sollten. Daneben macht diese Derivatisierung Dendrimere ohne chromophore Systeme der UV-Vis-Detektion erst zugänglich.



**Abb. 6.35** 3D-Fluoreszenzspektrum für das Fluorescamin-derivatisierte Dendrimer  $G_0$

Für die nach Derivatisierung resultierenden Carbonsäure-terminierten Dendrimere wurde ein System entwickelt, das ähnlich wie für die Trennung der Spaltprodukte der Standardproteinverdauung (siehe Kap. 6.1) aufgebaut war. Aufgrund der hohen Mobilität dieser Dendrimere musste die Ionenstärke des Puffers erniedrigt werden, um durch den höheren EOF akzeptable Analysenzeiten zu erreichen.

Es wurden Vorversuche zur Empfindlichkeit der Detektion nach der Derivatisierung von Dendrimeren durchgeführt. Dazu wurden Verdünnungsreihen verschiedener Dendrimere mit dem Reagenz umgesetzt. Es wurden für die Basisdendrimere  $G_0$  und  $G_2$  im Vergleich zur Bestimmung ohne Derivatisierung deutliche Steigerungen der Signalintensität beobachtet. So wurde die Steigung der Kalibriergeraden für das Kernmolekül  $G_0$  von 0,52 auf 1,97 um das vierfache erhöht. Dabei erniedrigte sich die Nachweisgrenze von 1,8  $\mu\text{g/ml}$  auf 0,6  $\mu\text{g/ml}$ . Ähnliches wurde für das  $G_2$  beobachtet (Steigung 1,95/Nachweisgrenze 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ). Für das **DAB-PPI- $G_1$**  Molekül, das keine Chromophore trägt, wurde ebenfalls eine Kalibriergerade mit ähnlicher Empfindlichkeit erhalten (Steigung 0,99/0,8  $\mu\text{g/ml}$  Nachweisgrenze)(siehe Abb. 6.36).



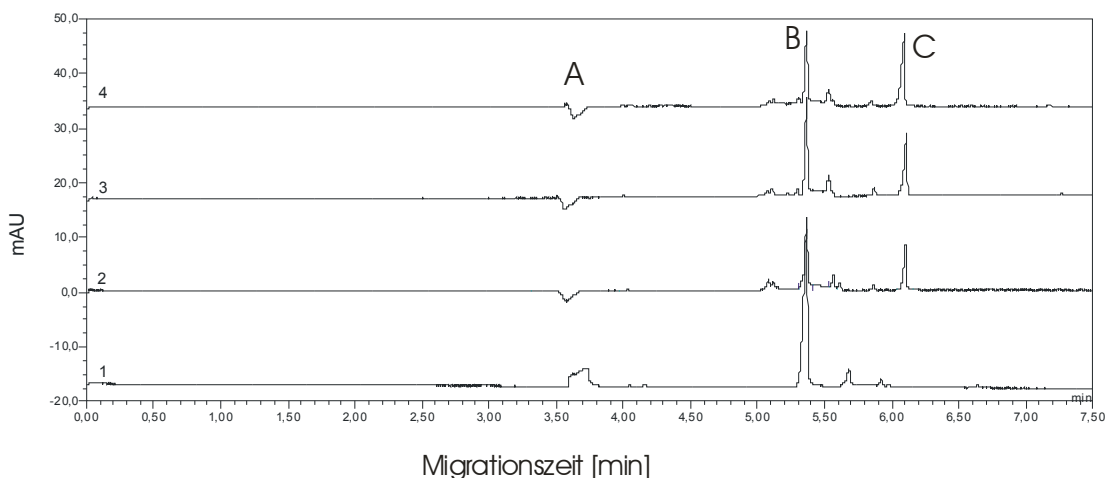
**Abb. 6.36** Kalibriergerade für das G<sub>2</sub>-Fluorescamin-Derivat und Abnahme der Hydrolysepeaks mit steigender Dendrimerkonzentration (links) und das DAB-PPI-G<sub>1</sub>-Fluorescamin-Derivat (rechts)

Zudem konnte die Derivatisierung gut mit den ebenfalls UV-aktiven Hydrolysepeaks des Fluorescamins kontrolliert werden, da diese nur beim ausreichenden Überschuss an Derivatisierungsreagenz vorhanden waren (siehe Abb. 6.36).

Im Folgenden sollte diese Methode genutzt werden, um die in Kapitel 6.4.1 erhaltenen Ergebnisse abzusichern. Bei einer Komigration in zwei grundsätzlich verschiedenen elektrophoretischen Systemen ist die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Komigration äußerst gering.

Als Vorversuch wurde geprüft, inwiefern koeluierende Amine aus den Zelllysaten und den Festphasenextraktionskartuschen die Detektion nach Derivatisierung behindern. Dazu wurde eine mit Zelllysate beladene Kartusche dem Aufarbeitungsprotokoll folgend behandelt, und das erhaltene Eluat derivatisiert und kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden neben den Hydrolyseprodukten des Fluorescamins (siehe Abb. 6.37) keine weiteren Peaks detektiert, so dass die Derivatisierung mit der Aufarbeitung kompatibel war.

Nach der Derivatisierung der SPE-Eluate wurden die kapillarelektrophoretische Auftrennung bzw. die Komigrationen vorgenommen. Die Quantifizierung ergab leicht erhöhte Dendrimergehalte in den Zellen gegenüber den vorher beschriebenen Versuchen. Das war auf die Flüchtigkeit des Methanols zurückzuführen, der zu 50% im Elutionsmittel der Festphasenkartuschen enthalten war. Die Komigration mit dem Kernmolekül  $G_0$  konnte für alle diskutierten Eluate gezeigt werden (siehe Abb. 6.37). Ein besonderes Problem war dagegen das **DAB-PPI- $G_1$** . Hier trat reproduzierbar unter Substanzeinwirkung eine Vielzahl von Peaks schwacher Intensität auf, die kaum quantifiziert werden konnten. Die Fläche des Peaks, der mit der Ausgangssubstanz komigrierte, ergab einen Anreicherungsgrad von 0,3.



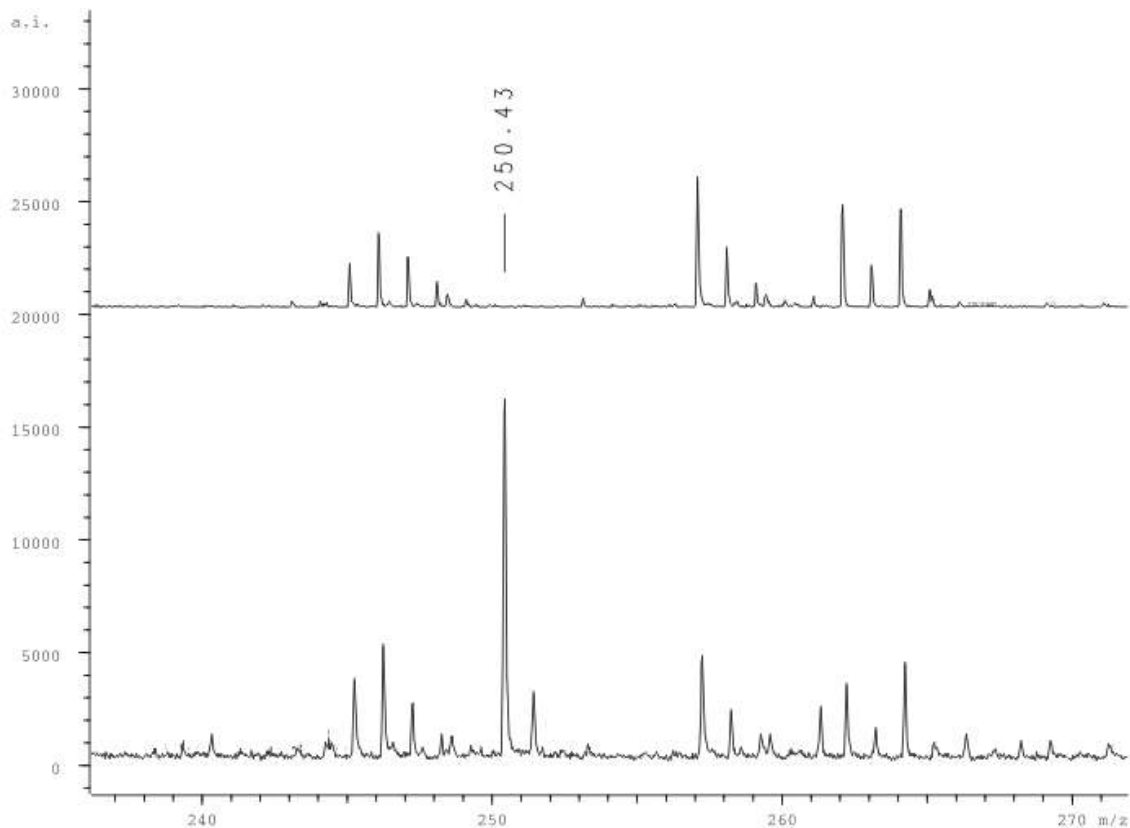
**Abb. 6.37** Derivatisierung von SPE-Eluaten mit Fluorescamin zur Absicherung der Zellaufnahme von  $G_0(\text{Phe})_3$  (Peak A EOF, Peak B Hydrolyseprodukt und Peak C  $G_0$ -Fluorescamin-Derivat): Elektropherogramm 1 SPE-Eluat Blindwert  
 Elektropherogramm 2 SPE-Eluat  $G_0(\text{Phe})_3$  Zellaufnahme  
 Elektropherogramm 3 Komigration SPE Eluat  $G_0(\text{Phe})_3$  Zellaufnahme mit  $G_0$ -Standard ( $10\mu\text{g/ml}$ )  
 Elektropherogramm 4  $G_0$ -Standard  $20\mu\text{g/ml}$

#### 6.4.3 Nachweis von Dendrimeren im Zellysat über MALDI-TOF

Die matrixunterstützte Laserdesorption/ionisation mit angeschlossenen Time-of-Flight-Massenanalysator (MALDI-TOF) ist in der Lage, große Moleküle, die nicht unzersetzt flüchtig sind, massenspektrometrisch zu vermessen. Dazu wird die Probe in eine Matrix eingebettet. Diese wird mit einem Laserpuls punktuell verdampft und reißt dabei die

Probenmoleküle mit. Die Ionisation, die einige Matrixmoleküle beim Verdampfen erfahren haben, wird auf die Analyten übertragen, so dass eine sehr schonende Ionisation erfolgt. Die hier erhaltenen Ionen werden in einen Massenanalysator nach ihrer Masse getrennt.<sup>[245]</sup> Diese Methode, die ursprünglich aus der Proteinanalytik stammt, ist sehr gut zur Charakterisierung der Dendrimeren geeignet.<sup>[129,183,244,282,285,287]</sup> Zum Nachweis von Dendrimeren aus komplexer Zellmatrix bzw. Festphaseneluaten wurde sie bisher noch nicht genutzt.

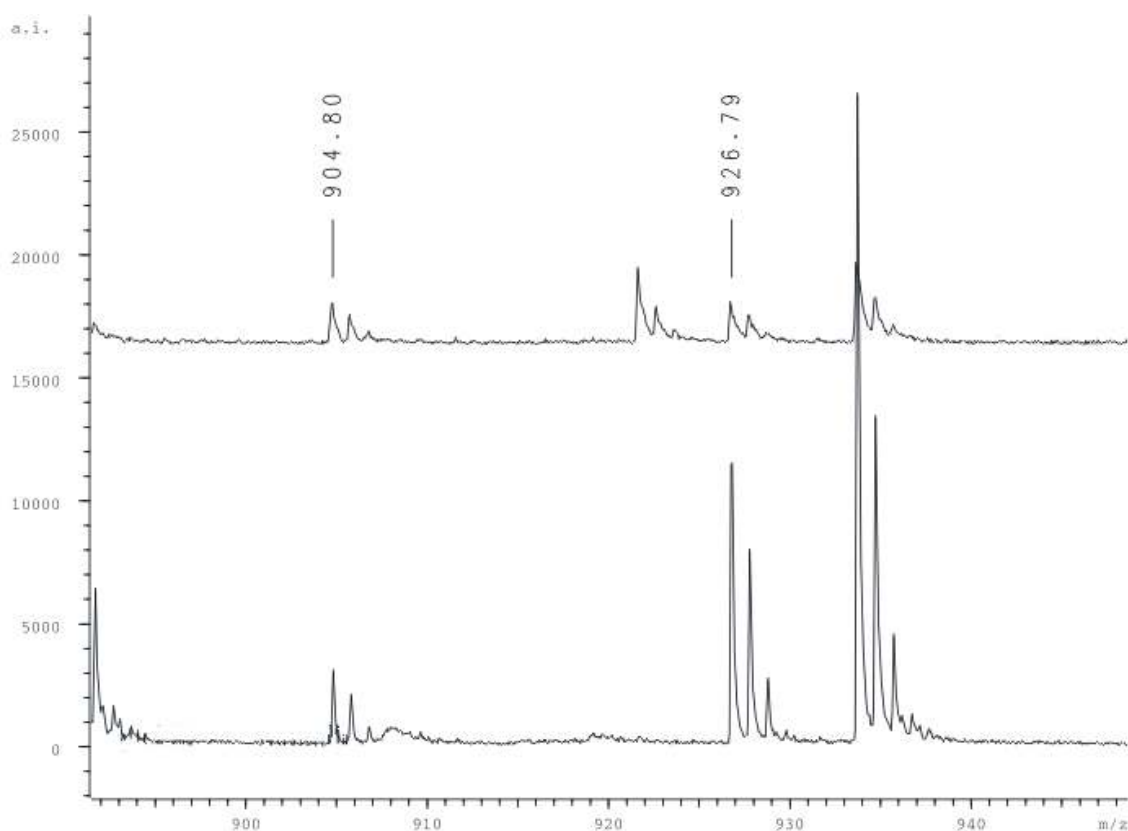
Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Massenspektrometrie auf der einen Seite den Befund der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zur proteolytischen Spaltung und der Zellaufnahme absichern und auf der anderen Seite als empfindlichere Arbeitsmethode zum Nachweis der Zellaufnahme von kapillarelektrophoretisch nicht erfassbaren Analyten dienen.



**Abb. 6.38** MALDI-TOF-Spektren eines SPE-Matrix-Blindwerts (oben) und einem SPE-Eluats der Zellaufnahme von  $G_0(\text{Phe})_3$  in MCF-7-Zellen. ( $[\text{G}_0+\text{H}]^+ = m/z 250,43$ )

In den SPE-Eluaten nach Inkubation mit  $G_0$ ,  $G_0(\text{Met})_3$  und  $G_0(\text{Phe})_3$  wurde die Masse des Basisdendrimers  $G_0$  sehr deutlich nachgewiesen (siehe Abb. 6.38). Lediglich für  $G_0(\text{Phe})_3$  konnte auch ein Nachweis der Ausgangsverbindung geführt werden.

Die elektrophoretisch nicht im Zelllysate nachzuweisenden Dendrimere  $G_0(\text{Asp})_3$  und  $G_0(\text{Dap})_3$  konnten auch massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Für das  $G_0(\text{Asp})_3$  wurde die Masse des potentiellen Abbauprodukts  $G_0(\text{Asp})_1$  und die Masse des Basisdendrimers  $G_0$  mit guter Intensität erhalten. Daneben konnten keine weiteren potentiellen Abbauprodukte gefunden werden.



**Abb. 6.39** MALDI-TOF-Spektren der Zellaufnahme von  $G_1$  (oben) und  $G_1(\text{Phe})_6$  (unten) in MCF-7-Zellen. ( $[G_1+H]^+ = m/z\ 904,8$  und  $[G_1+Na]^+ = m/z\ 926,79$ )

Für die elektrophoretisch aus den Zelllysaten nicht erfassbaren Verbindungen der ersten Generation konnten Aussagen zur Zellaufnahme und zum potentiellen Metabolismus nur über die Massenspektrometrie gemacht werden. Hierbei schienen die Trends, wie sie in der 0. Generation zu finden waren, ebenfalls gegeben zu sein. Das Basisdendrimer der

ersten Generation konnte gut nachgewiesen werden. Die Massen der Dendrimere **G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub>** und **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** wurden im Zelllysats nicht detektiert. Hier wurden nur das Basisdendrimer **G<sub>1</sub>** (siehe Abb. 6.39) und die mit einem Äquivalent der jeweiligen Aminosäure modifizierten Moleküle gefunden. Bei den Intensitäten (I) zeigte sich dieselbe Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation wie sie für die die Anreicherungsgrade der 0. Generation (siehe Tab. 6.4) erhalten wurde:

$$I(\mathbf{G}_1) < I(\mathbf{G}_1(\mathbf{Met})_6) < I(\mathbf{G}_1(\mathbf{Phe})_6).$$

Hierbei konnten die Intensitäten nicht als absolute Gehalte interpretiert werden. Die Proben wurden zwar an einem Tag nach dem gleichen Protokoll gemessen, aber die Probenzusammensetzung hat einen großen Einfluss auf die Kristallisation. So störten Polyethylenglykol-Gehalte die Kristallisation der Matrix auf dem Probenträger und damit auch die Ionisation der Probe. Da das zur Zellhomogenisation verwendete Detergenz Triton-X-100 diese Struktur enthält, war der Gehalt davon in der Probe nicht zu vernachlässigen. Die Elution des Triton-X-100 von den SPE-Kartuschen erfolgte sehr massiv ab einem Methanol-Gehalt von 80%. Dieser Gehalt wurde bei den Verbindungen **G<sub>1</sub>(Met)<sub>6</sub>** und **G<sub>1</sub>(Phe)<sub>6</sub>** deutlich überschritten, so dass man für diese beiden Verbindungen bei der massenspektrometrischen Messung von einer Signalreduktion ausgehen musste. Wenn man dazu noch die Wiederfindungen (siehe Tab. 6.3), die allerdings ohne Matrix erhalten wurden, mit einrechnet, wurde die oben diskutierte Tendenz der Abhängigkeit der Zellaufnahme von der Oberflächenmodifikation zusätzlich deutlich gestärkt.

Für die Verbindungen **G<sub>1</sub>(Asp)<sub>6</sub>** und **G<sub>1</sub>(Dap)<sub>6</sub>** konnte keine Spezies im Zelllysats nachgewiesen werden. Wie schon bei den Verbindungen der G<sub>0</sub>-Reihe korrelierte die geringe Zellaufnahme mit den Chemosensitivitätsdaten (siehe Kap. 6.2.1.1.2.1), bei denen beide Verbindungen keine toxische Aktivität zeigten.

Als weitere Korrelation sah man mit steigender Generation eine sinkende Zellaufnahme. Ließen sich die Moleküle der G<sub>0</sub>-Reihe teilweise noch kapillarelektrophoretisch gut im Zelllysats bestimmen, so gelang der Nachweis der Zellaufnahme bei der G<sub>1</sub>-Reihe nur noch teilweise mittels MALDI-TOF. Für das Molekül **G<sub>2</sub>** konnte noch nicht einmal der

massenspektrometrische Nachweis aus dem Zelllysate erhalten werden. Dieser Trend war entgegengesetzt der Zytotoxizität, die in dieser Reihe stieg (siehe Kap. 6.2.1.1.1.1).