

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

DISSERTATION

**Vergleichende Untersuchungen zur Proliferationshemmung
ausgewählter Tumorzelllinien durch Fluorouracil-Essigsäure in
verschiedenen Darreichungsformen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Jan Koziol

aus Wolfsburg

Gutachter/in: 1. N.N.

2. N.N.

3. N.N.

Datum der Promotion: 04.09.2015

Widmung

Meiner Familie & meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

Widmung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Krebs – Einführung in Karzinogenese und Epidemiologie.....	1
1.2 Therapeutische Konzepte bei Tumorerkrankungen.....	2
1.3 Chemotherapie.....	3
1.4 5-Fluorouracil (5-FU).....	6
1.4.1 Wirkmechanismus, Nebenwirkungen sowie pharmakologische Aspekte von 5-FU.....	7
1.4.2 Capecitabin – ein oral applizierbares 5-FU-Derivat.....	9
1.4.3 Resistenzen gegen die Wirksamkeit von 5-FU.....	9
1.5 Gezielte Zytostatikatherapie von Tumoren (Targeted drug delivery to tumors).....	10
1.6 Albumin als Carrier-Molekül.....	11
1.7 Aufgabenstellung.....	15
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien.....	16
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.3 Zelllinien.....	18
2.1.3.1 MDA-MB-231.....	18
2.1.3.2 T-47D.....	19
2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Wirkstoffherstellung.....	21
2.2.1.1 Synthese von Fluorouracil-Essigsäure (FUAc) aus 5-Fluorouracil.....	22
2.2.1.2 Kopplung von FUAc an bovines Serumalbumin (BSA).....	23
2.2.2 Zellkulturbedingungen.....	25
2.2.3 Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Test.....	26
2.2.3.1 Wirksamkeitsuntersuchungen von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA mittels MTT-Test.....	26
2.2.3.2 Allgemeine Bemerkung zur Auswertung des MTT-Tests.....	27
2.2.3.3 Einfluss einer pH-Wert-Änderung durch FUAc auf den MTT-Test.....	28

2.2.4	Zellzählung nach Trypanblaufärbung	29
2.2.5	Kernresonanzspektroskopie	30
2.2.6	Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation – Time-of-Flight (MALDI-ToF)	32
2.2.7	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	34
2.2.8	Verwendete Software und statistische Tests	36
3	Ergebnisse	37
3.1	NMR-Spektroskopie von FUAc synthetisiert aus 5-FU	37
3.1.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	37
3.1.2	¹³ C-NMR-Spektroskopie	39
3.2	MALDI-ToF-Messung von FUAc-BSA synthetisiert aus FUAc	41
3.3	Zellkulturversuche	44
3.3.1	Zelllinie MDA-MB-231	44
3.3.1.1	MTT-Tests	44
3.3.1.2	Zeitlicher Verlauf des Tumorzellwachstums	49
3.3.1.3	IC ₅₀ -Werte	50
3.3.1.4	Zellzählung nach Trypanblaufärbung	50
3.3.2	Zelllinie T-47D	52
3.3.2.1	MTT-Test	52
3.3.2.2	Zeitliche Darstellung des Tumorzellwachstums	56
3.3.2.3	IC ₅₀ -Werte	57
3.3.2.4	Zellzählung nach Trypanblaufärbung	58
3.4	Einfluss des pH-Wertes auf die MTT-Ergebnisse der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D	59
3.5	CLSM-Studien	60
4	Diskussion	63
4.1	Umwandlung von 5-FU in FUAc-BSA	63
4.1.1	Umwandlung von 5-FU in FUAc	64
4.1.1.1	Interpretation der Resultate der ¹ H-NMR-Spektroskopie	64
4.1.1.2	Interpretation der Resultate der ¹³ C-NMR-Spektroskopie	64
4.1.2	Kopplung von FUAc an BSA	65
4.1.2.1	MALDI-ToF Resultate von BSA	65
4.1.2.2	MALDI-ToF Resultate von FUAc-BSA	66
4.1.3	Genauere Betrachtung der Beladungsrate von BSA mit FUAc-Molekülen	66
4.1.4	Unterschiede zwischen BSA und HSA	67
4.1.5	Vor- und Nachteile von BSA als Carrier im Vergleich zu anderen Carrier-Molekülen	68
4.1.5.1	Liposomen	68
4.1.5.2	Nanopartikel	68
4.1.5.3	Erythrozyten	69
4.1.5.4	Polymere	69
4.2	Effekte von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA auf die Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D im MTT-Test	70
4.2.1	Effekte von 5-FU	70
4.2.2	Effekte von FUAc	71
4.2.3	Effekte von FUAc-BSA und BSA	74
4.3	Ergebnisse der Zellzählung im Vergleich zum MTT-Test	77
4.4	Methodenkritik	81
4.5	Pharmakologische Aspekte von FUAc-BSA	82
4.5.1	Applikation und Stabilität von FUAc-BSA	82

4.5.2	Der Weg zu den Tumorzellen sowie die Halbwertszeit und mögliche Strukturveränderungen von FUAc-BSA.....	83
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	86
5	Zusammenfassung.....	89
6	Literaturverzeichnis.....	90
7	Anhang.....	101
7.1	¹⁹ F-NMR-Spektroskopie von FUAc.....	101
7.2	p-Werte für Zelllinie MDA-MB-231	102
7.3	p-Werte für Zelllinie T-47D.....	104
7.4	Resultate der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	106
	Eidesstattliche Versicherung.....	107
	Curriculum vitae.....	108
	Publikationsliste.....	109
	Danksagung.....	110

Zusammenfassung

Einleitung: 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Zytostatikum, das in der Klinik z.B. für die Therapie des Mamma- bzw. des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Die Nebenwirkungen, die es bei Patienten verursacht (z.B. Hand-Fuß-Syndrom, etc.), und lange Applikationszeiten, die aufgrund einer kurzen Plasma- $t_{1/2}$ notwendig sind, bedeuten allerdings erhebliche Nachteile. Die genannten Schwächen der Therapie mit 5-FU könnten vermutlich mit Hilfe eines passenden Carriers behoben werden. Albumin bietet sich als Transportmolekül an, weil es über eine lange Plasma- $t_{1/2}$ von ungefähr 19 Tagen verfügt und darüber hinaus gezeigt wurde, dass Tumorzellen Albumin endozytieren und im Intrazellulärraum durch lysosomale Enzyme abbauen.

Methodik: Zunächst wurde 5-FU modifiziert, indem am N¹-Atom des Uracil-Ringes eine Methyl-Carboxyl-Gruppe gebunden wurde. Das Reaktionsprodukt (FUAc) wurde im nächsten Schritt mit Hilfe der Carbodiimid-Methode kovalent an die Modellsubstanz BSA gekoppelt, so dass FUAc-BSA entstand. Der Syntheserfolg wurde mittels ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie sowie MALDI-ToF untersucht. MTT-Tests, Zellzählungstests und CLSM-Studien wurden mit Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D durchgeführt, um das zytostatische Potential und die zelluläre Aufnahme von FUAc-BSA einzuschätzen.

Ergebnisse: Die molare Masse von FUAc-BSA (68.508 Da) war im Vergleich zu BSA (66.306 Da) um ca. 2.200 Da gesteigert, was einer Kopplung von durchschnittlich 12 Molekülen FUAc je BSA-Molekül entspricht. Sowohl die Resultate des MTT-Tests als auch des Zellzählungstests lassen erkennen, dass die Proliferationshemmung bei mABP-exprimierenden Zellen (T-47D) durch FUAc-BSA der durch 5-FU ähnelt. Für Zellen der Linie MDA-MB-231 (keine mABP-Expression) ist ein schwächerer zytostatischer Einfluss feststellbar. Die Resultate deuten an, dass mABP eine wichtige Rolle für die Wirkung albuminbasierter Zytostatika spielen könnte. Für FUAc war im MTT-Test bei beiden Zelllinien eine Überbestimmung der Zellvitalität gegenüber dem Zellzählungstest feststellbar. Diese Beobachtung kann unter der Annahme einer intrazellulären Spaltung von FUAc in 5-FU und Acetat, mit der anschließenden Aktivierung des Citratzyklus, begründet werden.

Schlussfolgerung: FUAc-BSA würde im klinischen Einsatz voraussichtlich gewisse Vorteile gegenüber 5-FU aufweisen, wie eine längere Plasma- $t_{1/2}$ und eine spezifische Aufnahme durch Tumorzellen bei vergleichbarer Wirksamkeit. Eine Untersuchung auf die Expression von mABP könnte ausschlaggebend für eine wirksame Behandlung mit albuminbasierten Zytostatika sein.

Abstract

Introduction: 5-Fluorouracil (5-FU) is a clinically well-established anti-cancer drug used for the treatment of many cancer types, such as breast and colorectal cancer. However, adverse effects (e.g. myelosuppression) and long administration periods due to its short blood plasma half-life (plasma- $t_{1/2}$) are substantial disadvantages of its application. By coupling 5-FU or a 5-FU adduct to a carrier-molecule it might be possible to overcome these disadvantages. A favorable drug-carrier characteristic is a long intravascular circulation time and additionally a high affinity of tumor cells to the carrier. Albumin meets those requirements, as it has a plasma- $t_{1/2}$ of approximately 19 days. Moreover, tumor cells endocytose albumin and degrade the protein in the intracellular space by lysosomal proteolysis.

Methods: First 5-FU was modified by coupling an acetic acid at its N¹-ring atom, the resulting adduct (FUAc) was bound covalently to a carrier molecule (bovine serum albumin, BSA (as model substance)) via carbodiimide coupling, and FUAc-BSA was obtained. The synthesis success was confirmed by ¹H-, ¹³C- and ¹⁹F-NMR-spectrometry as well as MALDI-ToF. MTT-assays and cell counting assays as well as CLSM studies with breast cancer cell lines T-47D and MDA-MB-231 were performed to evaluate the cytostatic potential and uptake of FUAc-BSA.

Results: The molar mass of FUAc-BSA (68,508 Da) was increased by about 2,200 Da compared to pure BSA (66,306 Da), which corresponds to the binding of 12 molecules FUAc per BSA molecule. The MTT-results as well as cell counting results demonstrate that the proliferation inhibition of membrane albumin-binding protein (mABP)-expressing T-47D cells by FUAc-BSA is similar to that of 5-FU and only moderate for MDA-MB-231 cells that lack such expression. That indicates that mABP might play an important role for albumin-based drug delivery. When adding FUAc an overestimation of cell vitality in MTT-assays compared to cell counting was found in both cell lines, which could be explained assuming an intracellular conversion from FUAc to 5-FU and acetate combined with resulting activation of the citric-acid cycle.

Conclusion: FUAc-BSA might probably have many clinical advantages in comparison to 5-FU, such as reduced adverse effects due to specific uptake by tumor cells, a prolonged plasma- $t_{1/2}$ and similar effectiveness. Further evaluation is necessary, but testing the tumorous expression of mABP could be crucial for successful treatment of patients with albumin-coupled drugs.

Abkürzungsverzeichnis

*	Zeichen für statistische Signifikanz
[BSA + H] ⁺	Einfach ionisiertes BSA-Molekül bei MALDI-ToF
[BSA + 2H] ²⁺	Zweifach ionisiertes BSA-Molekül bei MALDI-ToF
[FUAc-BSA + H] ⁺	Einfach ionisiertes FUAc-BSA-Molekül bei MALDI-ToF
[FUAc-BSA + 2H] ²⁺	Zweifach ionisiertes FUAc-BSA-Molekül bei MALDI-ToF
°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
A	
a.u.	arbitrary unit, engl. für „willkürliche Einheit“
AFL	5-Aminofluorescein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
B	
BCL 2	B-Cell Lymphoma 2, ein anti-apoptotisch wirkendes Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
C	
c	Stoffmengenkonzentration [M]
ca.	circa
CD-Spektroskopie	Zirkulardichroismus-Spektroskopie
cm ²	Quadratcentimeter
CMF-Schema	Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil
CoA	Coenzym A
CTL	Wachstumskontrolle
D	
δ	chemische Verschiebung bei der NMR-Spektroskopie
Da	Dalton
DHAP	2',6'-Dihydroxyacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuteriertes DMSO
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
dTMP	Desoxythymidin-Monophosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUMP	Desoxyuridin-Monophosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
E	
<i>E</i>	Formelzeichen für Energie [J]
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR-Effekt	enhanced permeability and retention effect
etc.	Et cetera
F	
<i>f</i>	Formelzeichen für Frequenz [Hz]
FdUMP	Fluor-Desoxyuridin-Monophosphat
FdUTP	Fluor-Desoxyuridin-Triphosphat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-BSA	Fluoresceinisothiocyanat-BSA
FKS	fetales Kälberserum
FOLFIRI-Schema	Polychemotherapie mit Folinsäure, 5-Fluorouracil und Irinotecan
FOLFOX-Schema	Polychemotherapie mit Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin
FUAc	Fluoruracilelessigsäure

F	
FUAc-BSA	albumingebundenes FUAc
FUTP	Fluor-Uridin-Triphosphat
G	
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
gp60	Glykoprotein 60
H	
h	Stunde(n)
<i>h</i>	Formelzeichen für das Planck'sche Wirkungsquantum [J*s]
HES	Hydroxyethylstärke
HSA	Humanes Serumalbumin
Hz	Hertz
I	
i.v.	intravenös
J	
J	Joule
<i>J</i>	Zeichen für die Kopplungskonstante bei der NMR-Spektroskopie [Hz]
K	
k	Kilo- (10 ³)
L	
λ	Wellenlänge [nm]
L	Liter
M	
mABP	Membranständiges albuminbindendes Protein
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionisation
m	Meter
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute(n)
MMS	Monozyten-Makrophagen-Systeme
mmol	Millimol
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
MTX-HSA	Methotrexat – humanes Serumalbumin
MW	Molekulargewicht [Da]
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
N	
N	Anzahl der Messwerte
$N_{\text{FUAc-BSA}}$	Anzahl an gekoppelten FUAc-Molekülen je BSA-Molekül
n	Stoffmenge [mol]
nab-Paclitaxel	Nano-Albuminpartikel gebundenes Paclitaxel
NAD ⁺	Oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ns	Nicht signifikant

P

p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
Plasma- $t_{1/2}$	Plasmahalbwertszeit
ppm	parts per million

R

RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RSA	Rat serum albumin
RT	Raumtemperatur [°C]

S

s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPARC	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine

T

$t_{1/2}$	Halbwertszeit
ToF	Time of flight
TS	Thymidilat-Synthase

V

VEGF	vascular endothelial growth factor
------	------------------------------------

W

w/v	weight per volume
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf des Zellzyklus.....	4
Abbildung 2: Strukturformeln von 5-FU (links) und Uracil (rechts).....	6
Abbildung 3: Dreidimensionale, verwundene Struktur von HSA mit vielen alpha-Helices	12
Abbildung 4: Herstellungsprozess von FUAc-BSA.....	21
Abbildung 5: Umwandlung von 5-FU zu FUAc nach Tada.	22
Abbildung 6: Übersicht über die Carbodiimid-Kopplung.....	24
Abbildung 7: Reduktion vom gelben MTT zum blauen Formazan	26
Abbildung 8: Zählkammer Neubauer-improved	30
Abbildung 9: Übersicht über den MALDI-ToF-Aufbau.....	33
Abbildung 10: Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM).....	34
Abbildung 11: Entstehung der orthogonalen CLSM-Bilder	35
Abbildung 12: ¹ H-NMR-Spektrum von FUAc in DMSO- <i>d</i> ₆	38
Abbildung 13: ¹³ C-NMR-Spektrum von FUAc in DMSO- <i>d</i> ₆	40
Abbildung 14: MALDI-ToF-Messung von BSA.	41
Abbildung 15: MALDI-ToF-Messung für FUAc-BSA	42
Abbildung 16: Vergleich der MALDI-ToF-Ergebnisse von BSA und FUAc-BSA	43
Abbildung 17: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 24 h	45
Abbildung 18: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 48 h.	46
Abbildung 19: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 72 h	47
Abbildung 20: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 96 h	48
Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf des Tumorzellwachstums der Zelllinie MDA-MB-231	49
Abbildung 22: Methodenvergleich für Zelllinie MDA-MB-231	51
Abbildung 23: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 24 h.....	53

Abbildung 24: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 48 h.....	54
Abbildung 25: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 72 h.....	55
Abbildung 26: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 96 h.....	56
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf des Tumorzellwachstums der Zelllinie T-47D.....	57
Abbildung 28: Methodenvergleich für Zelllinie T-47D.....	59
Abbildung 29: Einfluss des pH-Wertes auf den MTT-Test	60
Abbildung 30: CLSM-Bild von T-47D-Zellen nach 72 h Kultivierdauer	61
Abbildung 31: CLSM-Bild von MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Kultivierdauer.....	62
Abbildung 32: Strukturformeln von Orotsäure und FUAc im Vergleich	72
Abbildung 33: Identitätsdiagramme von Zellkulturergebnissen.....	78
Abbildung 34: ^{19}F -NMR-Spektrum von FUAc in $\text{DMSO-}d_6$	101
Abbildung 35: Zirkulardichroismus-Spektroskopie von BSA und FUAc-BSA	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Darstellung der Zytostatika.	5
Tabelle 2: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	16
Tabelle 3: Verwendete Substanzen	17
Tabelle 4: Übersicht über die Rezeptoren der verwendeten Tumorzelllinien.....	19
Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 6: Übersicht über die benötigten Substanzen für die FUAc-BSA-Synthese.....	25
Tabelle 7: Berechnete IC ₅₀ -Werte bei der Zelllinie MDA-MB-231.	50
Tabelle 8: Berechnete IC ₅₀ -Werte bei der Zelllinie T-47D.....	58
Tabelle 9: Berechnete IC ₅₀ -Werte von 5-FU im Vergleich zur Literatur	71
Tabelle 10: IC ₅₀ -Werte von FUAc im Vergleich zur Literatur	73
Tabelle 11: IC ₅₀ -Werte von FUAc-BSA im Vergleich	74
Tabelle 12: SPARC- bzw. mABP-Expression der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D.....	76
Tabelle 13: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 24 h-Ergebnissen der MDA-MB-231-Zellen.	102
Tabelle 14: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 48 h-Ergebnissen der MDA-MB-231-Zellen.	102
Tabelle 15: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 72 h-Ergebnissen der MDA-MB-231-Zellen.	103
Tabelle 16: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 96 h-Ergebnissen der MDA-MB-231-Zellen.	103
Tabelle 17: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 24 h-Ergebnissen der T-47D-Zellen.	104
Tabelle 18: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 48 h-Ergebnissen der T-47D-Zellen.	104
Tabelle 19: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 72 h-Ergebnissen der T-47D-Zellen.	105
Tabelle 20: MTT-Test: Berechnete p-Werte aus 96 h-Ergebnissen der T-47D-Zellen.	105

1 Einleitung

1.1 Krebs – Einführung in Karzinogenese und Epidemiologie

Die ersten Überlieferungen von der Krankheit, die wir in der heutigen Zeit als „Krebs“ bezeichnen, reichen mehrere tausend Jahre zurück. Möglicherweise hat der ägyptische Arzt Imhotep, der ca. 2625 v. Chr. lebte, bereits den ersten Fall eines Mammakarzinoms dokumentiert, als er von einer „geschwollenen Masse in der Brust“ bei einer seiner Patientinnen berichtete [1]. Das Wort „Krebs“ als Bezeichnung einer Krankheit wurde allerdings erst mehr als zwei Jahrtausende später von Claudius Galenus (129 – 216 n. Chr.) verwendet. Er war ein einflussreicher griechischer Arzt, der nach Rom auswanderte, um dort Patienten zu behandeln. Claudius Galenus beschrieb das Aussehen eines Tumors als einen thronenden Krebspanzer, der umgeben von Blutgefäßen war, die von außen auf diesen zuliefen. Die Adern erinnerten ihn an die Beine und die Scheren eines Krebses. Der Begriff „Krebs“ war geboren und hält sich bis heute [1,2].

Von der damaligen Zeit der ersten Beschreibungen von bösartigen Krebserkrankungen bis in die heutige hat die Forschung viel zum Verständnis der Karzinogenese beigetragen. Die vielleicht interessanteste Erkenntnis scheint zu sein, dass für die Entstehung von Malignomen Zellen des menschlichen Organismus verantwortlich sind, die sich durch Transformation zu malignen Zellen wandeln [3]. Insbesondere die Transformation epithelialer Zellen aus Lunge, Brust, Pankreas, Prostata und Ovar ist für viele Tumorerkrankungen verantwortlich [4]. Es handelt sich bei der Transformation um einen mehrstufigen Prozess, bei dem Tumorsuppressorgene bzw. Protoonkogene mutieren und in der Folge ihre Funktion verlieren bzw. einen Funktionsgewinn erhalten [3]. Aus molekularbiologischer Sichtweise benötigt die erwähnte Transformation die Akkumulation mehrerer Mutationen in der DNA, bevor Malignome entstehen. Mutationen an bestimmten Genen führen schließlich zu spezifischen Charakteristiken, die Krebszellen von nicht-malignen Zellen unterscheiden [3,5]. Dabei handelt es sich um:

- Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmender Signale
- Umgehung der Apoptose
- Unbegrenzt Zellteilungspotential
- Fähigkeit zur Induktion von Angiogenese
- Invasion in andere Gewebe und Bildung von Metastasen

- Veränderung des Zellmetabolismus
- Umgehung des Immunsystems

Insbesondere die Bildung von Metastasen durch maligne Zellen, die aus einem Primärtumor in andere Gewebe des menschlichen Organismus wandern, ist für ca. 90 % der Sterblichkeit durch Malignome verantwortlich [3]. Statistisch betrachtet waren Krebserkrankungen laut der World Health Organization (WHO) die Ursache für ca. 7,6 Millionen Tode weltweit im Jahr 2008. Hochrechnungen seitens der WHO schätzen, dass die Zahl der Krebstoten in Zukunft ansteigt und im Jahr 2030 ca. 13,1 Millionen betragen wird [6]. Alleine in den USA werden im Jahr 2013 nach Statistiken der American Cancer Society bei ca. 1,6 Millionen Menschen neue Fälle von Krebserkrankungen erwartet [7]. In der Statistik der Todesursachen rangierten die Krebserkrankungen im Jahr 2010 auf dem zweiten Platz hinter den kardiovaskulären Krankheiten [8]. Für Deutschland zeichnet sich ein ähnliches Bild ab wie in den USA. Auch hier stehen die Neubildungen in der Todesursachenstatistik auf dem zweiten Platz direkt hinter den Krankheiten des Kreislaufsystems. In Deutschland starben im Jahr 2011 insgesamt ca. 228.000 Menschen an Malignomen [9].

Anhand der genannten Zahlen offenbart sich folgendes Bild: Einerseits zählen bösartige Tumorerkrankungen zu den Krankheiten, die in den USA, Deutschland und weltweit bei Millionen von Menschen auftreten. Andererseits sterben trotz der intensiven Bemühungen der Forschung immer noch jedes Jahr viele Menschen an Krebs. Insofern erscheint es sinnvoll, einen Blick auf die therapeutischen Möglichkeiten der Humanmedizin zur Behandlung von Malignomen zu werfen.

1.2 Therapeutische Konzepte bei Tumorerkrankungen

Die Therapie von Tumoren basiert im Wesentlichen auf drei Säulen [10]:

- Chirurgische Resektion eines Tumors
- Radioonkologie
- Chemotherapie

Die Chemotherapie ist als Therapiekonzept von besonderer Bedeutung, wenn es um die Behandlung von Metastasen und Tumorrezidiven geht [10]. Im Folgenden wird deshalb näher auf die Chemotherapie eingegangen.

1.3 Chemotherapie

Die Chemotherapie kann in Abhängigkeit vom Tumor und dem Stadium der Krebserkrankung für verschiedene Ziele der Tumorthherapie eingesetzt werden. Es wird zwischen folgenden Ansätzen unterschieden:

- Adjuvante Chemotherapie, um nach einer chirurgischen Resektion möglicherweise verbliebene Tumorzellen zu eliminieren [10],
- neoadjuvante Chemotherapie, um ein sogenanntes Down-Staging zu erreichen und somit die Größe eines Tumors vor einer chirurgischen Resektion zu verringern [10].

Schließlich wird noch unterschieden zwischen:

- Einer kurativen Therapie mit dem Ziel der Genesung des Patienten und
- einem palliativen Ansatz, der Teilremissionen oder eine Verlängerung der Lebenszeit erreichen möchte [10].

Das Ziel der Chemotherapie, die folgend als Chemotherapeutika bzw. synonym als Zytostatika bezeichnet werden, ist demnach, im Idealfall, die vollständige Elimination von Tumorzellen [11]. Die Bezeichnung „Zytostatika“ beschreibt allerdings nicht das gesamte Wirkspektrum. Die verwendeten Substanzen wirken nicht nur zytostatisch, also das Zellwachstum hemmend, sondern in den meisten Fällen ebenso zytotoxisch, also zelltötend [10].

Tumorzellen unterscheiden sich von den gesunden Zellen des Körpers vor allem durch die ungehemmte Teilung der Zellen. Die Wirkung der Chemotherapeutika setzt an diesem Punkt der ungehemmten Zellproliferation seitens der Tumorzellen an. Bei der Proliferation durchlaufen Zellen den Zellzyklus, der sich in verschiedene Phasen aufteilt (siehe Abbildung 1).

In der G_1 -Phase wächst die Zelle und bereitet sich auf die anschließende S-Phase vor, in der die DNA-Replikation stattfindet. Danach folgen die G_2 -Phase, in der Enzyme und Strukturproteine synthetisiert werden, und die M-Phase, in der die eigentliche Zellteilung stattfindet. Anschließend beginnt der Zyklus wieder mit der G_1 -Phase. Zusätzlich gibt es noch eine Phase, in der sich ruhende Zellen befinden. Sie wird G_0 -Phase genannt. Zellen können nach der M-Phase entweder erneut direkt in die G_1 -Phase gelangen oder in die G_0 -Phase. Um zu proliferieren, müssen die Zellen jedoch aus der G_0 -Phase in den Zellzyklus zurückkehren [10–12].

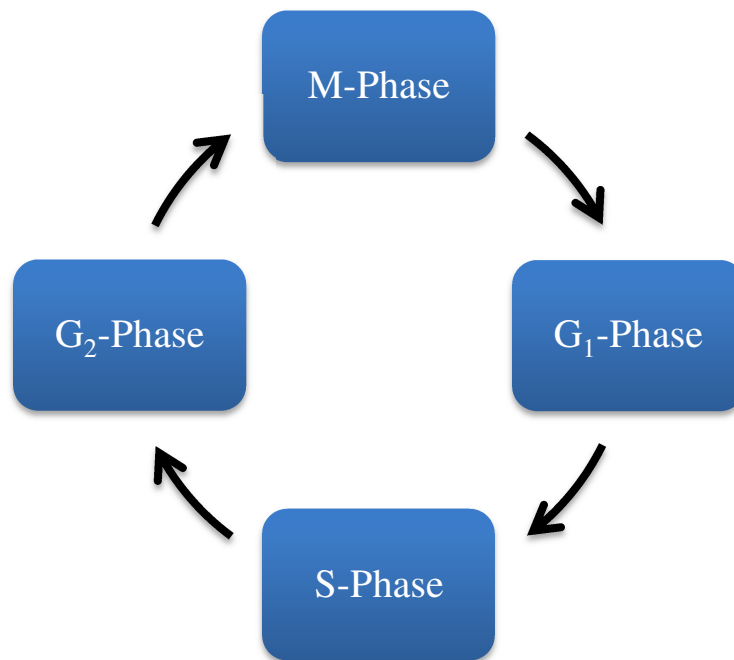


Abbildung 1: Schematischer Ablauf des Zellzyklus. Nicht dargestellt sind die Kontrollpunkte des Zellzyklus, die beim Übergang von G₁- zur S-Phase und von S- zu G₂-Phase zu finden sind. Außerdem könnten die Zellen nach der M-Phase in eine G₀-Phase übertreten, in der die Zellen ruhen.

Bei den Chemotherapeutika wird zwischen phasenspezifischen und phasenunspezifischen Zytostatika unterschieden. Die phasenspezifischen Zytostatika wirken nur in einzelnen Phasen des Zellzyklus, nicht aber über die gesamte Dauer der Zellteilung. Phasenspezifische Chemotherapeutika erzielen deshalb die besten Effekte auf maligne Zellen mit hoher Teilungsrate, denn bei einer hohen Proliferationsrate durchlaufen viele Tumorzellen gleichzeitig den Zellzyklus. Das bedeutet, dass sich ein verhältnismäßig größerer Anteil der Krebszellen in einer Zellzyklusphase befindet, in der das verwendete Zytostatikum wirksam ist. Bei malignen Zellen mit langsamer Teilungsrate hingegen ist der Anteil an Krebszellen, die sich in einer zytostatikawirksamen Zellzyklusphase befinden, geringer und ein phasenspezifisches Chemotherapeutikum dadurch weniger wirksam [10]. Deshalb ist die Dauer einer Therapie mit phasenspezifischen Zytostatika für den Erfolg entscheidender als die Konzentration des Zytostatikums [11]. Die phasenunspezifischen Zytostatika hingegen sind unabhängig von der Phase des Zellzyklus wirksam [11].

Die Gabe von Zytostatika bewirkt bei den Tumorzellen einen sogenannten „fractional-cell-kill“. Das bedeutet, ein bestimmtes Chemotherapeutikum tötet bei gleichbleibender Dosis eine konstante Fraktion, von z.B. 90 % der Tumorzellen, ab. Werden mehrere Zytostatika miteinander kombiniert gegeben (Polychemotherapie), erreicht man einen gesteigerten Anteil getöteter Krebszellen, da die Zytostatika an unterschiedlichen Stellen des Zellmetabolismus angreifen. Die Chemotherapie wird in mehreren Therapiezyklen verabreicht, damit bei jedem Zyklus ein kon-

stanter Anteil der Tumorzellen abgetötet wird. Schließlich bleiben nur noch sehr wenige oder, im Idealfall, überhaupt keine Tumorzellen zurück [10,12].

Tumorzellen können sich jedoch auch resistent gegenüber einer Therapie mit Zytostatika zeigen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass ein Zytostatikum nicht in ausreichender Konzentration in das Körperkompartiment gelangt, in dem ein Tumor lokalisiert ist. Zum anderen spielen tumorzellspezifische Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene eine wichtige Rolle. Dazu zählen zum Beispiel eine verminderte Wirkstoffaufnahme seitens der Tumorzellen bzw. eine geminderte Metabolisierung des Wirkstoffes, veränderte Zielsubstrate oder eine gesteigerte DNA-Reparatur. Außerdem können Zytostatika den Patienten teilweise aufgrund von ausgeprägten unerwünschten Nebenwirkungen nicht in der erforderlichen Dosis appliziert werden [10,12].

Die Ursache von starken Nebenwirkungen besteht darin, dass die proliferationshemmenden Effekte seitens der Zytostatika unselektiv auf sich schnell teilende Zellen gerichtet sind. Das bedeutet, neben den schnell proliferierenden Tumorzellen werden auch andere, gesunde Körperzellen von der Wirkung der Zytostatika beeinflusst. Eine spezifische, nur die Tumorzellen angreifende Therapie mittels konventioneller Chemotherapie ist deshalb nicht bekannt [11]. Zu den daraus resultierenden Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Erbrechen, Immunsuppression, Gerinnungsstörungen, Mukositis mit Stomatitis, Diarrhoe, Haarausfall, Einschränkungen der Spermatogenese sowie die Gefahr von Zytostatika-induzierten Zweitkarzinomen [11].

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Substanzklassen der Zytostatika und nennt den Wirkmechanismus [10–14]:

Tabelle 1: Allgemeine Darstellung der Zytostatika. Modifiziert nach [11,14].

Wirkstoffgruppe	Wirkmechanismus
Alkylantien	Durch die Alkylierung von Nucleinsäuren kommt es zur Bildung abnormer Basenpaarungen und zur Vernetzung von DNA- und RNA-Strängen
Antimetabolite	Werden aufgrund von Strukturähnlichkeiten in Nucleinsäuren eingebaut, die dadurch ihre Funktion verlieren. Es werden in der Folge auch Enzyme der Nucleotidbiosynthese gehemmt
Mitosehemmstoffe	Zerstörung von Mikrotubuli sowie verminderte Ausbildung des Spindelapparates führen zu Hemmung der Zellteilung

Topoisomerase-Inhibitoren	Topoisomerase I und II werden gehemmt. Daraus folgen DNA-Strangbrüche. Auch: Interkalation in die DNA
Antibiotika	Störung von DNA- und RNA-Synthese, Interkalation, Hemmung der Topoisomerase II, Bildung von Radikalen
Enzyme	Asparaginase, spaltet L-Asparagin (vor allem ALL-Zellen sind auf L-Asparagin angewiesen)
Hormone und Antagonisten	Bei hormonsensitiven Tumoren kann der Effekt von wachstumsfördernden Hormonen antagonisiert werden
Zytokine	Aktivierung von T-/B-Lymphozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen
Signaltransduktions- und Proteasom-Inhibitoren	Hemmung spezifischer Proteinkinasen sowie Enzymen und Effektormolekülen der intrazellulären Signaltransduktion. Folge sind sowohl Proliferations- als auch Angiogenesehemmung und Apoptose
Monoklonale Antikörper	Blockade/Bindung von Mediatoren & Zellmembranantigenen

1.4 5-Fluorouracil (5-FU)

In der Gruppe der Zytostatika gehört 5-FU zur Subgruppe der Antimetabolite, die in die DNA bzw. RNA eingebaut werden und dadurch deren physiologische Funktionen stört. Entdeckt wurde es im Jahr 1957 von Charles Heidelberger [15,16]. Vom physiologisch vorkommenden Uracil unterscheidet es sich lediglich um ein Fluor-Atom (siehe Abbildung 2).

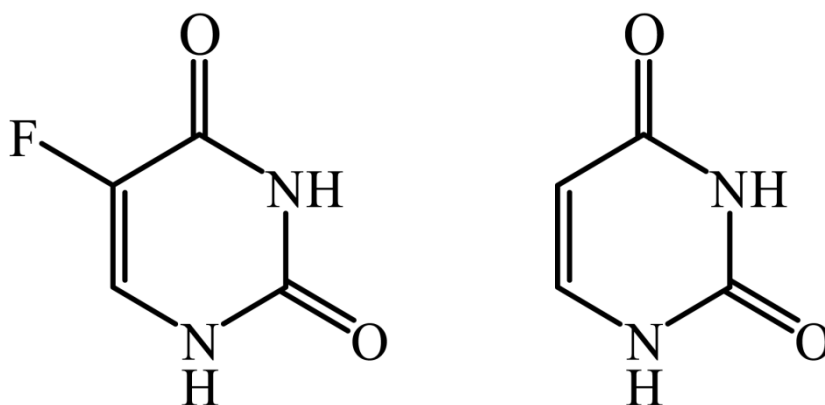


Abbildung 2: Strukturformeln von 5-FU (links) und Uracil (rechts).

In der Klinik wird 5-FU, in Kombination mit anderen Substanzen, bei vielen verschiedenen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom, dem Mammakarzinom, dem Pankreaskarzinom sowie Tumoren im Kopf- und Halsbereich eingesetzt [15,17–20].

1.4.1 Wirkmechanismus, Nebenwirkungen sowie pharmakologische Aspekte von 5-FU

Nach der i.v. Gabe gelangt 5-FU über den Blutkreislauf zum Malignom, passiert die Zellmembran der Tumorzellen mit Hilfe des Uracil-Transporters und erreicht schließlich den Intrazellulärraum [21]. Dort wird das 5-FU in den Metaboliten Fluor-Desoxyuridin-Monophosphat (FdUMP) umgewandelt. FdUMP ist in der Lage, das Enzym Thymidilat-Synthase (TS) zu hemmen. TS ist für die Umwandlung von Desoxyuridin-Monophosphat (dUMP) zu Desoxythymidin-Monophosphat (dTMP) verantwortlich. Die TS-Hemmung bewirkt eine verminderte Konzentration von dTMP und führt in der Folge zu einem Mangel an Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP), da dTTP ausgehend von dTMP synthetisiert wird.

Die genannten Effekte auf den Zellmetabolismus führen zu Konzentrationsverschiebungen aller Desoxynukleotide, wodurch die DNA-Synthese und die DNA-Reparatur negativ beeinflusst werden, was schließlich DNA-Schäden hervorruft [15,22]. Darüber hinaus führen das aus 5-FU gebildete Fluor-Desoxyuridin-Triphosphat (FdUTP) sowie hohe intrazelluläre Konzentrationen von Desoxyuridin-Triphosphat (dUTP) zu einem fehlerhaften Einbau in die DNA mit dem Resultat von DNA-Strangbrüchen und dem darauf folgenden Zelluntergang [15,22].

Die Funktion der RNA wird aufgrund der intrazellulären metabolischen Umwandlung von 5-FU in Fluor-Uridin-Triphosphat (FUTP) beeinflusst. Das FUTP wird in die RNA eingebaut und stört auf diesem Wege die physiologische Funktion der RNA. In *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass die in die RNA eingebaute Menge an 5-FU-Derivaten mit der Letalität der Tumorzellen korreliert [15,23,24]. Darüber hinaus führen die oben erwähnte Hemmung der TS durch FdUMP und der Einbau von FUTP in die RNA zu einer Stabilisierung des p53-Proteins, eines Tumorsuppressor-Proteins, das Apoptose seitens der Tumorzellen induzieren kann [15].

Die zytoreduktive Wirkung von 5-FU kann, z.B. durch die gleichzeitige Gabe von Folinsäure, intensiviert werden. Durch Folinsäure wird in den Tumorzellen verstärkt 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat gebildet, das zur Hemmung von TS beiträgt [25]. Darüber hinaus wird 5-FU auch mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan kombiniert, da durch die Polychemotherapie an mehreren Stellen des Tumormetabolismus eingegriffen wird und in klinischen Studien eine gesteigerte Wirkung im Vergleich zur alleinigen Therapie mit 5-FU gezeigt wurde [26,27]. In der Klinik

werden diese Wirkstoffkombinationen als FOLFOX (Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin)-Schema oder als FOLFIRI (Folinsäure, 5-FU, Irinotecan)-Schema bezeichnet und beim kolorektalen Karzinom eingesetzt [28]. Bei Mammkarzinomen wird darüber hinaus ein CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-FU) verwendet [29].

Allerdings werden nur maximal 3 % der applizierten 5-FU-Dosis zu zytotoxischen Metaboliten umgewandelt, während mehr als 80 % in kurzer Zeit abgebaut werden und damit keinen proliferationshemmenden Effekt erzielen. Die Plasmahalbwertszeit (Plasma- $t_{1/2}$) von 5-FU beträgt 10 - 20 min. Für die Degradation ist die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) verantwortlich, die vorrangig in der Leber zu finden ist und das Schlüsselenzym für den Abbau von 5-FU darstellt. Die entstehenden Metaboliten werden anschließend renal ausgeschieden [30]. Nach 24 h werden laut Heggie *et al.* bereits 60 – 90 % der applizierten 5-FU-Dosis über die Niere eliminiert [31]. Zusammenfassend betrachtet, deuten die genannten Informationen auf pharmakologische Defizite hin.

Darüber hinaus gehört 5-FU zu den phasenspezifischen Zytostatika, die lediglich in der S-Phase des Zellzyklus wirksam sind. D.h. eine lange Wirkdauer wäre aus therapeutischer Sicht sehr wünschenswert (siehe Abschnitt 1.3) [11]. In der Klinik wird 5-FU einerseits als Bolus i.v. injiziert, andererseits auch als 24 h-, 48 h- oder sogar 120 h-Dauerinfusion, um den Wirkspiegel über einen möglichst langen Zeitraum konstant zu halten und so dem pharmakologischen Defizit zu begegnen [32,33]. Aufgrund von genetischen Polymorphismen kommt es allerdings vor, dass bei manchen Patienten die Aktivität der DPD reduziert ist und 5-FU in der Folge eine gesteigerte $t_{1/2}$ sowie eine damit einhergehende höhere Toxizität besitzt [30].

Aber auch ohne eine geminderte DPD-Aktivität werden bei Patienten vielfältige Nebenwirkungen aufgrund des unspezifischen Einflusses von 5-FU ausgelöst, wie Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie sowie gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Mukositis, Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen. Darüber hinaus klagen die Patienten über das sogenannte Hand-Fuß-Syndrom und Haarausfall [30]. Als weitere Nebenwirkung einer Behandlung mit 5-FU muss die Kardiotoxizität genannt werden, die bei bis zu 18 % der Patienten auftritt. Konkret handelt es sich u.a. um Krankheitsbilder wie Angina pectoris, einen Myokardinfarkt und eine ventrikuläre Tachykardie bis hin zum kardiogenen Schock [34].

1.4.2 *Capecitabin – ein oral applizierbares 5-FU-Derivat*

Verschiedene Derivate von 5-FU sind für die Therapie von Tumoren hergestellt worden. Ein bekannter Vertreter ist Capecitabin, eine 5-FU-Prodrug mit einer molekularen Masse von 359,35 Da, die täglich zwei Mal oral eingenommen wird, was eine strikte Compliance seitens der Patienten voraussetzt. Nachdem es die gastrointestinale Mukosa überwunden hat, wird es mit Hilfe von hepatischen Enzymen metabolisch umgewandelt, gelangt schließlich zu den Tumorzellen und wird intrazellulär zu 5-FU aktiviert. Eingesetzt wird es für eine Therapie bei kolorektalen Karzinomen und Mammakarzinomen [35].

Im Vergleich zu 5-FU verfügt Capecitabin über den Vorteil einer geringfügig gesteigerten Plasma- $t_{1/2}$ [36]. Weil Capecitabin vorrangig erst in den Tumorzellen zu 5-FU umgewandelt wird, könnte man vermuten, dass es allein in Tumoren wirkt und weniger unerwünschte Nebenwirkungen verursacht als 5-FU. Tatsächlich wurde bei der Therapie von kolorektalen Karzinomen festgestellt, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit von Neutropenie und Stomatitis bei der Gabe von Capecitabin geringer ist als bei einer Therapie mit 5-FU. Das Hand-Fuß-Syndrom wurde jedoch wesentlich häufiger als Nebenwirkung beobachtet. Alle anderen Nebenwirkungen traten gleichhäufig auf [37]. Beim progressionsfreien Überleben und beim Gesamtüberleben wurden keine Unterschiede zwischen beiden Substanzen festgestellt [37].

1.4.3 *Resistenzen gegen die Wirksamkeit von 5-FU*

Obwohl die zytostatische Wirkung von 5-FU durch die Kombination mit weiteren Agenzien verstärkt werden kann (z.B. Folinsäure), treten trotzdem Fälle auf, in denen 5-FU nur schwache Wirkungen oder keine Effekte erzielt. In diesen Fällen spricht man von Resistenzen. So kann zum Beispiel eine gesteigerte Expression der TS dazu führen, dass Tumorzellen sich resistent gegenüber 5-FU zeigen [38]. Des Weiteren lassen Tumorzellen eine wesentlich schlechtere Wachstumshemmung durch 5-FU erkennen, wenn anstatt des p53-Wildtyp-Gens eine mutierte Form von p53 in den Zellen vorzufinden ist [39]. Allerdings wurde jüngst gezeigt, dass Resistenzen gegenüber 5-FU überwunden werden können. Karaayvaz *et al.* haben eine gesteigerte Chemosensitivität von Tumorzellen festgestellt, wenn eine bestimmte Form von microRNA, microRNA-129, zu Kolonkarzinomzellen transfiziert wird, da das anti-apoptotisch wirkende Protein *B-cell Lymphoma 2* (BCL 2) in der Folge supprimiert wird. Die Wirksamkeit von 5-FU war nach der Transfektion gesteigert [40].

1.5 Gezielte Zytostatikatherapie von Tumoren (Targeted drug delivery to tumors)

Resistenzen gegen Zytostatika wie z.B. 5-FU sind generell ein Problem bei der Chemotherapie. Ebenso schwer wiegen allerdings auch die zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen für die Patienten. Darüber hinaus sind der schnelle Abbau von 5-FU durch DPD sowie die damit einhergehende geringe $t_{1/2}$ pharmakologische Eigenschaften von 5-FU, die für die Therapie enorme Nachteile bringt.

Innerhalb der letzten Jahrzehnte sind deshalb Systeme und Strategien untersucht worden, die die gezielte Abgabe von Medikamenten an Tumoren mit Hilfe von Carrier-Molekülen gestatten sollen und gleichzeitig eine gesteigerte $t_{1/2}$ ermöglichen [41–44]. Das Ziel besteht darin, einen Großteil der applizierten Medikamente zu den Tumoren zu transportieren, während gleichzeitig keine oder nur eine minimale Akkumulation an anderen Stellen im Körper stattfindet. Dadurch sollen z.B. die systemischen, toxischen Nebenwirkungen aufgrund der zytostatischen Therapie verringert werden [41,42]. Beim targeted drug delivery sollten idealerweise mehrere Voraussetzungen bezüglich des Transportmoleküls erfüllt werden [41,45]:

- Hohe Beladbarkeit des Trägermoleküls (Carrier) mit der Wirksubstanz
- Hohe $t_{1/2}$
- Verbleib am Wirkungsort
- Freisetzung des Medikaments in einer wirkungsvollen Konzentration
- Keine unerwünschten Nebenwirkungen durch den Carrier
- Keine Immunantwort gegen den Carrier
- Gute Bioabbaubarkeit des Carriers
- Günstige Kosten-Nutzen-Relation

Als potentielle Wirkstoffcarrier wurden sowohl Liposomen, Polymere und Mizellen als auch Nanopartikel und Antikörper ins Kalkül gezogen. Darüber hinaus wurde auch mit Proteinen wie Albumin und Transferrin und ebenso mit Erythrozyten Versuche unternommen, sie als Drug Carrier zu verwenden [43,46,47].

Für die Erreichbarkeit der Tumorzellen durch Carrier spielt der *enhanced permeability and retention effect* (EPR-Effekt) eine wesentliche Rolle. Der EPR-Effekt basiert zum einen darauf, dass Malignome stark vaskularisiert sind; denn Tumorzellen sind in der Lage z.B. den Faktor *VEGF* (vascular endothelial growth factor) zu bilden und so Angiogenese zu induzieren. Zum anderen verfügen die durch die Angiogenese gebildeten Gefäße über eine Endothelschicht, die

von Poren durchzogen ist, was eine gesteigerte Durchlässigkeit der Endothelschicht zur Folge hat und eine gesteigerte Extravasation von Stoffen aus dem Blutkreislauf in den interstitiellen Raum ermöglicht [48]. Für die Tumorzellen besteht der Vorteil darin, dass sie dadurch sowohl mit mehr Sauerstoff als auch mit einer größeren Menge an Nährstoffen versorgt werden [49]. Die Größe der beschriebenen Poren zwischen den Endothelzellen reicht von 3 – 200 nm [43]. In der Literatur wurde von Maeda *et al.* beschrieben, dass auch Proteine mit einer Molekülmasse größer als 60 kDa durch den EPR-Effekt in den Extravasalraum gelangen können [50]. Lammers *et al.* argumentiert auf der anderen Seite, dass der EPR-Effekt aber auch nicht überbewertet werden sollte [43]. Zum einen seien die Tiermodelle, an denen der EPR-Effekt untersucht wurde, nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Zum anderen gäbe es große Unterschiede für die Durchlässigkeit von Endothelzellen, die von Tumor zu Tumor unterschiedlich sein kann [43].

Außerdem muss beachtet werden, dass größere Moleküle zwar in der Lage wären, das Herz-Kreislauf-System mittels des EPR-Effektes zu verlassen, aber aufgrund einer geringen Eindringtiefe in das Tumorgewebe nicht jede Tumorzelle erreichen. Dreher *et al.* haben gezeigt, dass die Extravasation und Eindringtiefe in Tumoren durch Dextran mit 40 – 70 kDa (hydrodynamischer Durchmesser: 6 nm), als Beispielsubstanz für Makromoleküle, die besten Ergebnisse liefert. Bei 2000 kDa-Dextran (hydrodynamischer Durchmesser: 50 nm) steigert sich zwar die Zirkulationszeit im intravaskulären System, aber die Akkumulation im Tumorgewebe sei gegenüber Carriern mit einer geringeren molaren Masse verringert [43,51]. Insofern kann nur ein Carrier mit einer molaren Masse bis maximal 70 kDa und ca. 6 – 12 nm Durchmesser einerseits die löcherige Architektur der Blutgefäße im Tumorgewebe effektiv nutzen und kombiniert diese Eigenschaft mit einer akzeptablen Eindringtiefe in das Tumorgewebe [43,51,52]. Bei der Wahl eines Carriers ist es wichtig, diese Voraussetzungen zu beachten, um eine möglichst effektive zytostatische Therapie zu erreichen.

1.6 Albumin als Carrier-Molekül

In Anbetracht der notwendigen Eigenschaften, die ein passender Carrier erfüllen sollte, wird erkennbar, wie schwierig es ist, ein Trägermolekül zu finden, das sowohl eine lange $t_{1/2}$ aufweist, sich im Plasma nach der Beladung mit 5-FU bzw. eines 5-FU-Derivates stabil verhält, keine Nebenwirkungen im Organismus auslöst und die erforderliche Größe aufweist, um den EPR-Effekt nutzen zu können. Außerdem sollte der Carrier selektiv von Tumorzellen aufgenommen werden, um unerwünschte systemische Nebenwirkungen durch das Zytostatikum so gering wie möglich

zu halten. Bei Albumin könnte es sich um einen passenden Carrier für die Tumorthherapie mit Zytostatika handeln.

Die Plasmaproteine im menschlichen Organismus bestehen etwa zur Hälfte aus Albumin. Die Leber synthetisiert täglich 10 – 15 g des Albumins und gibt es in den Intravasalraum ab [44,53]. Die Konzentration des humanen Serumalbumins (HSA) beträgt im Plasma zwischen 42 – 54 g/L und weist eine $t_{1/2}$ von ungefähr 19 Tagen auf. Die Molekülmasse beläuft sich auf 66 - 67 kDa und der hydrodynamische Durchmesser beträgt 7,2 nm [44,53,54].

Die physiologische Funktion von Albumin besteht einerseits darin, den kolloidosmotischen Druck im Intravasalraum aufrecht zu erhalten [53]. Deshalb wird HSA in der Klinik, wenn nichts anderes verfügbar ist, als Plasmaexpander verwendet [55]. Da die Aminosäuresequenz von HSA zu 16,8 % aus sauren Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) und zu 16,9 % aus basischen Aminosäuren (Lysin, Histidin und Arginin) besteht, dient es darüber hinaus dazu, den pH-Wert im Blut konstant zu halten [53].

Eine weitere enorm wichtige Funktion von Albumin ist letztlich der Transport von z.B. Schilddrüsen-, aber auch anderen Hormonen sowie von hydrophoben Molekülen, wie beispielsweise Medikamenten und Fettsäuren. Albumin kann hydrophobe Stoffe an sich binden und im Blutkreislauf transportieren, weil es eine hydrophile Oberfläche besitzt und gleichzeitig eine Art hydrophobe Taschen aufweist, in die sich hydrophobe Moleküle einlagern können [53].

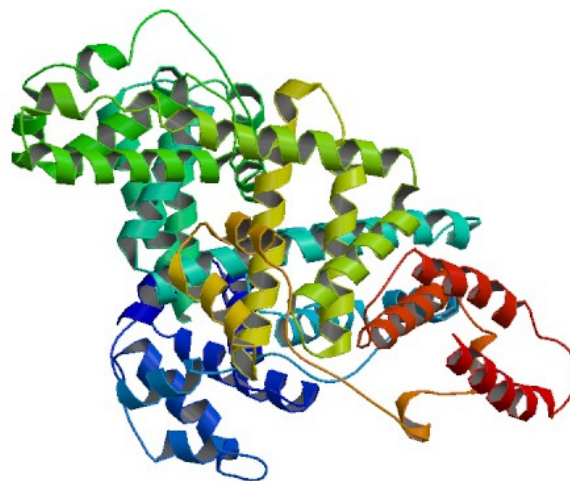


Abbildung 3: Dreidimensionale, verwundene Struktur von HSA mit vielen alpha-Helices [56].

Im Vergleich zwischen verschiedenen Tierspezies verfügen Albumin, Myoglobin und Hämoglobin über Strukturhomologien, die auf ein 77 Aminosäuren umfassendes, gemeinsames Vorläuferprotein, vor ungefähr 100 – 530 Millionen Jahren, schließen lassen [57]. Neben dem

menschlichen Organismus besitzen auch andere Tierspezies Albumin, in nur geringfügig veränderter Form, wie z.B. Ratten (rat serum albumin, RSA) und Rinder (bovine serum albumin, BSA). In der Gegenüberstellung von HSA und BSA wird deutlich, dass sowohl in der Anzahl der Aminosäuren als auch in der Abfolge nur geringe Unterschiede feststellbar sind [58–61].

Aufgrund des geringen hydrodynamischen Durchmessers ist Albumin bei Patienten mit einer Tumorerkrankung in der Lage, den Intravasalraum über den EPR-Effekt zu verlassen und zu den Tumorzellen zu gelangen. Einmal im Interstitium des Tumors angekommen, besitzt Albumin wegen der geringen Größe gute Diffusionseigenschaften, um in das gesamte Tumorgewebe zu diffundieren. Im Vergleich zu Immunglobulinen der Klasse G (ca. 150 kDa) diffundiert Albumin ungefähr zehn Mal schneller [62].

Sowohl die Plasma- $t_{1/2}$ als auch die Molekülmasse und die Größe des Proteins deuten darauf hin, dass Albumin ein vielversprechendes Carrier-Molekül zum Drug Targeting von Tumorzellen ist. Es erfüllt die Voraussetzungen für die Nutzung des EPR-Effektes (siehe Abschnitt 1.5) bestens. Darüber hinaus verfügt Albumin über einen weiteren wichtigen Vorteil, der nachfolgend dargestellt wird.

In Abschnitt 1.1 wurde beschrieben, dass sich der Metabolismus von Tumorzellen anders verhält als der von gesunden Zellen des Körpers. Diese Eigenschaft ist für Tumorzellen erforderlich, da während der G₁- und der S-Phase des Zellzyklus große Mengen an Energie benötigt werden. Der Energieverbrauch von Krebszellen ist also stark gesteigert [62]. Als ein wichtiger Energielieferant dient einerseits Glukose, die mittels Glykolyse abgebaut wird. Das Stoffwechselendprodukt der Glykolyse, Pyruvat, wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA decarboxyliert und schließlich in den Citratzyklus eingespeist, wo es zusammen mit Oxalacetat zu Citrat reagiert [63].

Zum anderen werden von Tumorzellen Plasmaproteine, insbesondere Albumin, endozytosevermittelt aufgenommen [62]. Nach der Aufnahme in den Intrazellulärraum erfolgt der Abbau in den Lysosomen, wo Proteasen das akkumulierte Albumin spalten. Anschließend werden die freien Aminosäuren in das Zytosol der Tumorzellen überführt und weiterverarbeitet. Die Aminosäuren des Albumins dienen den Tumorzellen zum einen als ergiebige Quelle für die Synthese von neuen Proteinen [54,62,63]. Zum anderen kann von den freien Aminosäuren intrazellulär die NH₂-Gruppe abgelöst werden. Die verbleibenden Kohlenstoffverbindungen werden anschließend auf verschiedenen Wegen zu Pyruvat, Acetyl-CoA oder anderen Metaboliten des Citratzyklus abgebaut. Dadurch ist ein Anschluss an den Stoffwechsel gegeben, der der Energiegewinnung

dienlich ist [62,63]. Für Tumorzellen ergibt sich somit der Vorteil, dass der Energiestoffwechsel nicht allein von der Glukosebereitstellung abhängt, sondern auch Albumin zur Energiegewinnung genutzt werden kann, das reichhaltig im Intravasalraum vorhanden ist und kontinuierlich von der Leber synthetisiert wird [44,53]. Die Akkumulation von Albumin wurde sowohl in Malignomen als auch in entzündeten Geweben beobachtet [44]. Somit ergeben sich vier entscheidende Vorteile für Albumin als Carrier:

- Es verfügt über eine lange $t_{1/2}$,
- gelangt über den EPR-Effekt direkt zu den Tumorzellen,
- kann aufgrund seines geringen hydrodynamischen Durchmessers tief in das Tumorgewebe eindringen und
- wird von Tumorzellen bevorzugt aufgenommen.

In der Praxis wird Albumin als Carrier für ein Zytostatikum z.B. beim Abraxane[®] (Nano-Albuminpartikel gebundenes Paclitaxel, nab-Paclitaxel) verwendet. Das Medikament ist für das metastasierte Mammakarzinom zugelassen und in der Erprobung für die Therapie von weiteren Tumorentitäten [18]. Es handelt sich um Nanopartikel, die das lipophile Zytostatikum Paclitaxel transportieren und Vorteile gegenüber der bisherigen Therapie mit Paclitaxel bieten [18,46]. Der Durchmesser der Partikel beträgt etwa 130 nm. Nach der i.v. Applikation löst sich die Albuminhülle der Partikel rasch auf und zurück bleiben lösliche, nicht-kovalent gebundene Albumin-Paclitaxel-Komplexe, die mit ca. 10 nm Durchmesser eine ähnliche Größe wie das physiologische HSA aufweisen [18,64]. Das nab-Paclitaxel gelangt daraufhin über den EPR-Effekt in das Tumorgewebe.

Neben dem EPR-Effekt trägt das 60 kDa-Glykoprotein (gp60) ebenfalls zur Aufnahme von nab-Paclitaxel in die Tumoren bei. Das gp60, auch Albondin, befindet sich auf der Oberfläche der Endothelzellen des Kapillarsystems und ermöglicht eine Transzytose vom Intravasalraum in den interstitiellen Raum, in dem sich der Tumor befindet [18,64]. Dort angekommen wird die Aufnahme von nab-Paclitaxel in die Tumorzellen eventuell durch das *Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine* (SPARC) begünstigt, das insbesondere natives Albumin bindet [18,54]. Die Expression von SPARC hat bei *in vivo* Experimenten zu einem verbesserten Ansprechen auf die Therapie mit nab-Paclitaxel im Vergleich zu einem anderen Taxan geführt. Somit könnte SPARC als ein Biomarker für das Ansprechen auf die Therapie mit nab-Paclitaxel dienen [65].

Als ein weiteres Beispiel für eine Zytostatika-Therapie mit Albumin als Carrier-Molekül kann das Methotrexat-HSA (MTX-HSA) genannt werden. In den vergangenen Jahren wurden mehrere

klinische Studien mit MTX-HSA als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Substanzen erprobt [66–68]. Der Unterschied zum nab-Paclitaxel besteht darin, dass das MTX mittels einer kovalenten Amidbindung an das HSA gekoppelt wurde [67]. Das Beladungsverhältnis zwischen MTX und HSA betrug 1:1, obwohl auch eine höhere Beladungsrate möglich gewesen wäre. Allerdings sorgt eine größeres MTX:HSA-Verhältnis dafür, dass das Monozyten-Makrophagen-System (MMS) der Leber das MTX-HSA, bzw. bei *in vivo* Experimenten an Ratten das MTX-RSA, aus dem Blutkreislauf aufnimmt und folglich weniger Wirkstoff zum Tumor gelangt. Außerdem geht damit eine verringerte $t_{1/2}$ einher [53,67,69]. Die gesteigerte Aufnahme seitens des MMS beruht auf der Denaturierung des Proteins durch die Menge an gekoppelten Molekülen. Deshalb ist es bei der Beladung von HSA wichtig, die native Struktur zu erhalten [53,69].

1.7 Aufgabenstellung

5-FU ist ein Zytostatikum, das in der Klinik sowohl beim Mammakarzinom als auch beim kolorektalen Karzinom sowie weiteren Tumorentitäten eingesetzt wird. Als nachteilig erweisen sich die Plasma- $t_{1/2}$, die nur 10 – 20 min beträgt und die unspezifische Toxizität, die sich nicht nur gegen Tumorzellen richtet, sondern ebenso gegen gesundes Körpergewebe.

Es wurde gezeigt, dass albumingebundenes, modifiziertes 5-FU (Fluorouracil-Essigsäure, FUAc) eine hohe Stabilität in verschiedenen Puffern (von den Autoren nicht genauer spezifiziert) und in Plasma besitzt [70]. Die Bindung von 5-FU an Albumin erfolgte nach Modifikation von 5-FU zu FUAc durch Anfügen einer Methyl-Carboxyl-Gruppe an den Uracil-Ring [71]. In Tierversuchen wurde erkennbar, dass bei einer i.v. Applikation von albumingebundenem FUAc über 24 h konstant 5-FU freigesetzt wurde. Allerdings wurden keine Experimente unternommen, um das zytostatische Potential zu untersuchen [71]. Weder die chemische Synthese noch die Zahl der gebundenen FUAc-Moleküle je Albumin-Molekül wurden bisher beschrieben.

Das Ziel der Arbeit besteht darin, ein Protokoll für die Synthese von albumingebundenem FUAc zu finden und die Menge des gekoppelten FUAc zu quantifizieren. Da der Erhalt der nativen Struktur nach der Kopplung von FUAc an Albumin einen essentiellen Faktor für die Plasma- $t_{1/2}$ und die Bindung an SPARC darstellt, muss ebenso untersucht werden, ob die Kopplung von FUAc einen strukturverändernden Einfluss auf das Albumin bewirkt. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten wird außerdem der proliferationshemmende Einfluss von FUAc bzw. albumingebundenem FUAc auf verschiedene Tumorzelllinien im Vergleich zu 5-FU überprüft.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

In der folgenden Tabelle werden die für diese Arbeit verwendeten Lösungen aufgeführt:

Tabelle 2: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien.

Puffer bzw. Lösung	Inhaltsstoffe
MTT-Lösung	1 mg/mL in RPMI 1640
Natronlauge	1 M: 40 g NaOH gelöst in 1 L H ₂ O, bzw. 10 M: 400 g NaOH gelöst in 1 L H ₂ O
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (pH-Wert 7,4 oder 8)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert-Anpassung mit 1 M NaOH
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640 Medium, Life Technologies GmbH, Darmstadt)	10 % FKS 1 % PenStrep Phenolrot GlutaMAX™
Solubilisierungslösung für den MTT-Test [72]	99,4 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 0,6 % Essigsäure 0,1 g/mL Sodiumdodecylsulfat (SDS)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die folgenden Chemikalien in analysereiner Qualität von den angegebenen Herstellern bezogen:

Tabelle 3: Verwendete Substanzen. Darstellung inklusive Molekulargewichten (MW) in [Da] und Hersteller.

Substanz	MW [Da]	Hersteller
2',6'-Dihydroxyacetophenon (DHAP, C ₈ H ₈ O ₃)	152,14	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ampuwa®	-	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Bovines Serumalbumin (BSA, ≥ 98 %, lyophilisiert)	≈ 66.430	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Chloressigsäure (C ₂ H ₃ ClO ₂)	94,5	J.T. Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO, C ₂ H ₆ OS)	78,13	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆ (DMSO- <i>d</i> ₆ , 99,8 %, C ₂ D ₆ SO)	84,17	Deutero GmbH
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	141,96	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	292,24	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid (EDC)	191,7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	60,05	J.T. Baker
Ethanol (70 %, C ₂ H ₆ O)	46,07	Merck KGaA
FITC-BSA (Fluorescein isothiocyanate bovines Serumalbumin, 66 kDa)	BSA: ≈ 66.400 FITC: 389,4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fetales Kälberserum (FKS)		Life Technologies GmbH
5-Fluorouracil (5-FU, 50 mg/mL, C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂)	130,08	Teva Pharma AG
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	VEB Jenapharm
Kaliumhydroxid (KOH)	56,11	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	195,2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT, C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S)	414,32	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	Merck KGaA

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	Merck KgaA
Natriumhydroxid (NaOH)	39,99	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N-Hydroxysuccinimid (NHS, C ₄ H ₅ NO ₃)	115,09	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Penicillin/Streptomycin (PenStrep, 10.000 Units/mL, 10 mg/mL)	334,39/581,57	Life Technologies GmbH
Phosphate Buffered Saline (PBS, pH-Wert 7,4)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (37 %, HCl)	36,46	J.T. Baker
Sodiumdodecylsulfat (SDS, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	288,38	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypanblau (0.5 % [w/v], C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	872,88	BioChrom AG
Trypsin (0,25 % mit EDTA, mit Phenolrot)	~23.000	Life Technologies GmbH

2.1.3 Zelllinien

Für die Zellkulturversuche wurden die Zelllinien MDA-MB-231 (freundlicherweise bereitgestellt von Frau PD Dr. med. Diana Lüftner, Oberärztin an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) und T-47D (freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Prof. Dr. med. Kurt Possinger, Klinikdirektor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin) verwendet.

2.1.3.1 MDA-MB-231

Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde im Jahr 1973 aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen, kaukasischen Patientin entnommen und kultiviert, nachdem die Patientin bereits eine Therapie mit 5-FU und Prednison aufgrund ihres Mammakarzinoms erhalten hatte. Diese Therapie erwies sich jedoch als ineffektiv. Bei der Patientin wurde ursprünglich im Jahr 1969 eine radikale Mastektomie der rechten Mamma vorgenommen. Histologisch zeigten sich dort papilläre und tubuläre Formationen. Darüber hinaus wurde auch ein intraduktales Karzinom festgestellt [73].

Die Mammakarzinom-Zellen MDA-MB-231 vermehren sich in Zellkultur einschichtig und adherent. Sie exprimieren Rezeptoren für den *epidermal growth factor* und den *transforming growth factor alpha* [74,75].

2.1.3.2 T-47D

Die Zelllinie T-47D wurde im Jahr 1978 aus einem Pleuraerguss einer 54-jährigen, weiblichen Patientin isoliert und kultiviert. Es handelt sich um metastatische Zellen eines duktales Mammakarzinoms, die in Zellkultur einschichtig und adhärent wachsen. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie Rezeptoren für Östrogen, Progesteron, Glukokortikoide, Androgene, Calcitonin und Prolaktin [76,77].

Die Zelllinie besitzt außerdem die Eigenschaft, langsamer zu proliferieren, wenn ihr BSA zugesetzt wird. T-47D wird deshalb als albuminsensibel bezeichnet. Die Tabelle 4 spiegelt die Informationen über die Tumorzell-Rezeptoren in komprimierter Form wider.

Tabelle 4: Übersicht über die Rezeptoren der verwendeten Tumorzelllinien. Legende: „+“ bedeutet, ein Protein wird exprimiert. „-“ bedeutet, ein Protein wird nicht exprimiert.

		Rezeptoren und Membranproteine									
		<i>Calcitonin</i>	<i>Androgen</i>	<i>Östrogen</i>	<i>Progesteron</i>	<i>Glukokortikoid</i>	<i>Prolaktin</i>	<i>Epidermal growth factor</i>	<i>Transforming growth factor alpha</i>	<i>mABP</i>	<i>SPARC</i>
Zelllinie	T-47D [74,76,77]	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	MDA-MB-231 [73-75]	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Im Vergleich zu der Zelllinie T-47D verfügen die MDA-MB-231-Zellen über keine Hormonrezeptoren und verhalten sich in ihrem Wachstum albuminsensibel [74,75].

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die folgende Auflistung zeigt die Geräte und Materialien, die für die Arbeitsschritte dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
μ-Slide 8 well, ibiTreat, tissue culture treated, sterile	Ibidi GmbH
24-Well Cell Culture Cluster, Flat bottom	Corning Incorporated
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (30 kDa)	Millipore GmbH
Automatic-Sarpette®	Sarstedt AG & Co
Blutgasanalysator ABL 725	Radiometer GmbH
Heraeus® Biofuge® Primo R Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH
Heraeus® Labofuge® 400 Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH
PowerWave 340 Mikroplatten-Spektralphotometer	BioTek Instruments GmbH
Eppendorfgefäße 2 mL, verschließbar	Eppendorf AG
Explorerer Feinwaage	Ohaus Europe GmbH
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG
Microtest Platte, 96 well, flat bottom	BD BioSciences
Magnetrührer HA 56.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Mehrkanal-Pipette Discovery Comfort, 8-Kanal, 20 - 200 μL	ABIMED GmbH
NMR-Röhrchen, Norell ST550-7	Norell, Inc.
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektron. Messgeräte GmbH & Co. KG
Roll-Mischgerät: Assistent RM 5 Assistant, Nr. 348	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
Rotilabo®-Spritzenfilter (Porengröße 0,22 μm)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt AG & Co.
Spektralphotometer U2800	Hitachi High-Technologies Corporation
Sterilwerkbank Thermo HERASafe	Heraeus Instruments GmbH
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Wasserbad Lauda MS	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG

Wasserfilteranlage EASYpure RoDi	Werner Reinstwassersysteme
Zählkammer Neubauer-Improved	LO Laboroptik
Zellkultur-Flasche, 75 cm ² Bodenfläche, Plug-Seal Cap	BD BioSciences
Zellsieb, 40 µm	BD BioSciences
Zentrifugenröhrchen 15 mL, verschließbar	Sarstedt AG & Co.
Zentrifugenröhrchen 50 mL, verschließbar	Sarstedt AG & Co.
Zytostatikabank HERAsafe	Heraeus Instruments GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Wirkstoffherstellung

Abbildung 4 veranschaulicht die Synthese des Wirkstoffes FUAc-BSA im Überblick:

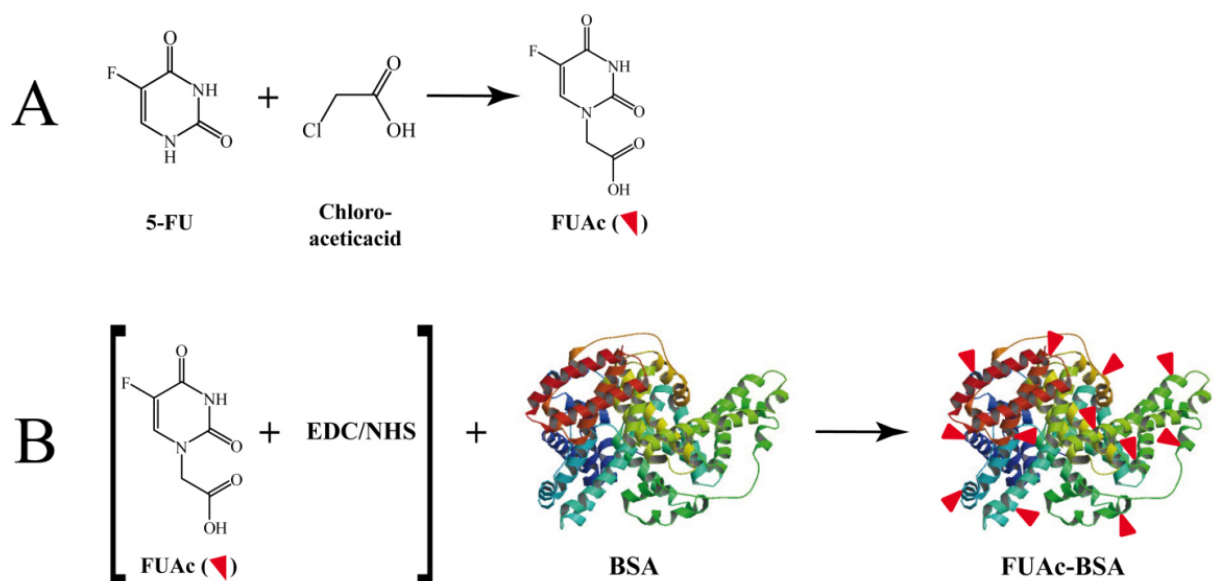


Abbildung 4: Herstellungsprozess von FUAc-BSA. Zunächst wurde in einer ersten Synthese (A) FUAc ausgehend von 5-FU hergestellt. In einer zweiten Reaktion (B) wurde das albuminbasierte Zytostatikum FUAc-BSA produziert. Die Struktur des BSA-Moleküls wurde modifiziert ausgehend von [78].

Die genauen Details der Herstellung werden in den Abschnitten 2.2.1.1 und 2.2.1.2 beschrieben.

2.2.1.1 Synthese von Fluorouracil-Essigsäure (FUAc) aus 5-Fluorouracil¹

Die Synthese von FUAc aus 5-FU erfolgte mit leichten Modifikationen auf der Basis von Tada [79]. Die Reaktionsgleichung für die FUAc-Synthese ist in Abbildung 5 dargestellt.

In einem ersten Ansatz **A** wurde in einem Volumen von 11 mL Wasser eine Lösung bestehend aus 1,73 g 5-FU ($n_{5\text{-FU}} = 13,3 \text{ mmol}$, $c_{5\text{-FU}} = 1,21 \text{ M}$) und 1,49 g Kaliumhydroxid (KOH) ($n_{\text{KOH}} = 13,3 \text{ mmol}$, $c_{\text{KOH}} = 2,41 \text{ M}$) angesetzt. In einem zweiten Ansatz **B** wurden zu 5 mL Wasser 1,25 g Chloressigsäure ($n_{\text{Chloressigsäure}} = 13,3 \text{ mmol}$, $c_{\text{Chloressigsäure}} = 2,65 \text{ M}$) zugegeben. Der Ansatz **B** wurde dem Reaktionsansatz **A** unter Rühren zugegeben, wodurch ein weißer Niederschlag entstand, der für 15 min bei Raumtemperatur weitergerührt wurde. Danach wurde langsam KOH zugefügt bis das Gemisch klar wurde und einen pH-Wert von 10 besaß. Anschließend wurde für weitere 15 min gerührt.

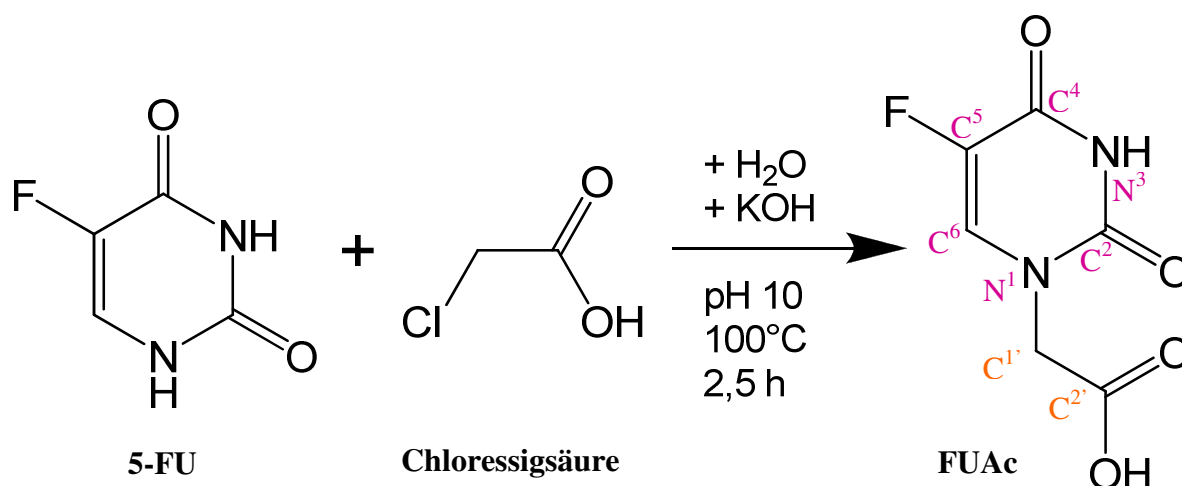


Abbildung 5: Umwandlung von 5-FU zu FUAc nach Tada [79]. Die an der Hauptreaktion beteiligten Stoffe sind als Strukturformeln dargestellt. Für das FUAc-Molekül sind die Ring-Atome und die C-Atome der angebenen Essigsäure durchnummeriert. Die C-Atome der Essigsäure wurden zusätzlich mit einem (') hinter der Nummer versehen und unterscheiden sich farblich von den Ring-Atomen.

Das Reaktionsgemisch wurde im nächsten Schritt für 2,5 h am Rückflusskühler gekocht. Als Reaktionsprodukt entstand FUAc, das auf Raumtemperatur abgekühlt und mit konzentrierter Salzsäure (37 %) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt wurde. Nachfolgend wurde die Mischung

¹ Die Synthese von FUAc wurde mit der Unterstützung von Herrn Dr. rer. nat. Torsten Sievers, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm, durchgeführt.

auf eine Temperatur von 4 °C abgekühlt. Nach 1 h wurde der pH-Wert erneut geprüft und eventuell auf einen pH-Wert von 2 eingestellt.

Während der Lagerung bei 4 °C für 24 h kristallisierte FUAc und bildete transparente Nadeln, die mittels Dekantieren und Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, ohne Bremse) von der Mutterlauge isoliert wurden. Der Überstand wurde entnommen, auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und für weitere 24 h bei 4 °C gelagert, um Reste von FUAc auskristallisieren zu lassen.

Im letzten Schritt wurden die isolierten Kristalle in einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst, anschließend mittels 37 %-iger Salzsäure bei einem pH-Wert von 2 erneut auskristallisiert (24 h bei 4 °C gelagert) und schließlich abzentrifugiert (10 min, 10.000 g, ohne Bremse). Der Überstand wurde verworfen und das sedimentierte FUAc unter dem Abzug bei Raumtemperatur getrocknet. Die Umsetzung von 5-FU zu FUAc wurde mittels NMR-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.2.5) kontrolliert.

2.2.1.2 Kopplung von FUAc an bovines Serumalbumin (BSA)²

Aufgrund der Homologie von HSA und BSA (siehe Abschnitt 1.6) wurde in den Versuchen dieser Arbeit BSA als Modellsubstanz verwendet. Die Carbodiimid-Kopplung erlaubt die Bildung von kovalenten Amid-Bindungen zwischen Carboxyl-Gruppen und Amino-Gruppen [80]. Die bei der Umwandlung von 5-FU zu FUAc angebundene Essigsäure besitzt eine freie Carboxyl-Gruppe. BSA ist ein Protein, das aus 583 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 66.430 Da besitzt [58]. Ungebundene Amino-Gruppen sind bei Proteinen wie BSA meist bei der Aminosäure Lysin in Form von ϵ -NH₂-Gruppen vorhanden. Außerdem stellen N-ständige Aminosäuren freie Amino-Gruppen zur Verfügung [81,82]. Die Kopplung läuft unter Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) ab, das freie Carboxyl-Gruppen aktiviert, und N-Hydroxysuccinimid (NHS), das die aktivierten Carboxyl-Gruppen für die Bindung an freie Amino-Gruppen stabilisiert [82]. Das Ergebnis der Reaktion ist eine Carbonsäureamid-Bindung zwischen FUAc und BSA. Abbildung 6 veranschaulicht exemplarisch, wie eine Carbodiimid-Kopplung funktioniert.

² Die Synthese von FUAc-BSA wurde mit Unterstützung von Herrn Dr. rer. nat. Yu Xiong, AG Bäumler, Charité – Universitätsmedizin Berlin, nach der in der Literatur publizierten EDC/NHS-Methode mit Modifikationen seitens der AG Bäumler durchgeführt [82].

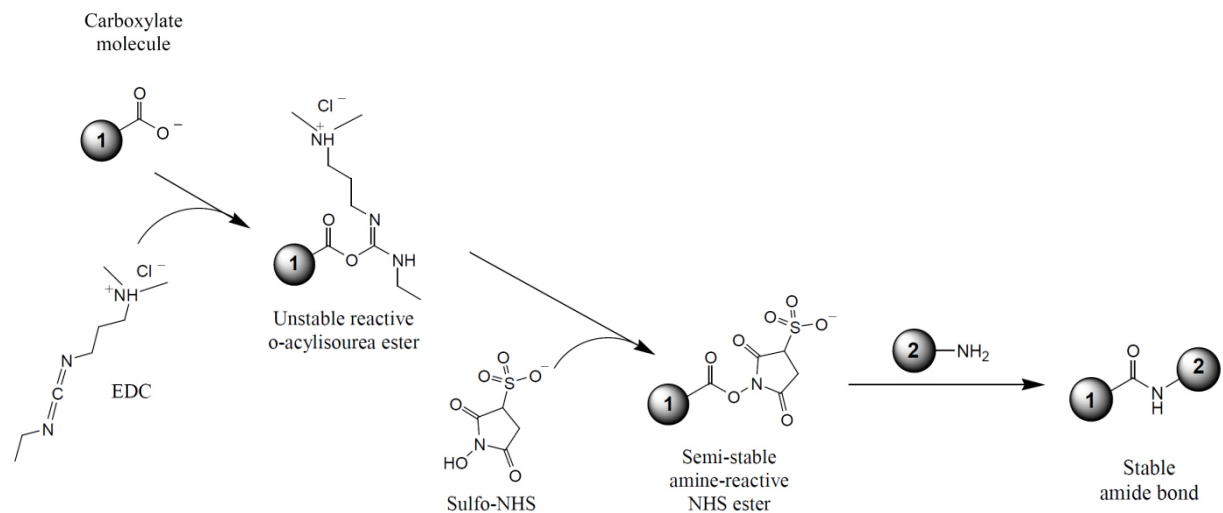


Abbildung 6: Übersicht über die Carbodiimid-Kopplung. Ein Molekül mit einer freien Carboxyl-Gruppe, wie z.B. FUAc, wird durch die Zugabe von EDC aktiviert. Als Zwischenprodukt bildet sich ein aktivierter, instabiler O-Acylisourea-Ester. Nach Hinzufügen von Sulfo-NHS oder NHS wird die Carboxyl-Gruppe für die Bindung an eine freie Amino-Gruppe stabilisiert, wie sie z.B. an BSA mehrfach vorkommt. Als Endprodukt entsteht eine stabile Carbonsäureamid-Bindung. Modifizierte Darstellung nach [83].

Für die Synthese von FUAc-BSA wurde zunächst im Ansatz ① eine 1:1-Mischung von PBS und H₂O mit einer BSA-Konzentration von 25 mg/mL angefertigt und für 1 h gerollt bis sich BSA vollständig gelöst hatte.

Im Ansatz ② wurden 132,5 mM FUAc und 500 mM NaCl in H₂O gelöst. Anschließend wurde Ansatz ② mit 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Im folgenden Schritt wurden 100 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) zugegeben, wodurch sich der pH-Wert auf 5,3 verringerte.

Im Ansatz ③ wurden 1,56 M EDC und 3,91 M NHS in H₂O gelöst. Das entspricht einem NHS/EDC-Konzentrationsverhältnis von ca. 2,5. 6 mL des Ansatz ③ wurden zu 36 mL von Ansatz ② (Verhältnis 1:6, pH-Wert 5,2) zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur moderat gerührt. Anschließend wurde 10 M Natronlauge zugegeben bis ein leicht alkalischer pH-Wert von 7,2 - 7,5 erreicht wurde. Schließlich wurde der Ansatz ②/Ansatz ③-Mischung das BSA in Form von Ansatz ①, in einem Volumenverhältnis von 7:6 (42 mL:36 mL), zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerollt. Nach 2 h wurde das synthetisierte FUAc-BSA mittels Zentrifugation (Amicon Ultra-15, 30 kDa, 5.000 g, 4 °C, 15 min, ohne Bremse) aufkonzentriert. Im letzten Schritt wurde das FUAc-BSA drei Mal mit H₂O gewaschen (5000 g, 4 °C, 15 min, ohne Bremse).

Die verschiedenen Ansätze ① - ③ und die jeweiligen Inhaltsstoffe sowie deren Stoffkonzentrationen sind in Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6: Übersicht über die benötigten Substanzen für die FUAc-BSA-Synthese. Dargestellt sind die verschiedenen Ansätze und deren Inhalt inklusive Stoffkonzentrationen.

Ansatz	Inhaltsstoffe mit Stoffkonzentrationen
①	BSA (25 mg/mL), gelöst in PBS (68,5 mM NaCl, 1,35 mM KCl, 5 mM Na ₂ HPO ₄ und 1 mM KH ₂ PO ₄), pH-Wert 7,0
②	FUAc: 132,5 mM, NaCl: 500 mM, MES: 100 mM, Natronlauge zum Einstellen des pH-Werts auf 7
③	EDC: 1,56 M, NHS: 3,91 M, gelöst in H ₂ O

Das synthetisierte FUAc-BSA wurde anschließend für 24 h bei -30 °C gelagert, bevor es lyophilisiert wurde. Der Erfolg der Synthese wurde mittels Massenspektrometrie (siehe Abschnitt 2.2.6) verifiziert.

2.2.2 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Bodenfläche im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde das Medium RPMI 1640 verwendet, das im 48 h-Rhythmus unter sterilen Bedingungen gewechselt wurde. Die Zelllinien wurden passagiert, wenn die Zellkulturflaschen zu 80 – 90 % mit Karzinomzellen bewachsen waren. Für das Passagieren wurde in die Flaschen 2,5 mL Trypsin 0,25 % zugegeben und anschließend für 12 ± 1 min im Brutschrank inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Danach wurde das Trypsin durch Zugabe von 7,5 mL Medium RPMI 1640 in seiner proteolytischen Wirkung inaktiviert und die Zellsuspension bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Tumorzellen in frischem Medium RPMI 1640 resuspendiert, bevor sie in einer 1:8- bis 1:12-Verdünnung wieder in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

2.2.3 Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Test

Um die zytostatische Wirkung von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA auf die Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D zu quantifizieren, wurde der MTT-Test verwendet.

Der MTT-Test erlaubt es, in kurzer Zeit die Vitalität bei einer großen Anzahl von verschiedenen Zellproben in 96-Well-Platten zu bestimmen [84]. Er ist besonders für das Testen von adhären wachsende Zelllinien geeignet [72,85]. Das 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ursprünglich ein wasserlösliches, gelbes Tetrazoliumsalz, das in die Zellen eindringt und dort zu wasserunlöslichen, blauen Formazankristallen verstoffwechselt wird. Diese Reaktion wird im Zellinneren durch zytosolische und mitochondriale Dehydrogenasen unter Verbrauch von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) katalysiert [84,86]. Anschließend werden die gebildeten Formazankristalle durch Zugabe einer Solubilisierungslösung (siehe 2.1.1) aus dem Zellinneren freigesetzt und gelöst. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm (PowerWave 340 Mikroplatten-Spektralphotometer).

Einzig vitale Zellen, mit Ausnahme von Erythrozyten, reduzieren MTT zu Formazan. Daraus folgt, dass sich die Menge an gebildetem Formazan proportional zur Anzahl der vitalen Zellen verhält. Allerdings unterscheidet sich die Umsetzung in Abhängigkeit von der Zelllinie. Ein Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Zelllinien ist somit nicht direkt möglich [87].

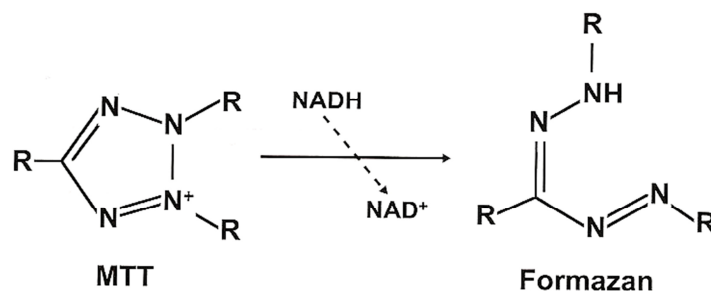


Abbildung 7: Reduktion vom gelben MTT zum blauen Formazan. Die Reaktion geschieht unter Verbrauch von NADH im Zytosol und in den Mitochondrien der Zellen. Nach [72].

2.2.3.1 Wirksamkeitsuntersuchungen von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA mittels MTT-Test

Die Karzinomzellen der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D wurden zu Beginn des Tests mit 2,5 mL Trypsin 0,25 % aus der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert und in Medium RPMI 1640

resuspendiert (analog zum in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Verfahren), bevor sie mit einer Zählkammer (Neubauer-improved) ausgezählt und in einer Dichte von 5.000 Zellen/Well in 96-Well-Platten (Microtest Platte, 96 well, flat bottom) ausgesät wurden. Als Nährmedium wurden 100 μL RPMI 1640 je Well zugegeben. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abpipettiert und direkt durch 200 μL Zytostatika- bzw. BSA-haltiges Zellkulturmedium ersetzt.

Die Wirkung von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA auf die Zelllinien wurde bei Konzentrationen von 100 μM , 300 μM und 500 μM getestet. Für jede Reaktion wurde die Menge an gekoppeltem FUAc je BSA-Molekül mittels MALDI-ToF (siehe Abschnitt 2.2.6) bestimmt ($N_{\text{FUAc/BSA}}$). Aus der gewünschten Wirkstoffkonzentration ($c_{5\text{-FU}}$) und $N_{\text{FUAc/BSA}}$ wurden Äquivalenzkonzentrationen für FUAc-BSA ($c_{\text{FUAc-BSA}}$) nach folgender Formel berechnet:

(Gleichung 1)

$$c_{\text{FUAc-BSA}} = \frac{c_{5\text{-FU}}}{N_{\text{FUAc/BSA}}}$$

BSA wurde in identischen Konzentrationen wie FUAc-BSA zugegeben. Zusätzlich wurden eine Wachstumskontrolle (jeweilige Zelllinie + 200 μL RPMI 1640) und ein Blank (200 μL RPMI 1640 ohne Zellen) angelegt.

Das Zellkulturmedium wurde zu den jeweiligen Messzeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h und 96 h) vorsichtig entfernt und durch 100 μL sterile MTT-Lösung ($c = 1 \text{ mg/mL}$) ersetzt. Nach 2 h Inkubationszeit im Brutschrank wurde die MTT-Lösung entfernt und 100 μL Solubilisierungslösung zugegeben. Anschließend wurde die 96-Well-Platte 15 min geschüttelt, um die entstandenen Formazankristalle zu lösen und photometrisch am Plattenleser bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ ausgewertet.

2.2.3.2 Allgemeine Bemerkung zur Auswertung des MTT-Tests

Jeder der vier Wirkstoffe wurde beim MTT-Test in den Konzentrationen 100 μM , 300 μM und 500 μM experimentell getestet. Daraus ergeben sich zwölf Kombinationsmöglichkeiten. Jede Kombinationsmöglichkeit wurde als Siebenfach-Bestimmung gemessen. Außerdem wurde eine Wachstumskontrolle (CTL, sechsfach) und ein Nullwert (Blank, sechsfach) gemessen. Der Blank wurde von den Messwerten subtrahiert. Der größte und der kleinste Wert jeder siebenfach-Bestimmung wurden herausgenommen, um Ausreißer zu beseitigen. Bei der CTL wurde identisch verfahren. Daraus folgt, dass für die CTL Vierfach-Bestimmungen und für die anderen Messungen Fünffach-Bestimmungen in die Ergebnisse eingingen. Für die Auswertung wurde der

Mittelwert der vier Messwerte der CTL gebildet und als 100 %-Wert gesetzt. Die anderen Messwerte eines Messzeitpunktes wurden auf den Mittelwert der CTL bezogen und so ebenfalls in Prozent umgerechnet. Für jeden Messzeitpunkt wurde die CTL jeweils neu als 100 %-Wert berechnet. Das Verfahren wurde gewählt, um die einzelnen Zelllinien miteinander vergleichen zu können.

Es wurden Messungen bei vier Messzeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h und 96 h durchgeführt. Die vier Messzeitpunkte ergeben eine komplette Messreihe. Für jede Zelllinie wurden vier Messreihen durchgeführt. Die Prozent-Daten aller vier Messreihen wurden anschließend zusammengefasst und ausgewertet. Dabei wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % auf signifikante Unterschiede getestet. Auf diese Weise wurde mit jeder einzelnen Zelllinie verfahren.

Die Ergebnisse werden mit Hilfe von Liniendiagrammen und Boxplots dargestellt. Die Antennen der Boxplots zeigen Minimum und Maximum der Werte an. Die Boxplots selber geben unteres Quartil, Median und oberes Quartil wider. Außerdem befinden sich oberhalb der Boxplots entweder ein Stern als Ausdruck einer statistischen Signifikanz gegenüber der CTL oder „ns“, was „nicht signifikant“ bedeutet.

2.2.3.3 Einfluss einer pH-Wert-Änderung durch FUAc auf den MTT-Test

Um eine mögliche Änderung des pH-Wertes durch die Zugabe von FUAc in das Zellkulturmedium RPMI 1640 zu untersuchen, wurde der MTT-Test auf folgende Weise modifiziert: 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA wurden in einer Konzentration von 300 μ M auf die Tumorzellen gegeben und für 72 h inkubiert. Jede zu messende Substanz wurde zwei Mal je Platte ausgesät; ein Mal auf der linken und ein Mal auf der rechten Seite. Zwei Stunden bevor die standardmäßige sterile MTT-Lösung zugegeben wurde, ist das Medium der rechten Seite abgenommen worden und wurde durch frisches, zytostatikafreies Medium ersetzt, um den pH-Wert auf den Ausgangswert des Zellkulturmediums einzustellen. Anschließend wurde nach dem Standardprotokoll verfahren.

2.2.4 Zellzählung nach Trypanblaufärbung³

Um eine Aussage über das zytotoxische Potential von 5-FU im Vergleich zu FUAc und FUAc-BSA zu treffen, wurde neben dem MTT-Test außerdem stichprobenartig eine Bestimmung der Zellzahl nach 72 h bei einer Wirkstoffkonzentration von 300 μM für 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA bei beiden Zelllinien vorgenommen. Außerdem wurden Werte für CTL und Blank erhoben.

Zur Bestimmung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen wurde die Zellzählung nach Trypanblaufärbung verwendet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der tote Zellen durchgängig blau anfärbt, während vitale Zellen keine Färbung zeigen. Die Färbung kommt zustande, da die Zellmembranintegrität von toten Zellen vermindert ist und so ein Eindringen des Farbstoffes in das Zellinnere ermöglicht. Im Zytoplasma bindet das Trypanblau an Zellproteine, wodurch die Blaufärbung zustande kommt [72].

Die Karzinomzellen wurden dafür zu Beginn des Tests mit 2,5 mL Trypsin 0,25 % aus der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert und in Medium RPMI 1640 resuspendiert (analog zum in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Verfahren), bevor sie mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt und in einer Dichte von 30.000 Zellen je Well (Ausnahme T-47D: 60.000 Zellen je Well) in 24-Well-Platten ausgesät wurden. Mit dem Medium RPMI 1640 wurde auf ein Volumen von 590 μL je Well aufgefüllt. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium abpipettiert und direkt durch 1.180 μL zytostatika- bzw. BSA-haltiges Zellkulturmedium in einer Konzentration von 300 μM ersetzt (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Außerdem wurde eine Wachstumskontrolle ausgesät. Die Volumina wurden so gewählt, dass sie den Bedingungen in der 96-Well-Platte beim MTT-Test entsprechen.

72 h nach der Aussaat wurde zunächst das Medium abpipettiert, 200 μL Trypsin 0,25 % je Well zugegeben und für 12 ± 1 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 μL Medium zugefügt, um das Trypsin 0,25 % in seiner proteolytischen Aktivität zu neutralisieren. Die 600 μL -Zellsuspension wurde homogenisiert und in ein 2 mL-Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 100 μL der Zellsuspension entnommen und in einem weiteren 2 mL-Eppendorfgefäß für 4 min mit 100 μL von 0,5 % Trypanblau unter leichter Agitation inkubiert. Anschließend wurden 10 μL in eine Zählkammer pipettiert, von der vier Eck-Großquadrate ausgezählt (siehe Abbil-

³ Die Zellzählungen wurden mit der Unterstützung von Frau Kathrin Smuda, AG Bäumler, Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

dung 8) wurden, und der Mittelwert gebildet. Für jede Probe wurde die Zahl der Tumorzellen im Triplikat bestimmt.

Beim Zählen wurden in einer ersten Zählrunde die blau angefärbten, toten Zellen gezählt und anschließend, in einer zweiten Zählrunde, die Gesamtzellzahl bestimmt. Für die CTL wurde der Mittelwert der drei Messungen gebildet und als 100 %-Wert gesetzt. Die anderen Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrolle bezogen und so ebenfalls in Prozent umgerechnet. Die Menge an vitalen Zellen wurde berechnet, indem von der Gesamtzellzahl die Menge der toten Zellen subtrahiert wurde.

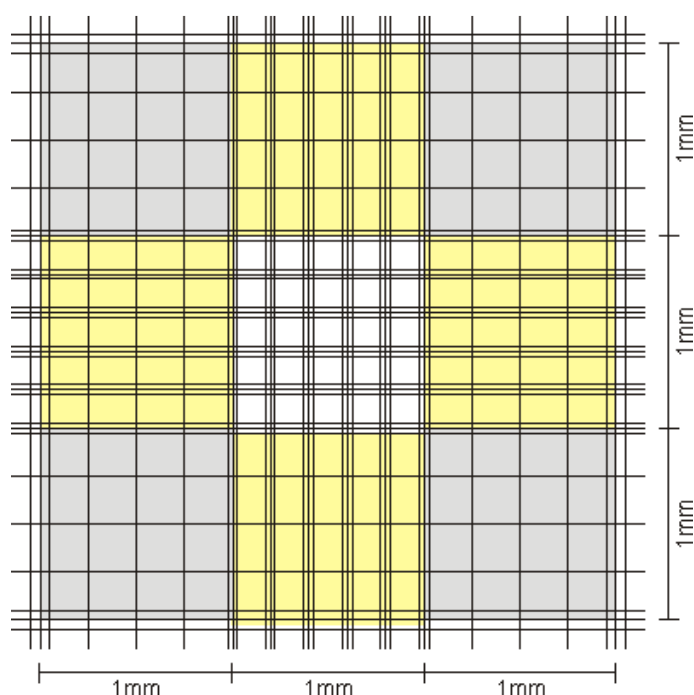


Abbildung 8: Zählkammer Neubauer-improved. Insgesamt besitzt die Zählkammer 3 x 3 Großquadrate. Die vier Eck-Quadrate sind jeweils grau hinterlegt. Ihre Kantenlänge beträgt 1 x 1 mm. Die Höhe der Kammer beläuft sich auf 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ ($= 0,1 \mu\text{L}$) je Eck-Quadrat [88,89].

2.2.5 Kernresonanzspektroskopie⁴

Bei der Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) handelt es sich um eine Methode, die genutzt wird, um die Struktur von chemischen Molekülen zu untersuchen und aufzuklären.

⁴ Die NMR-Spektroskopie-Messungen wurden durchgeführt von der Arbeitsgruppe NMR (Leitung: Herr Prof. Dr. Clemens Mügge) des Institutes für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin und von Herrn Dr. rer. nat. Torsten Sievers, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm.

Chemische Moleküle sind strukturell so aufgebaut, dass sie aus einer bestimmten Anzahl von Atomen bestehen. Jedes einzelne dieser Atome verfügt wiederum über einen Atomkern. Die Atomkerne weisen insgesamt eine positive Ladung auf; weil sie aus neutral geladenen Neutronen und positiv geladenen Protonen bestehen [90,91]. Außerdem verfügen die Atomkerne über einen sogenannten Eigendrehimpuls (Spin), der zu magnetischen Momenten und den damit verbundenen Energieniveaus führt, die für jedes Atom charakteristisch sind und z.B. für die medizinische Diagnostik im MRT Verwendung finden [92].

Bei der NMR-Spektroskopie wird das zu untersuchende chemische Molekül für die Strukturaufklärung in einem starken äußeren Magnetfeld (mehrere Tesla) platziert. Die Kern-Spins der einzelner Atome (z.B. H-Atome bei der ^1H -NMR-Spektroskopie) können unter der Wirkung des äußeren Magnetfeldes zwei mögliche Zustände annehmen, entweder *parallel* oder *antiparallel* gerichtet. Die Kerne, deren Spin parallel zum äußeren Magnetfeld angeordnet sind, besitzen einen energieärmeren, die antiparallel liegenden Spins einen geringfügig energiereicheren Zustand. Die Energiedifferenz steigt, je stärker das äußere Magnetfeld ist, in dem das zu untersuchende chemische Molekül platziert wurde [92].

Mittels einer Hochfrequenz-Spule ($60 - 600 \cdot 10^6$ Hz), die eine elektromagnetische Strahlung erzeugt, wird dem zu untersuchenden chemischen Molekül Energie zugeführt. Die Menge der zugeführten Energie steht nach folgender Formel in einer proportionalen Beziehung zu der Frequenz der elektromagnetischen Strahlung:

(Gleichung 2)
$$E = h \times f$$

Die Energie E ist gleich dem Planck'schen Wirkungsquantum h ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J*s) multipliziert mit der Frequenz f der elektromagnetischen Strahlung. Über die Änderung der Anregungsfrequenz kann demnach die Menge der zugeführten Energie variiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Anregungsfrequenz konstant zu lassen und die Stärke des äußeren Magnetfeldes zu verändern [92].

Wenn die zugegebene Energie genau der Energiedifferenz zwischen energieärmeren und energiereicheren Zustand entspricht, absorbieren die Atomkerne die Energie, werden angeregt und nehmen den energiereicheren Zustand an. Dieser Fall wird als Resonanz bezeichnet und ist messbar. Die Resonanzfrequenzen der einzelnen ^1H -Atome eines Moleküls hängen beispielsweise von der chemischen Umgebung der einzelnen Atomkerne ab. Außerdem können durch die

Nähe von benachbarten ^1H -Atomen Wechselwirkungen (Spin-Spin-Kopplung) untereinander auftreten. Ein NMR-Spektrum wird hauptsächlich durch zwei Größen charakterisiert: Einerseits durch die chemische Verschiebung δ als ein Maß für die Resonanzverschiebung des Atomkerns gegenüber dem Standard. Andererseits durch die Spin-Spin-Kopplung, die zu Dubletts, Tripletts und Quartetts in einem NMR-Spektrum führen kann und die Wechselwirkung benachbarter Kernspins beschreibt. Kopplungen können mit der (n+1)-Regel vorhergesagt werden. Wenn ein ^1H -Kern zum Beispiel eine bestimmte Anzahl n ^1H -Nachbarn aufweist, erhält man ein in n+1 Signale aufgeteiltes NMR-Signal. Ein Maß für die Aufspaltung eines NMR-Signals ist die Kopplungskonstante J , die in Hertz (Hz) angegeben wird [14,92].

In dieser Arbeit wurden ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektroskopien verwendet, um den Erfolg der Synthese von FUAc aus 5-FU nachzuweisen. Die Messung wurde an einem DMX400 von Bruker (Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde deuteriertes DMSO (DMSO- d_6) genutzt. Für die Messungen wurden 5 - 10 mg des Reaktionsproduktes in ein NMR-Röhrchen (Norell, ST550-7) überführt und anschließend 600 μL DMSO- d_6 als Lösungsmittel hinzugegeben. Die Probe wurde verschlossen und leicht geschwenkt, bis sich die Substanz vollständig gelöst hatte. Anschließend erfolgte die Messung. Alle chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) angegeben und beziehen sich auf den Peak von DMSO- d_6 .

2.2.6 *Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation – Time-of-Flight (MALDI-ToF)*⁵

Das MALDI-ToF ist eine Art der Massenspektrometrie, die in dieser Arbeit genutzt wurde, um einerseits den Syntheserfolg von FUAc-BSA zu kontrollieren und andererseits um zu quantifizieren, wie viele Moleküle FUAc je BSA Molekül kovalent gebunden wurden. Beim MALDI-ToF werden die zu messenden Agenzien ionisiert und aufgrund ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) im elektrischen Feld voneinander getrennt und gemessen [93].

Das Prinzip funktioniert folgendermaßen: Die zu messende Probe (BSA bzw. FUAc-BSA, $c = 1 \text{ mg/mL}$, gelöst in H_2O) wird in einem sogenannten Probe-/Matrix-Komplex auf dem Probeträger aufgebracht und kristallisiert. Die Matrix bestand bei den Messungen dieser Arbeit aus 2',6'-Dihydroxyacetophenon (DHAP). Anschließend wird der Probe-/Matrix-Komplex mit einem Laser beschossen (siehe Abbildung 9) [94].

⁵ Die Messungen wurden mit der Hilfe von Felix Wojcik, AG Hartmann, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm, durchgeführt.

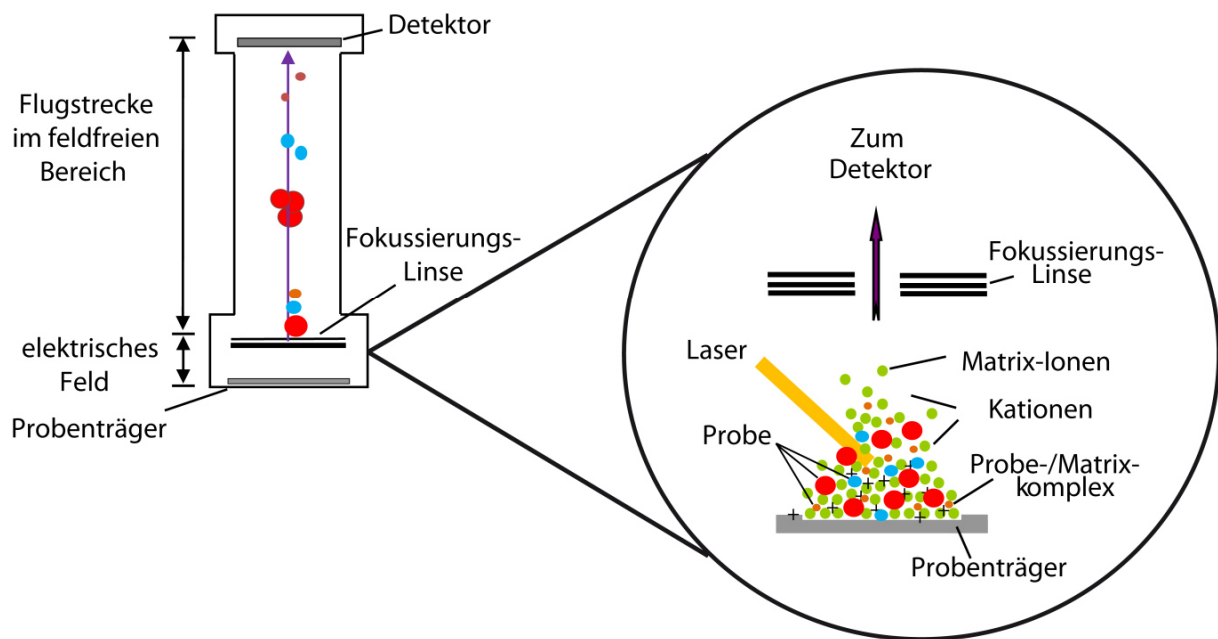


Abbildung 9: Übersicht von dem MALDI-ToF-Aufbau. Linker Teil der Abbildung: Schwere Moleküle (große rote Kreise) erreichen den Detektor aufgrund der größeren Masse später als kleine, leichte Moleküle (kleine rote bzw. blaue Kreise). Rechter Teil der Abbildung: Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich, wo das elektrische Feld anliegt. Ein Probe-/Matrix-Komplex ist auf dem Probenträger fixiert, wird durch Laserimpulse ionisiert und in Richtung des Detektors beschleunigt. Modifiziert nach [95].

Die Energie des Laserimpulses wird so gewählt, dass einzelne Moleküle der Probe ionisieren und aus dem Probe-/Matrix-Komplex herausgelöst werden. Wegen der Ionisation durch den Laser entstehen Kationen der Probe-Moleküle, die mit Hilfe eines elektrischen Feldes zum Detektor hin beschleunigt werden.

Dabei werden die Kationen des Probe-/Matrix-Komplexes in Abhängigkeit von ihrer Masse aufgetrennt. Bei einer einfach positiven Ladung werden jene Moleküle in einem konstanten elektrischen Feld stärker beschleunigt, die eine geringere Masse besitzen. Die Moleküle hingegen, die eine große Masse aufweisen, erfahren eine geringere Beschleunigung im elektrischen Feld. Daraus folgt, dass Moleküle mit geringer Masse eine höhere Geschwindigkeit erreichen als Moleküle großer Masse. Da sowohl leichte als auch schwere Moleküle in dem feldfreien Bereich, der sich an das elektrische Feld anschließt, die identische Streckenlänge zurücklegen müssen, erreichen leichte Moleküle den Detektor früher als die Moleküle großer Masse. Demnach werden unterschiedliche Flugzeiten (Time-of-Flight) benötigt [93,94]. Der Detektor ist in der Lage, die geringen Unterschiede in den Flugzeiten zwischen zwei Molekülen festzustellen und mit einem Standard zu vergleichen. Die Signale werden von einem Computer umgerechnet und in einem

Diagramm aufgetragen. Auf der y-Achse wird die Signalintensität abgebildet, auf der x-Achse wird das Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetragen. Bei einer einfachen Ionisation lässt sich direkt die Masse eines Moleküls ablesen [93,94]. Insbesondere wenn eine einzelne Substanz gemessen wird, erweist sich das Verfahren als sehr einfach, um die Masse festzustellen.

Die MALDI-ToF-Spektren wurden mit dem Gerät Autoflex Speed von Bruker (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen.

2.2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) erlaubt eine höhere optische Auflösung als konventionelle Durchlichtmikroskope [14]. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 10 dargestellt.

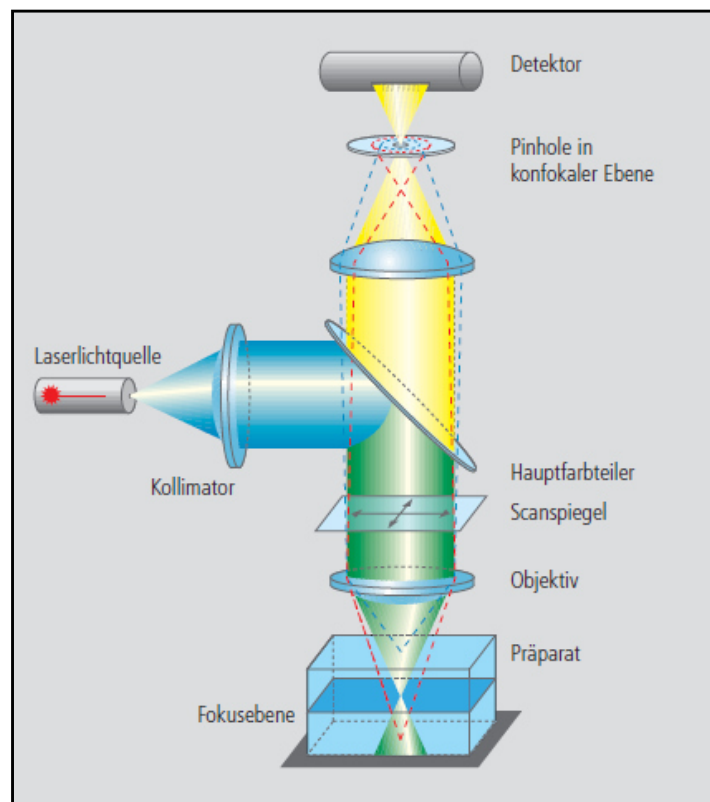


Abbildung 10: Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). Schematische Darstellung von dem Strahlenweg des CLSM [96].

Als Lichtquelle dient beim CLSM das emittierte Licht eines Lasers. Der Laserstrahl passiert zunächst einen dichroitischen Hauptfarbteiler und wird mit Hilfe eines Objektivs in einer bestimmten Ebene des Präparates, der sogenannten Fokusebene, in einem Punkt gebündelt. Das vom Prä-

parat reflektierte Licht durchläuft dieselbe Optik rückwärts und trifft auf eine Lochblende, die sich zur Fokusebene des Präparates konfokal verhält. Das bedeutet, dass nur Licht aus der Fokusebene in der Lage ist, die Lochblende zu passieren und zum Photomultiplier zu gelangen. Daraus folgt die höhere Kontrastschärfe des CLSM im Vergleich zum konventionellen Durchlichtmikroskop.

Ein einzelner, abgetasteter Punkt stellt lediglich einen Teilbereich des gesamten Präparates dar. Um ein vollständiges Präparatbild zu erhalten, wird das gesamte Präparat spalten- und zeilenweise mit vielen Einzelpunkten ausgelesen. Die Einzelpunkte werden im Computer verrechnet und ergeben letztendlich das vollständige, mikroskopische Bild. Dreidimensionale Abbildungen sind möglich, wenn die Fokusebene eines Präparates schrittweise verschoben wird. Fluoreszenzmarkierte Stoffe können ebenfalls mit Hilfe des CLSM sichtbar gemacht werden. Dafür stehen Laser im Wellenlängenbereich von $\lambda = 351 - 633 \text{ nm}$ zur Verfügung [96–98].

Für die Arbeit wurde ein CLSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Deutschland) verwendet. Es diente der mikroskopischen Aufnahme von sogenannten Z-Stacks der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D. Die folgende Abbildung 11 veranschaulicht die Entstehung der CLSM-Bilder.

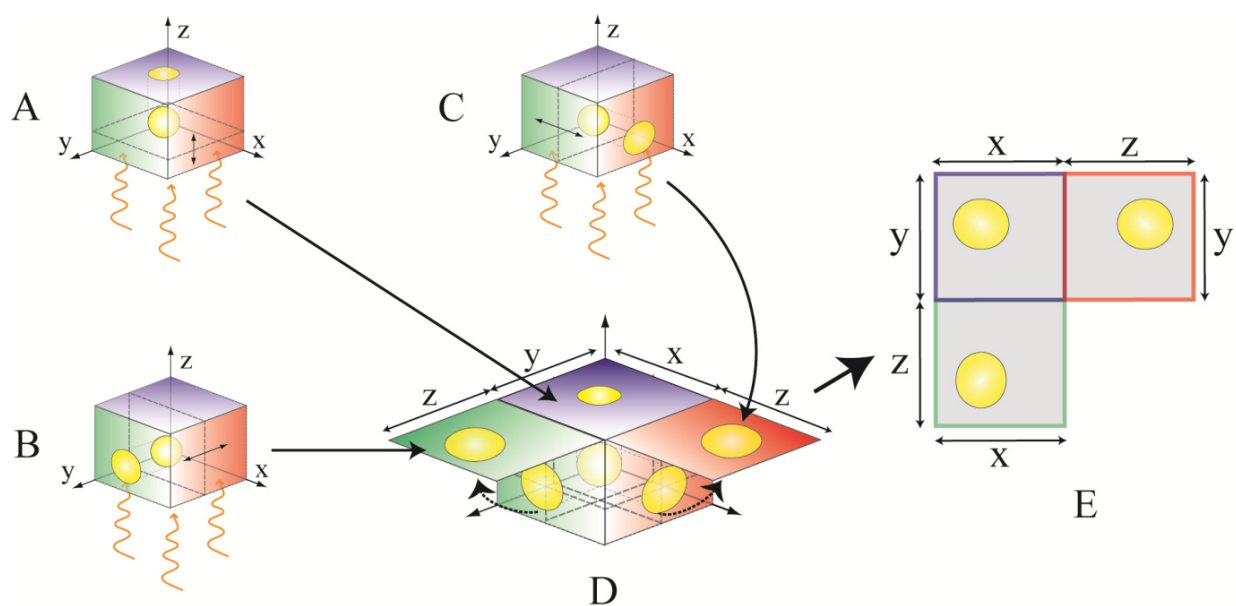


Abbildung 11: Entstehung der orthogonalen CLSM-Bilder. Die orangenen gewundenen Pfeile repräsentieren den optischen Pfad der Lichtquelle. (A): Die gelbe Kugel innerhalb des Würfels wird durch eine verschiebbare x-y-Ebene entlang der z-Achse geschnitten (Z-Stack). Die Projektion des Schnittes ist auf der oberen Ebene des Würfels zu sehen. (B): Schnitt durch die x-z-Ebene mit Projektion auf die Oberfläche. (C): Schnitt durch die y-z-Ebene mit Projektion auf die Oberfläche. (D): Alle Projektionen werden in einem Würfel zusammengefasst. Die x-z-Ebene und die y-z-Ebene werden auf eine Höhe mit der x-y-Ebene hochgeklappt. (E): Schematische Darstellung des abschließenden, orthogonalen CLSM-Bildes.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well in μ -Slide 8-well-Platten ausgesät, anschließend 200 μ L Medium zugegeben, das 300 μ M eines BSA/FITC-BSA (9:1)-Gemisches (Fluoresceinisothiocyanat-BSA) enthielt, und für 72 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Das FITC-BSA fluoresziert, nachdem es mit einem Laser bei $\lambda = 488$ nm Wellenlänge angeregt wurde. Mit Hilfe des Fluoreszenzsignals wird erkennbar, ob es in bestimmten Bereichen der Zellen, z.B. im intrazellulären Raum, akkumuliert oder ob es keine Anreicherung gibt.

2.2.8 *Verwendete Software und statistische Tests*

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism® 6.0 verwendet [99]. Die Berechnung von statistischen Signifikanzen erfolgte mittels eines zweiseitigen nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige, nicht-normalverteilte Stichproben. Bei einem Signifikanzniveau (p) von $p < 0,01$ wurden zwei Verteilungen als signifikant unterschiedlich angenommen. Zusätzlich wurde die inhibitorische Konzentration 50 berechnet (IC_{50}), die angibt, welche Wirkstoffkonzentration nötig ist, um die Proliferation von Tumorzellen um 50 % im Vergleich zur Wachstumskontrolle zu inhibieren [100].

Außerdem wurde folgende Software verwendet: Adobe Illustrator CS3®, Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010, Mendeley Desktop, Zeiss LSM Image Browser und MDL ISIS™/Draw 2.5.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Ergebnisdarstellung wird die erfolgreiche Umsetzung von 5-FU zu FUAc (siehe Abschnitt 2.2.1.1) gezeigt. Als Nachweismethode wurde die NMR-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.2.5) gewählt. Anschließend wird auf die Resultate der MALDI-ToF-Messung (siehe Abschnitt 3.2) eingegangen, die die erfolgreiche Synthese von FUAc-BSA aus FUAc bestätigen.

In der Folge wird die konzentrationsabhängige und zeitabhängige biologische Wirkung von FUAc und FUAc-BSA sowie von BSA und 5-FU auf die Tumorzelllinien MDA-MB-231 und T-47D (siehe Abschnitt 2.1.3) beschrieben. Für die Charakterisierung wurden der MTT-Test (siehe Abschnitt 2.2.3) und die Zellzählung nach Trypanblaufärbung (siehe Abschnitt 2.2.4) verwendet. Abschließend werden die CLSM-Bilder ausgewertet, die die Aufnahme von FITC-BSA in die Zellen der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D zeigen.

3.1 NMR-Spektroskopie von FUAc synthetisiert aus 5-FU

An die Ausgangssubstanz 5-FU sollte Essigsäure gekoppelt werden, die eine freie Carboxylgruppe aufweist und der späteren Ankopplung von BSA an das Reaktionsprodukt FUAc dient (siehe Abschnitt 2.2.1.1 und Abbildung 5) [79].

Um den Syntheserfolg der Reaktion zu überprüfen, wurde das Reaktionsprodukt mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und mit ^{19}F -NMR-Spektroskopie untersucht. Ein ^1H -NMR-Spektrum von FUAc ist in Abbildung 12 dargestellt, das Resultat der ^{13}C -NMR-Spektroskopie zeigt Abbildung 13. Die Ergebnisse der ^{19}F -NMR-Spektroskopie sind in Abbildung 34 (siehe Anhang) veranschaulicht.

3.1.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

In der ^1H -NMR-Spektroskopie des FUAc sind folgende Peaks erkennbar (siehe Abbildung 12).

Es ist ein Singulett mit einer Signalintensität von 1,0 bei 13,23 ppm feststellbar, das der Carboxylgruppe ($\text{C}^2\text{-O-O-H}$) zugeordnet wird. Die Signalintensität des Peaks deutet auf die Anwesenheit eines einzelnen H-Atoms hin. Die chemische Verschiebung von 13,23 ppm lässt starke elektronegative Atome in der Umgebung des H-Atoms vermuten, wodurch eine Tieffeldverschiebung resultiert. Die zwei O-Atome verfügen jeweils über eine Elektronegativität

von 3,4 [92] und verursachen so die relativ große chemische Verschiebung mit hoher Wahrscheinlichkeit.

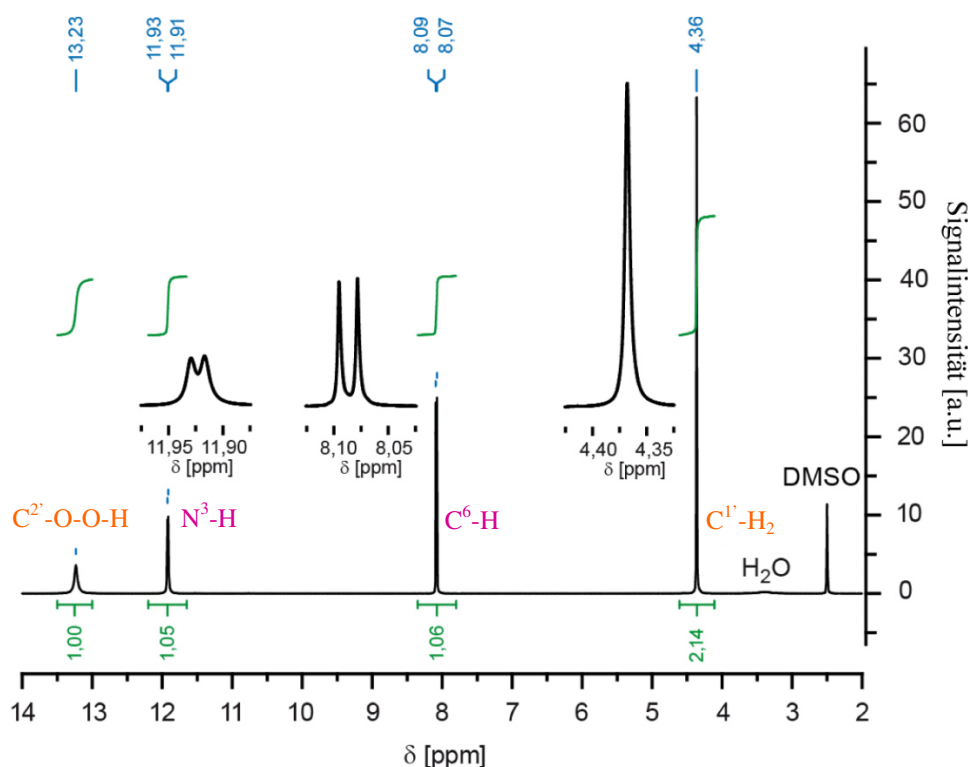


Abbildung 12: ^1H -NMR-Spektrum von FUAc in $\text{DMSO-}d_6$. Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung δ [ppm] aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Signalintensität [a.u.] abgebildet. Die Signale sind den jeweiligen chemischen Gruppen des FUAc-Moleküls zugeordnet, die ein H-Atom beinhalten. Die grünen Zahlen unter den Signalen und die senkrecht darüber befindlichen grünen Integrale geben den Flächeninhalt unter den Signalen an. Der Flächeninhalt eines Signals verhält sich proportional zur Anzahl der H-Atome der jeweiligen chemischen Gruppe. Die blauen Zahlen am oberen Rand der Abbildung geben den Wert für die chemische Verschiebung δ [ppm] wieder. Für das $\text{N}^3\text{-H}$ -, das $\text{C}^6\text{-H}$ - und das $\text{C}^{1'}\text{-H}_2$ -Signal sind außerdem Vergrößerungen dargestellt. Die orange- und pinkfarbigen Buchstaben C, O, N und H zeigen die Zuordnung des Peaks zur jeweiligen Gruppe des FUAc-Moleküls (siehe Abbildung 5).

Des Weiteren wurde ein Dublett bei 11,93 ppm und 11,91 ppm mit einer Signalintensität von 1,05 gefunden, was auf ein einzelnes H-Atom hindeutet, das eine starke chemische Verschiebung erfährt. Es müssen sich stark elektronenziehende Atome in der Umgebung befinden. Deshalb handelt es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um das $\text{N}^3\text{-H}$, dessen direkte Nachbarn zwei elektronenziehende $\text{C}=\text{O}$ -Gruppen (am C^2 und am C^4) sind. Außerdem verfügt das Fluor-Atom (am C^5) ebenfalls über eine starke elektronenziehende Wirkung und trägt so zur Tieffeldverschiebung bei. Die Aufspaltung in ein Dublett resultiert durch das Fluor-Atom, da es

sich in der sogenannten J_4 -cis-Position (J_4 -Kopplungskonstante: 5,1 Hz) befindet und so das N^3 -H-Signal beeinflusst.

Außerdem zeigte sich ein Dublett bei 8,09 ppm und 8,07 ppm. Die Größe der chemischen Verschiebung spricht für eine elektronenziehende Gruppe in der unmittelbaren Umgebung. Außerdem ist das Signal in ein Dublett aufgespalten. Die Kopplungskonstante J_3 beträgt 6,8 Hz und ist damit größer als die J_4 -Kopplungskonstante des vorherigen Dubletts (11,93 ppm und 11,91 ppm). Das weist auf ein H-Atom oder ein Fluor-Atom in J_3 -Position als näheren Nachbar hin. Die Signalintensität (1,06) symbolisiert die Anwesenheit von einem einzelnen H-Atom. Aufgrund dieser Ergebnisse wird das Signal dem C^6 -H zugeschrieben.

Das Singulett bei 4,36 ppm besitzt eine Signalintensität mit einem Wert von 2,14 und ist damit ca. doppelt so groß wie die vorherigen Signalintensitäten. Deshalb müssen zwei H-Atome vorliegen, die auf das Signal einwirken. Die chemische Verschiebung kommt entweder durch einen schwach elektronenziehenden Nachbarn zustande oder stellt eine Mischung aus stark elektronenziehenden Nachbarn und stark elektronenschiebenden Nachbarn dar, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung hemmen. Es handelt sich deshalb um das C^1 -H₂, das zwei H-Atome besitzt und mit dem N^1 auf der einen Seite einen elektronenschiebenden und mit der Carboxylgruppe (C^2 -O-O-H), auf der Gegenseite, einen elektronenziehenden Nachbarn besitzt.

Das Signal des Singulett bei ca. 3,3 – 3,4 ppm entsteht durch Restwasser in der Probe und das Singulett bei ca. 2,5 ppm chemischer Verschiebung wird dem Lösungsmittel DMSO- d_6 zugeordnet.

3.1.2 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Um den Syntheserfolg der Umwandlung von 5-FU zu FUAc zu bestätigen, wurde darüber hinaus eine ^{13}C -NMR-Spektroskopie von FUAc durchgeführt (siehe Abbildung 13). Die Präparation der FUAc-Probe erfolgte simultan zu der oben beschriebenen für die 1H -NMR-Spektroskopie. Die Ergebnisse spiegeln die erfolgreiche Synthese von FUAc aus 5-FU wider. Die einzelnen Peaks aus Abbildung 13 sind den C-Atomen von FUAc zugeordnet (siehe Abbildung 5).

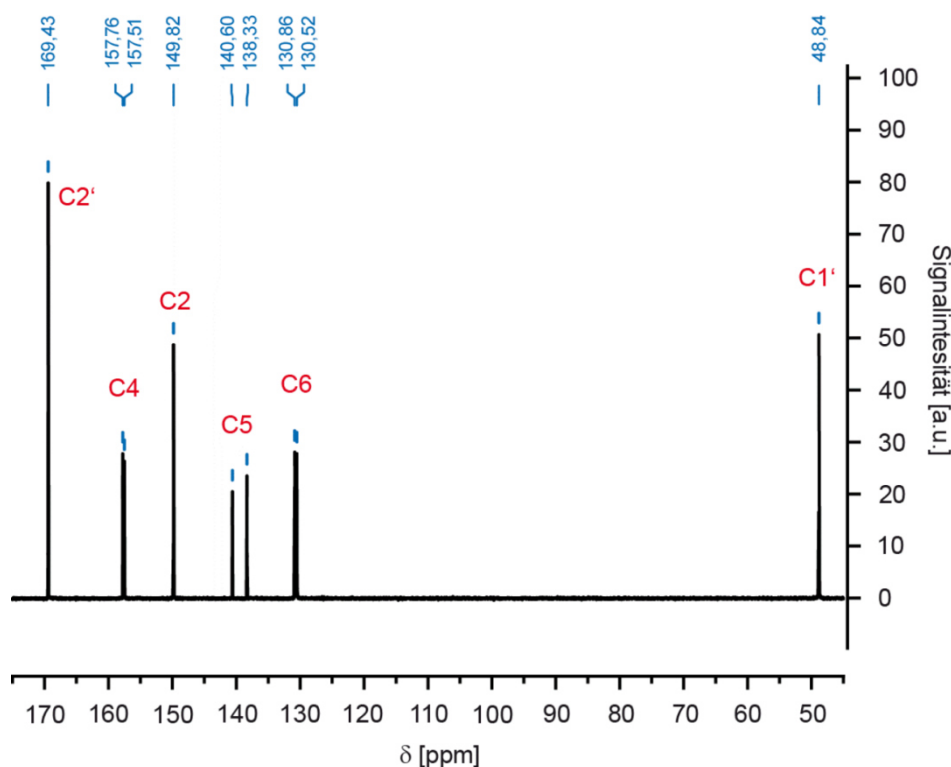


Abbildung 13: ^{13}C -NMR-Spektrum von FUAc in $\text{DMSO-}d_6$. Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung δ [ppm] aufgetragen, die y-Achse zeigt die Signalintensität [a.u.]. Die roten Buchstabe-Zahl-Kombinationen geben die Zuordnung des jeweiligen Peaks zum C-Atom im FUAc-Molekül an. Die blauen Zahlen sind die Messwerte der chemischen Verschiebung.

Insgesamt sind sechs Signale (drei Singulets und drei Dubletts) dargestellt, wovon $\text{C}^{1'}$, $\text{C}^{2'}$ und C^2 Singulets und C^4 , C^5 und C^6 Dubletts sind. Demnach sind sechs C-Atome in dem Molekül vorhanden, wie es für FUAc ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FN}_2\text{O}_4$) erwartet wurde.

Das Fluoratom an C^5 -Position besitzt eine starke Elektronegativität und als Folge davon eine große elektronenziehende Wirkung [92]. Dadurch werden sogenannte C-F-Kopplungen hervorgerufen, was an den Dubletts bei dem ^{13}C -Spektrum erkennbar ist. Bei dem Dublett (140,60 ppm und 138,33 ppm) handelt es sich um eine J_1 -Kopplung (siehe Abschnitt 2.2.5), die durch die direkte Nachbarschaft eines Kohlenstoffatoms zum Fluoratom hervorgerufen wird. Die weiteren zwei Dubletts entsprechen J_2 -Kopplungen. Sie entstehen, da das substituierte Fluoratom ebenfalls am C^4 - bzw. am C^6 -Ringatom elektronenziehenden Einfluss ausübt.

Die Ergebnisse der ^1H -NMR-Spektroskopie und der ^{13}C -NMR-Spektroskopie zeigen, dass die Synthese von FUAc aus 5-FU erfolgreich verlaufen ist. Aus 1,73 g (13,3 mmol) 5-FU wurden 0,745 g (3,96 mmol) FUAc hergestellt. Das entspricht einer Ausbeute von ca. 30 %.

3.2 MALDI-ToF-Messung von FUAc-BSA synthetisiert aus FUAc

Im nächsten Schritt wurde das synthetisierte FUAc mittels einer Carbodiimid-Kopplung kovalent an BSA gebunden (siehe Abschnitt 2.2.1.2 und Abbildung 6).

Um den Erfolg der Synthese zu überprüfen und die Menge an gebundenem FUAc zu quantifizieren, wurde eine Massenspektrometrie, genauer eine MALDI-ToF-Messung, von dem Reaktionsprodukt vorgenommen.

Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der MALDI-ToF-Messung für die Negativkontrolle BSA:

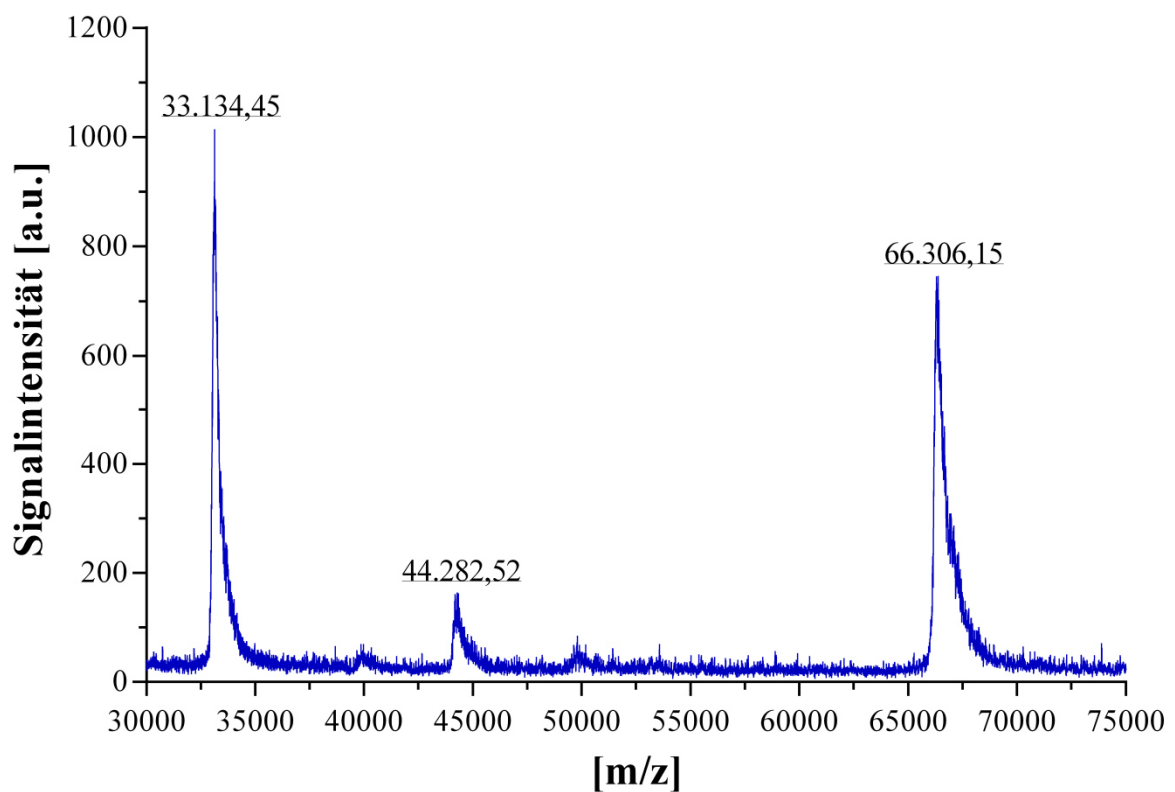


Abbildung 14: MALDI-ToF-Messung von BSA. Auf der x-Achse ist das Masse-Ladungs-Verhältnis [m/z] aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Signalintensität [a.u.].

In der Abbildung sind drei Peaks erkennbar, wobei der Peak bei 66.306,15 m/z als $[BSA + H]^+$ zugeordnet wird, da der Hersteller eine Molekülmasse von 66.430 Da für BSA angibt [101]. Die mittels MALDI-ToF ermittelte Molekülmasse von BSA beträgt demnach 66.306 Da. Woher die anderen beiden Peaks bei 44.282,52 m/z und bei 33.134,45 m/z stammen könnten, wird in der Diskussion in Abschnitt 4.1.2.1 betrachtet.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 15 das Resultat der Massenspektrometrie für FUAc-BSA dargestellt:

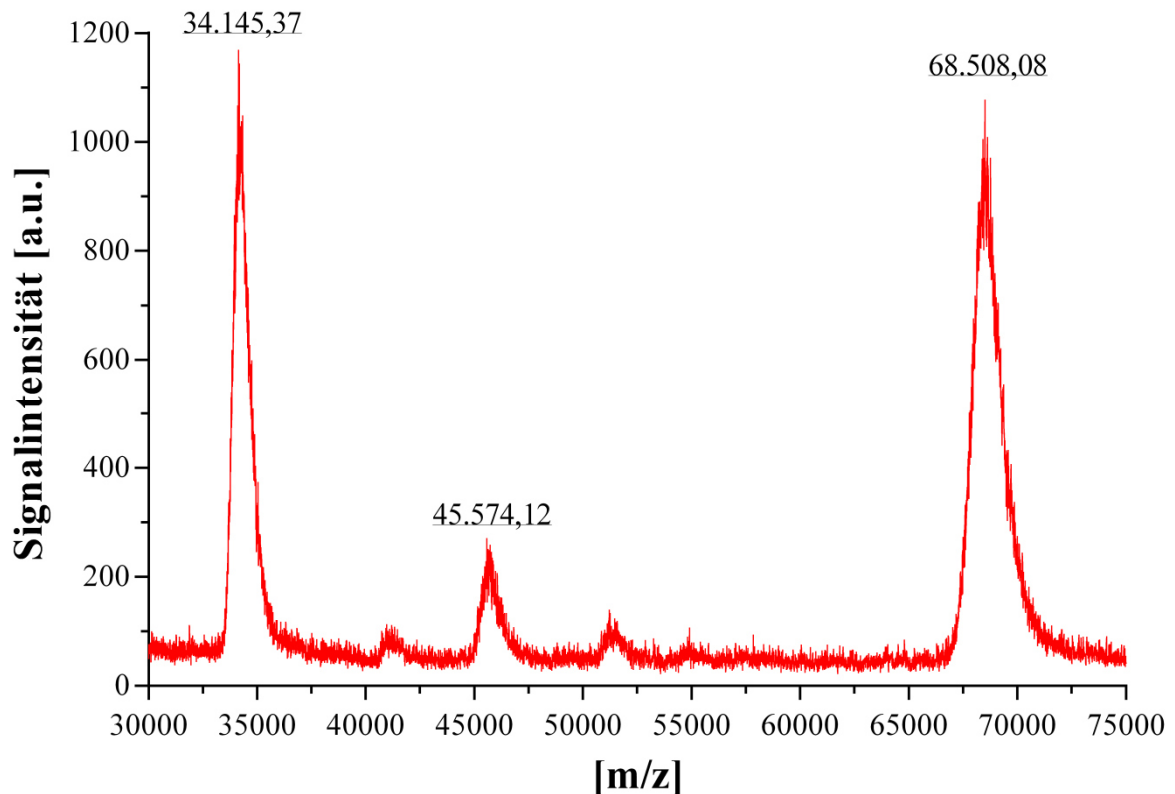


Abbildung 15: MALDI-ToF-Messung für FUAc-BSA. Auf der x-Achse: Masse-Ladungs-Verhältnis [m/z]. Auf der y-Achse: Signalintensität [a.u.].

In der Darstellung sind ebenfalls drei Peaks feststellbar. Der Peak bei 68.508,08 m/z wird als $[\text{FUAc-BSA} + \text{H}]^+$ zugeordnet. Die Molekülmasse von FUAc-BSA beträgt folglich 68.508 Da. Wie die Peaks bei 45.574,12 m/z und bei 34.145,37 m/z entstanden sein könnten, wird ausführlicher in der Diskussion in Abschnitt 4.1.2.2 erörtert.

Die folgende Abbildung 16 veranschaulicht die Ergebnisse der MALDI-ToF-Messungen in einer direkten Gegenüberstellung:

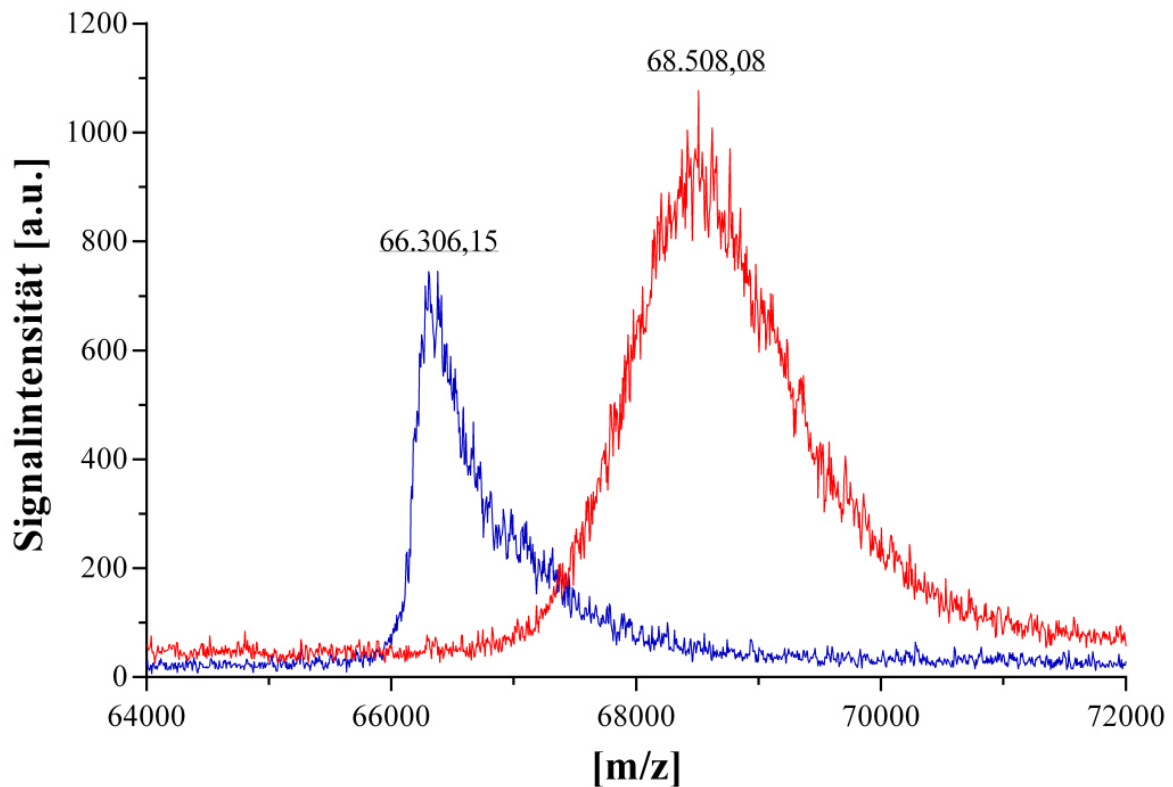


Abbildung 16: Vergleich der MALDI-ToF-Ergebnisse von BSA und FUAc-BSA. Vergrößerte Darstellung der beiden Peaks im Bereich des Masse-Ladungs-Verhältnisses von 64.000 bis 72.000 m/z sowohl für BSA (—) als auch für FUAc-BSA (—). Auf der x-Achse ist das Masse-Ladungs-Verhältnis $[m/z]$ aufgetragen, auf der y-Achse wird die Signalintensität [a.u.] dargestellt.

Bei beiden Messungen handelt es sich um BSA-Moleküle, wobei bei dem FUAc-BSA zusätzlich FUAc kovalent an das Molekül BSA gebunden wurde. Die rote Kurve des FUAc-BSA zeigt einen Peak, der sich in seiner Position auf der x-Achse deutlich von dem des BSA unterscheidet. Die Rechtsverschiebung bedeutet, dass sich das Masse-Ladungs-Verhältnis erhöht hat, d.h. $[FUAc-BSA + H]^+$ besitzt eine größere Masse als $[BSA + H]^+$.

Zunächst wurde die Differenz zwischen $[FUAc-BSA + H]^+$ und $[BSA + H]^+$ gebildet:

$$68.508,08 \text{ Da} - 66.306,15 \text{ Da} = 2.201,93 \text{ Da}$$

Das FUAc-BSA-Molekül besitzt folglich eine um ca. 2.200 Da größere Molekülmasse als ein reines BSA-Molekül. Ein einzelnes FUAc-Molekül verfügt über ein Molekulargewicht von 188,1 Da. Dividiert man beide Werte durcheinander, erhält man folgendes Ergebnis:

$$\frac{2.201,93 \text{ Da}}{188,1 \frac{\text{Da}}{\text{FUAc-Molekül}}} = 11,7 \approx 12 \text{ FUAc-Moleküle}$$

Daraus folgt, dass pro BSA-Molekül durchschnittlich zwischen 11 - 12 Moleküle FUAc kovalent gebunden wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kopplung von FUAc an BSA erfolgreich verlaufen ist. Aus 900 mg (0,0135 mmol) BSA wurden 873,3 mg (0,0127 mmol) FUAc-BSA synthetisiert. Das entspricht einer Ausbeute von ca. 94 %.

3.3 Zellkulturversuche

Um die Wirkung von den verschiedenen Substanzen 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA auf die Zelllinien zu charakterisieren, wurde der MTT-Test (siehe Abschnitt 2.2.3) sowie die Zellzählung nach Trypanblaufärbung (siehe Abschnitt 2.2.4) verwendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D dargestellt.

3.3.1 Zelllinie MDA-MB-231

3.3.1.1 MTT-Tests

Die Abbildung 17 bis Abbildung 20 und die Tabelle 13 bis Tabelle 16 (siehe Anhang) zeigen die Resultate des MTT-Tests für die Zelllinie MDA-MB-231. Daran anschließend, in Abbildung 21, werden die Ergebnisse in Form eines Kurvendiagramms dargestellt, um den Einfluss der Wirkstoffe im zeitlichen Verlauf zu veranschaulichen. Zuletzt wurden die Resultate des MTT-Tests verwendet, um IC_{50} -Werte zu berechnen (Tabelle 7).

Für alle Darstellungen wurde die gleiche Skalierung verwendet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu den vier Messzeitpunkten zu erleichtern. Da die 24 h-Werte (siehe Abbildung 17 und Tabelle 13) sehr stark streuen, liegen einige Werte außerhalb des Darstellungsbereiches.

Nach 24 h zeigt 5-FU bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 μM eine statistisch signifikante Inhibition der Zellproliferation gegenüber der CTL, während bei 300 μM und 500 μM keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden können. FUAc-BSA zeigt bei 100 μM , wie 5-FU, eine signifikante Wachstumshemmung, für Wirkstoffkonzentrationen von 300 μM und 500 μM ist die Hemmung der Zellteilung im Vergleich zur Wachstumskontrolle hochsignifikant. In der Gegenüberstellung zu 5-FU ist erkennbar, dass FUAc-BSA bei 300 μM und 500 μM signifikant stärker zytostatisch wirkt als 5-FU.

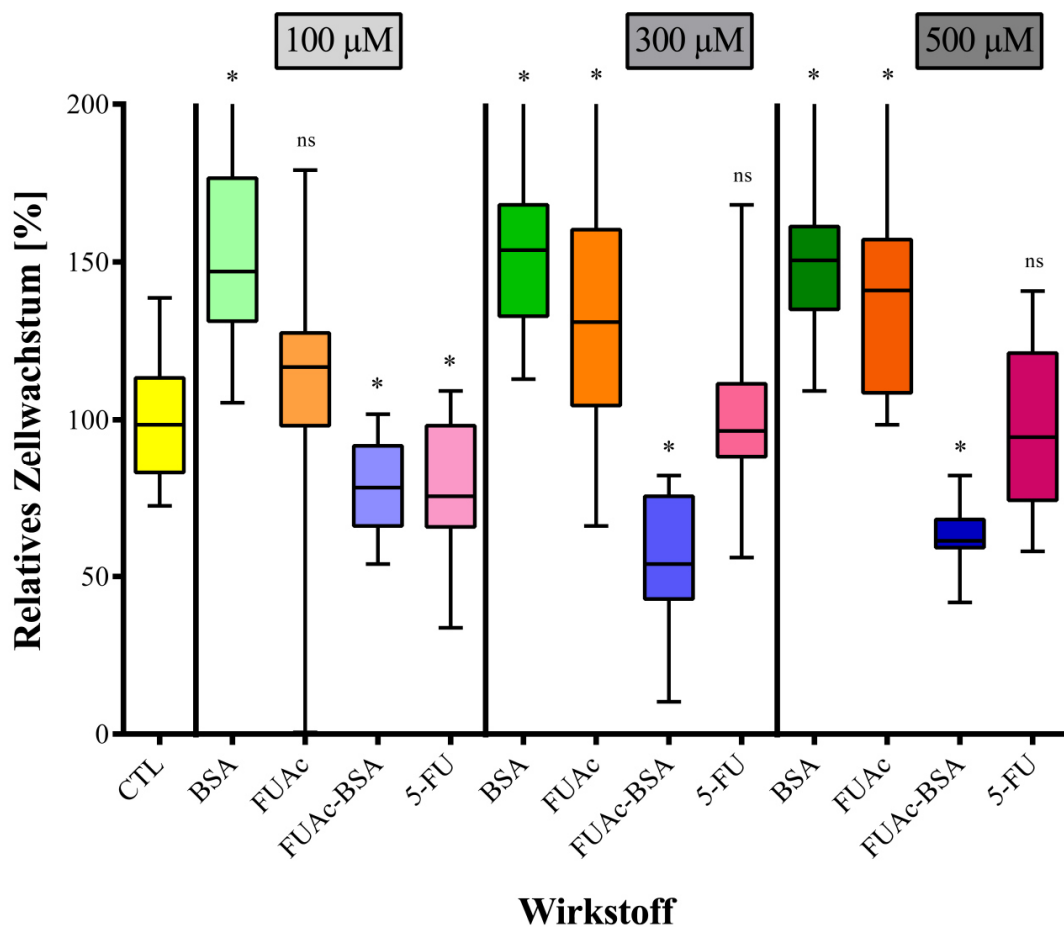


Abbildung 17: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 24 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 12) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 15) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 μM , 300 μM , 500 μM) sind durch eine durchgezogene Linie optisch voneinander getrennt. * $\hat{=}$ signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,01) gegenüber der CTL.

Reines FUAc besitzt offenbar keinen Effekt auf das Zellwachstum bei 100 μM und scheint proliferationsfördernd in den Konzentrationen 300 μM und 500 μM gegenüber der CTL zu wirken. Vergleicht man FUAc und FUAc-BSA bei identischen Wirkstoffkonzentrationen miteinander, wird die signifikant stärkere Wirksamkeit von FUAc-BSA deutlich (p-Werte: 100 μM :

0,0068; 300 μM : <0,0001; 500 μM : <0,0001). Reines BSA bewirkt in allen Wirkstoffkonzentrationen eine hochsignifikante Proliferationsförderung gegenüber der CTL.

Nach 48 h, 72 h und 96 h zeigt 5-FU bei allen drei Wirkstoffkonzentrationen eine hochsignifikante Inhibition des Zellwachstums gegenüber der CTL. Auf die Ergebnisse wird in der Folge lediglich Bezug genommen, um mögliche Vergleiche zu den anderen Wirkstoffen anzustellen. FUAc-BSA bewirkt ebenfalls eine hochsignifikante Verminderung der Tumorzellproliferation. In der Gegenüberstellung von 5-FU und FUAc-BSA wird ersichtlich, dass 100 μM 5-FU signifikant zytostatischer wirkt als 500 μM FUAc-BSA.

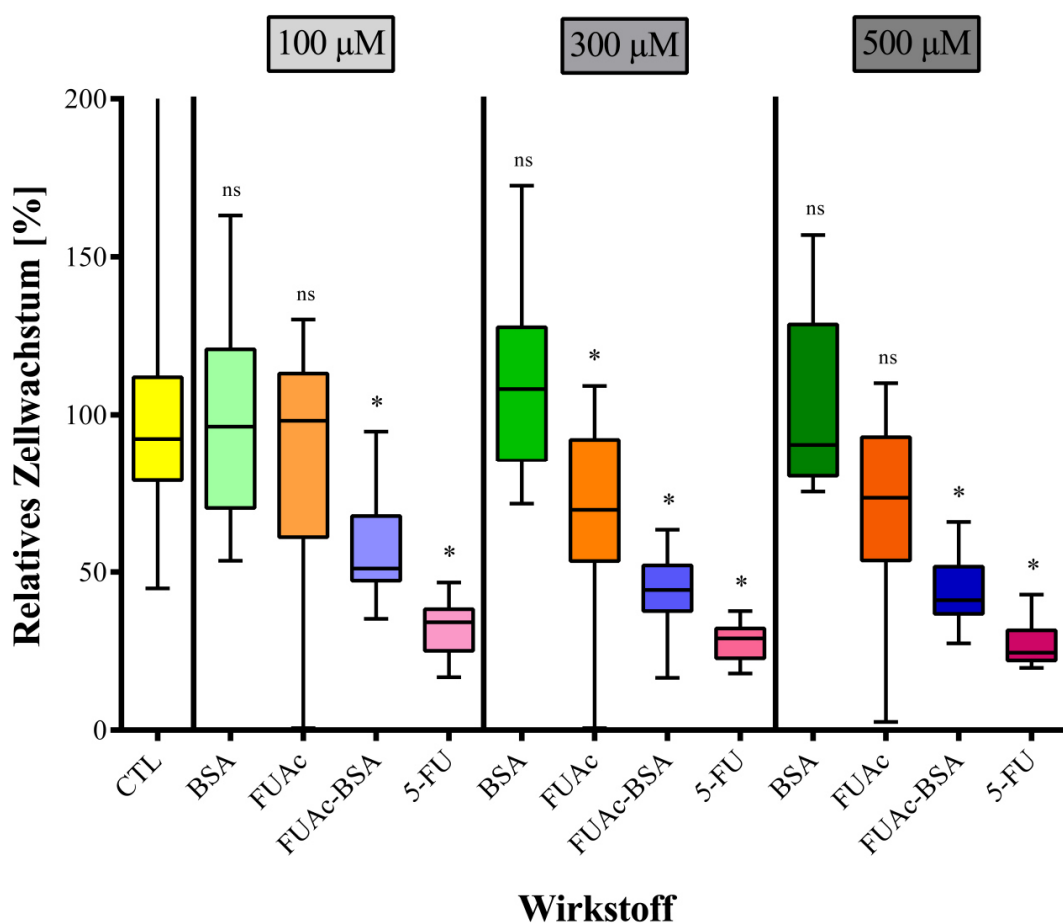


Abbildung 18: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 48 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 μM , 300 μM , 500 μM) sind durch eine durchgezogene Linie optisch voneinander getrennt. * $\hat{=}$ signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,01) gegenüber der CTL.

Reines FUAc zeigt bei 100 μM und bei 500 μM keinen statistisch messbaren Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zur CTL. Lediglich bei 300 μM ist eine schwache Wachstumsinhibition gegenüber der Wachstumskontrolle erkennbar. FUAc-BSA ist bei identischer Wirkstoffkon-

zentration vergleichsweise stärker wirksam als reines FUAc. Für BSA sind gegenüber der CTL keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Nach 72 h bewirkt FUAc-BSA bei allen drei Wirkstoffkonzentrationen eine signifikante Inhibition der Tumorzellproliferation gegenüber der Wachstumskontrolle. Zwischen 100 μM FUAc-BSA und 500 μM FUAc-BSA ist ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar. 5-FU weist im Vergleich zu allen FUAc-BSA-Konzentrationen eine signifikant stärkere Wirksamkeit auf.

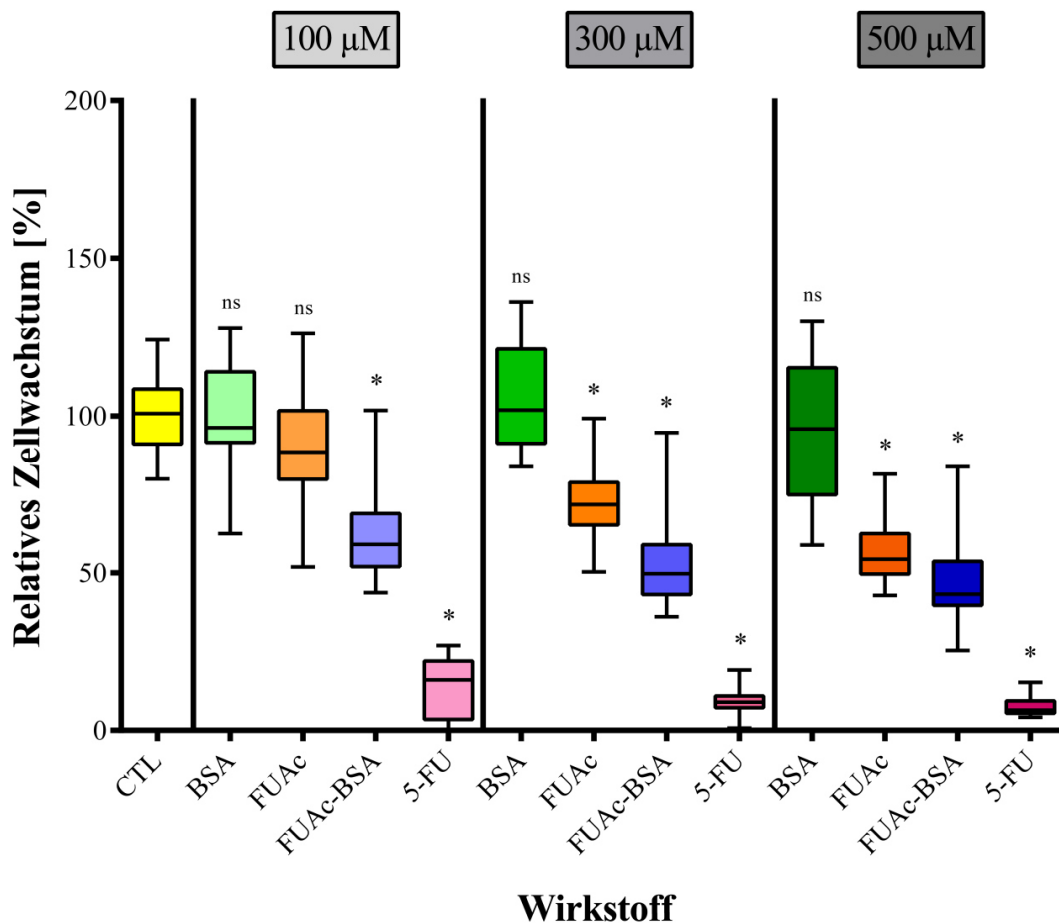


Abbildung 19: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 72 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 μM , 300 μM , 500 μM) sind durch eine durchgezogene Linie optisch voneinander getrennt. * $\hat{=}$ signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,01) gegenüber der CTL.

Reines FUAc besitzt bei 100 μM anscheinend keinen zytostatischen Effekt auf das Wachstum der Zellen. Bei einer Gabe von 300 μM und 500 μM wird jedoch die hochsignifikante Wirksamkeit von FUAc im Vergleich zur CTL deutlich. In der Gegenüberstellung der MTT-Ergebnisse bei identischen Wirkstoffkonzentrationen von FUAc und FUAc-BSA verfügt FUAc-BSA über

einen stets größeren, statistisch signifikanten Effekt auf die Wachstumshemmung. Reines BSA besitzt keinen nachweisbaren Einfluss auf die Teilung der Zellen.

Nach 96 h bewirkt FUAc-BSA weiterhin eine hochsignifikante Proliferationsinhibition bei den Tumorzellen. In der Gegenüberstellung zu 5-FU zeigt sich erneut ein schwächerer Effekt seitens FUAc-BSA.

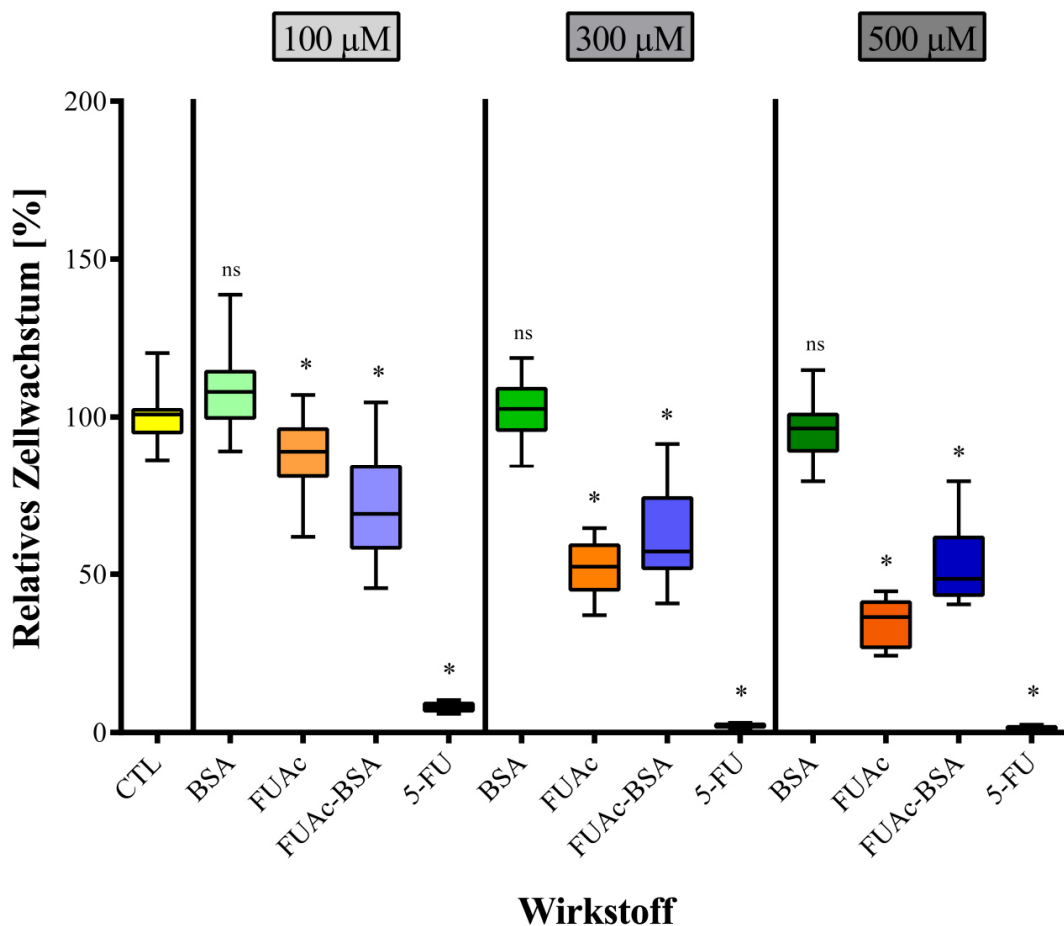


Abbildung 20: MTT-Ergebnisse für Zelllinie MDA-MB-231 nach 96 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 µM, 300 µM, 500 µM) sind durch eine durchgezogene Linie optisch voneinander getrennt. * $\hat{=}$ signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,01) gegenüber der CTL.

Reines FUAc verfügt bei 100 µM offenbar über einen schwachen Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zur CTL. Dieser Effekt verstärkt sich mit steigender Wirkstoffkonzentration. Bei 100 µM Wirkstoffkonzentration wirkt FUAc-BSA signifikant stärker als FUAc (p-Wert = 0,0011). Bei 300 µM sind die beiden Wirkstoffe weitestgehend identisch wirksam (p-Wert = 0,0158) und bei 500 µM verfügt reines FUAc über einen größeren zytostatischen Ein-

fluss auf die Zellproliferation (p -Wert $< 0,0001$) als FUAc-BSA. Reines BSA bewirkt bei allen Wirkstoffkonzentrationen keine Proliferationsänderung im Vergleich zur CTL.

3.3.1.2 Zeitlicher Verlauf des Tumorzellwachstums

Die folgende Abbildung 21 stellt die Ergebnisse des MTT-Tests bei Gabe von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA für die Zelllinie MDA-MB-231 im zeitlichen Verlauf dar.

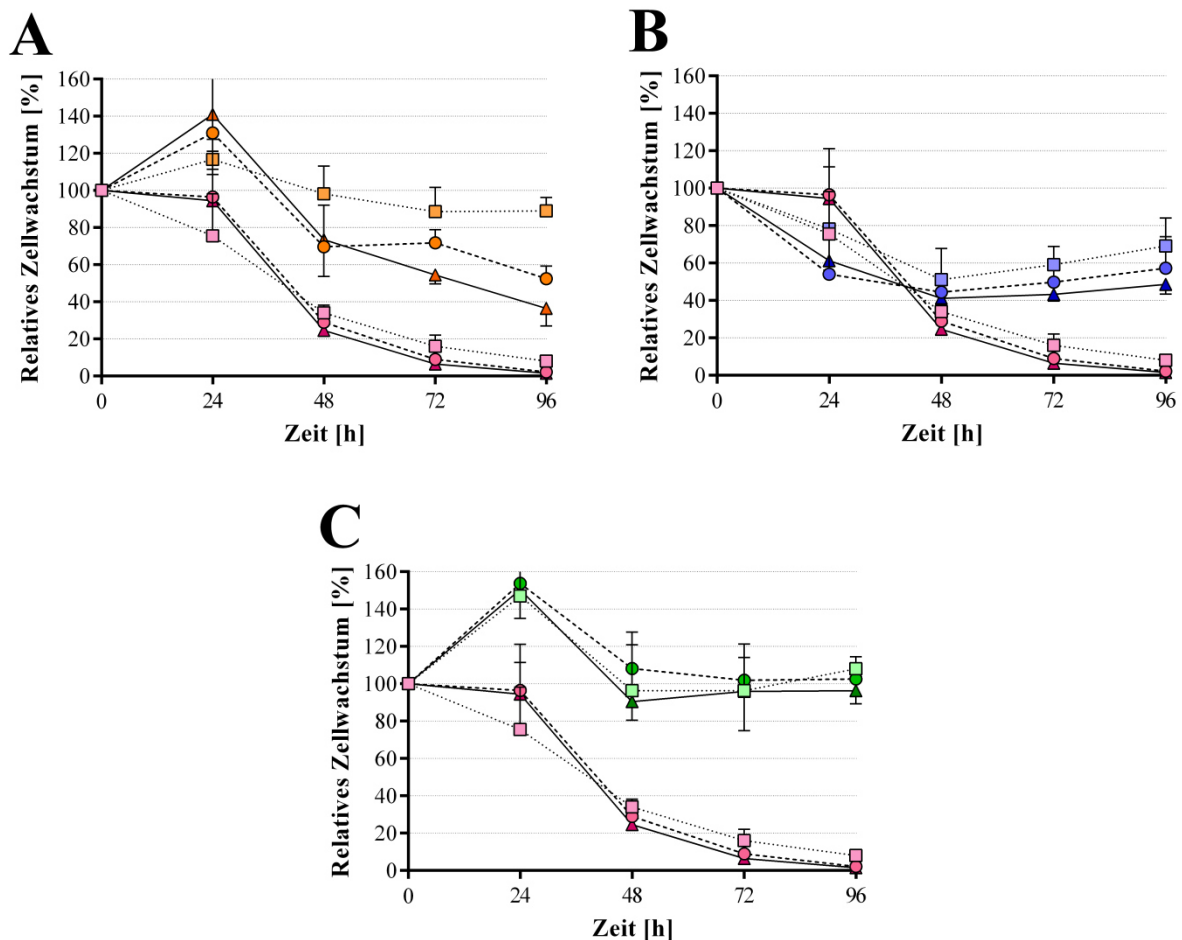


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf des Tumorzellwachstums der Zelllinie MDA-MB-231. Dargestellt sind die Resultate unter Einfluss von FUAc (A), FUAc-BSA (B) und BSA (C) im Vergleich zu 5-FU. Gezeigt sind der Median und die zugehörige obere bzw. untere quartile Abweichung der Ergebnisse des MTT-Tests. Legende: \cdots \square \cdots 100 μ M 5-FU, $-\cdots$ \circ $-\cdots$ 300 μ M 5-FU, $-\cdots$ \triangle $-\cdots$ 500 μ M 5-FU, \cdots \square \cdots 100 μ M FUAc, $-\cdots$ \circ $-\cdots$ 300 μ M FUAc, $-\cdots$ \triangle $-\cdots$ 500 μ M FUAc, \cdots \square \cdots 100 μ M FUAc-BSA, $-\cdots$ \circ $-\cdots$ 300 μ M FUAc-BSA, $-\cdots$ \triangle $-\cdots$ 500 μ M FUAc-BSA, \cdots \square \cdots 100 μ M BSA, $-\cdots$ \circ $-\cdots$ 300 μ M BSA, $-\cdots$ \triangle $-\cdots$ 500 μ M BSA.

Das Referenz-Zytostatikum 5-FU bewirkt nach 24 h eine schwache Proliferationshemmung, die im weiteren Verlauf zunimmt und nach 96 h ihr Maximum erreicht. Ein scheinbar wachstums-

fördernder Effekt von FUAc, der nach 24 h feststellbar ist, kehrt sich im Beobachtungszeitraum zu einer zytostatischen Wirkung um und erreicht ihr Maximum nach 96 h. FUAc-BSA ist 5-FU nach 24 h ebenbürtig, jedoch nach 48 h in seinem zytostatischen Einfluss unterlegen. Das Wachstum der MDA-MB-231-Zellen zeigt nach 72 h und 96 h unter dem Einfluss von FUAc-BSA im Vergleich zur CTL eine geringfügige Erholung. Für reines BSA wird nach 24 h eine starke Förderung der Zellproliferation ersichtlich.

Nach 48 h und im weiteren Verlauf zeigt sich kein signifikanter Einfluss des BSA auf die Zellproliferation im Vergleich zur Wachstumskontrolle.

3.3.1.3 IC_{50} -Werte

Die berechneten IC_{50} -Werte, dargestellt in Tabelle 7, wurden aus den Ergebnissen des MTT-Tests für die Zelllinie MDA-MB-231 gewonnen. Der niedrigste IC_{50} -Wert ergab sich für 5-FU. Mit steigender Konzentration folgen FUAc-BSA und reines FUAc. Die Vertrauensintervalle der beiden Substanzen überschneiden sich in einem Bereich von 502,5 – 698,7 μ M. Für reines BSA konnte keine IC_{50} -Konzentration berechnet werden.

Tabelle 7: Berechnete IC_{50} -Werte bei der Zelllinie MDA-MB-231. Dargestellt sind die Werte für 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und reines BSA. Die Zahlen in den Klammern repräsentieren das 95 %-Vertrauensintervall.

IC_{50}-Werte nach 72 h	<u>Wirkstoffe</u>			
	5-FU [μ M]	FUAc [μ M]	FUAc-BSA [μ M]	BSA [μ M]
<u>Zelllinie MDA- MB-231</u>	1,324 (0,07 - 24,52)	651,5 (502,5 - 844,7)	407,8 (238,1 - 698,7)	-

3.3.1.4 Zellzählung nach Trypanblaufärbung

Die folgende Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Zellzählung nach Trypanblaufärbung. Die Resultate der Zellzählung werden denen des MTT-Tests gegenüber gestellt und verglichen.

Bei der Gabe von 300 μ M BSA ist ein zytostatischer Einfluss, 74,9 % Zellwachstum im Vergleich zur CTL, feststellbar. Beim MTT-Test ist scheinbar ein geringfügig proliferationsfördernder Effekt erkennbar (106,2 %). Für 300 μ M FUAc ist die Differenz (61,1 %) zwischen beiden

Methoden verursacht durch einen wesentlich geringen Messwert bei der Zellzählung (11,2 %) im Vergleich zum MTT-Test (72,3 %). Für FUAc-BSA vermindert sich der prozentual gemessene Unterschied zwischen beiden Methoden auf 16,4 %. Die Zellzählung ergab eine Gesamtzellzahl von 36,6 %, während der MTT-Test 53,0 % vitale Zellen im Vergleich zur CTL erfasst hat. Der stärkste Effekt wurde für 300 μ M 5-FU festgestellt, das bei der Zellzählung die Gesamtzellzahl auf 2,0 % reduzierte. Im MTT-Test wurde eine Inhibition auf 9,5 % festgestellt.

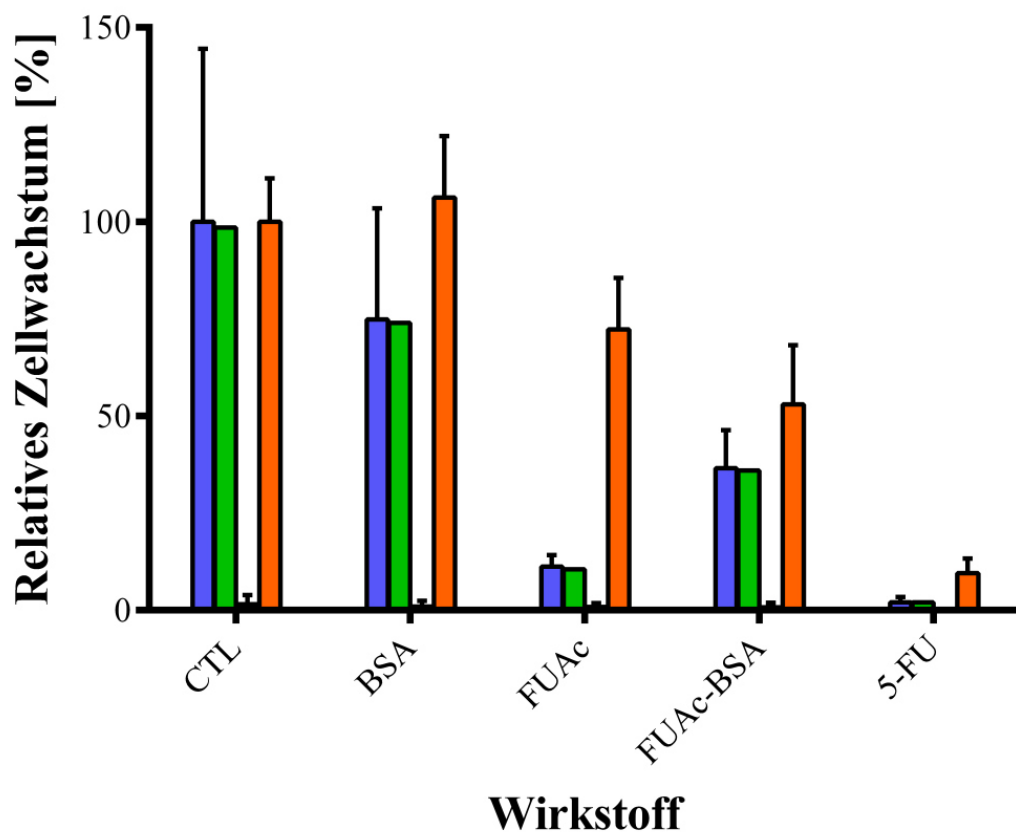


Abbildung 22: Methodenvergleich für Zelllinie MDA-MB-231. Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der Zellzählung (N = 6) und denen des MTT-Tests. Auf der x-Achse ist der jeweilige Wirkstoff (c = 300 μ M) aufgetragen. Auf der y-Achse ist das relative Zellwachstum in Prozent angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung. Legende: ■ Zellzählung: Gesamtzellzahl, ■ Zellzählung: vitale Zellen, ■ Zellzählung: tote Zellen, ■ MTT-Test: vitale Zellen.

Die prozentuale Differenz zwischen beiden Methoden beträgt zwischen 7,5 % für 5-FU und 61,1 % für FUAc. Die Menge an avitalen Zellen liegt zwischen 0,0 – 1,5 %.

3.3.2 Zelllinie T-47D

3.3.2.1 MTT-Test

Die Abbildung 23 bis Abbildung 26 und Tabelle 17 bis Tabelle 20 (siehe Anhang) zeigen die Resultate des MTT-Tests für die Zelllinie T-47D in Form von Boxplots. Im Anhang sind die zugehörigen Tabellen mit den berechneten p-Werten angeordnet. In Abbildung 27 werden die Ergebnisse in Form eines Kurvendiagramms dargestellt, um den Einfluss der Wirkstoffe im zeitlichen Verlauf zu veranschaulichen. Zuletzt wurden die Resultate des MTT-Tests verwendet, um IC_{50} -Werte zu berechnen (siehe Tabelle 8).

Nach einem Zeitraum von 24 h bewirkt 5-FU bereits eine statistisch hochsignifikante Inhibition der Tumorzellen in den drei Wirkstoffkonzentrationen 100 μ M, 300 μ M und 500 μ M. Dieses Ergebnis setzt sich zu den folgenden Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h fort. Auf die Ergebnisse wird deshalb in der Folge lediglich Bezug genommen, um mögliche Vergleiche zu den anderen Wirkstoffen anzustellen.

Reines FUAc weist nach 24 h anscheinend in allen drei Wirkstoffkonzentrationen keinen signifikant wachstumshemmenden Effekt im Vergleich zur Wachstumskontrolle auf. FUAc-BSA zeigt zu diesem Zeitpunkt in allen drei Wirkstoffkonzentrationen eine hochsignifikante Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur CTL. Die Wachstumsinhibition nimmt konzentrationsabhängig zu. Bei einer Gabe von 100 μ M verhält sich FUAc-BSA insignifikant im Vergleich zu 100 μ M FUAc (p-Wert = 0,019), jedoch besteht gleichzeitig kein signifikanter Unterschied zu 100 μ M 5-FU (p-Wert = 0,5513). Für 300 μ M und 500 μ M verfügt FUAc-BSA anscheinend über eine statistisch signifikant starke Wirkung im Vergleich zu FUAc (p-Werte = 0,0005 bzw. <0,0001). Außerdem zeichnet sich bei Betrachtung der Abbildung 23 eine Tendenz ab, die einen stärkeren inhibitorischen Effekt seitens FUAc-BSA im Vergleich zu 5-FU bei Gegenüberstellung der jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen vermuten lässt. Die p-Werte lassen allerdings keine Signifikanz sowohl für 300 μ M (p-Wert = 0,0586) als auch für 500 μ M (p-Wert = 0,011) erkennen. Reines BSA zeigt bei allen drei Wirkstoffkonzentrationen keine Signifikanz zu der Wachstumskontrolle.

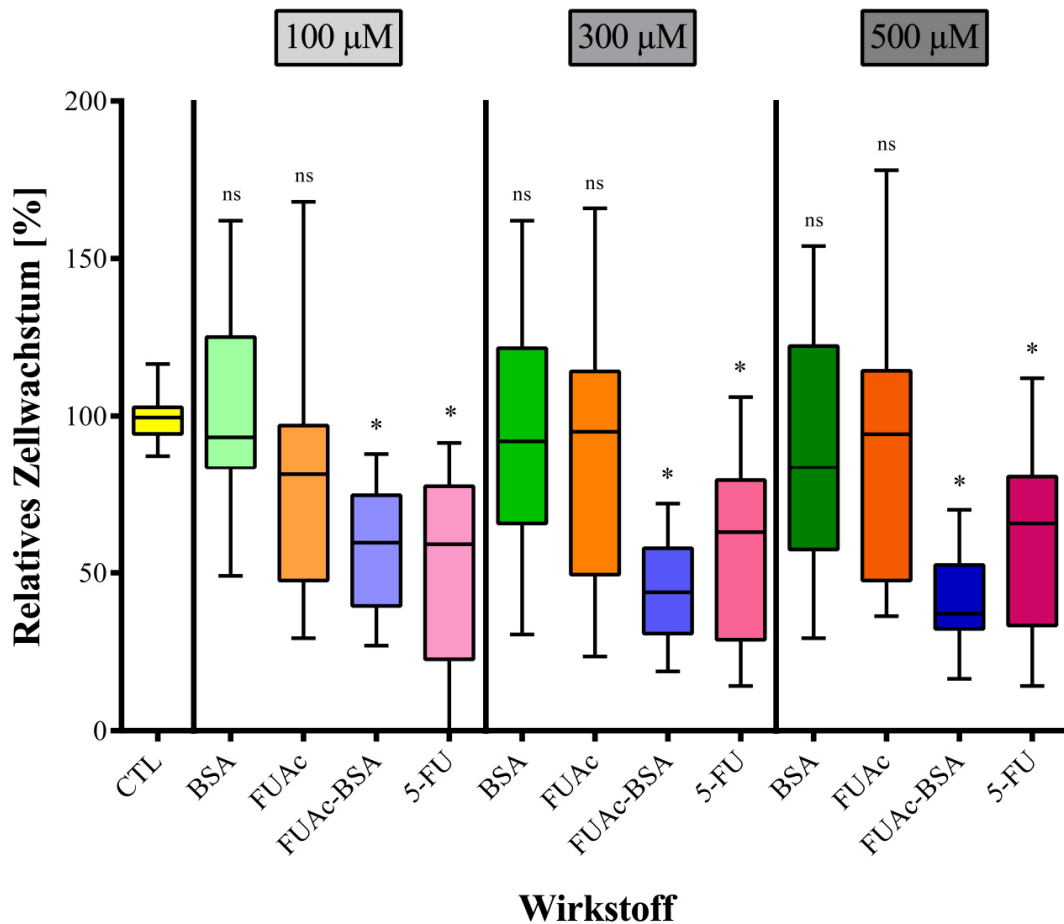


Abbildung 23: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 24 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 µM, 300 µM, 500 µM) sind durch eine durchgezogene Linie optisch voneinander getrennt. * $\hat{=}$ signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,01) gegenüber der CTL.

Nach 48 h erbringt reines 100 µM FUAc scheinbar keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Wachstumskontrolle. Bei Wirkstoffkonzentrationen von 300 µM und 500 µM zeichnet sich ein inhibitorischer Effekt von FUAc ab, der mit steigender Konzentration zunimmt. Der Unterschied verhält sich signifikant zur CTL. FUAc-BSA zeigt in allen Wirkstoffkonzentrationen einen signifikanten wachstumshemmenden Einfluss auf die Tumorzellen verglichen mit der CTL. Bereits 100 µM FUAc-BSA besitzt offenbar einen hochsignifikant stärkeren inhibitorischen Einfluss als FUAc mit Konzentrationen von 100 µM, 300 µM und 500 µM (jeweiliger p-Wert < 0,0001). In der Gegenüberstellung zu 5-FU lassen sich für FUAc-BSA keine statistisch signifikanten Differenzen feststellen. Reines BSA besitzt bei 100 µM und 300 µM keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Bei der Gabe von 500 µM ist ein geringfügiger wachstumshemmender Einfluss erkennbar (p-Wert = 0,004).

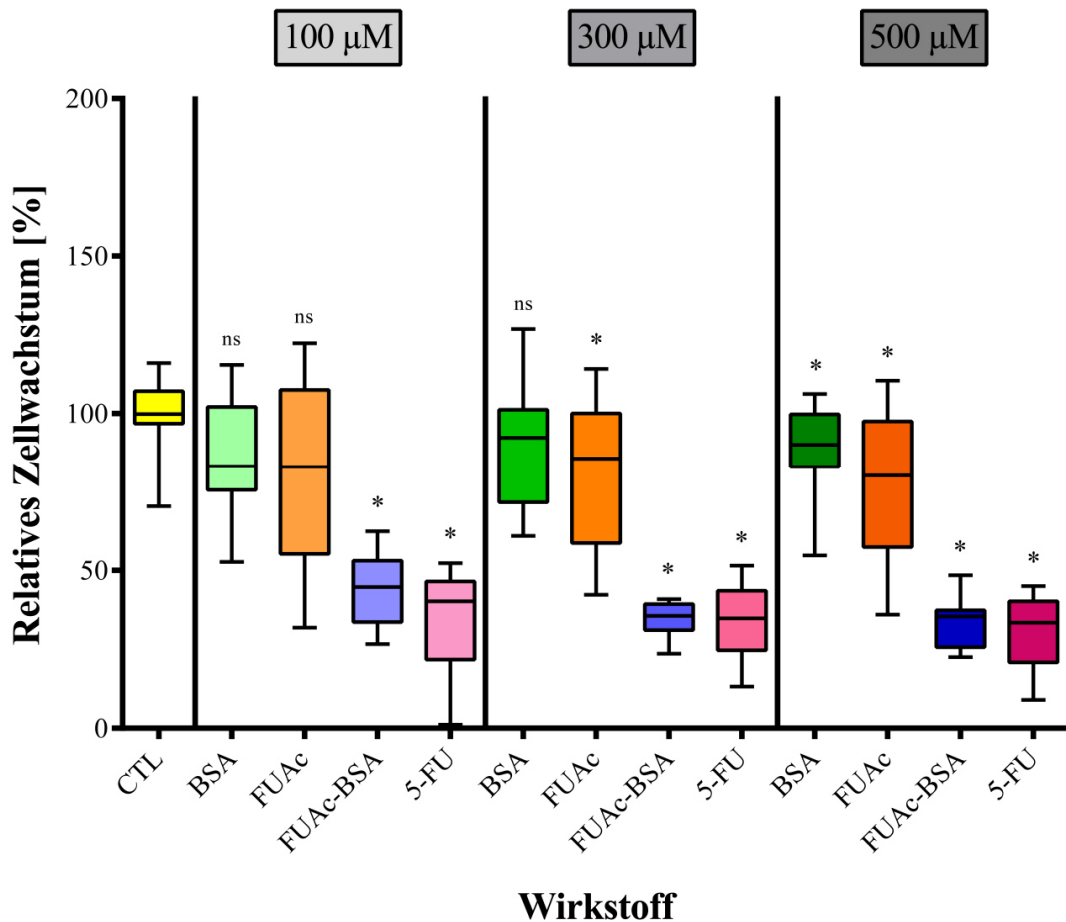


Abbildung 24: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 48 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 µM, 300 µM, 500 µM) sind durch eine durchgezogene Linie optisch voneinander getrennt. * $\hat{=}$ signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) gegenüber der CTL.

Nach 72 h bewirken 100 µM und 300 µM reines FUAc scheinbar keine statistisch signifikante Inhibition der Zellproliferation in Bezug auf die Wachstumskontrolle. Lediglich 500 µM FUAc sorgt offenbar für eine geringfügige Wachstumshemmung der Tumorzellen gegenüber der Kontrolle (p -Wert = 0,0011). Interessanterweise weist 300 µM FUAc nach 48 h offenbar noch einen signifikanten, zytostatischen Effekt auf, der nach 72 h verschwindet. FUAc-BSA bewirkt im Gegensatz zu reinem FUAc weiterhin bei allen Wirkstoffkonzentrationen eine hochsignifikante Inhibition der Zellproliferation (p -Wert < 0,0001) gegenüber der CTL. Grafisch wird zudem eine konzentrationsabhängige Zunahme der Wirksamkeit deutlich. Allerdings zeigt FUAc-BSA im Vergleich zu 5-FU nun in allen Wirkstoffkonzentrationen eine signifikant schwächere Wirkung. Nach 48 h sind die beiden Wirkstoffe in der konzentrationsabhängigen Gegenüberstellung noch ebenbürtig. Reines BSA besitzt keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen.

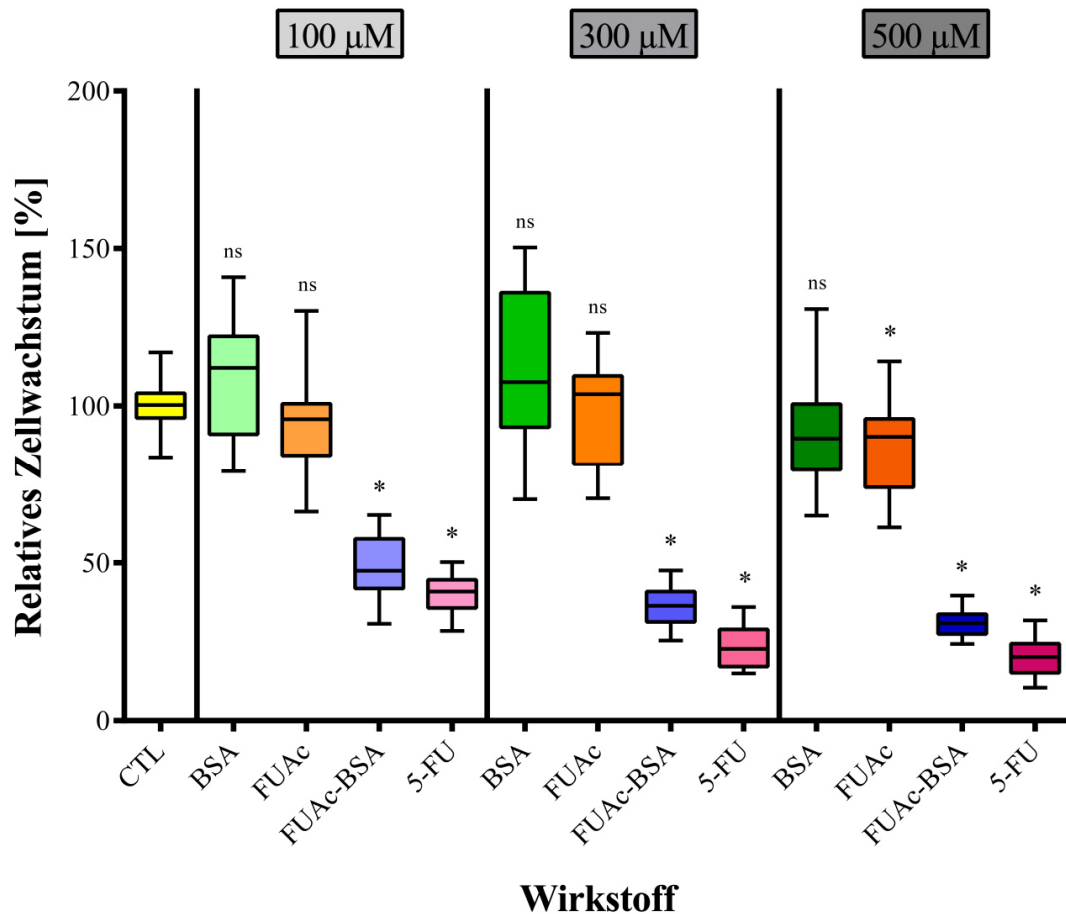


Abbildung 25: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 72 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 µM, 300 µM, 500 µM) sind durch eine gepunktete Linie optisch voneinander getrennt. * \triangleq signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) gegenüber der CTL.

Nach einem Zeitraum von 96 h verfügt 100 µM FUAc offenbar weiterhin keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation, während 300 µM FUAc (p -Wert = 0,0054) und 500 µM FUAc (p -Wert <0,0001) scheinbar eine konzentrationsabhängige Wirkzunahme erkennen lassen. FUAc-BSA wirkt bei 100 µM, 300 µM und 500 µM weiterhin hochsignifikant antiproliferativ im Vergleich zur CTL. Die Effekte steigen konzentrationsabhängig. Im Vergleich zu FUAc verhält sich anscheinend bereits 100 µM FUAc-BSA gegenüber 500 µM FUAc hochsignifikant (p -Wert <0,0001). Bei einer Betrachtung zwischen 100 µM 5-FU und 100 µM FUAc-BSA zeigt sich die stärkere Wirkung zu Gunsten von 5-FU (p -Wert <0,0001). Allerdings sind 300 µM FUAc-BSA bzw. 500 µM FUAc-BSA scheinbar 100 µM 5-FU in ihrer antiproliferativen Wirkung ebenbürtig (p -Werte = 0,0641 bzw. 0,6634). Reines 100 µM bzw. 300 µM BSA verhält sich im Vergleich zur Wachstumskontrolle nicht signifikant. Lediglich 500 µM BSA sorgt für eine gehemmte Proliferation gegenüber der CTL (p -Wert <0,0001).

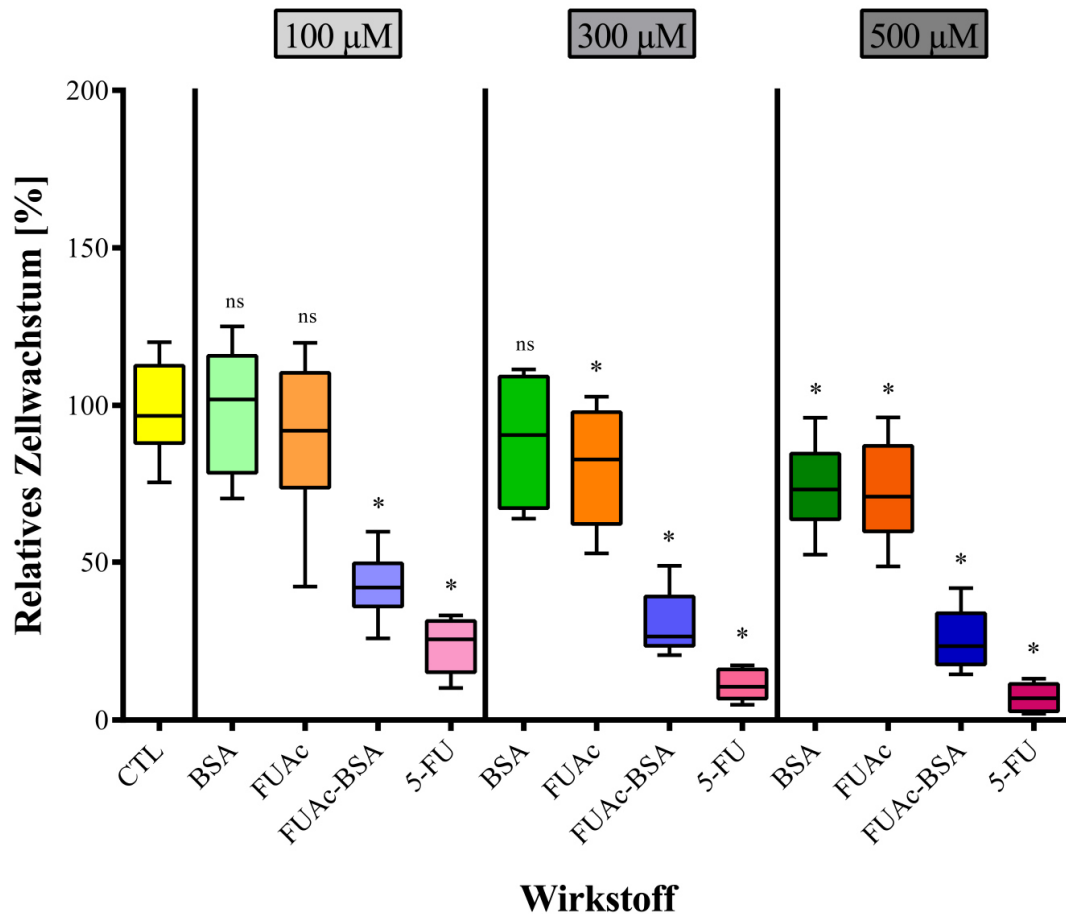


Abbildung 26: MTT-Ergebnisse für Zelllinie T-47D nach 96 h. Auf der x-Achse sind links die CTL (N = 16) und außerdem der jeweilige Wirkstoff (N = 20) aufgetragen. Die Angaben der y-Achse sind in Prozent. Die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen (100 µM, 300 µM, 500 µM) sind durch eine gepunktete Linie optisch voneinander getrennt. * \triangleq signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) gegenüber der CTL.

3.3.2.2 Zeitliche Darstellung des Tumorzellwachstums

Die folgende Abbildung 27 stellt die Ergebnisse des MTT-Tests für Zelllinie T-47D im zeitlichen Verlauf dar. 5-FU zeigt einen konstanten inhibitorischen Einfluss auf das Zellwachstum, der schon nach 24 h erkennbar ist und sich bis nach 96 h fortsetzt. Der scheinbar schwache zytostatische Effekt von FUAc nimmt bis nach 48 h langsam zu. Im Anschluss, nach 72 h und 96 h, stagniert die antiproliferative Wirkung. Für FUAc-BSA ist ein durchgehender wachstumshemmender Effekt nachweisbar, der bis nach 48 h kaum Unterschiede zu 5-FU aufweist und erst im weiteren Verlauf einen geringfügigen, aber signifikant stärkeren Einfluss von 5-FU erkennen lässt.

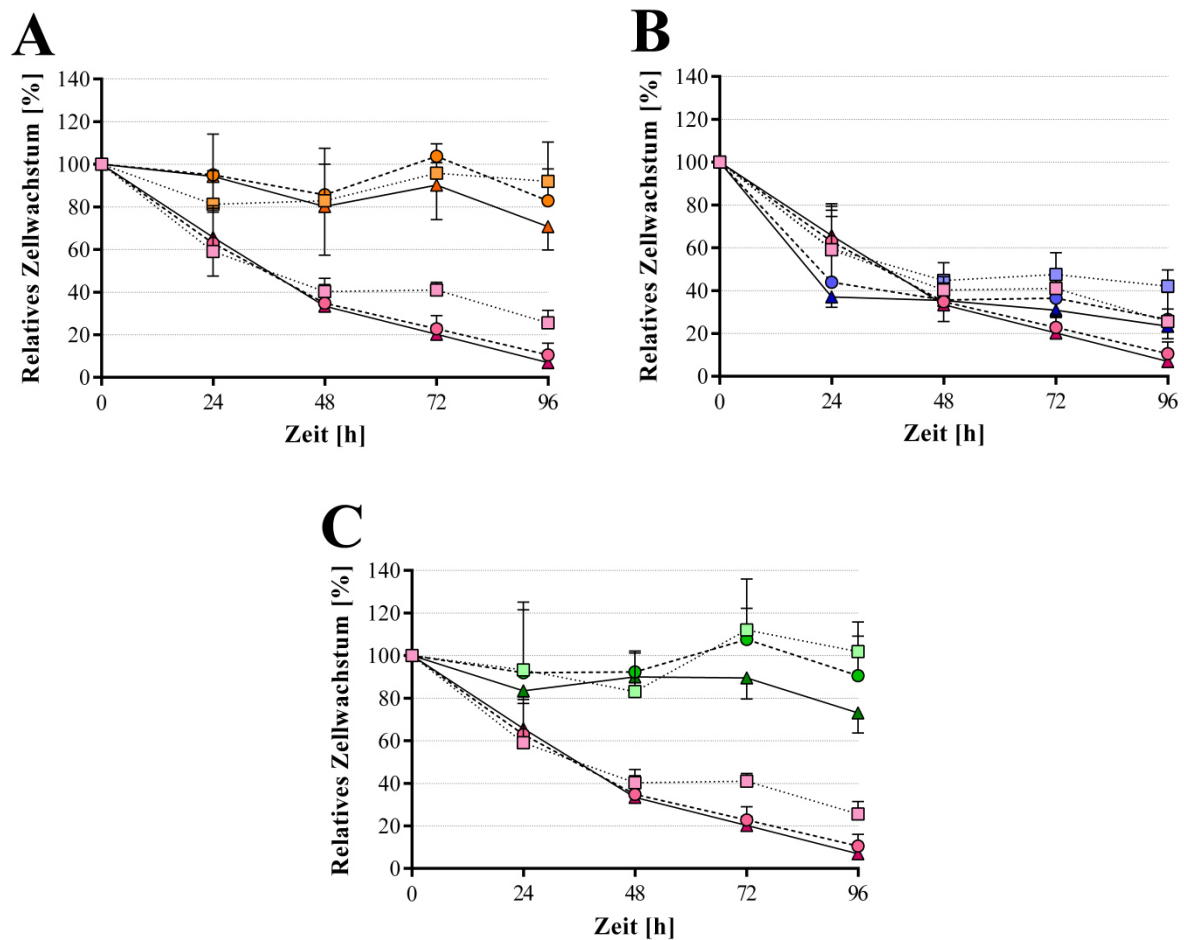


Abbildung 27: Zeitliche Verlauf des Tumorzellwachstums der Zelllinie T-47D. Dargestellt sind die Resultate unter Einfluss von FUAc (A), FUAc-BSA (B) und BSA (C) bezogen auf die Positivkontrolle 5-FU. Gezeigt sind die Mediane und die dazugehörige obere bzw. untere quartile Abweichung der Ergebnisse des MTT-Tests. Legende: $\cdots \square \cdots$ 5-FU 100 μM , $-\bullet-$ 5-FU 300 μM , $- \blacktriangle -$ 5-FU 500 μM , $\cdots \square \cdots$ FUAc 100 μM , $-\bullet-$ FUAc 300 μM , $- \blacktriangle -$ FUAc 500 μM , $\cdots \square \cdots$ FUAc-BSA 100 μM , $-\bullet-$ FUAc-BSA 300 μM , $- \blacktriangle -$ FUAc-BSA 500 μM , $\cdots \square \cdots$ BSA 100 μM , $-\bullet-$ BSA 300 μM , $- \blacktriangle -$ BSA 500 μM .

Reines BSA zeigt weitestgehend keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen T-47D. Lediglich nach 96 h ist ein mäßiger inhibitorischer Einfluss erkennbar.

3.3.2.3 IC_{50} -Werte

Die IC_{50} -Werte wurden aus den Resultaten des MTT-Tests berechnet (siehe Abschnitt 2.2.8). Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse zusammenfassend. Für 5-FU wurde der kleinste Wert für die IC_{50} -Konzentration berechnet. Geringfügig größere Resultate zeigen die Berechnungen für FUAc-BSA. Die Konfidenzintervalle von 5-FU und FUAc-BSA überschneiden sich minimal. Einen

wesentlich höheren IC_{50} -Wert zeigt sich bei FUAc. Das Konfidenzintervall überlappt nicht mit denen vom 5-FU oder dem FUAc-BSA. Für reines BSA konnten keine IC_{50} -Werte berechnet werden.

Tabelle 8: Berechnete IC_{50} -Werte bei der Zelllinie T-47D. Dargestellt sind die Werte für 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und reines BSA. Die Zahlen in den Klammern repräsentieren das 95 %-Vertrauensintervall.

IC_{50}- Werte nach 72 h	<u>Wirkstoffe</u>			
	5-FU [μ M]	FUAc [μ M]	FUAc-BSA [μ M]	BSA [μ M]
<u>Zelllinie</u> <u>T-47D</u>	50,64 (37,62 - 68,16)	913,5 (358,1 – 2331)	88,62 (65,64 - 119,6)	-

3.3.2.4 Zellzählung nach Trypanblaufärbung

Die folgende Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der Zellzählung nach Trypanblaufärbung. Die Resultate der Zellzählung werden denen des MTT-Tests gegenüber gestellt und verglichen.

Für 300 μ M BSA ist bei der Zellzählung eine verminderte Proliferation (80,6 %) im Vergleich zur Wachstumskontrolle erkennbar. Beim MTT-Test ist ein schwacher proliferationsfördernder Einfluss feststellbar (112,0 %). 300 μ M FUAc erzielt bei der Methode der Zellzählung eine Wachstumsinhibition auf 42,1 %. Im Kontrast dazu zeigt 300 μ M FUAc beim MTT-Test scheinbar keinen Effekt (97,4 %). Vergleicht man die Resultate der Zellzählung mit denen des MTT-Tests für 300 μ M FUAc, ist eine prozentuale Differenz von 55,3 % erkennbar. 300 μ M FUAc-BSA zeigt bei der Tumorzelllinie T-47D sowohl in der Zellzählung (20,9 %) als auch beim MTT-Test (36,3 %) einen gesteigerten zytostatischen Einfluss im Vergleich zu 300 μ M FUAc. 300 μ M 5-FU bewirkt sowohl bei der Zellzählung als auch beim MTT-Test die größte Proliferationshemmung (19,1 % bzw. 23,8 %). Betrachtet man die Resultate des MTT-Tests im Vergleich zur Menge der vitalen Zellen, die bei der Zellzählung gemessen wurden, ist ein Vergleich zwischen beiden Methoden möglich. Die prozentualen Abweichungen zwischen beiden Messmethoden bewegen sich im Bereich von 4,7 % (5-FU) bis maximal 55,3 % (FUAc). Auf mögliche Ursachen für die Diskrepanzen wird in der Diskussion (siehe Abschnitt 4.3) näher eingegangen. Für den Anteil der avitalen Zellen wurden bei der Zellzählung Werte zwischen 0,0 - 7,3 % gemessen.

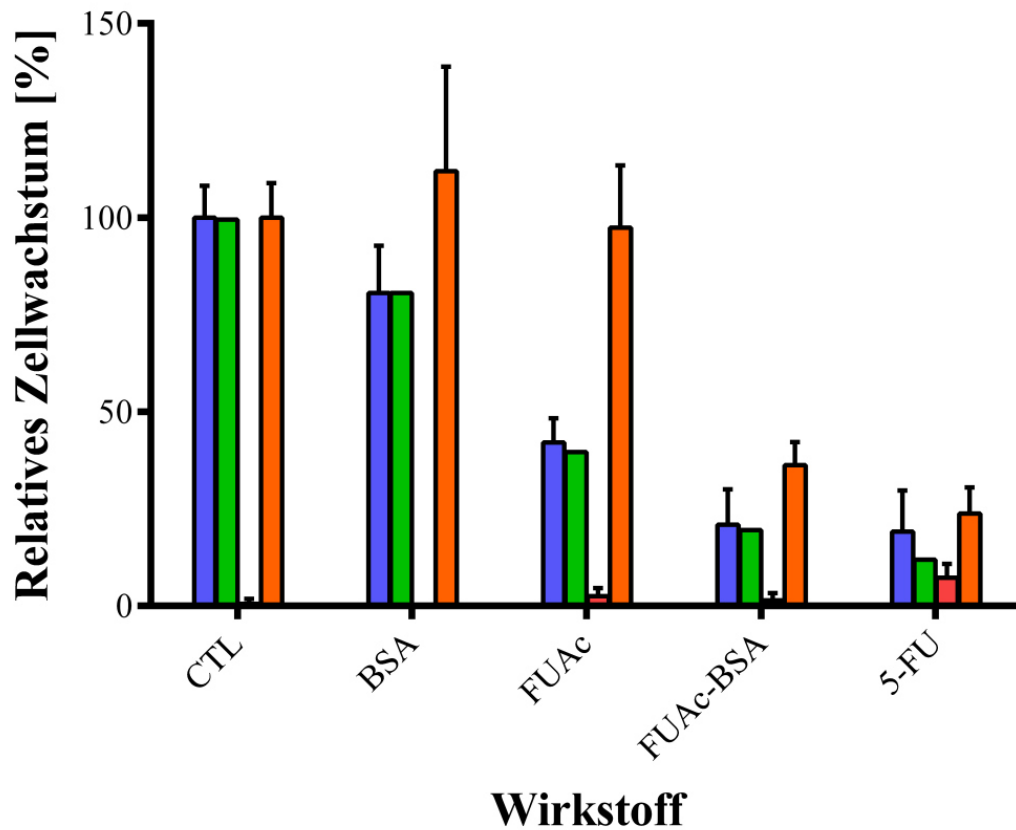


Abbildung 28: Methodenvergleich für Zelllinie T-47D. Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der Zellzählung (N = 6) und denen des MTT-Tests. Auf der x-Achse ist der jeweilige Wirkstoff ($c = 300 \mu\text{M}$) mit der Konzentration aufgetragen. Auf der y-Achse ist das relative Zellwachstum in Prozent angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung. Legende: ■ Zellzählung: Gesamtzellzahl, ■ Zellzählung: vitale Zellen, ■ Zellzählung: tote Zellen, ■ MTT-Test: vitale Zellen.

3.4 Einfluss des pH-Wertes auf die MTT-Ergebnisse der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D

Die größten Unterschiede zwischen MTT-Test und Zellzählung wurden für FUAc offenkundig. Aufgrund des Herstellungsprozesses von FUAc, der die Absenkung auf einen pH-Wert von 2 beinhaltet, liegt die Vermutung nahe, dass der pH-Wert einen Einfluss auf den MTT-Test haben könnte. Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse für die Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D:

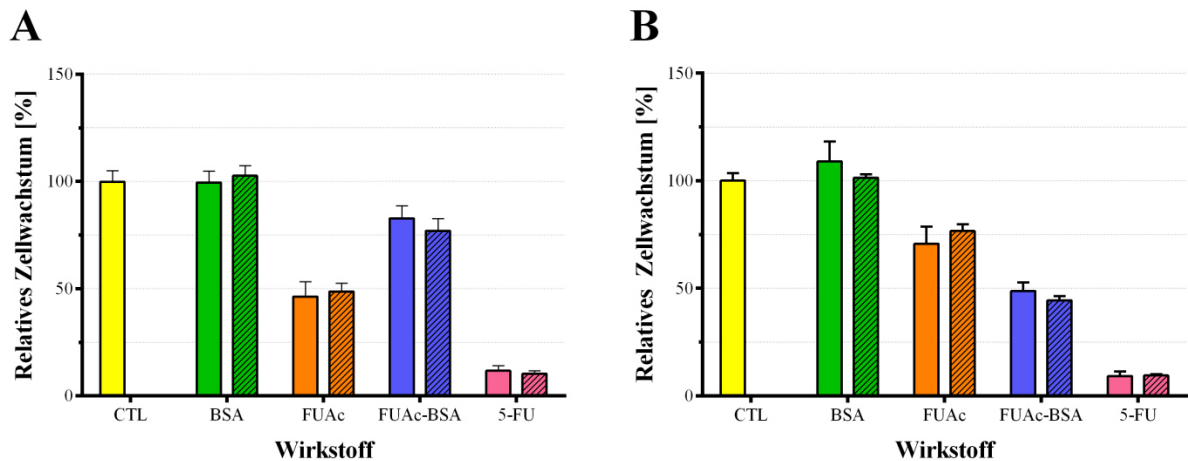


Abbildung 29: Einfluss des pH-Wertes auf den MTT-Test. Die Graphen zeigen die Resultate der durchgeführten Experimente für Zelllinie MDA-MB-231 (A) und T-47D (B). Links ist die CTL (N = 4) als einzelner Balken abgebildet. Für die Wirkstoffe (N = 5) sind jeweils zwei Balken sichtbar. Der linke Balken symbolisiert jeweils das Ergebnis, wenn das Zellkulturmedium belassen wurde. Die jeweils rechten Balken (mit Schraffierung) zeigen die Resultate, wenn das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Die Balkenhöhe symbolisiert den Mittelwert, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung. Jeder Substanz wurde eine andere Farbe zugeordnet. Legende: Medium wurde belassen, Medium wurde gewechselt.

Beim Betrachten der Ergebnisse wird deutlich, dass die Änderungen aufgrund des Mediumwechsels gering sind. Insofern scheint es unwahrscheinlich, dass der pH-Wert der ursächliche Grund ist, warum die Resultate des MTT-Tests und der Zellzählung für FUAc so starke Differenzen aufweisen. In Abschnitt 4.3 wird näher auf die Thematik eingegangen.

3.5 CLSM-Studien

Die Zellkulturversuche zeigen, dass FUAc-BSA insbesondere bei der Zelllinie T-47D einen proliferationshemmenden Einfluss ausübt. Um mehr Informationen über die Aufnahme von FUAc-BSA in die Tumorzelllinien MDA-MB-231 und T-47D zu erhalten, wurden die Zellen unter Zugabe von 300 μ M eines BSA/FITC-BSA (9:1)-Gemisches inkubiert. Anschließend wurden mittels CLSM Z-Stacks im Durchlicht- und im Fluoreszenzmodus aufgenommen und in einem orthogonalen Schnitt überlagert (siehe Abschnitt 2.2.7).

Adhärent wachsende Tumorzellen der Zelllinie T-47D sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Überlagerung des Transmissions- und des Fluoreszenz-Modus erlauben es, die Verteilung des FITC-BSA innerhalb der Zellen sichtbar zu machen. In den Zellen sind starke Fluoreszenzsigna-

le sichtbar, die sich homogen im intrazellulären Raum in Form von Vesikel-ähnlichen Strukturen verteilen.

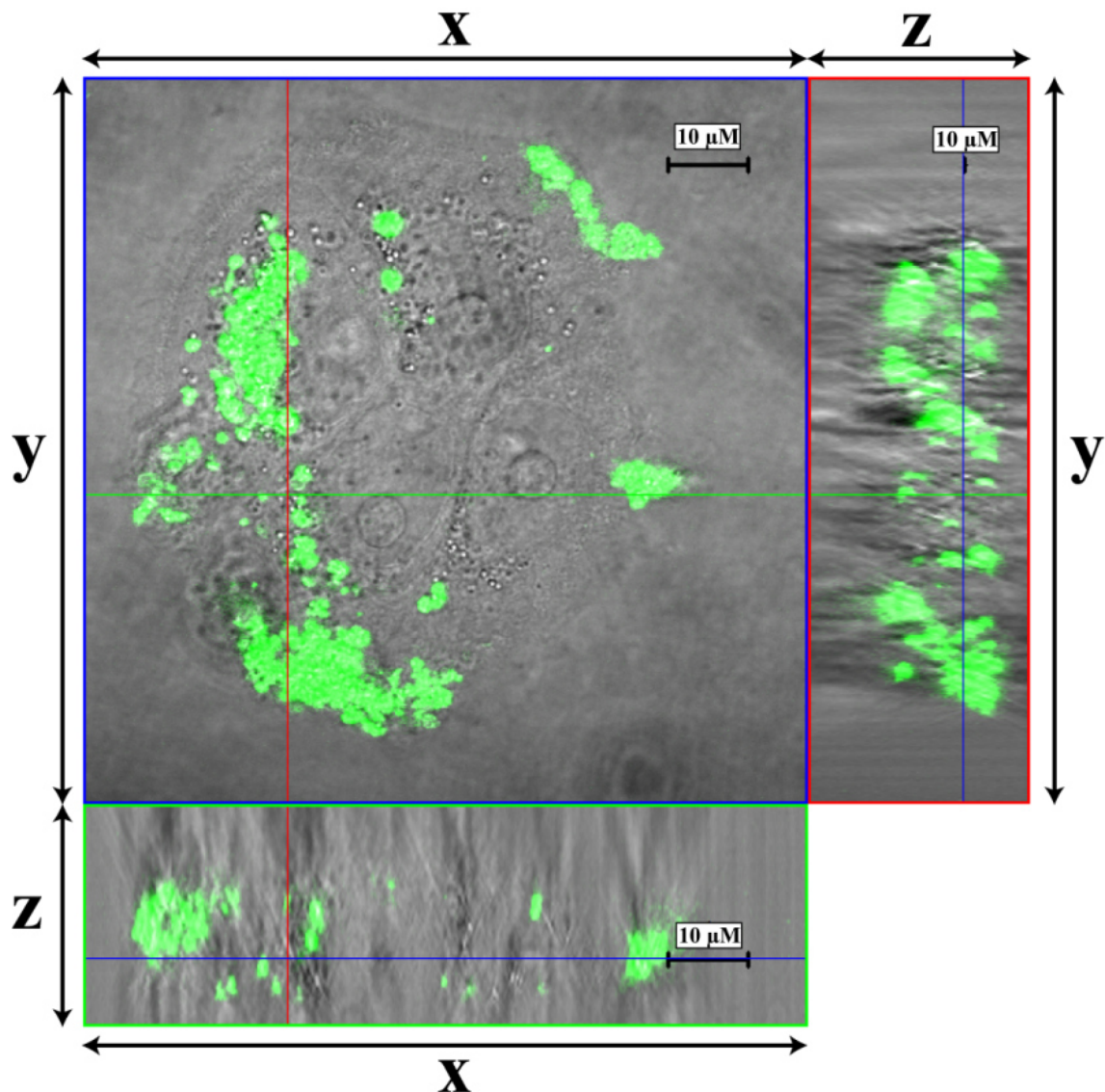


Abbildung 30: CLSM-Bild von T-47D-Zellen nach 72 h Kultivierdauer. Orthogonale Ansicht nach Zugabe eines BSA/FITC-BSA-Gemisches. Das grüne Signal verdeutlicht die Verteilung des FITC-BSA. Die Pfeile und Buchstaben an den Kanten stellen dar, von welchen Achsen (x,y,z) die jeweiligen Kanten gebildet werden.

Fluoreszenzsignale lassen sich ebenfalls in den CLSM-Bildern der Zelllinie MDA-MB-231 (Abbildung 31) feststellen. Die Menge an intrazellulär befindlichem FITC-BSA ist jedoch geringer als bei den Tumorzellen der Linie T-47D. Außerdem ist erkennbar, dass die Bereiche mit gesteigerter Fluoreszenzintensität vorrangig auf Regionen in Zellmembrannähe zu finden sind: Einerseits im Extrazellularraum, wo es direkte Zell-Zell-Kontakte gibt; andererseits im Intrazel-

lularraum in der Nähe der Zellmembran. Es wird jedoch kein Fluoreszenzsignal im Zentrum der Zellen erkennbar, wie die orthogonale Ansicht verdeutlicht.

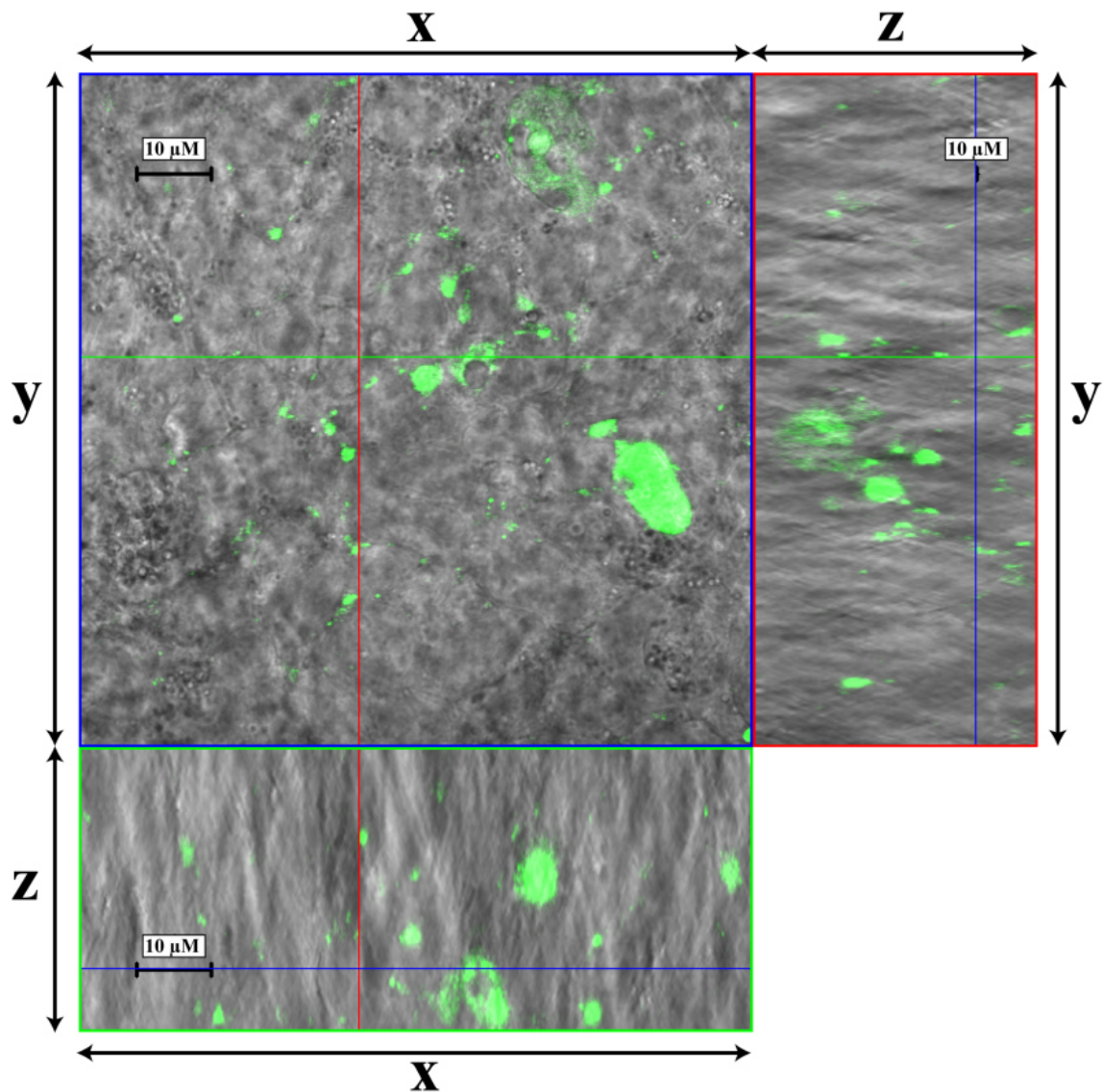


Abbildung 31: CLSM-Bild von MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Kultivierdauer. Orthogonale Ansicht nach Zugabe eines BSA/FITC-BSA-Gemisches. Die Beschriftung an den Kanten entspricht der aus Abbildung 30.

4 Diskussion

Das Zytostatikum 5-FU (MW = 130,08 Da) verfügt nur über eine kurze Plasma- $t_{1/2}$ von 10 – 20 min. Innerhalb von 24 h werden ca. 60 – 90% von intravenös appliziertem 5-FU (einschließlich seiner Metabolite) renal ausgeschieden [31,102]. Neben seiner zytostatischen Wirkung auf Tumore führt es aber auch zu unerwünschten Nebenwirkungen bei Patienten, wie dem Hand-Fuß-Syndrom, Übelkeit, Durchfall und Myelosuppression. In der Klinik wird es für die Therapie von Mammakarzinomen, kolorektalen Karzinomen und weiteren Tumorentitäten eingesetzt.

Das Ziel der Arbeit bestand einerseits darin, ein 5-FU-Derivat zu entwickeln, dessen zytostatische Wirkung der von reinem 5-FU entspricht und aufgrund eines selektiven Tumor-Targetings möglicherweise weniger unerwünschte Nebenwirkungen verursacht. Andererseits sollte die Plasma- $t_{1/2}$ des 5-FU-Derivates im Blutkreislauf wesentlich über der von reinem 5-FU liegen. Als Carrier-Substanz für 5-FU wurde daher Albumin gewählt, das von Tumorzellen endozytiert wird und über eine Plasma- $t_{1/2}$ von ca. 19 Tagen verfügt [18].

5-FU wurde zunächst chemisch modifiziert, um es an Albumin koppeln zu können. Der Erfolg der Synthese wurde mittels NMR-Spektroskopie überprüft. Im nächsten Schritt wurde das entstandene FUAc kovalent an BSA gebunden und die Anzahl der FUAc-Moleküle je BSA-Molekül mittels MALDI-ToF quantifiziert. Anschließend wurde in Zellkulturversuchen an den Tumorzelllinien T-47D und MDA-MB-231 Toxizitätsprüfungen durchgeführt. Zunächst werden deshalb die Messergebnisse von der FUAc- bzw. FUAc-BSA-Synthese diskutiert. Außerdem werden Vergleiche zu anderen albuminbasierten Zytostatika bzw. anderen 5-FU-Carriern vorgenommen. Danach werden die Resultate der Zellkulturversuche erörtert und die verwendeten Methoden MTT-Test und Zellzählungstest kritisch betrachtet. Letztlich wird ein Ausblick auf notwendige Untersuchungen gegeben, die durchgeführt werden müssten, um FUAc-BSA für therapeutische Zwecke verwenden zu können.

4.1 Umwandlung von 5-FU in FUAc-BSA

In den folgenden Abschnitten werden die Resultate von NMR-Spektroskopie und MALDI-ToF diskutiert.

4.1.1 Umwandlung von 5-FU in FUAc

Um 5-FU an den Carrier BSA kovalent binden zu können, wurde zunächst FUAc synthetisiert, das eine Acetyl-Gruppe am N¹-Atom des 5-FU-Ringes aufweist (siehe Abbildung 5). Die Synthese erfolgte nach Tada [79]. Die Resultate der NMR-Spektroskopie sind im Abschnitt 3.1 (Abbildung 12 und Abbildung 13) dargestellt.

4.1.1.1 Interpretation der Resultate der ¹H-NMR-Spektroskopie

Tada hat eine ¹H-NMR-Spektrometrie von FUAc in DMSO-*d*₆ zur Überprüfung des Syntheseerfolges durchgeführt. Folgende Ergebnisse lieferte die von ihm durchgeführte Untersuchung: Ein Singulett bei 4,40 ppm mit einer Signalintensität von 2, das dem C^{1'}-H₂ zugeordnet wurde. Darüber hinaus ein Dublett bei 8,09 ppm mit einer Signalintensität von 1 und einer Kopplungskonstante $J = 7$ Hz, das dem C⁶-H zugeteilt wurde. Zuletzt wurde ein Singulett mit einer Signalintensität von 1 bei 11,18 ppm vorgefunden, das laut Tada dem N³-H-Signal entspricht.

Die Peaks bei 4,40 ppm und bei 8,09 ppm von Tada stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Lediglich der Peak bei 11,18 ppm zeigt im Vergleich zu dem gemessenen Peak bei 11,92 ppm eine gewisse Diskrepanz. Außerdem fällt auf, dass Tada in der ¹H-NMR-Spektroskopie keinen Peak im Bereich von 13,23 ppm chemischer Verschiebung gefunden hat. Nach der Zuordnung von Tada und unter Betrachtung der Struktur- bzw. der Summenformel von FUAc (C₆H₅FN₂O₄) ist erkennbar, dass die Carboxyl-Gruppe mit einem H-Atom keine Zuordnung erfahren hat [103].

4.1.1.2 Interpretation der Resultate der ¹³C-NMR-Spektroskopie

Kim *et al.* beschreiben Peaks bei 49,5 ppm (dem C^{1'} zugeordnet) sowie außerdem bei 131 ppm (dem C⁵ zugeordnet), bei 150 ppm (dem C² zugeordnet), bei 158 ppm (dem C⁴ zugeordnet) und bei 170 ppm (dem C^{2'} zugeordnet). Für das C⁶-Ringatom wird kein Peak beschrieben und dementsprechend keine Zuordnung vorgenommen [103]. Insgesamt ähneln die Messergebnisse dieser Arbeit stark den Werten von Kim *et al.*.

Im Vergleich zu Tada bzw. Kim *et al.* gibt es gewisse Unterschiede bei den Resultaten der ¹H-NMR-Spektroskopie sowie bei der ¹³C-NMR-Spektroskopie, die aber z.B. auf der Verwen-

dung unterschiedlicher Messgeräte basieren können. Zusammenfassend betrachtet, zeigen die Messergebnisse die erfolgreiche Synthese von FUAc aus 5-FU.

4.1.2 Kopplung von FUAc an BSA

Daran anschließend erfolgte die Kopplung von FUAc an BSA mittels der Carbodiimid-Methode (siehe Abschnitt 2.2.1.2). Die Synthese erbrachte das Zytostatikum FUAc-BSA. Je BSA-Molekül wurden 12 Moleküle FUAc kovalent gebunden.

4.1.2.1 MALDI-ToF Resultate von BSA

Die mittels MALDI-ToF gemessene molekulare Masse von reinem BSA stimmt mit der vom Hersteller angegebenen (66.430 Da) weitestgehend überein [101]. Neben dem Peak bei 66.306 m/z sind außerdem jeweils ein Peak bei 33.134 m/z und bei 44.282 m/z erkennbar.

Der Peak bei 33.134 m/z liegt auf der x-Achse etwa bei der Hälfte des BSA-Peaks. ($(33.134 \text{ m/z}) / (66.306 \text{ m/z}) \approx 0,499$). Folgende Erklärung kann diese Beobachtung begründen: Bei der Methode des MALDI-ToF werden die Proteine durch einen Laserstrahl ionisiert, aufgrund der negativen Ladung in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Passagezeit des Moleküls für eine bestimmte Strecke gemessen. So werden Rückschlüsse auf die molekulare Masse eines Moleküls möglich (siehe Abschnitt 2.2.6). Wird ein Molekül doppelt ionisiert, besitzt es eine doppelte Ladung und wird dementsprechend auch ca. doppelt so stark im elektrischen Feld beschleunigt. Es handelt sich bei dem Peak bei 33.134 m/z um BSA, das zweifach ionisiert wurde ($[\text{BSA} + 2\text{H}]^{2+}$) und deshalb bei gleichbleibender Molekülmasse eine etwa doppelt so starke Beschleunigung im elektrischen Feld des MALDI-ToF erfahren hat. Cho *et al.* haben bei ihrem MALDI-ToF-Daten den gleichen Effekt beobachtet. Dort ist sogar eine fünffache Ionisierung des Albumin-Moleküls gemessen worden [104].

Der Peak bei 44.282 m/z entspricht ca. 2/3 der molekularen Masse von reinem BSA. ($(44.282 \text{ m/z}) / (66.306 \text{ m/z}) \approx 0,667$). Das Resultat lässt sich folgendermaßen erklären: Es ist möglich, dass BSA Dimere bildet, die folglich eine doppelte Molekülmasse (ca. 132 kDa) im Vergleich zu einem BSA-Monomer aufweisen [105,106]. Würde ein BSA-Dimer einfach ionisiert, müsste sich ein Peak bei ca. 132.000 m/z zeigen. In diesem Bereich wurden jedoch keine MALDI-ToF-Messungen vorgenommen. Ein zweifach ionisiertes BSA-Dimer hätte seinen Peak in dem Bereich von 66.000 m/z und würde durch den Peak von $[\text{BSA} + \text{H}]^+$ verschleiert werden.

Wenn ein BSA-Dimer jedoch dreifach ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt wird, müsste sich ein Peak bei ca. 44.000 m/z zeigen, da eine doppelte BSA-Masse eine dreifache Ladung tragen würde.

4.1.2.2 MALDI-ToF Resultate von FUAc-BSA

Für die Peaks bei 34.145 m/z und bei 45.574 m/z bei den Ergebnissen von FUAc-BSA verhält es sich ähnlich wie beim BSA (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Durch eine zweifache Ionisation wird das FUAc-BSA-Molekül ($[\text{FUAc-BSA} + 2\text{H}]^{2+}$) doppelt so stark beschleunigt. Folglich entsteht ein Peak, der annähernd bei der Hälfte des $[\text{FUAc-BSA} + \text{H}]^+$ -Peaks liegt ($(34.145 \text{ m/z}) / (68.508 \text{ m/z}) \approx 0,498$).

Der Peak bei 45.574 m/z entspricht ca. 2/3 der molekularen Masse von FUAc-BSA ($(45.574 \text{ m/z}) / (68.508 \text{ m/z}) \approx 0,665$). Die Interpretation dieses Ergebnisses folgt der bei reinem BSA. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um ein FUAc-BSA-Dimer, das dreifach ionisiert worden war. Wang *et al.* haben nach der Kopplung von Fumonisin B₁, einem Toxin, an BSA ebenfalls einen kleinen Peak bei den MALDI-ToF-Resultaten gefunden, der sich ungefähr bei 47.745 m/z des Fumonisin B₁-BSA-Peaks bei 74.355 m/z zeigte ($(47.745 \text{ m/z}) / (74.355 \text{ m/z}) \approx 0,642$) [107]. Auch in Untersuchungen mittels Gelelektrophorese zeigen sich Banden im Bereich von 130 kDa, die auf die Bildung von Fumonisin B₁-BSA-Dimeren hindeuten [107].

4.1.3 Genauere Betrachtung der Beladungsrate von BSA mit FUAc-Molekülen

Die Ergebnisse des MALDI-ToF zeigen eine kovalente Bindung von ca. 12 Molekülen FUAc je Molekül BSA (siehe Abschnitt 3.2). Das entspricht einer Sättigung von ca. 34 – 40 % aller 30 - 35 zugänglichen Lysin-Seitenketten des BSA an die FUAc potenziell hätte gebunden werden können [108].

Andere Zytostatika, die Albumin als Carrier nutzen, weisen ähnliche Beladungsraten auf wie für FUAc-BSA. Dosio *et al.* beschreibt eine kovalente Bindung von bis zu 30 Molekülen Paclitaxel an humanes Serumalbumin (Paclitaxel-HSA) [109]. Das kommerziell vertriebene nab-Paclitaxel enthält pro Ampulle 100 mg Paclitaxel und ca. 900 mg Albumin. Daraus lässt sich ein Verhältnis von ca. 8,5 mol Paclitaxel zu 1 mol Albumin berechnen. Beim nab-Paclitaxel wird das Zytostatikum allerdings nicht kovalent gebunden, sondern lagert sich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen in das Albumin-Molekül ein und nutzt es so als Transportprotein [64,110]. Stehle

et al. beschreibt eine kovalente Kopplung von Methotrexat an Ratten-Albumin (MTX-RSA) mit einer Bandbreite von 1 -20 Molekülen Methotrexat je Molekül Albumin. Um die Bindungsrate von MTX an Albumin zu steigern, wurde in den Experimenten von Stehle *et al.* die Konzentration von zugegebenem aktiviertem MTX erhöht [69]. Aufgrund der Bindungsraten von Stehle *et al.* und von Dosio *et al.* kann angenommen werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit auch für FUAc-BSA höhere Beladungsraten erreicht werden könnten.

4.1.4 Unterschiede zwischen BSA und HSA

In der Arbeit sollte die proliferationshemmende Wirkung von FUAc in verschiedenen Darreichungsformen untersucht werden. Dabei wurde als Modellmolekül BSA gewählt, da es kostengünstig zur Verfügung steht. Es stellt sich nun die Frage, ob die erzielten Resultate von der Modellsubstanz BSA auf HSA übertragbar sind, da für eine Anwendung am Menschen auf HSA als Carrier-Molekül gewechselt werden müsste. Zur Beantwortung sollen zunächst Unterschiede in der Struktur betrachtet werden. HSA verfügt in seiner Primärsequenz über 585 Aminosäuren. Das BSA-Molekül weist 583 Aminosäuren auf. Die Primärsequenzen der beiden Proteine stimmen zu 76 % überein, sodass nur geringe strukturelle Unterschiede angenommen werden können, die sich mittels spektroskopischer Analysen nachweisen lassen [58–60].

Stehle *et al.* hat *in vivo* Untersuchungen zu dem Verhalten von Ratten-Albumin (RSA), HSA und BSA in Ratten durchgeführt. Er erfasste die hepatische sowie die durch einen Tumor aufgenommene Menge einer infundierten Albumin-Dosis bei Ratten und fand heraus, dass 14 – 18 % der Albumine in den Tumor gelangten [61]. RSA wurde zu 5,8 % hepatisch aufgenommen. HSA gelangte zu 6,9 % und BSA zu 8,0 % in die Leber. Die Differenz zwischen HSA und BSA betrug also lediglich 1,1 % [61]. Dafür könnten laut Stehle *et al.* einerseits die unterschiedliche Struktur der Albumine, aber auch der Prozess der radioaktiven Markierung der Albumine verantwortlich sein. Er schließt daraus, dass HSA auch für die Verwendung als Carrier in Tierversuchen dienen kann [61]. Aus den genannten Gründen lässt sich resümieren, dass die Unterschiede zwischen BSA und HSA minimal sind und sich die Resultate mit größter Wahrscheinlichkeit auf HSA als Carrier für FUAc übertragen lassen.

4.1.5 Vor- und Nachteile von BSA als Carrier im Vergleich zu anderen Carrier-Molekülen

Nachfolgend wird betrachtet, welche 5-FU-Carrier bisher untersucht wurden und kurz auf deren Charakteristiken bzw. Vor- und Nachteile eingegangen. Die Fülle der publizierten Arbeiten ist enorm und sie alle einzeln zu besprechen, würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Insofern werden beispielhaft 5-FU-Carrier beschrieben, die jeweils eine Gruppe von Carrier-Systemen repräsentiert.

4.1.5.1 Liposomen

Thomas *et al.* haben mit 5-FU beladene „liposomale Nanopartikel“ hergestellt. Dafür wurde ein ternärer Komplex bestehend aus 5-FU, Kupfer und Polyethylenimin gebildet und in Liposomen eingekapselt. Die Bildung von 5-FU-Komplexen wurde durchgeführt, um die Diffusionsfähigkeit von 5-FU, bedingt durch die starke Hydrophobizität des Moleküls, aus den Liposomen herabzusetzen [33]. Die Freisetzung von 5-FU im Ternärkomplex aus den Liposomen war verzögert im Vergleich zu 5-FU, das als Reinsubstanz in Liposomen eingekapselt wurde. *In vivo* wurde festgestellt, dass ein höherer Wirkspiegel über einen längeren Zeitraum erzielt werden kann [33]. Der mittlere Durchmesser der liposomalen ternären 5-FU-Nanopartikel betrug 95 – 170 nm. Für die Liposomen wäre es zwar noch möglich, den EPR-Effekt zu nutzen, aber die Eindringtiefe in die Tumore wäre mit großer Wahrscheinlichkeit gering [43]. Außerdem wird 5-FU ungezielt im Blutplasma aus den Liposomen freigesetzt. Insofern würde auch gesundes Gewebe von 5-FU geschädigt werden.

4.1.5.2 Nanopartikel

Lui *et al.* beschreiben Selen-Partikel, auf deren Oberfläche 5-FU mittels Selen-Sauerstoff- bzw. Selen-Stickstoff-Bindungen gebunden wurde. Bei *in vitro*-Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Bindung von 5-FU auf der Oberfläche die endozytische Aufnahme der Partikel um den Faktor 6 – 9 gegenüber unbeladenen Selen-Partikeln steigert [111]. Da die Partikel einen mittleren Durchmesser von 70 nm aufweisen, wäre ihre Penetration in das Tumorgewebe vermutlich, wie bei den Liposomen, nur gering. Darüber hinaus werden in Plasma nach 60 min bereits 50 % des gebundenen 5-FU aus den Partikeln freigesetzt [43,111].

4.1.5.3 Erythrozyten

Wang *et al.* haben Erythrozyten mit 5-FU beladen und Mäusen, die an malignem Aszites litten, intraperitoneal injiziert. Sowohl die maximale 5-FU-Konzentration im intraperitonealen Raum als auch die Zeitspanne, über die das Zytostatikum nachgewiesen wurde, waren gesteigert im Vergleich zu freiem, intraperitoneal appliziertem 5-FU. Darüber hinaus nahm die Menge an malignem Aszites nach einer Behandlung mit 5-FU-Erythrozyten signifikant ab und bei den Mäusen war ein verlängertes Leben nachweisbar [112]. Für eine lokale Therapie, mit einer verzögerten Freisetzung von 5-FU im Intraperitonealraum, scheinen 5-FU-Erythrozyten Vorteile gegenüber freiem 5-FU zu besitzen. Für eine systemische Therapie mit 5-FU, die i.v. appliziert wird, sind 5-FU-Erythrozyten weniger geeignet, um Wirkstoffe gezielt vom Intravasalraum zu Tumorzellen zu transportieren, da sie mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 7 – 8 μm viel zu groß sind, um den EPR-Effekt nutzen zu können [45]. Außerdem verbleibt freies 5-FU nur für kurze Zeit in den Erythrozyten, da es aufgrund seiner Hydrophobizität durch Zellmembranen diffundieren kann [33,112].

4.1.5.4 Polymere

Des Weiteren wurden von Luo *et al.* Untersuchungen mit Hydroxyethylstärke (HES, MW = 130 kDa) als Carrier für 5-FU vorgenommen. Dafür wurde FUAc über eine kovalente Ester-Bindung an den jeweiligen Carrier gekoppelt [113,114].

In humanem Plasma wurden innerhalb von 20 - 25 h eine Menge von 50 % der FUAc-HES-Moleküle zu freiem FUAc und HES gespalten [113]. Das bedeutet, bei einer einmaligen intravenösen Gabe von FUAc-HES würden nach 24 h weiterhin freies FUAc nachweisbar sein, während 5-FU, mit einer Plasma- $t_{1/2}$ von 10 – 20 min, bereits größtenteils ausgeschieden worden wäre [113].

Ein Nachteil von dem verwendeten HES besteht jedoch darin, dass die Molekülmasse mit 130 kDa um den Faktor zwei zu groß ist, um den EPR-Effekt nutzen zu können [43]. Zusätzlich kann HES, insbesondere der ersten und der zweiten Generation, Nebenwirkungen bei der Hämostase verursachen, da nach der Gabe von HES z.B. die Plasmakonzentrationen des Gerinnungsfaktors VIII und des Von-Willebrand-Faktors sinken. Darüber hinaus ist es möglich, dass HES die Nierenfunktion negativ beeinflusst und in verschiedenen Geweben akkumuliert, wie der

Leber, der Haut und möglicherweise sogar in der Plazenta [55,115]. Bezüglich der Anreicherung sind in der Literatur allerdings auch gegenteilige Informationen verfügbar [113].

Vor dem Hintergrund der dargestellten Carrier-Systeme lässt sich resümieren, dass die in Abschnitt 1.5 genannten Erfordernisse an einen Carrier, wie z.B. eine gesteigerte $t_{1/2}$ in Kombination mit einer Nutzbarkeit des EPR-Effektes und einer selektiven Aufnahme von Tumorzellen, etc. von Albumin erfüllt werden, während andere Carrier die Voraussetzungen mit Einschränkungen erfüllen.

4.2 Effekte von 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA auf die Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D im MTT-Test

Die zytostatische Hemmung der Zellproliferation seitens 5-FU, FUAc und FUAc-BSA wurde *in vitro* an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Dafür wurde der MTT-Test und der Zellzählungstest an den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D durchgeführt (siehe Abschnitte 2.2.3 und 2.2.4.).

Die intrazelluläre Umwandlung von FUAc in 5-FU ist bisher ungeklärt [113]. Deshalb wurde zusätzlich die Wirkung von 5-FU als Referenzmolekül untersucht. Außerdem wurde der Effekt von BSA untersucht. Als Wirkstoffkonzentrationen wurden 100 μM , 300 μM und 500 μM gewählt. Die Zellen wurden in einer zu 5-FU bzw. zu FUAc äquivalenten Konzentration mit FUAc-BSA inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Zusätzlich wurden die IC_{50} -Werte für die Wirkstoffe 5-FU, FUAc und FUAc-BSA berechnet (siehe Abschnitte 3.3.1.1 und 3.3.2.1).

4.2.1 Effekte von 5-FU

Das für die Behandlung von Tumoren etablierte Zytostatikum 5-FU zeigt gegenüber den anderen untersuchten Agenzien die stärkste Proliferationshemmung auf die Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB-231 (siehe Abschnitt 3.3.1) bzw. T-47D (siehe Abschnitt 3.3.2) und damit einhergehend die niedrigsten IC_{50} -Werte (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8). In Tabelle 9 werden die berechneten IC_{50} -Werte mit Literaturdaten verglichen.

Tabelle 9: Berechnete IC₅₀-Werte von 5-FU im Vergleich zur Literatur. Die Werte wurden für beide Zelllinien, MDA-MB-231 und T-47D, kalkuliert. Die rechte Hälfte beschreibt Literaturwerte. Die Zahlen in den runden Klammern repräsentieren: Zusätzliche Informationen, die 95 %-Konfidenzintervalle und/oder die Wirkdauer des 5-FU.

		Eigene Resultate (72 h)		In der Literatur beschrieben	
		Zelllinie		Zelllinie	
		T-47D	MDA-MB-231	T-47D	MDA-MB-231
Substanz	5-FU	50,6	1,32	2,8 ± 0,1 (144 h) [116]	9,3 ± 0,3
	[μM]	(37,6 – 68,1)	(0,07 – 24,5)	153,75 (48 h, in Glukose-freiem Medium) [117]	(72 h) [118]

Der Wirkmechanismus von 5-FU wurde bereits vielfältig wissenschaftlich untersucht und wurde im Abschnitt 1.4 erläutert. Die Zelllinie T-47D weist im Vergleich zu Zelllinie MDA-MB-231 höhere IC₅₀-Werte auf. Die in der Literatur beschriebenen Werte für die beiden Zelllinien liegen in einer ähnlichen Größenordnung.

4.2.2 Effekte von FUAc

Während reines 5-FU bei beiden Tumorzelllinien nach 48 h starke zytostatische Effekte erzielt, zeigt FUAc eine mittelstarke Proliferationshemmung bei der Zelllinie MDA-MB-231 (siehe Abschnitt 3.3.1) und eine schwache Proliferationshemmung bei Zelllinie T-47D (siehe Abschnitt 3.3.2).

Die Unterschiede in der zytostatischen Wirkung von FUAc im Vergleich zu 5-FU können nur aufgrund der chemischen Modifikation von FUAc entstehen. Der strukturelle Aufbau von FUAc differiert gegenüber dem von 5-FU in einer zusätzlichen Methyl-Carboxyl-Gruppe (siehe Abbildung 4) am N¹-Atom des Uracil-Ringes. Damit steht dieses N-Atom für eine kovalente Bindung an Ribose bzw. Desoxyribose und eine darauf folgende intrazelluläre Synthese von FdUMP, FUTP und weiteren Metaboliten, wie sie unter physiologischen Bedingungen erfolgt, nicht mehr zur Verfügung [15,119]. Insofern können die schwächeren proliferationshemmenden Effekte von FUAc gegenüber 5-FU unter Betrachtung der FUAc-Molekülstruktur gut erklärt werden. Luo *et*

al. und Chung *et al.* sind z.B. der Auffassung, dass eine Konversion von reinem FUAc in 5-FU wenig wahrscheinlich ist [71,113].

Der modifizierte chemische Aufbau führt außerdem dazu, dass FUAc aufgrund der Wirkung der Carboxyl-Gruppe und dessen Beitrag zum Dipolmoment des FUAc-Moleküls eine gesteigerte Polarität aufweist und geringfügig hydrophiler ist als 5-FU. Unter physiologischen Bedingungen (pH = 7,4) befindet sich das FUAc-Molekül im geladenen Zustand, da Carboxyl-Gruppen bei pH-Werten zwischen 3 - 5 deprotoniert werden, je nachdem ob andere stark elektronegative Gruppen anwesend sind [92]. FUAc gibt bereits oberhalb eines pH-Wertes von 2 das Proton der Carboxyl-Gruppe ab. Tada hat diese Eigenschaft verwendet, um bei der Synthese von FUAc, genau wie in dieser Arbeit (siehe Abschnitt 2.2.1.1), den Aufreinigungsprozess von FUAc zu vollziehen. Bei einem pH-Wert von 2 wird die Carboxyl-Gruppe protoniert, FUAc bildet Kristalle und fällt aus, so dass es von der Mutterlauge getrennt werden kann [79].

Die beschriebene Zunahme der Hydrophilität in Kombination mit der Ladung des FUAc-Moleküls hat einerseits zur Folge, dass FUAc nur in reduziertem Maße vom Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum, durch die hydrophile Zone der Lipiddoppelschicht der Tumorzellen hindurch, gelangt [120]. Andererseits führt die Methyl-Carboxyl-Gruppe von FUAc möglicherweise zu einer Blockade des Uracil-Transporters der Tumorzellen, über den reines 5-FU in den Intrazellulärraum gelangt. Für die Orotsäure, ein am C⁶-Atom des Uracil-Ringes carboxyliertes Molekül, das strukturelle Ähnlichkeiten mit FUAc aufweist (siehe Abbildung 32 bzw. Abbildung 5), haben Wohlhüter *et al.* gezeigt, dass es nicht mit Hilfe des Uracil-Transporters in den Intrazellulärraum gelangt [21].

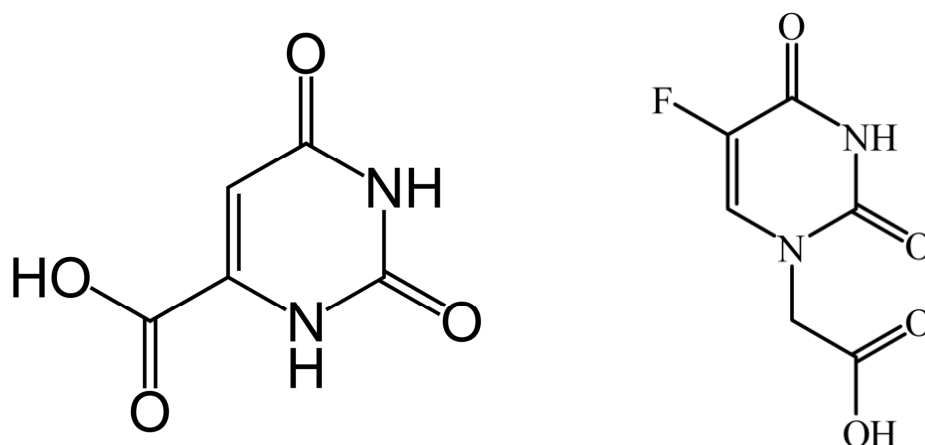


Abbildung 32: Strukturformeln von Orotsäure und FUAc im Vergleich. Dargestellt ist der chemische Aufbau von Orotsäure (links), der die Ähnlichkeit zum FUAc-Molekül (rechts) verdeutlicht. Beide Moleküle bestehen aus einem Uracil-Molekül (siehe Abbildung 2 rechts). Orotsäure besitzt jedoch eine zusätzliche Carboxyl-Gruppe am C⁶-Atom. FUAc weist eine Methyl-Carboxyl-Gruppe am N¹-Atom des Uracil und ein Fluor-Atom am C⁵-Atom auf.

Die Orotsäure kann die Zellmembran deshalb nur relativ langsam mittels Diffusion überwinden ($t_{1/2}$: 2.890 – 6.930 s). Uracil oder 5-FU, die den Uracil-Transporter verwenden, gelangen wesentlich schneller ins Zellinnere ($t_{1/2}$: 25 – 58 s) [21]. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen FUAc und Orotsäure ist es wahrscheinlich, dass das FUAc-Molekül ähnlich langsam wie Orotsäure in den Intrazellulärraum diffundiert.

Obwohl der Metabolismus und Abbau von FUAc noch nicht abschließend geklärt ist, liefern die genannten Begründungen logische Ansätze und Erklärungen für eine geminderte zytostatische Wirkung seitens FUAc im Vergleich zu 5-FU [71,113].

Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte ist feststellbar, dass die Zelllinie MDA-MB-231, die für 5-FU niedrigere IC_{50} -Werte aufweist als T-47D (siehe Tabelle 9), stärker in ihrer Proliferation durch FUAc gehemmt wird (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Berechnete IC_{50} -Werte von FUAc im Vergleich zur Literatur. Die Werte wurden für beide Zelllinien, MDA-MB-231 und T-47D, kalkuliert. Die rechte Hälfte beschreibt Literaturwerte. Die Zahlen in den runden Klammern zeigen zusätzliche Informationen, die 95 %-Konfidenzintervalle und/oder die Wirkdauer des FUAc.

		Eigene Resultate (72 h)		In der Literatur beschrieben		
		Zelllinie		Zelllinie		
		T-47D	MDA-MB-231	T-47D	MDA-MB-231	Andere
Substanz	FUAc	913,5	652	Nicht publiziert	Nicht publiziert	0,196 (HeLa, 72 h) [121]
	[μ M]	(358 – 2313)	(502 – 844)			0,267 (SGC-7901, 72 h) [121]
						und 88,17 (HL-60, 48 h) [122]

Die in der Literatur beschriebenen Werte differieren zum Teil erheblich von den gemessenen. Allerdings ist bei Betrachtung der Literaturdaten erkennbar, dass ein starker Zusammenhang mit der verwendeten Zelllinie existiert. Sowohl Sun *et al.* als auch Qu *et al.* haben ebenfalls eine geringere zytostatische Wirkung von FUAc im Vergleich zu 5-FU festgestellt [121,122]. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit den Resultaten dieser Arbeit. Die Unterschiede zwischen

den zwei Zelllinien unterstützen außerdem die Annahme, dass neben den Transportmechanismen auch der zellspezifische Metabolismus einen Einfluss auf die zytostatische Effektivität von FUAc besitzt.

4.2.3 Effekte von FUAc-BSA und BSA

FUAc-BSA bewirkt bei der Zelllinie MDA-MB-231 eine mittelstarke Wachstumshemmung (siehe Abschnitt 3.3.1), während bei der anderen Mammakarzinom-Zelllinie T-47D ein starker inhibitorischer Einfluss auf die Zellproliferation festgestellt wurde (siehe Abschnitt 3.3.2). Diese Beobachtung spiegelt sich auch bei den IC_{50} -Werten wieder (siehe Tabelle 11). Der Effekt von FUAc-BSA ähnelt bei der Zelllinie T-47D in seiner Stärke dem von reinem 5-FU. In der Literatur sind weder für die verwendeten Zelllinien noch für andere Zelllinien IC_{50} -Werte auffindbar gewesen.

Tabelle 11: Berechnete IC_{50} -Werte von FUAc-BSA im Vergleich. Die Werte wurden für beide Zelllinien, MDA-MB-231 und T-47D, kalkuliert. Es waren keine Literaturwerte verfügbar. Die Zahlen in den runden Klammern zeigen die 95 %-Konfidenzintervalle für FUAc-BSA.

		Eigene Resultate (72 h)	
		Zelllinie	
		T-47D	MDA-MB-231
Substanz	FUAc-BSA [μ M]	88,6 (65,6 – 119,6)	408 (238 – 699)

In der Literatur ist beschrieben, dass Tumorzellen Albumin aufnehmen, da es für sie eine Quelle von Energie darstellt, und in der Folge ihre Proliferation steigert [44,54,62,65]. Bei reinem BSA zeigen die Zellexperimente keinen wachstumsfördernden Einfluss. Ein Grund dafür könnte sein, dass die in den Experimenten verwendeten BSA-Konzentrationen (inklusive des FKS im Medium RPMI 1640) im Bereich von 2,85 – 5,06 mg/mL liegen, die physiologische Albuminkonzentration mit 35 – 50 mg/mL jedoch um den Faktor 5 – 20 größer ist [44,72]. Die Stoffkonzentration von BSA reicht möglicherweise nicht aus, um die erwarteten Effekte zu beobachten. Eine Ausnahme bilden die MTT-Ergebnisse nach 24 h bei der Zelllinie MDA-MB-231. Ein derart starker proliferationsfördernder Einfluss erscheint allerdings trotz statistischer Signifikanz als

unwahrscheinlich. Für FUAc und für 5-FU sind ähnliche Tendenzen erkennbar und es stellt sich die Frage, ob bei den 24 h-Werten für die Zelllinie MDA-MB-231 vielleicht ein methodischer Fehler eine Rolle gespielt haben könnte. Darüber hinaus ist im MTT-Test für die Zelllinie MDA-MB-231 von 0 h – 48 h bei der Zugabe von FUAc-BSA ein zytostatischer Einfluss feststellbar. Von 48 h – 96 h stagniert jedoch der antiproliferative Einfluss von FUAc-BSA.

Um diese Resultate zu verstehen, ist es notwendig, die Einflüsse von Albumin auf das Tumorzellwachstum zu betrachten und die möglichen Wege der FUAc-BSA-Aufnahme zu diskutieren. Wie oben beschrieben, kann Albumin von Tumorzellen aufgenommen werden. Der Mechanismus mit dem die Albumin-Moleküle die Zellmembran der Tumorzellen überwinden, ist die Endozytose [18,54]. Anschließend wird das in den Endosomen befindliche Albumin den Lysosomen zugeführt und abgebaut [18,62].

Auf der Oberfläche der Zellmembran verschiedener Zelltypen wurde die Anwesenheit von Proteinen beschrieben, die eine spezifische Bindung von Albumin ermöglichen. Zum Beispiel wurde auf Endothelzellen das Glykoprotein 60 (gp60) gefunden. Bindet Albumin an gp60, wird das Albuminmolekül endozytiert, in Endosomen durch die Endothelzelle geschleust (Transzytose) und schließlich in den Extravasalraum abgegeben [46,65]. Außerdem wurde von weiteren Proteinen auf Zelloberflächen berichtet, die Albumin spezifisch binden. Zum einen handelt es sich um SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), das von bestimmten Tumorzellen in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. Dort bindet es z.B. nab-Paclitaxel (albumingebundenes Paclitaxel) und führt vermutlich zu dessen zellulärer Aufnahme [18,64]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von SPARC mit der Effektivität des Wirkstoffes nab-Paclitaxel korreliert [65]. Zum anderen wurde ein membranständiges albuminbindendes Protein (mABP) beschrieben [74]. Es handelt sich um ein Protein, das auf der Zellmembran bestimmter östrogensensitiver Tumorzellen, wie beispielsweise T-47D, zu finden ist. Es wurde vermutet, dass Albumin bei mABP-exprimierenden Zellen in der Lage wäre, einen proliferationshemmenden Einfluss auszuüben [74]. Dieser inhibitorische Einfluss sei jedoch eher bei humanem Albumin zu finden und weniger bei BSA [123]. Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurde ein zellteilungshemmender Einfluss des reinen BSA für die Zelllinie T-47D nachgewiesen.

Die folgende Tabelle 12 ist ein Ausschnitt von Tabelle 4 aus Abschnitt 2.1.3. Das Expressionsmuster von den Zellrezeptoren der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien T-47D und MDA-MB-231 zeigt, dass SPARC in keiner der zwei verwendeten Zelllinien anwesend war, sondern nur das mABP.

Tabelle 12: SPARC- bzw. mABP-Expression der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D. Legende: „+“ bedeutet, ein Protein wird exprimiert. „-“ bedeutet, ein Protein wird nicht exprimiert.

		Proteinexpression	
		SPARC	mABP
Zelllinie	T-47D [74,124]	-	+
	MDA-MB-231 [65,74]	-	-

Die Informationen der Tabelle 12 legen den Schluss nahe, dass die Expression von mABP ein Grund für die starke zytostatische Wirkung von FUAc-BSA bei der Zelllinie T-47D ist. Falls die Hypothese zutreffen sollte, müsste bei T-47D-Zellen eine stärkere Endozytose von FUAc-BSA beobachtet werden.

Um diese Frage zu klären, wurden CLSM-Experimente durchgeführt. Im Abschnitt 3.5 wurden die Ergebnisse der CLSM-Aufnahmen beschrieben, mit deren Hilfe untersucht wurde, inwieweit die Tumorzellen die Modellsubstanz FITC-BSA aufnehmen. BSA besitzt ein Molekulargewicht von ca. 66.000 Da und FITC von 389 Da. Die kovalente Bindung von FITC an BSA erfolgt, wie beim FUAc-BSA, über freie NH₂-Gruppen von Lysin. Das Analysezertifikat des Herstellers (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für das verwendete FITC-BSA zeigt eine Beladung von 13 mol FITC je Mol BSA [125]. In Anbetracht der identischen Kopplungsmethode von FITC an BSA, des molaren Verhältnisses von 13:1 (FITC:BSA) und einer ähnlichen molaren Masse von FITC im Vergleich zu FUAc scheint FITC-BSA den Anforderungen an eine Modellsubstanz für die Aufnahme von FUAc-BSA gerecht zu werden.

In den CLSM-Aufnahmen (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31) ist eine verstärkte Aufnahme von FITC-BSA in den Zellen T-47D erkennbar. Darüber hinaus sind Vesikel-ähnliche Strukturen sichtbar, wie sie in der Literatur für die endozytotische Aufnahme von Albumin beschrieben werden [18,54].

Die Unterschiede in der Verteilung und Stärke der Fluoreszenzsignale zwischen den Tumorzellen der beiden Zelllinien deuten stark darauf hin, dass die Zellen der Linie MDA-MB-231 weniger effektiv FUAc-BSA aufnehmen als die Zellen der Linie T-47D. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Resultaten des MTT-Tests, bei denen die T-47D-Zellen wesentlich stärker auf den zytostatischen Einfluss von FUAc-BSA reagieren als die Tumorzellen der Linie MDA-MB-231. Die MTT-Ergebnisse werden deshalb auf folgende Weise interpretiert: Die Zel-

len MDA-MB-231 nehmen FUAc-BSA in einer Menge auf, die beim intrazellulären Abbau von FUAc-BSA in den Lysosomen zur einer Inhibition der Zellproliferation führt. Allerdings kann die Inhibition nach 48 h von den Zellen kompensiert werden. Vermutlich stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem wachstumshemmenden Effekt des FUAc und des proliferationsfördernden Einfluss von BSA ein. Die T-47D-Zellen nehmen hingegen so viel FUAc-BSA auf, dass die Zellproliferation fast vollständig inhibiert wird. Im Abschnitt 4.2.2 wurde beschrieben, dass eine Konversion von reinem FUAc in 5-FU laut Literatur als unwahrscheinlich angesehen wird. Im Kontrast dazu scheint FUAc jedoch über enzymatische Reaktionen in 5-FU zurückgewandelt werden zu können, wenn es über Amid- oder Ester-Bindungen kovalent an ein Carrier-Molekül gebunden ist [71,113].

Die Hypothese einer gesteigerten FUAc-BSA-Aufnahme und der damit einhergehenden größeren zytostatischen Wirkung an den T-47D-Zellen konnte mit Hilfe der CLSM-Aufnahmen bestätigt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die verstärkte Anreicherung von FITC-BSA bzw. FUAc-BSA aufgrund einer effektiveren Endozytose durch die Expression des mABP auf den T-47D-Zellen geschieht.

Für das albuminbindende Protein SPARC wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Expression mit einer besseren Wirksamkeit von nab-Paclitaxel auf Tumorzellen sowohl bei Mammakarzinomen als auch bei Pankreaskarzinomen einhergeht. In dem Zusammenhang wurde die Frage aufgeworfen, ob SPARC als ein Biomarker für das Ansprechen auf nab-Paclitaxel individuell für Patienten bestimmt werden sollte [65,126,127]. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann keine Aussage über die Rolle von SPARC getroffen werden. Da die mABP-exprimierenden Tumorzellen T-47D aber besser auf FUAc-BSA ansprechen als die nicht-exprimierenden der Zelllinie MDA-MB-231, könnte möglicherweise auch mABP als ein Biomarker für albuminbasierte Zytostatika dienen.

4.3 Ergebnisse der Zellzählung im Vergleich zum MTT-Test

Neben dem MTT-Test wurden außerdem Zellzählungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.1.4 bzw. Abschnitt 3.3.2.4), um die Resultate des MTT-Tests zu überprüfen. Dafür wurden 5-FU, FUAc, FUAc-BSA und BSA in einer Konzentration von 300 μ M auf die Tumorzellen der Linien MDA-MB-231 bzw. T-47D gegeben und für 72 h unter Zellkulturbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.2) inkubiert.

Nach der Anfärbung der Zellen mit Trypanblau wurden fast ausschließlich vitale Zellen und nur wenige tote Zellen beobachtet. Lediglich bei der Gabe von 5-FU wurde bei den T-47D-Zellen eine größere Anzahl toter Zellen festgestellt (7,3 %). Für FUAc und FUAc-BSA wurden sowohl bei den Zellen der Linie MDA-MB-231 als auch bei den T-47D-Zellen keine oder nur sehr wenige avitale Zellen erkannt, was für eine geminderte Zytotoxizität der beiden Agenzien spricht.

Beim MTT-Test zeigte sich bei beiden verwendeten Zelllinien stets eine Überbestimmung im Vergleich zur Zellzählung (siehe Abbildung 33). Es ist auffällig, dass insbesondere bei Gabe von BSA und FUAc große Diskrepanzen zwischen MTT-Test und Zellzählung auftraten.

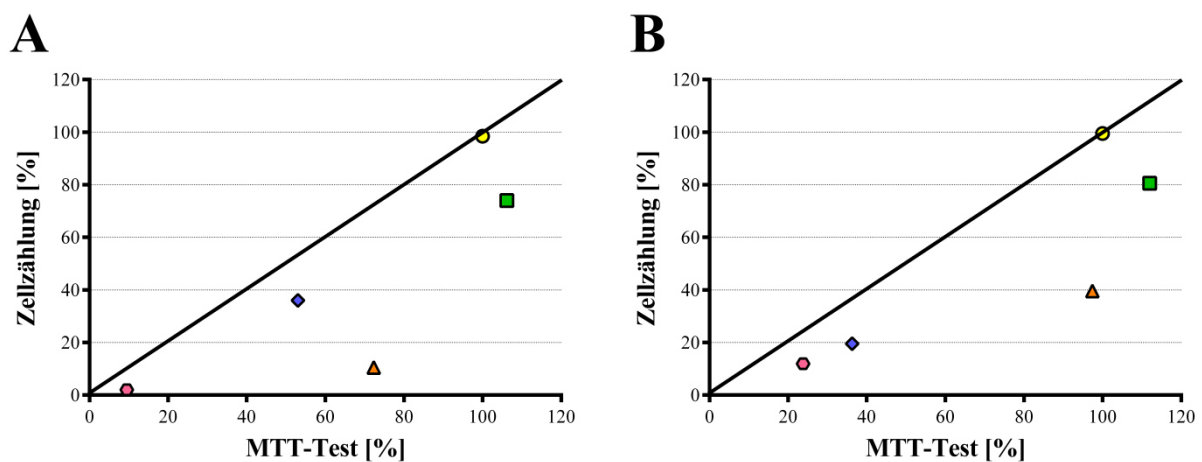


Abbildung 33: Identitätsdiagramme von Zellkulturergebnissen. Dargestellt sind Identitätsdiagramme für die Zelllinien MDA-MB-231 (A) und T-47D (B), in denen die Resultate des MTT-Tests (x-Achse) denen der Zellzählung (y-Achse) gegenübergestellt sind. Die Gerade zeigt, wo die Punkte liegen müssten, wenn beide Methoden die gleichen prozentualen Ergebnisse liefern würden. Legende: ● CTL, ■ BSA, ▲ FUAc, ◆ FUAc-BSA, ⬡ 5-FU.

Für reines BSA, FUAc-BSA und 5-FU betragen die Abweichungen ca. 25 – 30 %, was im Bereich des Messfehlers der beiden Methoden liegt. Beim FUAc hingegen ergeben sich Unterschiede im Bereich von ca. 50 % und das obwohl bei der Gestaltung der Experimente darauf geachtet wurde, dass die Versuchsbedingungen bei beiden Testmethoden möglichst identisch sind. Die großen Unstimmigkeiten treten bei beiden verwendeten Zelllinien und nur bei der Gabe von FUAc auf. Insofern entstehen die Differenzen mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der verwendeten Methoden und sind darauf zurückzuführen.

Der MTT-Test ist im Vergleich zur Zellzählung kein Test, der direkt die Anzahl der Zellen bestimmt, sondern eine spektroskopische Analyse der 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan-Konzentration, das durch die chemische Reduktion von MTT entsteht (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Spaltung von MTT in Formazan findet einerseits durch mitochondriale und

zytosolische Dehydrogenasen unter Anwesenheit von NADH und NADPH statt, aber auch freie Thiol-Gruppen in der Aminosäure Cystein können zu einer verstärkten Umsetzung zu Formazan führen [84,86,128]. Zusätzlich haben Berridge *et al.* gezeigt, dass die Zugabe von NADH bzw. NADPH die Reduktion von MTT zu Formazan steigern kann [86]. Die gemessene Formazan-Konzentration gibt demnach Aufschluss über die metabolische Aktivität der Zellen, die in der Folge indirekt einen Schluss auf die Anzahl der vitalen Zellen zulässt. Das trifft jedoch nur zu, wenn die Bedingungen konstant bleiben und es keine Veränderungen, zum Beispiel in der metabolischen Aktivität, gibt [86].

Bezüglich der Rolle von Albumin sind widersprüchliche Informationen in der Literatur auffindbar. Funk *et al.* beschreiben für MTT-Tests eine Überbestimmung, die aus der Anwesenheit von Albumin resultiert [128]. Hung *et al.* hingegen berichten von einer Unterbestimmung, wenn Albumin in einer 10 %-igen Konzentration zugegen ist [129]. Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten eher darauf hin, dass die These von Funk *et al.* zutrifft, da die MTT-Ergebnisse für BSA im Vergleich zur Zellzählung konstant höhere Werte ergeben haben. Albumin verfügt also vermutlich über einen Einfluss auf den MTT-Test, der die Differenzen in den Resultaten der beiden Messmethoden erklären kann.

Im nächsten Schritt wird die konstante Überbestimmung von FUAc genauer erörtert. Jabbar *et al.* argumentieren, dass der pH-Wert die Resultate des MTT-Tests entscheidend im Vergleich zur Zellzählung beeinflussen kann [130]. Aufgrund der Absenkung des pH-Wertes auf 2 bei der Herstellung von FUAc lag der Verdacht nahe, das Medium könnte durch die Zugabe von FUAc angesäuert werden und deshalb die Diskrepanz zur Zellzählung hervorrufen. Um die Hypothese zu untersuchen, wurde der MTT-Test geringfügig modifiziert und ausgewertet (siehe Abschnitt 3.4). Die Resultate demonstrieren lediglich geringfügige Differenzen aufgrund des Mediumwechsels. Der Einfluss des pH-Wertes scheint in den Experimenten dieser Arbeit nur minimal zu sein und nicht der ausschlaggebende Faktor für die Unterschiede. Diese reichen in keinem Fall aus, um eine Abweichung von 50 % zu erklären. Insofern muss die Hypothese verworfen werden, die den pH-Wert als auslösende Ursache annimmt. Daraus folgt, dass die extrazellulären Umstände mit großer Wahrscheinlichkeit nicht herangezogen werden können, um eine Erklärung zu finden. Deshalb werden im nächsten Schritt die intrazellulären Prozesse der Tumorzellen genauer betrachtet.

Wie oben beschrieben, hängt die Umsetzung von MTT zu Formazan entscheidend von der metabolischen Aktivität der Tumorzellen ab. Wenn FUAc einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen besäße, wäre ein direkter Schluss auf die Proliferationsaktivität der Zellen unzulässig.

Luo *et al.* und Chung *et al.* erwähnen in ihren Arbeiten, dass die intrazelluläre Umwandlung von FUAc in 5-FU unwahrscheinlich erscheint [71,113]. Wird hypothetisch die Spaltung von FUAc angenommen, würden 5-FU und Acetat entstehen (siehe Abbildung 4 (A), die Reaktion würde rückwärts ablaufen und in der Freisetzung von 5-FU und Acetat münden anstatt in Chloroacetat). Acetat wird im Intrazellulärraum, unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP), kovalent an das Coenzym A (CoA) durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase gebunden. Es entsteht Acetyl-CoA [131]. Acetyl-CoA ist unter anderem ein essentieller Bestandteil der Fettsäure-Synthese und des Energiestoffwechsels, da es in den Citratzyklus eingeschleust wird. Aus Acetyl-CoA und Oxalacetat wird Citrat gebildet [132,133]. Bei einem Durchlauf durch den Citratzyklus werden drei Moleküle NADH gebildet. Wie oben erwähnt, trägt NADH zur Reduktion von MTT zu Formazan bei, dessen Absorption photometrisch beim MTT-Test bestimmt wurde. In Übereinstimmung mit der Hypothese wird von Liu in der Literatur eine Beschleunigung des Citratzyklus in Prostatakarzinomzellen aufgrund einer gesteigerten Verfügbarkeit von Acetyl-CoA beschrieben [134]. Es wird angenommen, dass ein gesteigerter Metabolismus der Tumorzellen nicht zwangsläufig mit einer vermehrten Zellproliferation einhergeht.

Die MTT-Ergebnisse lassen sich mit der Hypothese der gesteigerten metabolischen Aktivität aufgrund eines NADH-Überschusses gut erklären. Da bei der Zellzählung die Anzahl der Tumorzellen nachgewiesen wird, hat die metabolische Aktivität der Zellen keinen Einfluss auf die Methode.

Gleichzeitig setzt die Hypothese aber die intrazelluläre Spaltung von FUAc in 5-FU und Acetat voraus. Da das N¹-Atom ohne eine Spaltung aus chemischer Sicht voll besetzt wäre und da eine Bindung von Ribose an das N¹-Atom des Uracil-Ringes für die Wirkung von 5-FU essentiell ist (siehe Abschnitt 4.2.2), scheint die Spaltung unabdingbar für den zytostatischen Effekt von FUAc zu sein. Die chemische Betrachtung des FUAc-Moleküls und die beobachteten Ergebnisse von MTT-Test und Zellzählung führen zu folgender Schlussfolgerung: Entgegen den Publikationen von Luo *et al.* und Chung *et al.* [71,113] erhärten die Resultate dieser Arbeit die These, dass FUAc intrazellulär in 5-FU und Acetat gespalten wird. Die für die zytostatische Wirkung notwendige Konversion von FUAc in 5-FU erklärt auch die geringere proliferationshemmende Potenz von FUAc gegenüber 5-FU. Die These muss mit weiteren Experimenten, die den intrazellulären Abbau von FUAc bzw. FUAc-BSA betreffen, genauer untersucht werden.

4.4 Methodenkritik

Die kritische Auseinandersetzung mit den verwendeten Methoden konzentriert sich auf den MTT-Test, da die Ergebnisse dieser Methode teilweise im Widerspruch zu den direkten gewonnenen Ergebnissen aus der Zellzählung stehen.

Der MTT-Test bietet den Vorteil, dass innerhalb kurzer Zeit photometrisch eine große Anzahl an Resultaten generiert werden kann. Darüber hinaus ist das Verfahren relativ einfach durchzuführen. Zu den Nachteilen zählen die großen Streuungen der 24 h-Messwerte. Die zum Teil relativ großen Standardabweichungen lassen sich nach 24 h bei beiden Zelllinien erkennen und werden deshalb einem methodischen Fehler zugeschrieben. Auch wenn in höchstem Maße auf eine gleichmäßige Aussaat der Zellen geachtet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zahl der Zellen in den einzelnen Wells verschieden war. Darüber hinaus werden die Tumorzellen beim Vorgang des Aussäens durch die vorherige Behandlung mit Trypsin-EDTA einer gewissen Belastung ausgesetzt. Möglicherweise überstehen manche Zellen den Arbeitsschritt nicht. Ein weiterer Grund könnte sein, dass ein gewisser Teil der Zellen nach dem Aussäen länger braucht, um adhärent anzuwachsen und deshalb später proliferiert als andere Zellen. Die Werte nach 48 h, 72 h und 96 h besitzen wesentlich kleinere Standardabweichungen und werden als verlässlicher betrachtet. Gleichzeitig scheinen gewisse Substanzen, wie in dieser Arbeit BSA und FUAc, die Umsetzung von MTT zu Formazan zu modifizieren.

Insofern scheint es unumgänglich, ein weiteres Verfahren hinzu zu ziehen, damit stichprobenartig die mit dem MTT-Test gewonnenen Resultate überprüft werden können. Die Bestimmung von Zellzahlen mittels der Zellzählung ist sicher die direkteste Methode, um die Proliferationshemmung von Tumorzellen zu untersuchen. Trotzdem ist das Verfahren nur begrenzt praktikabel, da es ein langwieriger Prozess ist, bis alle Zellen gelöst, gefärbt und gezählt wurden. Um für mehrere Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten Untersuchungen durchzuführen, ist die Methode der Zellzählung zu aufwendig. Für Stichproben erscheint das Verfahren jedoch sehr sinnvoll.

Für die Berechnung der IC_{50} -Werte wurden die verwendeten Konzentrationen 100 μ M, 300 μ M und 500 μ M herangezogen. Die 95 %-Vertrauensintervalle sind teilweise jedoch relativ weit und überlappen sich. Bei späteren Untersuchungen wäre es sinnvoll, eine größere Anzahl von Stoffkonzentrationen zu untersuchen, um die Bandbreite der Vertrauensintervalle für die IC_{50} -Werte einzuschränken. Allerdings sollten die berechneten IC_{50} -Werte in dieser Arbeit lediglich einen Eindruck und eine gewisse Vergleichbarkeit über die Wirksamkeit der verschiedenen Agenzien

vermitteln. Insofern wird die Untersuchung von den drei Wirkstoffkonzentrationen als ausreichend betrachtet, um die gewünschten Aussagen vornehmen zu können.

Schließlich bleibt zu erwähnen, dass die *in vitro*-Experimente ein Modell darstellen, um die *in vivo*-Wirksamkeit von 5-FU und dessen Addukten gegenüber malignen Tumorzellen abzuschätzen, aber keine realen Bedingungen zu simulieren vermögen. Unberücksichtigt bleiben z.B. die $t_{1/2}$ der 5-FU-Derivate, sodass nicht erfasst werden konnte, ob FUAc-BSA aufgrund seiner höchstwahrscheinlich gesteigerten $t_{1/2}$ gegebenenfalls bessere Resultate erzielt als 5-FU. Dafür hätten beispielsweise die 48 h-Werte von 5-FU mit den 96 h-Werten von FUAc-BSA verglichen werden können.

Insgesamt betrachtet hat sich die Ergänzung der MTT-Tests mit den Zellzählungstest als sinnvoll erwiesen, um zunächst *in vitro* einen Eindruck über die zytostatische Wirksamkeit von 5-FU und dessen Addukten zu gewinnen.

4.5 Pharmakologische Aspekte von FUAc-BSA

4.5.1 Applikation und Stabilität von FUAc-BSA

Bisher wurden der intrazelluläre Metabolismus und die Wirkung von 5-FU, FUAc und von FUAc-BSA bei Tumorzellen betrachtet (siehe Abschnitte 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.3). Die Voraussetzung für die Wirkungen der genannten Agenzien ist jedoch, dass das Tumorgewebe im Organismus in ausreichender Konzentration erreicht wird. Im folgenden Abschnitt wird auf die Applikation und die Stabilität von FUAc-BSA im Plasma eingegangen.

FUAc-BSA müsste, wie 5-FU auch, intravenös appliziert werden, da das Albumin des FUAc-BSA bei einer oralen Gabe durch die Enzyme des Verdauungsapparates gespalten würde [71,135]. Somit ist eine orale Gabe von FUAc-BSA nicht in Erwägung zu ziehen. Ein entscheidender Nachteil von 5-FU besteht darin, dass es über einen langen Zeitraum von 24 h oder länger appliziert wird [32,33,71]. Capecitabin besitzt im Gegenteil dazu die Eigenschaft, dass es oral eingenommen werden kann [136]. Die Applikation ist deshalb patientenfreundlicher als die von 5-FU oder von FUAc-BSA.

Des Weiteren ergibt sich die Frage, ob sich FUAc-BSA nach einer intravenösen Applikation stabil verhalten würde. Kim *et al.* hat mittels *in vitro*-Experimenten herausgefunden, dass sich die Bindung zwischen FUAc und humanem Serumalbumin (HSA) als sehr widerstandsfähig

darstellt. Nach 12 h wurden beim FUAc-HSA lediglich 1,2 % 5-FU abgespalten. Die Art der Bindung wird leider nicht genauer charakterisiert. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich ebenfalls um eine Amid-Bindung handelt [70]. Insofern kann geschlussfolgert werden, dass auch das FUAc-BSA nach einer intravenösen Applikation weitestgehend unverändert bliebe.

4.5.2 Der Weg zu den Tumorzellen sowie die Halbwertszeit und mögliche Strukturveränderungen von FUAc-BSA

Nach einer i.v.-Applikation von Zytostatika, die Albumin als Carrier-Molekül verwenden, sind prinzipiell zwei Wege möglich, um vom Intravasalraum zu den Tumorzellen zu gelangen. Zum einen kann aufgrund des geringen hydrodynamischen Durchmessers von Albumin der EPR-Effekt genutzt werden, der in Abschnitt 1.5 beschrieben wurde. FUAc-BSA scheint mit einer molekularen Masse von ca. 68,5 kDa im Bereich der oberen Grenze zu liegen.

Zum anderen wurde für nab-Paclitaxel beschrieben, dass es im intravaskulären System an gp60-exprimierende Endothelzellen bindet und mittels Transzytose, in Caveolae transportiert, durch die Endothelzellen hindurch in den Extravasalraum freigesetzt wird [64].

FUAc-BSA würde höchstwahrscheinlich ebenfalls einerseits über den EPR-Effekt, andererseits über gp60-vermittelte Transzytose, zu den Tumorzellen gelangen, wenn die native Struktur von BSA nach der Kopplung von FUAc erhalten bliebe. Dabei stellt sich die Frage, ob das gesamte FUAc-BSA in Tumorgewebe akkumuliert wird oder ob evtl. auch andere Organe einen gewissen Teil von FUAc-BSA aufnehmen. Dieser Frage soll folgend nachgegangen werden.

Neben den Beladungsraten von RSA mit MTX (siehe Abschnitt 4.1.3) haben Stehle *et al.* in ihrer Arbeit auch das Targeting von MTX-RSA in Abhängigkeit von der Anzahl gebundener MTX-Moleküle je Molekül RSA untersucht. Sie gelangen zu dem Ergebnis, dass die Menge gebundener MTX-Moleküle entscheidenden Einfluss darauf besitzt, zu welchem Gewebe an Ratten appliziertes MTX-RSA gelangt. Ist ein Molekül MTX pro RSA gekoppelt (MTX(1)-RSA), gelangt das Zytostatikum vorrangig in den Tumor und akkumuliert nach 24 h nur zu 6 % in der Leber. Bei der Gabe von MTX(3)-RSA befinden sich 12 % nach 24 h in der Leber. Dieser Wert steigert sich bis zu 60 % nach 24 h bei der Applikation von MTX(20)-RSA. Gleichzeitig sinkt die Menge an aufgenommenem MTX-RSA durch die Tumorzellen von 25 % für MTX(1)-RSA auf 2 % für MTX(20)-RSA [69]. Stehle *et al.* begründen ihre Resultate damit, dass durch die Kopplung von MTX die oberflächliche Ladung von RSA verändert wird. Die sogenannten Scavenger-

Rezeptoren von Kupffer-Sternzellen in der Leber binden das ladungsveränderte MTX-RSA, nehmen es auf und sorgen auf diesem Wege für die Akkumulation in der Leber [69]. Darüber hinaus wird mit großer Wahrscheinlichkeit auch die native Struktur des Albumins verändert, was ebenfalls ein Grund für die Anreicherung in der Leber ist, da das in der Leber ansässige retikuloendotheliale System für die Aufnahme von strukturverändertem Albumin verantwortlich ist. Stehle *et al.* sehen aufgrund ihrer Resultate in der Beladungsrate den entscheidenden Einfluss auf die Strukturveränderungen an Albumin [53,54,69].

Zusätzlich zieht die Erkennung durch das retikuloendotheliale System und die damit einhergehende Aufnahme, in z.B. Leberzellen, eine Verkürzung der Zirkulationszeit von albuminbasierten Zytostatika nach sich. Somit würde sich bei einer hohen Beladungsrate höchstwahrscheinlich die Wirkdauer von albuminbasierten Zytostatika wie FUAc-BSA reduzieren. Trotzdem konnten Chung *et al.* auch nach 36 h noch 5-FU im Blut von Kaninchen nachweisen, nachdem FUAc-HSA appliziert worden war [71]. Die Ergebnisse müssen allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da die Arbeitsgruppe nicht auf die Beladungsraten von HSA eingeht, sodass der Erhalt der nativen Struktur nicht abschließend beurteilbar ist.

Aus den genannten Argumenten folgt, dass es offenbar eine Begrenzung der Beladungsrate von Albumin als limitierender Faktor des Tumor-Targetings gibt, die sich als ein Nachteil von Albumin als Carrier erweist. Gleichzeitig würde aber aus den genannten Begebenheiten die Chance resultieren, ein albumingebundenes Zytostatikum, wie FUAc-BSA, in Abhängigkeit von der Beladungsrate unterschiedlichen Körperorganen bevorzugt zuzuführen. Eine starke BSA-Beladung mit FUAc-Molekülen könnte vermutlich ein Targeting zu Lebertumoren ermöglichen, während eine geringere Beladungsrate für Tumoren anderer Gewebe, wie z.B. das Mammakarzinom, eingesetzt werden könnte.

Darüber hinaus haben Chung *et al.* in Tierexperimenten herausgefunden, dass sich nach der intravenösen Applikation von FUAc-HSA an Kaninchen bereits nach einer Zeit von 30 min 5-FU im Gehirn nachweisen lässt, während bei der Gabe von reinem 5-FU kein Wirkstoff nachgewiesen werden konnte. Daraus wird deutlich, dass FUAc die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, wenn es an das Trägermolekül Albumin gebunden wird [71]. Kremer *et al.* unterstützt diese These einer gesteigerten Zugänglichkeit von albumingebundenen Substanzen mit seiner Arbeit. Er hat 5-aminofluorescein (AFL), einen Farbstoff, in einem molaren Verhältnis von 1:1 an HSA gebunden und zwischen 0,5 – 4 Tage vor einer Operation eines Gehirntumors über einen Zeitraum von 5 – 10 min appliziert. In 84 % der Operationen konnte das Tumorgewebe mittels eines Argon-Lasers, der eine Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm ausgesandt hat, angeregt werden. Folglich

konnte das Tumorgewebe besser erkannt werden. Die Arbeiten von Chung *et al.* und Kremer *et al.* werfen die Frage auf, ob Gehirntumore zukünftig unter anderem mit FUAc-BSA oder FUAc-HSA behandelt werden könnten.

Nichtsdestotrotz sollten Veränderungen der nativen Struktur von Albumin vermieden werden, um das Tumorgewebe als primäres Ziel mittels eines albumingebundenen Wirkstoffes, wie FUAc-BSA, zu erreichen. Je weniger strukturelle Abweichungen aufgrund der Kopplung eines einzelnen FUAc-Moleküls entstehen, desto mehr FUAc-Moleküle können insgesamt gekoppelt werden, ohne dass sich die Struktur des FUAc-BSA vom nativen BSA unterscheidet.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die kovalente Kopplung von FUAc einen Einfluss auf die native Struktur von BSA besitzt und falls ja, ob es in dem gleichen Maße die native Struktur verändert wie andere albuminbasierte Zytostatika, wie MTX beim MTX-RSA oder Paclitaxel beim nab-Paclitaxel oder beim Paclitaxel-HSA. Um einer Antwort auf diese Frage näher zu kommen, werden zunächst die Molekulargewichte der einzelnen Zytostatika betrachtet.

5-FU besitzt ein Molekulargewicht von 130,08 Da [102] und reines FUAc hat aufgrund der Kopplung von Essigsäure ein Molekulargewicht von 188,1 Da (Abschnitt 4.1 und 4.1.2). Im Vergleich dazu verfügt MTX über ein zwei- bis dreifach höheres Molekulargewicht von 454,5 Da [137] und Paclitaxel ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) sogar über eine vier- bis fünffach höhere molekulare Masse von 853,9 Da [64]. Stehle *et al.* empfiehlt eine 1:1-Kopplung von MTX und RSA für MTX-RSA, um die Veränderung der nativen Struktur möglichst gering zu halten. Bereits fünf gebundene MTX-Moleküle führen zu einer starken Veränderung der nativen Struktur [69]. Für Paclitaxel treten bei der Bindung an Albumin aufgrund der verhältnismäßig großen Molekülmasse und der damit einhergehenden Molekülgröße vermutlich noch stärkere Abweichungen auf. Nab-Paclitaxel bindet ca. 8,5 Moleküle Paclitaxel je Albumin-Molekül, unterscheidet sich aber von MTX-RSA, HSA-Paclitaxel und FUAc-BSA dadurch, dass um das Trägerprotein Albumin eine weitere Schicht aus nativen Albumin in Form eines Nanopartikels synthetisiert wurde [46,64].

Aufgrund der geringen molekularen Masse von reinem FUAc im Vergleich zu reinem Paclitaxel oder reinem MTX ist es wahrscheinlich, dass im Vergleich zu anderen albuminbasierten Zytostatika mehr Moleküle FUAc kovalent an BSA gebunden werden können, ohne dass die native Struktur des BSA verändert wird. Die ersten Resultate weiterführender Untersuchungen mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie lassen vermuten, dass die native Struktur von BSA nach der kovalenten Bindung von FUAc nur geringfügig verändert wird (Abbildung 35, siehe Anhang).

Insofern erscheint eine Kopplung eines kleinen Moleküls wie FUAc sinnvoller zu sein, um die native Struktur des BSA beizubehalten.

Insgesamt betrachtet ist die $t_{1/2}$ von Albumin (BSA/HSA) im Plasma nach einer Beladung mit FUAc in Vergleich zu reinem Albumin vermutlich reduziert, da die native Struktur verändert würde und zu einer Erkennung durch das retikuloendotheliale System führte. Trotzdem ist die $t_{1/2}$ mit großer Wahrscheinlichkeit wesentlich länger als die von reinem 5-FU bzw. die von Capecitabin(-metaboliten) mit ca. 50 min – 3 h [36]. Die wesentlich längere Wirkdauer von albumingebundenem FUAc in Kombination mit der Selektivität für Plasmaproteine seitens der Tumorzellen würde vermutlich die Applikationsintervalle für die Patienten wesentlich angenehmer werden lassen und darüber hinaus möglicherweise zu weniger unerwünschten Nebenwirkungen führen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die zytostatische Wirkung von FUAc-BSA wirkt zunächst vielversprechend. Die Brustkrebszellen, insbesondere die mABP-exprimierenden, haben sehr gute Wachstumsinhibitionen gezeigt, die sich annähernd auf einem Level mit 5-FU bewegen. Die Kopplung an Albumin als Carrier verspricht zudem *in vivo* ein Targeting zu den Tumorzellen und eine verlängerte $t_{1/2}$, die möglicherweise mit weniger Nebenwirkungen behaftet wäre als eine Therapie mit Capecitabin oder reinem 5-FU. Die gesteigerte $t_{1/2}$ hätte möglicherweise den Effekt, dass die Tumorzellen aufgrund der längeren Exposition durch das Zytostatikum bessere Ansprechraten zeigen.

In weiteren Experimenten wurde mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie begonnen zu prüfen, wie sich die native Struktur nach der kovalenten Kopplung von FUAc an Albumine ändert. Eine weitere mögliche Methode zur Aufklärung der Proteinkonformation wäre zum Beispiel eine Röntgenstrukturanalyse. In Zusammenhang damit erscheint es möglicherweise sinnvoll, das Syntheseprotokoll an gewissen Stellen zu variieren, um geringere Beladungsverhältnisse von Albumin mit FUAc zu erreichen, was nach Stehle *et al.* als essentiell für *in vivo* Versuche beschrieben wurde. Im nächsten Schritt könnten *in vivo* Experimente erfolgen, um einerseits die Plasma- $t_{1/2}$ exakt zu bestimmen, aber auch die zytostatische Potenz von FUAc-Albumin auf Tumoren im Tiermodell genauer zu evaluieren.

In dieser Arbeit wurde als Modellsubstanz für Albumin-Carrier BSA verwendet. Aufgrund der großen Homologie zum HSA könnte BSA jedoch höchstwahrscheinlich ohne großen Aufwand

durch HSA ersetzt werden, um die Wirkungen und Nebenwirkungen in klinischen Studien zu prüfen.

Des Weiteren könnte die Rolle von mABP für die Aufnahme von albuminbasierten Zytostatika untersucht werden. Bei zukünftigen Experimenten wäre es interessant herauszufinden, wie Zellen reagieren, wenn sie lediglich SPARC und kein mABP exprimieren bzw. welchen Effekt FUAc-BSA bei Tumorzellen erreicht, die sowohl SPARC als auch mABP auf ihrer Oberfläche tragen. Die Mammakarzinom-Linie MCF-7 würde sich als Modell für solche Experimente anbieten. Möglicherweise könnte sich das mABP langfristig als ein Marker für die Reaktion von Tumoren auf albuminbasierte Zytostatika etablieren. Bei Biopsien könnten Pathologen gezielt nach der Expression von mABP suchen und, im Falle einer Anwesenheit von mABP, darauf verweisen, dass eine albuminbasierte Zytostatika-Therapie vermutlich gute Ansprechraten erzielen würde. Ähnliches wird gerade für Expression von SPARC erforscht.

Weiterhin fiel auf, dass zum Teil große Diskrepanzen zwischen MTT-Test und Zellzählung auftraten. Insofern kann die Empfehlung ausgesprochen werden, dass neben einem indirekten, metabolischen Test auf Zellvitalität zusätzlich ein direkter Test gewählt werden sollte. Die Zellzählung eignet sich bestens dafür, stichprobenartig die Ergebnisse des MTT-Tests oder anderer Stoffwechselltests zu überprüfen. In größerem Umfang erscheint die Zellzählung jedoch zu aufwendig. In Zusammenhang mit den Differenzen von Zellzählung und MTT-Test wurde zudem die Hypothese der Spaltung von FUAc in 5-FU und Acetat aufgestellt, die die experimentellen Beobachtungen widerspruchsfrei erklärt. Trotzdem sollten weitere Untersuchungen erfolgen, die den intrazellulären Abbau von FUAc bzw. FUAc-BSA/HSA untersuchen.

In Zeiten, in denen das Gesundheitssystem geprägt ist von Kostendruck und ökonomischer Effizienz, spielen nicht zuletzt die monetären Aspekte eine wichtige Rolle für die Umsetzbarkeit eines Projektes in die Praxis. Dazu lässt sich resümieren, dass die Synthese von FUAc-BSA nicht allzu aufwendig ist, die benötigten Agenzien kostengünstig erstanden werden können und die Herstellung von FUAc-BSA außerdem zuverlässig funktioniert. Natürlich liegt der Kostenaufwand höchstwahrscheinlich höher als bei einer Applikation von reinem 5-FU, zumal für die Applikation bei Menschen vermutlich auf HSA als Carrier gewechselt werden müsste. Die Frage, ob die Mehrkosten für die Modifikationen an 5-FU gerechtfertigt sind und in der Gegenüberstellung zum Wohlergehen des Patienten bewertet werden sollten, berührt ethische Diskussionspunkte, die in dieser Arbeit nicht behandelt werden können.

Möglicherweise würden die Patienten jedoch weniger Nebenwirkungen unterliegen und der Gebrauch von zusätzlichen Medikamenten könnte gesenkt werden, was die Ausgaben an anderer Stelle wiederum senken würde. Insofern sind vermutlich mehrere Jahre weiterer Forschung notwendig bis FUAc-BSA/HSA in der klinisch-praktischen Tätigkeit der Ärzte Einzug hält. In Anbetracht der ermittelten Daten dieser Arbeit erscheint es jedoch hochgradig sinnvoll, die Forschung mit albumingebundenem FUAc voranzutreiben.

5 Zusammenfassung

Einleitung: 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Zytostatikum, das in der Klinik z.B. für die Therapie des Mamma- bzw. des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Die Nebenwirkungen, die es bei Patienten verursacht (z.B. Hand-Fuß-Syndrom, etc.), und lange Applikationszeiten, die aufgrund einer kurzen Plasma- $t_{1/2}$ notwendig sind, bedeuten allerdings erhebliche Nachteile. Die genannten Schwächen der Therapie mit 5-FU könnten vermutlich mit Hilfe eines passenden Carriers behoben werden. Albumin bietet sich als Transportmolekül an, weil es über eine lange Plasma- $t_{1/2}$ von ungefähr 19 Tagen verfügt und darüber hinaus gezeigt wurde, dass Tumorzellen Albumin endozytieren und im Intrazellulärraum durch lysosomale Enzyme abbauen.

Methodik: Zunächst wurde 5-FU modifiziert, indem am N¹-Atom des Uracil-Ringes eine Methyl-Carboxyl-Gruppe gebunden wurde. Das Reaktionsprodukt (FUAc) wurde im nächsten Schritt mit Hilfe der Carbodiimid-Methode kovalent an die Modellsubstanz BSA gekoppelt, so dass FUAc-BSA entstand. Der Syntheserfolg wurde mittels ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie sowie MALDI-ToF untersucht. MTT-Tests, Zellzählungstests und CLSM-Studien wurden mit Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D durchgeführt, um das zytostatische Potential und die zelluläre Aufnahme von FUAc-BSA einzuschätzen.

Ergebnisse: Die molare Masse von FUAc-BSA (68.508 Da) war im Vergleich zu BSA (66.306 Da) um ca. 2.200 Da gesteigert, was einer Kopplung von durchschnittlich 12 Molekülen FUAc je BSA-Molekül entspricht. Sowohl die Resultate des MTT-Tests als auch des Zellzählungstests lassen erkennen, dass die Proliferationshemmung bei mABP-exprimierenden Zellen (T-47D) durch FUAc-BSA der durch 5-FU ähnelt. Für Zellen der Linie MDA-MB-231 (keine mABP-Expression) ist ein schwächerer zytostatischer Einfluss feststellbar. Die Resultate deuten an, dass mABP eine wichtige Rolle für die Wirkung albuminbasierter Zytostatika spielen könnte. Für FUAc war im MTT-Test bei beiden Zelllinien eine Überbestimmung der Zellvitalität gegenüber dem Zellzählungstest feststellbar. Diese Beobachtung kann unter der Annahme einer intrazellulären Spaltung von FUAc in 5-FU und Acetat, mit der anschließenden Aktivierung des Citratzyklus, begründet werden.

Schlussfolgerung: FUAc-BSA würde im klinischen Einsatz voraussichtlich gewisse Vorteile gegenüber 5-FU aufweisen, wie eine längere Plasma- $t_{1/2}$ und eine spezifische Aufnahme durch Tumorzellen bei vergleichbarer Wirksamkeit. Eine Untersuchung auf die Expression von mABP könnte ausschlaggebend für eine wirksame Behandlung mit albuminbasierten Zytostatika sein.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Mukherjee S., 2012, *Der König aller Krankheiten*, DuMont Buchverlag, Köln.
- [2] Bleif M., 2013, *Krebs*, Klett-Cotta, Stuttgart.
- [3] Hanahan D., and Weinberg R. A., 2000, “The hallmarks of cancer”, *Cell*, **100**(1), pp. 57–70.
- [4] Sporn M. B., 1996, “The war on cancer”, *Lancet*, **347**(9012), pp. 1377–1381.
- [5] Hanahan D., and Weinberg R. A., 2011, “Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell*, **144**(5), pp. 646–674.
- [6] World Health Organization, 2013, “Cancer Fact sheet N°297” [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. [Accessed: 14-Feb-2013].
- [7] American Cancer Society, 2013, “Cancer Facts & Figures 2013,” pp. 1–64 [Online]. Available: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>. [Accessed: 15-Sep-2013].
- [8] Centers for Disease Control and Prevention, 2010, “Deaths and Mortality” [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>. [Accessed: 13-Apr-2013].
- [9] Statistisches Bundesamt, 2011, “Todesursachen” [Online]. Available: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle/GestorbeneAnzahl.html>. [Accessed: 14-Feb-2013].
- [10] Aktories K., Förstermann U., Hofmann F. B., Starke K., Allgaier C., Barth H., Bechthold A., Biel M., Bönisch H., Brigelius-Flohé R., Dekant W., Diener H.-C., Dilger K., Eichelbaum M., Engelhard K., Eschenhagen T., Feuerstein T., Flockerzi V., Göthert M., Gröbner W., Gudermann T., Hofbauer K. G., Hoffmeister D., Hohlfeld T., Höllt V., Just I., Kaina B., Keller C., Kilbinger H., Kleinert H., Lode H., Maier W., Mebs D., Möhler H., Oetjen E., Panten U., Rustenbeck I., Schild H., Schlicker E., Schrör K., Schubert R., Schwab M., Sonntag H.-G., Speck U., Stahlmann R., Steinfeldt H. J., Turnheim K., Unger C., Vamvakas S., Walter-Sack I., Weber A.-A., Werner C., Wolfram S., and Wollenberg P., 2009, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.
- [11] Karow T., and Lang-Roth R., 2011, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Thomas Karow, Köln.
- [12] Herdegen T., Böhm R., Cimin-Bredée N., Culman J., Gohlke P., Ley L., Luippold G., Ufer M., and Wätzig V., 2008, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [13] Bayerl C., Bramlage P., Busch E., Diener H.-C., Dippel E., Ebert U., Frölich J. C., Gendolla A., Gerwig M., Göke M. N., Goerdt S., Hadem J., Hufnagel A., Jonas J. B.,

- Kälsch A.-I., Kastrup O., Keilholz U., Kellner H., Kirch W., Knauf W., Krappweis J., Lenk M., Lode H., Manns M. P., Meier P. N., Möller H.-J., Morgenstern I., Müller N., Müller-Wieland D., Ockenga J., Paulus W. E., Philipp A., Potthoff A., Riedel M., Rzyany B., Schadendorf D., Schrezenmeier H., Schwarz U. I., Stahlmann R., Thiel E., van der Woude F. J., Wagner S., Wedemeyer H., Wehling M., and Zouboulis C. C., 2005, *Klinische Pharmakologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [14] Göppert S., 2012, “Erythrozyten als Drug-Carrier für eine Krebstherapie – in vitro Untersuchungen am Kolonkarzinom-Modell”, Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- [15] Longley D. B., Harkin D. P., and Johnston P. G., 2003, “5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies”, *Nat Rev Cancer*, **3**(5), pp. 330–338.
- [16] Heidelberger C., Chaudhuri N. K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Schnitzer R. J., Plevin E., and Scheiner J., 1957, “Fluorinated Pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds”, *Nature*, **179**(4561), pp. 663–666.
- [17] Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG), 2012, “Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials”, *Lancet*, **379**(9814), pp. 432–444.
- [18] Elsadek B., and Kratz F., 2012, “Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon”, *J Control Release*, **157**(1), pp. 4–28.
- [19] Schmiegel W., Pox C., Reinacher-Schick A., Adler G., Arnold D., Fleig W., Fölsch U. R., Frühmorgen P., Graeven U., Heinemann V., Hohenberger W., Holstege A., Junginger T., Kopp I., Köhlbacher T., Porschen R., Propping P., Riemann J.-F., Rödel C., Sauer R., Sauerbruch T., Schmitt W., Schmoll H.-J., Seufferlein T., Zeitz M., and Selbmann H.-K., 2010, “S3-guidelines for colorectal carcinoma”, *Z Gastroenterol*, **48**(1), pp. 65–136.
- [20] Adler G., Seufferlein T., Bischoff S., Brambs H.-J., Feuerbach S., Grabenbauer G., Hahn S., Heinemann V., Hohenberger W., Langrehr J., Lutz M., Mücke O., Neuhaus H., Neuhaus P., Oettle H., Schlag P., Schmid R., Schmiegel W., Schlottmann K., Werner J., Wiedenmann B., and Kopp I., 2008, “S3-Guideline ‘Exocrine Pancreatic Carcinoma’ 2007”, *Z Gastroenterol*, **46**(5), pp. 449–482.
- [21] Wohlhueter R. M., McIvor R. S., and Plagemann P. G., 1980, “Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells”, *J Cell Physiol*, **104**(3), pp. 309–19.
- [22] Yoshioka A., Tanaka S., Hiraoka O., Koyama Y., Hirota Y., Ayusawa D., Seno T., Garrett C., and Wataya Y., 1987, “Deoxyribonucleoside Triphosphate Imbalance”, *J Biol Chem*, **262**(17), pp. 8235–8241.
- [23] Glazer R. I., and Lloyd L. S., 1982, “Association of Cell Lethality with Incorporation of 5-Fluorouracil into Nuclear RNA in Human Colon Carcinoma Cells in Culture”, *Mol Pharmacol*, **21**(2), pp. 468–473.
- [24] Kufe D. W., and Major P. P., 1981, “5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity”, *J Biol Chem*, **256**(19), pp. 9802–5.

- [25] Aurnhammer P., Balogh A., Benecke R., Bigalke H., Böger R., Brune K., Dhein S., Dominiak P., Drewelow B., Erdmann E., Eschenhagen T., Fink H., Förstermann U., Foth H., Fricke U., Fromm M. F., Gathof B. S., Glossmann H., Gramatzki M., Greinacher A., Greven J., Gross P., Gudermann T., Gundert-Remy U., Haefeli W. E., Haen E., Heidbreder M., Hellweg R., Hindricks G., Hinz B., Hofmann H., Hohlfeld T., Joost H.-G., Kelm M., Klotz U., Kolloch R., Kramer H. J., Kretzschmar M., Kreutz R., Kroemer H., Legat F. J., Lemmer B., Manger B., Mardin C. Y., Martens F., May K., Moser A., Nauck M., Ortmann O., Oßwald H., Racké K., Ravens U., Reisinger E. C., Resch K., Risler T., Ritter C., Salameh A., Schilling T., Schömig E., Schrör K., Schwab M., Schwörer H., Seyberth H. W., Siegmund W., Sittl R., Stahlmann R., Striessnig J., Suttorp N., Sydow K., Szamel M., Taubert D., Weber A.-A., Wettengel R., Wieland T., and Zeilhofer H. U., 2010, *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- [26] Douillard J. Y., Cunningham D., Roth a D., Navarro M., James R. D., Karasek P., Jandik P., Iveson T., Carmichael J., Alakl M., Gruia G., Awad L., and Rougier P., 2000, “Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial”, *Lancet*, **355**(9209), pp. 1041–7.
- [27] Giacchetti S., Perpoint B., Zidani R., Le Bail N., Faggiuolo R., Focan C., Chollet P., Llory J. F., Letoumeau Y., Coudert B., Bertheaut-Cvitkovic F., Larregain-Fournier D., Le Rol A., Walter S., Adam R., Misset J. L., and Lévi F., 2000, “Phase III Multicenter Randomized Trial of Oxaliplatin Added to Chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer”, *J Clin Oncol*, **18**(1), pp. 136–147.
- [28] Weber T., and Link K. H., 2011, “Kolonkarzinom: Aktueller Stand der multimodalen Therapie”, *Zbl Chir*, **136**(4), pp. 325–333.
- [29] Joensuu H., and Gligorov J., 2012, “Adjuvant treatments for triple-negative breast cancer,”, *Ann Oncol*, **23**(Supplement 6), pp. vi40–vi45.
- [30] Amstutz U., Froehlich T. K., and Largiadèr C. R., 2011, “Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity”, *Pharmacogenomics*, **12**(9), pp. 1321–36.
- [31] Heggie G. D., Sommadossi J., Cross D. S., Huster W. J., and Diasio R. B., 1987, “Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile”, *Cancer Res*, **47**(8), pp. 2203–2206.
- [32] Köhne C.-H., Bedenne L., Carrato A., Bouché O., Popov I., Gaspà L., Valladares M., Rougier P., Gog C., Reichardt P., Wils J., Pignatti F., and Biertz F., 2013, “A randomised phase III intergroup trial comparing high-dose infusional 5-fluorouracil with or without folinic acid with standard bolus 5-fluorouracil/folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: The Pan-European Trial in Adjuvant Colo”, *Eur J Cancer*, **49**(8), pp. 1868–1875.
- [33] Thomas A. M., Kapanen A. I., Hare J. I., Ramsay E., Edwards K., Karlsson G., and Bally M. B., 2011, “Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-fluorouracil for parenteral administration: formulation design, pharmacokinetics and efficacy”, *J Control Release*, **150**(2), pp. 212–9.

-
- [34] Sorrentino M. F., Kim J., Foderaro A. E., and Truesdell A. G., 2012, “5-fluorouracil induced cardiotoxicity: Review of the literature”, *Cardiol J*, **19**(5), pp. 453–458.
- [35] Álvarez P., Marchal J. A., Boulaiz H., Carrillo E., Vélez C., Rodríguez-Serrano F., Melguizo C., Prados J., Madeddu R., and Aranega A., 2012, “5-Fluorouracil derivatives: a patent review”, *Expert Opin Ther Pat*, **22**(2), pp. 107–123.
- [36] Pronk L. C., Vasey P., Sparreboom A., Reigner B., Planting Ast., Gordon R. J., Osterwalder B., Verweij J., and Twelves C., 2000, “A phase I and pharmacokinetic study of the combination of capecitabine and docetaxel in patients with advanced solid tumours”, *Brit J Cancer*, **83**(1), pp. 22–29.
- [37] Petrelli F., Cabiddu M., and Barni S., 2012, “5-Fluorouracil or capecitabine in the treatment of advanced colorectal cancer: a pooled-analysis of randomized trials”, *Med Oncol*, **29**(2), pp. 1020–1029.
- [38] Copur S., Aiba K., Drake J. C., Allegra C. J., and Chu E., 1995, “Thymidilate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil”, *Biochem Pharmacol*, **49**(10), pp. 1419–1426.
- [39] Bunz F., Hwang P. M., Torrance C., Waldman T., Zhang Y., Dillehay L., Williams J., Lengauer C., Kinzler K. W., and Vogelstein B., 1999, “Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents”, *J Clin Invest*, **104**(3), pp. 263–269.
- [40] Karaayvaz M., Zhai H., and Ju J., 2013, “miR-129 promotes apoptosis and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer”, *Cell Death Dis*, **4**(6), pp. 1–9.
- [41] Bae Y. H., and Park K., 2011, “Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility”, *J Control Release*, **153**(3), pp. 198–205.
- [42] Kwon I. K., Lee S. C., Han B., and Park K., 2012, “Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors”, *J Control Release*, **164**(2), pp. 108–114.
- [43] Lammers T., Kiessling F., Hennink W. E., and Storm G., 2011, “Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress”, *J Control Release*, **161**(2), pp. 175–187.
- [44] Kratz F., 2008, “Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles”, *J Control Release*, **132**(3), pp. 171–83.
- [45] Pierige F., Serafini S., Rossi L., and Magnani M., 2008, “Cell-based drug delivery”, *Adv Drug Deliv. Rev*, **60**(2), pp. 286–295.
- [46] Kratz F., and Elsadek B., 2012, “Clinical impact of serum proteins on drug delivery”, *J Control Release*, **161**(2), pp. 429–45.
- [47] Sternberg N., Georgieva R., Duft K., and Bäuml H., 2012, “Surface-modified loaded human red blood cells for targeting and delivery of drugs.”, *J Microencapsul*, **29**(1), pp. 9–20.
- [48] Maeda H., 2010, “Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects”, *Bioconjugate Chem*, **21**(47), pp. 797–802.

- [49] Fang J., Nakamura H., and Maeda H., 2011, “The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect”, *Adv Drug Deliv. Rev.*, **63**(3), pp. 136–151.
- [50] Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., and Hori K., 2000, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review”, *J Control Release*, **65**(1-2), pp. 271–284.
- [51] Dreher M. R., Liu W., Michelich C. R., Dewhirst M. W., Yuan F., and Chilkoti A., 2006, “Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers”, *J Natl Cancer I*, **98**(5), pp. 335–344.
- [52] Popovic Z., Liu W., Chauhan V. P., Lee J., Wong C., Greytak A. B., Insin N., Nocera D. G., Fukumura D., Jain R. K., and Bawendi M. G., 2010, “A Nanoparticle Size Series for In Vivo Fluorescence Imaging”, *Angew Chem Int Ed Engl*, **49**(46), pp. 8649–8652.
- [53] Neumann E., Frei E., Funk D., Becker M. D., Schrenk H.-H., Müller-Ladner U., and Fiehn C., 2010, “Native albumin for targeted drug delivery”, *Expert Opin Drug Deliv*, **7**(8), pp. 915–25.
- [54] Frei E., 2011, “Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells”, *Diabetol Metab Syndr*, **3**(11), pp. 1–4.
- [55] Westphal M., James M. F. M., Kozek-Langenecker S., Stocker R., Guidet B., and van Aken H., 2009, “Hydroxyethyl Starches: Different Products - Different Effects”, *Anesthesiology*, **111**(1), pp. 187–202.
- [56] Bhattacharya A. A., Curry S., and Franks N. P., 2000, “Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin: High resolution crystal structures”, *J Biol Chem*, **275**(49), pp. 38731–38738.
- [57] Mazzaferro E. M., Rudloff E., and Kirby R., 2002, “The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient”, *J Vet Emerg Crit Care*, **12**(2), pp. 113–124.
- [58] Hirayama K., Akashi S., Furuya M., and Fukuhara K., 1990, “Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS”, *Biochem Biophys Res Commun*, **173**(2), pp. 639–646.
- [59] Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., and Kobayashi K., 1999, “Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution”, *Protein Eng*, **12**(6), pp. 439–46.
- [60] Huang B. X., Kim H.-Y., and Dass C., 2004, “Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass spectrometry”, *J Am Soc Mass Spectrom*, **15**(8), pp. 1237–47.
- [61] Stehle G., Wunder A., Schrenk, Hans Herrmann Hartung G., Heene D. L., and Sinn H., 1999, “Albumin-based drug carriers: comparison between serum albumins of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate”, *Anticancer Drugs*, **10**(8), pp. 785–90.
- [62] Stehle G., Sinn H., Wunder A., Schrenk H. H., Stewart J. C. M., Hartung G., Maier-Borst W., and Heene D. L., 1997, “Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself—

- implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia”, *Crit Rev Oncol Hematol*, **26**(2), pp. 77–100.
- [63] Rassow J., Hauser K., Netzker R., and Deutzmann R., 2008, *Duale Reihe - Biochemie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [64] Petrelli F., Borgonovo K., and Barni S., 2010, “Targeted delivery for breast cancer therapy: the history of paclitaxel”, *Expert Opin Pharmacother*, **11**(8), pp. 1413–1432.
- [65] Desai N. P., Trieu V., Hwang L. Y., Wu R., Soon-Shiong P., and Gradishar W. J., 2008, “Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status”, *Anticancer Drugs*, **19**(9), pp. 899–909.
- [66] Vis A. N., van der Gaast A., van Rhijn B. W. G., Catsburg T. K., Schmidt C., and Mickisch G. H. J., 2002, “A phase II trial of methotrexate-human serum albumin (MTX-HSA) in patients with metastatic renal cell carcinoma who progressed under immunotherapy”, *Cancer Chemother Pharmacol*, **49**(4), pp. 342–345.
- [67] Burger A. M., Hartung G., Stehle G., Sinn H., and Fiebig H. H., 2001, “Pre-clinical evaluation of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts in vivo”, *Int J Cancer*, **92**(5), pp. 718–24.
- [68] Bolling C., Graefe T., Lübbling C., Jankevicius F., Uktveris S., Cesas A., Meyer-Moldenhauer W.-H., Starkmann H., Weigel M., Burk K., and Hanauske A.-R., 2006, “Phase II study of MTX-HSA in combination with Cisplatin as first line treatment in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma”, *Invest New Drugs*, **24**(6), pp. 521–527.
- [69] Stehle G., Sinn H., Wunder A., Schrenk H. H., Schütt S., Maier-Borst W., and Heene D. L., 1997, “The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats”, *Anticancer Drugs*, **8**(7), pp. 677–685.
- [70] Kim C.-K., Lee M. G., Park M. K., Lee H., and Kang H. J., 1989, “In vitro Drug Release Characteristics of Methotrexate-Human Serum Albumin and 5-Fluorouracil-Acetic Acid-Human Serum Albumin Conjugates”, *Arch Pharm Res*, **12**(3), pp. 186–190.
- [71] Chung S. M., Yoon E. J., Kim S. H., Lee M. G., Lee H., Park M. K., and Kim C.-K., 1991, “Pharmacokinetics of 5-fluorouracil after intravenous infusion of 5-fluorouracil-acetic acid-human serum albumin conjugates to rabbits”, *Int J Pharm*, **68**(1-3), pp. 61–68.
- [72] Lindl T., and Gstraunthaler G., 2008, *Zell- und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [73] Cailleau R., Young R., Olivé M., and Reeves Jr. W. J., 1974, “Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions”, *J Natl Cancer Inst*, **53**(3), pp. 661–74.
- [74] Powell C. E., Soto A. M., Michaelson C. L., Diba F., Mounier F., Verroust P. J., and Sonnenschein C., 2003, “Characterization of a plasma membrane-resident albumin-binding protein associated with the proliferation of estrogen-target, serum-sensitive cells”, *Steroids*, **68**(6), pp. 487–496.

- [75] American Type Culture Collection (ATCC®), 2012, “MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)” [Online]. Available: <https://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-26&Template=cellBiology>. [Accessed: 24-Jul-2012].
- [76] Keydar I., Chen L., Karby S., Weiss F. R., Delarea J., Radu M., Chaitcik S., and Brenner H. J., 1979, “Establishment and Characterization of a Cell Line of Human Breast Carcinoma Origin”, *Eur J Cancer*, **15**(5), pp. 659–70.
- [77] American Type Culture Collection (ATCC®), 2012, “T-47D (ATCC® HTB-133™)” [Online]. Available: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-133&Template=cellBiology#aProp2c0ac>. [Accessed: 21-Jul-2012].
- [78] Bujacz A., 2012, “Crystal Structure of Bovine Serum Albumin” [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S>. [Accessed: 25-Sep-2013].
- [79] Tada M., 1975, “Antineoplastic Agents. The Preparation of 5-Fluorouracil-1-acetic Acid Derivatives”, *Bull Chem Soc Jpn*, **48**(11), pp. 3427–3428.
- [80] Staros J. V., Wright R. W., and Swingle D. M., 1986, “Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions”, *Anal Biochem*, **156**(1), pp. 220–222.
- [81] Wong S. S., and Wongt L.-J. C., 1992, “Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes”, *Enzym. Microb Technol*, **14**(11), pp. 866–874.
- [82] Grabarek Z., and Gergely J., 1990, “Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters”, *Anal Biochem*, **185**(1), pp. 131–135.
- [83] Thermo Fisher Scientific Inc., 2012, “NHS and Sulfo-NHS” [Online]. Available: <http://www.piercenet.com/instructions/2160650.pdf>. [Accessed: 27-Sep-2012].
- [84] Mosmann T., 1983, “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays”, *J Immunol Methods*, **65**(1-2), pp. 55–63.
- [85] Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., and Boyd M. R., 1988, “Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines”, *Cancer Res*, **48**(17), pp. 4827–4833.
- [86] Berridge M. V., and Tan A. S., 1993, “Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction”, *Arch Biochem Biophys*, **303**(2), pp. 474–482.
- [87] Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D., and Mitchell J. B., 1987, “Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing”, *Cancer Res*, **47**(4), pp. 936–942.

- [88] User: Alcibiades, 2006, "Neubauer improved schema" [Online]. Available: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neubauer_improved_schema.gif. [Accessed: 27-Jul-2012].
- [89] Carl Roth GmbH & Co. KG, 2013, "Zählkammern Neubauer improved" [Online]. Available: <http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do;jsessionid=2E659CBECDC8E1B4AC93785AB223D18E?favOid=0000000000014b2c00030023&act=showBookmark&lang=de-de&market=DE>. [Accessed: 21-Sep-2013].
- [90] Hoche D., Dr. Küblbeck J., Prof. Dr. habil. Meyer L., Dr. Reichwald R., Dr. Schmidt G.-D., and Dr. Schwarz O., 2003, Duden Basiswissen Schule. Physik Abitur, Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG und DUDEN PAETEC GmbH, Berlin & Mannheim.
- [91] Fishedick A., Dr. Grubert L., Dr. Hartmann A., Dr. Hennig H., Dr. Kaiser B., Dr. Kauschka G., Prof. Dr. Kemnitz E., Dr. Klawitter E., Lilienthal U., Prof. Dr. Link A., Dr. Mederow G., Prof. Dr. Müller S., Dr. Riederer C., Dr. Riederer U., Dr. Scheurell S., Dr. Schönherr M., Dr. Simon R., and Dr. Vogt H., 2007, Duden Basiswissen Schule. Chemie Abitur, Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG und DUDEN PAETEC GmbH, Berlin & Mannheim.
- [92] Hart H., Craine L. E., Hart D. J., and Hadad C. M., 2007, Organische Chemie, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [93] Dörner K., Deufel T., Dörner R., Haschke-Becher E., Heppner H. J., Kiehntopf M., Klingmüller D., Löffler H., Lütjohann D., Madlener K., Pötzsch B., and Sommer R., 2009, Klinische Chemie und Hämatologie, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [94] Jurinke C., Oeth P., and van den Boom D., 2004, "MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis", *Mol Biotechnol*, **26**(2), pp. 147–163.
- [95] Wieser A., Schneider L., Jung J., and Schubert S., 2012, "MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics — identification of microorganisms and beyond (mini review)", *Appl Microbiol Biotechnol*, **93**(3), pp. 965–974.
- [96] Carl Zeiss AG Deutschland, 2012, Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Carl Zeiss AG Deutschland, Jena.
- [97] Wilhelm S., 2012, Confocal Laser Scanning Microscopy, Carl Zeiss AG Deutschland, Jena.
- [98] Carl Zeiss AG Deutschland, 2006, LSM 510 META - Bedienungsanleitung, Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy, Jena.
- [99] GraphPad Software Inc., 2013, "GraphPad Software" [Online]. Available: www.graphpad.com. [Accessed: 12-Aug-2013].
- [100] Graefe K. H., Lutz W., and Bönisch H., 2011, Duale Reihe - Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.

- [101] Sigma Aldrich, 2013, "Albumin from bovine serum" [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2153pis.Par.0001.File.tmp/a2153pis.pdf. [Accessed: 03-May-2013].
- [102] Wong H. L., Bendayan R., Rauth A. M., Li Y., and Wu X. Y., 2007, "Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles ☆", *Adv Drug Deliv Rev*, **59**(6), pp. 491–504.
- [103] Kim K. S., Lim D. S., and Cho S. H., 1996, "Synthesis of Polymeric Drugs Containing D-Glucosamine as a Spacer", *Korea Polym J*, **4**(1), pp. 16–22.
- [104] Cho Y.-T., Chen C.-W., Chen M.-P., Hu J.-L., Su H., Shiea J., Wu W.-J., and Wu D.-C., 2013, "Diagnosis of albuminuria by tryptic digestion and matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry", *Clin Chim Acta*, **420**, pp. 76–81.
- [105] Militello V., Casarino C., Emanuele A., Giostra A., Pullara F., and Leone M., 2004, "Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering", *Biophys Chem*, **107**(2), pp. 175–187.
- [106] Sigma-Aldrich, 2013, "Albumin from bovine serum dimer mol wt ~132 kDa" [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a8654?lang=de®ion=DE>. [Accessed: 16-Sep-2013].
- [107] Wang Y., He C.-H., Zheng H., and Zhang H.-B., 2012, "Characterization and Comparison of Fumonisin B1-Protein Conjugates by Six Methods", *Int J Mol Sci*, **13**(1), pp. 84–96.
- [108] Harlow E., and Lane D. P., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [109] Dosio F., Brusa P., Crosasso P., Arpicco S., and Cattel L., 1997, "Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel – albumin conjugate", *J Control Release*, **47**(3), pp. 293–304.
- [110] Bischoff J., Denkert C., Desai N., Harbeck N., Kunzmann V., Linder M., Loibl S., Prinzler J., and Thomssen C., 2013, *Nanotechnologie beim Mammakarzinom - Grundlagen und aktuelle Perspektiven*, UNI-MED Verlag AG, Bremen.
- [111] Liu W., Li X., Wong Y.-S., Zheng W., Zhang Y., Cao W., and Chen T., 2012, "Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5-Fluorouracil to Achieve Anticancer Synergism", *ACS Nano*, **6**(8), pp. 6578–6591.
- [112] Wang G.-P., Guan Y.-S., Jin X.-R., Jiang S.-S., Lu Z.-J., Wu Y., Li Y., Li M., and Luo F., 2010, "Development of novel 5-fluorouracil carrier erythrocyte with pharmacokinetics and potent antitumor activity in mice bearing malignant ascites", *J Gastroenterol Hepatol*, **25**(5), pp. 985–990.
- [113] Luo Q., Wang P., Miao Y., He H., and Tang X., 2012, "A novel 5-fluorouracil prodrug using hydroxyethyl starch as a macromolecular carrier for sustained release", *Carbohydr Polym*, **87**(4), pp. 2642–2647.

- [114] Hao A. J., Deng Y. J., Li T. F., Suo X. B., Cao Y. H., Hao Y. L., and Zhang Y., 2006, "Degradation Kinetics of Fluorouracil-Acetic-Acid-Dextran Conjugate in Aqueous Solution", *Drug Dev Ind Pharm*, **32**(6), pp. 757–763.
- [115] Kozek-Langenecker S. A., 2005, "Effects of Hydroxyethyl Starch Solutions on Hemostasis", *Anesthesiology*, **103**(3), pp. 654–660.
- [116] García M. A., Carrasco E., Aguilera M., Alvarez P., Rivas C., Campos J. M., Prados J. C., Calleja M. A., Esteban M., Marchal J. A., and Aránega A., 2011, "The Chemotherapeutic Drug 5-Fluorouracil Promotes PKR-Mediated Apoptosis in a p53-Independent Manner in Colon and Breast Cancer Cells", *PLoS One*, **6**(8), p. e23887.
- [117] Scriven P., Coulson S., Haines R., Balasubramanian S., Cross S., and Wyld L., 2009, "Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer", *Br J Cancer*, **101**(10), pp. 1692–1698.
- [118] Liu W., Zhou J., Bendsdorf K., Zhang H., Liu H., Wang Y., Qian H., Zhang Y., Wellner A., Rubner G., Huang W., Guo C., and Gust R., 2011, "Investigations on cytotoxicity and anti-inflammatory potency of licofelone derivatives", *Eur J Med Chem*, **46**(3), pp. 907–913.
- [119] Carli D., Honorat M., Cohen S., Megherbi M., Vignal B., Dumontet C., Payen L., and Guittou J., 2009, "Simultaneous quantification of 5-FU, 5-FUrd, 5-FdUrd, 5-FdUMP, dUMP and TMP in cultured cell models by LC-MS/MS", *J Chromatogr B*, **877**(27), pp. 2937–2944.
- [120] Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P., 2005, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [121] Sun Z.-J., Sun B., Sun C.-W., Wang L.-B., Xie X., Ma W.-C., Lu X.-L., and Dong D.-L., 2012, "A poly(glycerol-sebacate-(5-fluorouracil-1-acetic acid)) polymer with potential use for cancer therapy", *J Bioact Compat Polym*, **27**(1), pp. 18–30.
- [122] Qu J. Q., Huang J., Wang L. F., and Sun G. C., 2001, "Synthesis, Characterization, and Antitumour Activity of Palladium(II) Complex of 5-Fluorouracil-1-acetic Acid and Ammine", *Chem Pap - Chem Zvesti*, **55**(5), pp. 319–322.
- [123] Soto A. M., and Sonnenschein C., 1984, "Mechanism of Estrogen Action On Cellular Proliferation: Evidence For Indirect And Negative Control On Cloned Breast Tumor Cells", *Biochem Biophys Res Commun*, **122**(3), pp. 1097 – 1103.
- [124] Dhanesuan N., Sharp J. A., Blick T., Price J. T., and Thompson E. W., 2002, "Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition", *Breast Cancer Res Treat*, **75**(1), pp. 73–85.
- [125] Sigma Aldrich, 2013, "Certificate of Analysis: Albumin, Bovine-Fluorescein" [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/COFA/A9/A9771/A971-250MG_____080M7400__.pdf. [Accessed: 22-May-2013].

-
- [126] Cortes J., and Saura C., 2010, “Nanoparticle albumin-bound (nabTM)-paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer”, *Eur J Cancer Suppl.*, **8**(1), pp. 1–10.
- [127] Costello E., Greenhalf W., and Neoptolemos J. P., 2012, “New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment”, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **9**(8), pp. 435–444.
- [128] Funk D., Schrenk H.-H., and Frei E., 2007, “Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay”, *Biotechniques*, **43**(2), pp. 178–186.
- [129] Huang K. T., Chen Y. H., and Walker A. M., 2004, “Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids”, *Biotechniques*, **37**(3), pp. 406–412.
- [130] Jabbar S. A. B., Twentyman P. R., and Watson J. V., 1989, “The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons”, *Br J Cancer*, **60**(4), pp. 523–528.
- [131] Starai V. J., Celic I., Cole R. N., Boeke J. D., and Escalante-Semerena J. C., 2002, “Sir2-Dependent Activation of Acetyl-CoA Synthetase by Deacetylation of Active Lysine”, *Science*, **298**(5602), pp. 2390–2392.
- [132] Thauer R. K., 1988, “Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria”, *Eur J Biochem*, **176**(3), pp. 497–508.
- [133] Luong A., Hannah V. C., Brown M. S., and Goldstein J. L., 2000, “Molecular Characterization of Human Acetyl-CoA Synthetase, an Enzyme Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Proteins”, *J Biol Chem*, **275**(34), pp. 26458–26466.
- [134] Liu Y., 2006, “Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer”, *Prostate Cancer Prostatic Dis*, **9**(3), pp. 230–234.
- [135] Behrends J. C., Bischofberger J., Deutzmann R., Ehmke H., Frings S., Grissmer S., Hoth M., Kurtz A., Leipziger J., Müller F., Pedain C., Rettig J., Wagner C., and Wischmeyer E., 2012, *Duale Reihe - Physiologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [136] Judson I. R., Beale P. J., Trigo J. M., Aherne W., Crompton T., Jones D., Bush E., and Reigner B., 1999, “A human capecitabine excretion balance and pharmacokinetic study after administration of a single oral dose of 14C-labelled drug”, *Invest New Drugs*, **17**(1), pp. 49–56.
- [137] Alvarez-Figueroa M. J., and Blanco-Méndez J., 2001, “Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions”, *Int J Pharm*, **215**(1-2), pp. 57–65.

7 Anhang

7.1 ^{19}F -NMR-Spektroskopie von FUAc

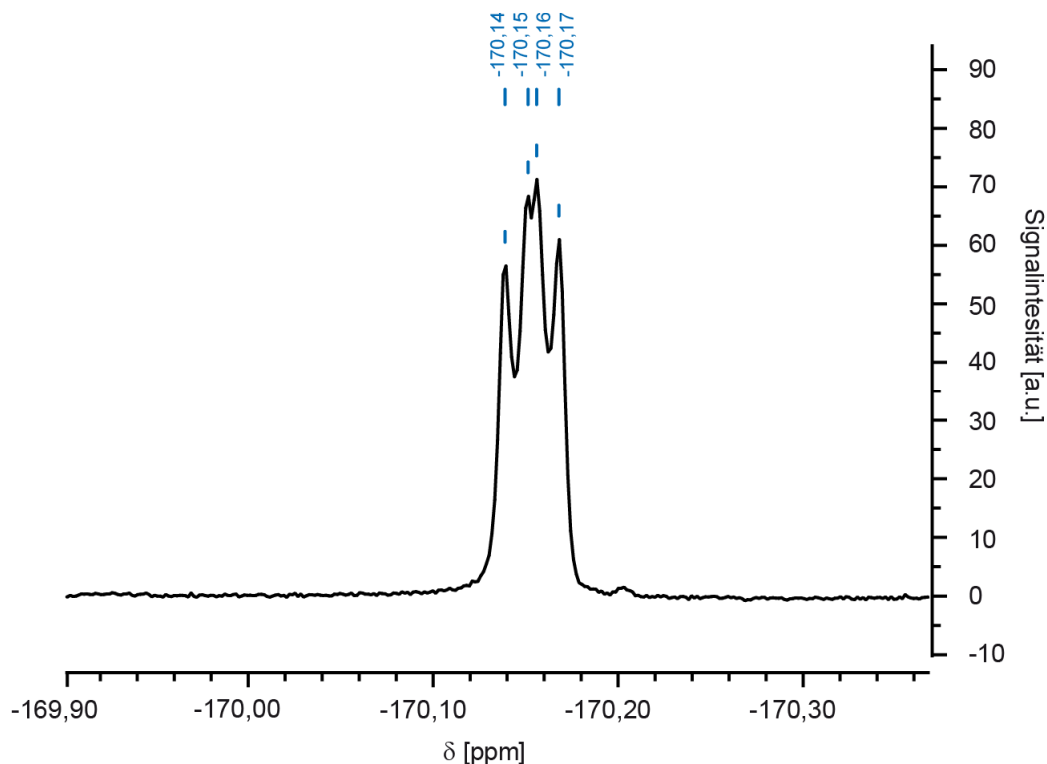


Abbildung 34: ^{19}F -NMR-Spektrum von FUAc in $\text{DMSO-}d_6$. Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung δ [ppm] aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Signalintensität [a.u.] abgebildet. Die blauen Zahlen am oberen Rand der Abbildung geben den Wert für die chemische Verschiebung δ [ppm] wieder.

Die Abbildung zeigt ein einzelnes zusammenhängendes Signal mit einer chemischen Verschiebung δ von -170,15 ppm. Das Signal ist in vier Peaks aufgespalten. Es handelt sich dabei um ein Dublett von einem Dublett, das auf folgende Weise entsteht. Ein erstes Dublett tritt durch eine J_3 -Kopplung mit 6,4 Hz auf, die mit der J_3 -Kopplung aus der ^1H -NMR-Spektroskopie (6,8 Hz) korrespondiert und durch das Wasserstoffatom hervorgerufen wird, das am C^6 -Atom von FUAc gebunden ist (siehe Abbildung 5). Ein zweites Dublett resultiert aus einer J_4 -Kopplung mit 4,7 Hz, die mit der J_4 -Kopplung aus der ^1H -NMR-Spektroskopie (5,1 Hz) annähernd übereinstimmt und durch das Wasserstoffatom am N^3 -Atom von FUAc verursacht wird. Abweichungen von 10 % zwischen J -Kopplungs-Wertepaaren liegen in einem akzeptablen Bereich. Das zweite Dublett führt also dazu, dass das erste Dublett ein weiteres Mal aufgespalten wird. In der Folge entstehen insgesamt vier Peaks, die die erfolgreiche Synthese von FUAc aus 5-FU zeigen.

7.4 Resultate der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)⁶

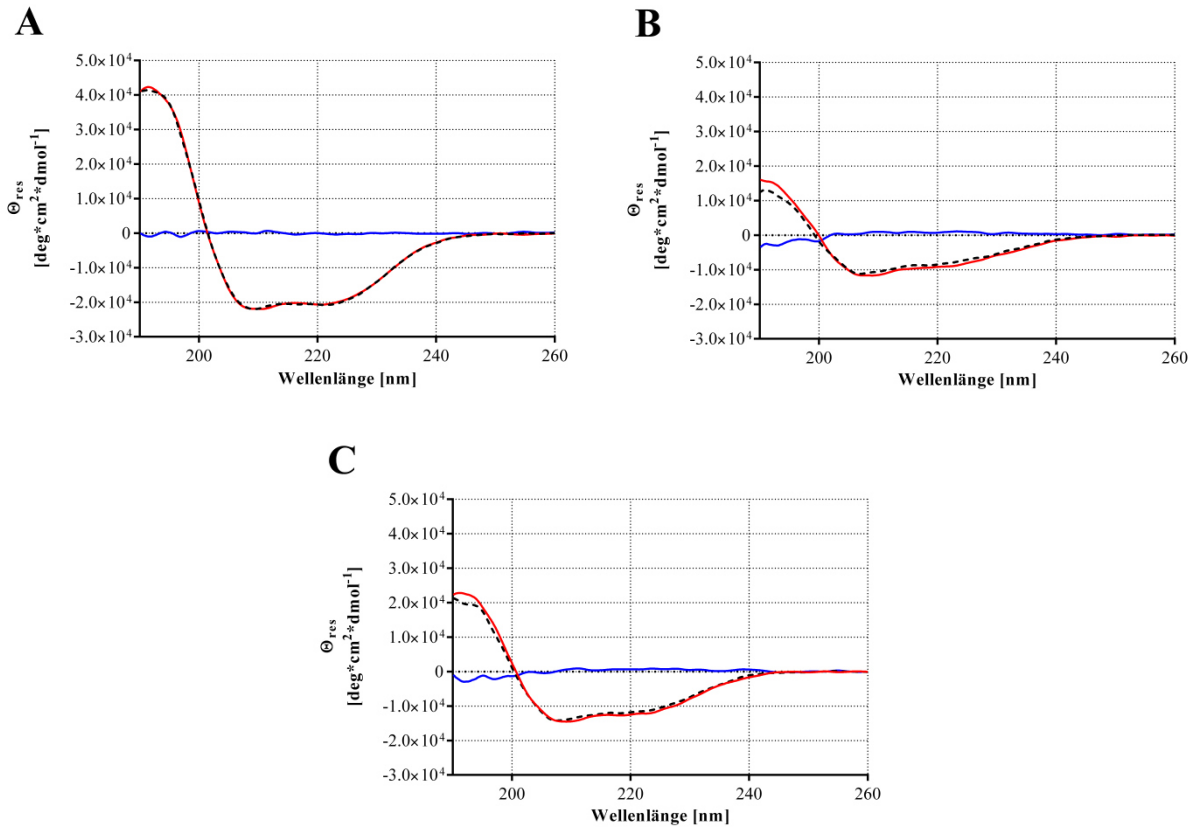


Abbildung 35: Zirkulardichroismus-Spektroskopie von BSA und FUAc-BSA. Jeweils verglichen wurden BSA (schwarze Linie) mit FUAc-BSA (rote Linie). Darüber hinaus ist die Differenz zwischen beiden Substanzen veranschaulicht (blaue Linie). Auf der x-Achse ist die Wellenlänge aufgetragen, auf der y-Achse ist die molare Elliptizität Θ_{res} dargestellt. Die Messungen wurden mit dem Gerät JASKO J-720 Japan durchgeführt. Legende: **A:** bei 20 °C, **B:** bei 80 °C, **C:** bei 20 °C nachdem auf 80 °C erhitzt wurde.

⁶ Die Messungen der CD-Spektroskopie wurden mit der Unterstützung von Heike Nikolenko, AG Peptide-Lipid Interaction, im Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie, Berlin Buch, durchgeführt.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michael Jan Koziol, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleichende Untersuchungen zur Proliferationshemmung ausgewählter Tumorzelllinien durch Fluorouracil-Essigsäure (FUAc) in verschiedenen Darreichungsformen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Berlin, den 04.08.2015

.....

Michael Jan Koziol

Curriculum vitae

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

Publikationsliste

Publikation in einem „peer reviewed“ Journal

1.) Michael J. Koziol, Torsten K. Sievers, Kathrin Smuda, Yu Xiong, Angelika Müller, Felix Wojcik, Axel Steffen, Margitta Dathe, Radostina Georgieva, Hans Bäumler, “Kinetics and Efficiency of a Methyl-Carboxylated 5-Fluorouracil - Bovine Serum Albumin Adduct for Targeted Delivery“, eingereicht bei Macromolecular Bioscience (begutachtet und zur Publikation empfohlen), 2013.

Publikationen im Rahmen der Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen

1.) Michael J. Koziol, Torsten K. Sievers, Kathrin Smuda, Yu Xiong, Angelika Müller, Felix Wojcik, Axel Steffen, Margitta Dathe, Radostina Georgieva, Hans Bäumler. „An albumin-coupled cytostatic agent for targeted cancer therapy.“ IV International Workshop on „Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications“ (2013), Golm, Germany.

(Workshop)

2.) Michael J. Koziol, Torsten K. Sievers, Kathrin Smuda, Yu Xiong, Angelika Müller, Felix Wojcik, Axel Steffen, Margitta Dathe, Radostina Georgieva, Hans Bäumler. „Kinetics and Efficiency of a Methyl-Carboxylated 5-Fluorouracil – Bovine Serum Albumin Adduct for Targeted Delivery.“ 1st Workshop and Summer School „Dual-Imaging of Nano/Microsized Theranostics“ (2013), Berlin, Germany.

(Workshop und Summer School)

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Hans Bäumler, Leiter der Forschungsabteilung des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, aussprechen, der mich mit seiner unbändigen Schaffenskraft sowohl fachlich als auch persönlich hervorragend betreut hat und bei mir mit seiner Wissbegierde und Offenheit einen nachhaltigen Eindruck hinterlassen hat.

Außerdem möchte ich meinen großen Dank gegenüber Frau Dr. rer. nat. Radostina Georgieva bekunden, die mit ihren Anregungen und ihrem fachlichen Rat eine unschätzbare Hilfe für das Gelingen dieser Arbeit gewesen ist.

Herrn Dr. rer. nat. Torsten Sievers vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (MPIGK) in Golm möchte ich für seine Offenheit danken, sich mit fachfremden Zusammenhängen zu beschäftigen und für seine freundliche Art, die die gemeinsamen Stunden im Institut immer sehr kurzweilig haben werden lassen. Außerdem gilt mein Dank Herrn Felix Wojcik (MPIKG), der die MALDI-ToF-Messungen durchgeführt hat.

Frau Dr. rer. nat. Margitta Dathe vom Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie, Leiterin der AG Peptide-Lipid Interaction, gebührt Dank, dass sie so freundlich war, mich die CD-Spektroskopie-Untersuchungen durchführen zu lassen und Frau Heike Nikolenko, die mich tatkräftig und freundschaftlich dabei unterstützt hat.

Nicht zuletzt möchte ich der ganzen AG Bäumler für die letzten zwei Jahre danken, die wir miteinander verbringen durften. Allen voran Kathrin Smuda, die mir mit ihrer Engelsgeduld dabei geholfen hat, mich in die Methoden einzuarbeiten und mir immer zur Seite stand, wenn ich sie brauchte. Dr. rer. nat. Yu Xiong danke ich für die unendlich vielen Ratschläge und das „obligatorische“ Mittagessen. Axel Steffen für die unzähligen Korrekturen und Anmerkungen für diese Arbeit und alles andere. Außerdem gilt mein Dank Angelika Müller, die den Grundstein für dieses Projekt gelegt hat, und Anne Grünberg für die gute Arbeitsatmosphäre am Schreibtisch. Allen Mitgliedern meiner „Zweit-AG“ Dörner, bei der ich zu jeder Tages- und Nachtzeit aufschlagen durfte, möchte ich danken, allen voran Sarah Fleischer für ihre herzliche Art und auch allen anderen für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, namentlich genannt Claudia Giesecke, Karin Reiter und Ina Wirries.

Meiner Familie, meinen Freunden und allen anderen, die an mich glauben und mich unterstützen – vielen Dank!

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832), deutscher Dichter und Naturwissenschaftler