
Folat Rezeptor α
vermittelte Aufnahme von
Photosensibilisator-Konjugaten
und
die Phototoxizität der Folsäure

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Fach Pharmakologie und Toxikologie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
Kathrin Butzbach
geboren am 13.10.1981 in Bad Schwalbach
Mainz, 2016

*„Equipped with his five senses,
man explores the universe around him
and calls this adventure science.”*

(Edwin Powell Hubble, 1889 – 1953)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Spezifisches Targeting von Medikamenten	1
1.1.1 Rezeptor-vermitteltes Targeting von Medikamenten.....	2
1.1.1.1 Der Folat Rezeptor	2
1.1.2 Ausnutzung des Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effektes.....	5
1.1.2.1 Albumin als Transportvehikel	6
1.1.2.2 Dextran als Transportvehikel	9
1.1.2.3 Andere Transportvehikel	11
1.1.3 Andere Ansätze zum spezifischen Transport von Medikamenten.....	12
1.2 Photodynamische Therapie (PDT).....	13
1.2.1 Photosensibilisatoren in der photodynamischen Therapie	13
1.2.1.1 β -Carbolin-Derivate	16
1.2.1.2 Tetraphenylporphyrin (TPP)	17
1.2.2 Anwendungen von Photosensibilisatoren in der photodynamischen Therapie	18
1.2.2.1 Photodynamische Krebstherapie in der Praxis.....	21
1.3 Folsäure.....	22
1.3.1 Physiologischer Nutzen der Folsäure	22
1.3.2 Photochemie der Folsäure	24
2 Ziel der Arbeit	27
3 Materialien:	28
3.1 Verwendete Geräte:.....	28
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	30

3.3	Chemikalien:.....	30
3.4	Puffer und Arbeitslösungen	32
3.5	Enzyme	34
3.6	Zelllinien:.....	35
3.6.1	KB.....	35
3.6.2	HeLa.....	35
3.6.3	M2IV/04.....	35
3.6.4	HaCaT.....	35
3.7	Antikörper	36
4	Methoden.....	37
4.1	Grundlegende Techniken zum Arbeiten in Zellkultur.....	37
4.1.1	Kultivieren von Säugerzellen	37
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	37
4.2	Darstellung der BSA- β -Carbolin- und der BSA- β -Carbolin-Folat- Konjugate	38
4.2.1	BSA- β -Carbolin-Konjugate (A β C).....	38
4.2.2	BSA- β -Carbolin-Folat-Konjugate (A β CF).....	39
4.3	Analytik der BSA-Konjugate	39
4.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
4.3.2	Photometrische Folat-Bestimmung	40
4.3.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	40
4.4	Bestimmung der Zelltoxizität	40
4.4.1	Proliferation.....	40
4.4.2	WST-1 Assay	41
4.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
4.5.1	Nicht-konfokal	43
4.5.2	Konfokal.....	44
4.6	Quantifikation von DNA-Schäden	45

4.6.1	PM2 Assay.....	45
4.6.2	Alkalische Elution.....	47
4.7	Bestimmung von Mikrokernen	49
4.8	Proliferationskurven.....	50
4.9	Durchflusszytometrie	50
4.9.1	Quantifizierung des FR α	50
4.9.2	Quantifizierung der intrazellulären TPP-Fluoreszenz.....	51
5	Ergebnisse.....	52
5.1	Aufnahme von Photosensibilisatoren in Zellen über den Folsäure-Rezeptor α (FR α) ...	52
5.1.1	FR α vermittelte Aufnahme von Albumin- β -Carbolin-Konjugaten.....	52
5.1.1.1	Herstellung und Analytik der Albumin- β -Carbolin-Konjugate.....	53
5.1.1.2	Mikroskopische Untersuchungen der FR α vermittelten Zellaufnahme	55
5.1.1.3	Extrazelluläre DNA-schädigende Wirkung der β -Carboline.....	60
5.1.1.4	Zytotoxizität der Albumin- β -Carbolin-Konjugate	65
5.1.2	FR α vermittelte Aufnahme von Tetraphenylporphyrin (TPP) beladenen Dextran-Partikeln.....	72
5.1.2.1	Zytotoxizitätsstudien.....	72
5.1.2.2	Mikroskopische Untersuchung der Zellaufnahme von TPP-beladenen Dextran-Partikeln	79
5.1.2.3	Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellaufnahme von TPP-beladenen Dextran-Partikeln.....	80
5.2	Phototoxizität der Folsäure.....	83
5.2.1	Extrazelluläre DNA schädigende Wirkung von Folsäure	83
5.2.2	Zytotoxizität von Folsäure	87
5.2.3	Intrazelluläre DNA schädigende Wirkung von Folsäure.....	90
5.2.4	Mutagenität von Folsäure	96
6	Diskussion.....	100

6.1	Folsäure-vermittelte Zellaufnahme von Konjugaten und Partikeln	100
6.1.1	Albumin-Folsäure-Konjugate für die Rezeptor-vermittelte PDT.....	100
6.1.1.1	Albumin bildet mit Folsäure und β -Carbolinen Konjugate fester Stöchiometrie	100
6.1.1.2	β -Carbolin-beladene Albumin-Folsäure Konjugate werden FR α vermittelt aufgenommen und gelangen ins Lysosom	101
6.1.1.3	Albumin-Bindung verhindert die DNA-schädigende Wirkung des β -Carbolins	102
6.1.1.4	β -Carbolin-beladene Albumin-Folsäure Konjugate lösen nach Bestrahlung FR α spezifische Zytotoxizität aus	103
6.1.1.5	Potentielle Optimierung des Albumin-Folsäure Systems.....	104
6.1.2	Folsäure-konjugierte Dextran-Partikel für die Rezeptor-vermittelte PDT	106
6.1.2.1	Folsäure-konjugierte Dextran-Partikel können lipophile Substanzen FR α spezifisch transportieren.....	106
6.1.2.2	Spermin-modifizierte Dextran-Partikel ohne Folsäure-Modifikation transportieren lipophile Substanzen unspezifisch in Zellen	107
6.1.2.3	Potentielle Optimierung des Dextran-Partikel Systems	108
6.1.3	Partikel-vermittelte PDT.....	108
6.1.4	Eignung der eingesetzten Photosensibilisatoren	110
6.2	Phototoxizität der Folsäure.....	111
6.2.1	Folsäure ist photozytotoxisch durch extrazellulär entstehendes H ₂ O ₂	111
6.2.2	Folsäure ist photogenotoxisch	111
6.2.3	Risikoeinschätzung	113
7	Zusammenfassung.....	115
8	Literaturverzeichnis.....	117
	Appendix.....	125
	Curriculum Vitae.....	127

Abkürzungsverzeichnis

5-methyl-THF	5-Methyltetrahydrofolsäure
6-Cap	6-Carboxypterin
6-Fop	6-Formylpterin
8-oxoG	8-Hydroxy-guanin
A β C	Albumin- β -Carbolin-Konjugat
A β CF	Albumin- β -Carbolin-Folsäure-Konjugat
AcDex	Acetalisiertes Dextran
AK	Antikörper
Alb	Albumin
AP-Läsion	apurinische-/apyrimidinische Läsionen
β C	β -Carbolin
BER	Basen Excisions Reparatur
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Cat	Katalase
cHa	<i>N</i> ² -Carboxyethyl-harmin
CLIC	Clathrin independent carrier
cnHo	<i>N</i> ² -Carboxyethyl-norharman
CMC	<i>N</i> -Cyclohexyl- <i>N'</i> -(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate
CPD	Cyclobutanpyrimidin Dimer
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
dest.	Destilliert
Dex	Dextran
DHF	Dihydrofolsäure
DHFR	Dihydrofolsäurereduktase
DLS	dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxiribonukleinsäure)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoIII	Endonuklease III
EndoIV	Endonuklease IV
EPR	Enhanced permeability and retention
Fapy	Formamidopyrimidin
FACS	Fluorescence associated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fpg	Formamidopyrimidin DNA-Glykosylase
FA	Folic acid (Folsäure)
FR α	Folat Rezeptor α
FS	Folsäure
FSC	forward scatter
GEEC	GPI-AP enriched endosomal compartments
gp60	Glycoprotein 60
GPI-AP	Glycosylinositolphosphat anchored protein (Glycosylinositolphosphat verankertes Protein)
GSH	Glutathion
Ha	Harmin
Hp	Hematoporphyrin
ISC	Intersystem Crossing
Kat	Katalase
kbp	Kilobasenpaare
LP	long pass
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser-desorption/ionization-time of flight mass spectrometer
MTX	Metothrexat
NADP ⁺ (NADPH + H ⁺)	Nicotinamid diphosphat
N ² -ce-Ha	N ² -Carboxyethyl-harmin
N ² -ce-nHo	N ² -Carboxyethyl-norharman

nHo	Norharman
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIR	nahes Infrarot
OGG1	8-Oxo-guanin-Glykosylase 1
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PBSCMF	Phosphate buffered saline, Calcium- und Magnesium free (Phosphatpuffer, calcium- und magnesiumfrei)
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
Polβ	Polymeraseβ
ProtK	Proteinase K
PS	Photosensibilisator
PVA	Polyvinylalkohol
RFC	Reduced folate carrier
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPM	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOD	Superoxiddismutase
SpAcDex	Spermin modifiziertes acetyliertes Dextran
SPARC	Secreted protein, acidic and rich in Cysteine
SSC	sideward scatter
SSB	single-strand break (Einzelstrangbruch)
T4-endoV	T4 Endonuklease V
TAE	Tris, Acetyl, EDTA
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
THF	Tetrahydrofolsäure
TPP	Tetraphenylporphyrin

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
vis	visible (sichtbar)
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Spezifisches Targeting von Medikamenten

Krebs ist in Industrieländern die zweithäufigste Todesursache [1]. Durch die Einwirkung exogener und endogener Noxen werden Onkogene aktiviert und/oder Tumorsuppressorgene deaktiviert, wodurch einzelne entartete Zellen mit unkontrolliertem Wachstum beginnen [2]. Die Therapie von Tumorerkrankungen zielt deswegen in den meisten Fällen darauf ab die Zellproliferation zu unterbinden, wobei Krebszellen stärker beeinträchtigt werden müssen, als gesunde Zellen. Der Einsatz klassischer Zytostatika, wie zum Beispiel der Mitosehemmstoff Paclitaxel oder der DNA-Crosslinker Cisplatin, führt zu massiven und für den Patienten sehr belastenden Nebenwirkungen, die im Allgemeinen dadurch entstehen, dass auch manche gesunde Körperzellen eine hohe Proliferationsrate haben und dadurch besonders empfindlich auf den Einsatz von Zytostatika reagieren. Die bekanntesten sind Erbrechen durch die Zerstörung der sich schnell teilenden enterochromaffinen Zellen im Darm und daraus folgender Dauerstimulation der Area postrema im Gehirn sowie eine starke Immunsuppression durch Verhinderung der T- und B-Zell-Proliferation und daraus folgende Infektionen. Außerdem kann das mutagene Potential vieler Zytostatika die Ursache für systemisch auftretende Sekundärtumore sein. Diese Aufzählung ist nur ein kleiner Teil der unerwünschten Wirkungen, die bei der Therapie von Tumoren auftreten können. Deswegen ist es wichtig, die entarteten Zellen gezielt mit dem Zytostatikum adressieren zu können, um den Patienten eine effizientere Therapie und eine höhere Lebensqualität zu ermöglichen. Es gibt verschiedene Ansätze, um dieses Ziel zu erreichen. Erstens können Tumorzellen mittels tumorspezifischer Antigene oder überexprimierte Oberflächenrezeptoren adressiert werden (siehe Abschnitt 1.1.1). Zweitens kann mittels nano- und makromolekularer Formulierungen der besondere Aufbau solider Tumore ausgenutzt werden, wodurch der *Enhanced Permeability and Retention* Effekt zum Tragen kommt (siehe Abschnitt 1.1.2). Drittens kann durch die Verwendung von Photosensibilisatoren (siehe Abschnitt 1.2) der Wirkbereich auf ein bestrahltes Areal eingeschränkt werden. Auf die verschiedenen Möglichkeiten der Spezifizierung soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.1.1 Rezeptor-vermitteltes Targeting von Medikamenten

Tumorzellen haben im Vergleich zu gesunden Körperzellen einen völlig veränderten Metabolismus. Daraus ergibt sich ein anderes Muster an Oberflächenmolekülen. Während zum Beispiel MHC-Moleküle herunterreguliert werden [3], um der Erkennung durch das Immunsystem auszuweichen, werden Rezeptoren, die das Wachstum fördern, wie zum Beispiel der Rezeptor für den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), oder den erhöhten Nährstoffbedarf befriedigen, wie zum Beispiel der Folat Rezeptor α (FR α) oder der Transferrin Rezeptor 1 (TfR1), der den Eisenstoffwechsel reguliert, häufig hochreguliert. Um eine Wirkung über signalgebende Rezeptoren, wie den VEGF-Rezeptor, zu erreichen, werden Inhibitoren oder monoklonale Antikörper angewendet, die ihre Wirkung spezifisch durch Blockade dieses Rezeptors entfalten [4]. Bei FR α und TfR1 handelt es sich um endozytische Rezeptoren. Durch Bindung des Substrates wird alles, was an das Substrat gebunden ist, endozytisch in die Zelle eingeschleust. Der TfR1 spielt eine wichtige Rolle im Eisenstoffwechsel von Körperzellen. Transferrin kann Eisen binden und wird dann erst über den Rezeptor aufgenommen. Dort gelangt es in ein saures Zellkompartiment, wo das Eisen abdissoziiert. Dieser Mechanismus macht den TfR1 durch dessen Hochregulation in vielen entarteten Geweben zu einer nützlichen Struktur, um speziell Tumorzellen zu erreichen[5], [6].

Ein weiteres interessantes Target für Rezeptor-vermittelte Endozytose ist der FR α . Dieser ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

1.1.1.1 Der Folat Rezeptor

Folat Rezeptoren (FR) sind Cystein-reiche Oberflächen-Glykoproteine [7] mit einer Masse von 38 – 45 kDa. Es gibt drei verschiedene Isoformen: FR α , FR β und FR γ . Ihnen ist gemein, dass die hochaffine Folat-Bindungstasche ($K_D = 0,1 - 1 \text{ nM}$) aus denselben konservierten Aminosäuren besteht [8]. FR α und β sind über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert [9], während die γ Isoform ein lösliches Protein ist [10]. Die Isoformen sind im Körper auf unterschiedlichen Zellen lokalisiert. FR α ist in geringen Mengen auf der luminalen Seite vieler gesunder, polarisierter Epithelzellen zu finden. FR β befindet sich bevorzugt auf Zellen des hämatopoetischen und lymphatischen Systems. Ein großer Teil der Folsäure-Versorgung gesunder Körperzellen wird aber auch vom *reduced folate carrier* (RFC) übernommen [11], der ubiquitär auf

allen Körperzellen exprimiert wird, aber eine deutlich niedrigere Affinität zur Folsäure hat. Der FR α ist deshalb ein so spannendes Target für die gezielte Krebstherapie, weil ca. 40 % aller Tumore ihn überexprimieren und ihre Polarisierung verlieren, um in einer Folsäure-armen Umgebung ihren hohen Folsäure-Bedarf zu decken [12], der durch die stark gesteigerte Proliferationsrate zustande kommt. (Auf die physiologische Bedeutung der Folsäure wird in Abschnitt 1.3 näher eingegangen.) Dies betrifft besonders stark Adenokarzinome des Urogenitaltraktes und verschiedene Gehirntumore [13], [14], während andere Arten von Tumoren davon weniger häufig betroffen sind. Die Überexpression der Folatrezeptoren korreliert mit der Wachstumsrate der Krebszellen, wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte [15], [16]. Die Rezeptoren treten geclustert auf der Zelloberfläche auf. Der GPI-Anker des Moleküls ist in sogenannten *lipid rafts* (cholesterin- und sphingolipidreiche Inseln) in der Membran verankert. Je nach Folsäureangebot können sie hoch- und runterreguliert werden (siehe Abb. 1.1). Außerdem ist ihre Expression über Steroid-Rezeptoren-vermittelte Mechanismen induzierbar. Die Abhängigkeit der FR α -Expression vom Estrogenspiegel ist therapeutisch besonders bei Tumoren des weiblichen Urogenitaltraktes von Bedeutung [17], [18].

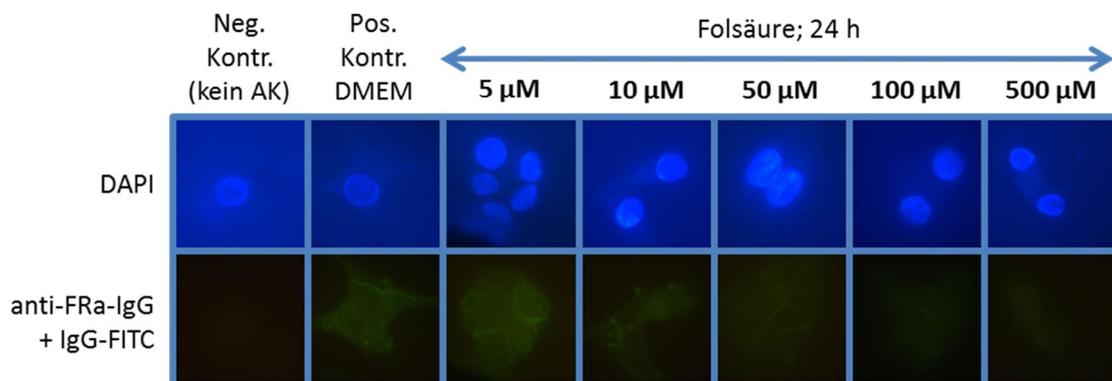


Abb. 1.1: *Regulation des FR α in KB Zellen nach 24 h Inkubation mit Folsäureüberschuss.* Die Kernfärbung wurde mit DAPI durchgeführt. Der FR α wurde mit einem murinen IgG AK gegen den human FR α inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem FITC-gelabelten goat-anti-mouse IgG versehen. Nach dem waschen wurden die Zellen mit eiskaltem PFA (4 %) fixiert.

Die Aufnahme des Rezeptors und des gebundenen Liganden erfolgt endozytotisch, wie bei allen Glycosylphosphatidylinositol verankerten Proteinen (GPI-APs), über den sogenannten *Clathrin-independent carrier* (CLIC) Weg. CLIC-vermittelte Endozytose ist in der Lage größere Volumina aufzunehmen als Clathrin- und Caveolin-vermittelte Vesikel. Die durch den CLIC Weg

aufgenommene Ladung wird in sogenannte *GPI-AP enriched endosomal compartments* (GEECs) transportiert. Im Normalfall findet hier die Ablösung der Folsäure und deren Transport ins Zytosol statt, wo sie als Kofaktor benötigt wird. Der Rezeptor wird mit Hilfe kleiner GTPasen zu Recycling-Endosomen transportiert, die ihn zurück zur Zelloberfläche transportieren [19]. Der Rezeptor hat eine extrem hohe *turn-over* Geschwindigkeit und der beschriebene Zyklus dauert nur wenige Minuten [20]. Findet nun aber eine multivalente Rezeptorbindung, wie es zum Beispiel bei Folsäure-gekoppelten Nanopartikeln der Fall ist, statt, weicht der intrazelluläre Transportweg vom klassischen CLIC Weg ab. Es wird vermutet, dass diese Art von Cargo nach Endozytose in den Caveolin-vermittelten Transportweg eingeht und lysosomal verdaut wird [21], [22]. Aus Studien mit unterschiedlichen Zelllinien geht allerdings hervor, dass die genauen Transportwege zelltypspezifisch und komplex sind. Für die endgültige Distribution spielen in allen Fällen das frühe Endosom und der Golgi Apparat eine sehr wichtige Rolle [23], [24].

Eine weitere Besonderheit der GPI-APs ist deren Fähigkeit zur Transzytose in verschiedenen polarisierten Epithelzellen, wie es zum Beispiel beim FR α in der Leber und der Niere beobachtet werden kann [25]–[27]. Hierbei wird der Rezeptor samt Ladung von der basolateralen Seite der Zelle über den Golgi Apparat zur apikalen Seite transportiert und aus der Zelle ausgeschleust. So wird verhindert, dass die Folsäure aus dem Körper ausgeschieden oder verstoffwechselt wird. Aus dieser Besonderheit ergibt sich ein weiterer Vorteil Folsäure-gebundener Medikamente. Da diese durch Leber- und Nierenzellen transportiert werden, ohne an deren intrazelluläres Target zu gelangen, können sie weder Hepato- noch Nephrotoxizität verursachen.

Für die Anwendung in Therapie und Diagnostik muss also zwischen mono- und multivalenten Molekülen unterschieden werden. Wird ein kleines Molekül monovalent an Folsäure gebunden, besteht die Gefahr, dass ein großer Teil davon nicht das Zytosol erreicht oder sogar über den Recycling Weg aus der Zelle ausgeschleust wird. Um diesen Umstand zu umgehen wird in der Praxis auf einen Trick zurückgegriffen. Die Folsäure wird über eine Disulfidbrücke an das zu transportierende Molekül gebunden. Das frühe Endosom ist leicht sauer (ca. pH 6), wodurch die Disulfidbindung gespalten und das Molekül von der Folsäure getrennt wird. Mit der Substanz Vintafolide (EC145) befindet sich ein solches Medikament kurz vor der Zulassung. Dabei handelt es sich um ein Prodrug, das im Sauren Desacetylvinblastinhydrazid freisetzt und bei Cisplatin-resistentem Eierstockkrebs eingesetzt werden soll [28]. Bei multivalenter Folsäurebindung an Nanopartikel werden mehrere FR α in den *lipid rafts* quervernetzt und die über den Rezeptor aufgenommene Ladung wird endosomal transportiert und lysosomal verdaut [24]. Dies kann sich

zunutze gemacht werden, um Nanopartikel mit therapeutisch oder diagnostisch interessanten Molekülen zu beladen. Durch ihre Größe haben Nanopartikel den zusätzlichen Vorteil, dass sie Nutzen aus dem sogenannten *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) Effekt ziehen und sich so verstärkt in Tumorgewebe anreichern. Auf den EPR und verschiedene Transportvehikel soll im nächsten Abschnitt detailliert eingegangen werden.

1.1.2 Ausnutzung des Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effektes

Der *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) Effekt ist eine Besonderheit soliden Tumorgewebes, die es ermöglicht, Gewebsspezifität durch Molekülgröße zu erreichen. Tumorgewebe ist grundsätzlich anders aufgebaut als gesundes Gewebe. Wegen des erhöhten Nährstoffbedarfs ist ein Tumor sehr stark vaskularisiert. Die Endothelien, die die Blutgefäße umschließen, sind im Tumorgewebe häufig fenestriert. Zell-Zell-Kontakte sind hier, ähnlich wie in entzündetem Gewebe, durch die Kallikrein-Kinin-Kaskade aufgelockert [29], wodurch größere Moleküle aus der Blutbahn leichter in das Tumorgewebe übertreten können als in gesundem Gewebe. Die Porengröße variiert dabei und kann zwischen 100 und 780 nm liegen [30]. Außerdem haben diese Gefäße oft so gut wie keine glatte Muskulatur. In der Praxis bedeutet das, dass die Anreicherung großer Moleküle durch Steigerung des Blutdrucks (durch z.B. Angiotensin II) beschleunigt werden kann. Zusätzlich ist in Tumoren (im Gegensatz zu entzündetem Gewebe) das lymphatische System häufig schlecht ausgebildet, was dazu führt, dass diese großen Moleküle nicht abtransportiert werden und sich anreichern [31]. Das Prinzip des EPR Effektes ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt.

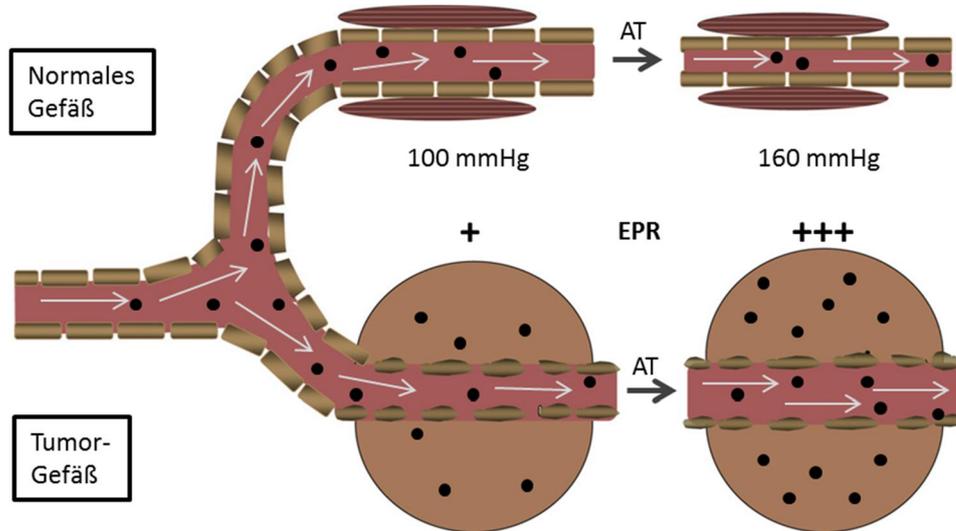


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des EPR Effektes. Hochmolekulare Substanzen können gesundes Gewebe nicht penetrieren, während sie in das Tumorgewebe übertreten können, da dieses stärker vaskularisiert und durch lose Zell-Zell-Kontakte fenestriert ist. Erhöhung des Blutdrucks durch Angiotensin II (AT) verstärkt diesen Effekt (modifiziert nach [31]).

Um die systemische Toxizität einzuschränken, die niedermolekulare Zytostatika auslösen, wird seit vielen Jahren an Möglichkeiten geforscht, diese Zytostatika an hochmolekulare Partikel aller Art zu binden. Dieser Ansatz ermöglicht eine universellere Form des Targetings und kann auf ein breiteres Tumorspektrum angewendet werden als das Targeting von spezifischen Rezeptoren oder anderen Epitopen. Die Anforderungen an Partikel, die zur Anreicherung im Tumorgewebe über den EPR Effekt geeignet sind, sind eine Molekülgröße von mindestens 40 kDa [32], eine gute Biokompatibilität und minimale Immunogenität. Außerdem spielen Lipophilie und Ladungsverhältnisse eine sehr große Rolle. Da Gefäße durch eine Vielzahl von sulfatierten und carboxylierten Zuckerresten auf der Zellaußenseite in der Regel eine negativ geladene Oberfläche haben, kann die Verwendung eines kationischen Partikels den EPR deutlich steigern [33]. In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden näher auf Serumalbumin und Partikel aus modifizierten Dextran-Polymeren als für die gezielte Tumorthherapie geeignete Transportvehikel eingegangen.

1.1.2.1 Albumin als Transportvehikel

Ein Transportmolekül, das in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat, ist das Albumin. Es wird vom Körper nicht als fremd erkannt und ist demzufolge nicht immunogen. Es ist preisgünstig und hat mit 66,5 kDa eine sehr gute Größe, um den EPR Effekt auszunutzen. Albumin

hat zwei weitere Vorteile, die ein effizienteres Tumortargeting zur Folge haben. Solide Tumore haben einen enormen Bedarf an Proteinbausteinen, den sie häufig durch den Verdau von Serumalbumin decken, weshalb Albumin überdurchschnittlich gut von vielen Krebszellen aufgenommen wird. Zu diesem Zweck haben viele Tumore spezifische Rezeptoren. Beispielsweise den gp60 Rezeptor auf vielen Tumorendothelien, der Albumin via Transzytose ins Interstitium des Tumors transportiert [34]. Das Glykoprotein SPARC bindet daraufhin Albumin im Interstitium und hält es bis zu dessen Aufnahme in die Tumorzellen dort zurück (siehe Abbildung 1.3).

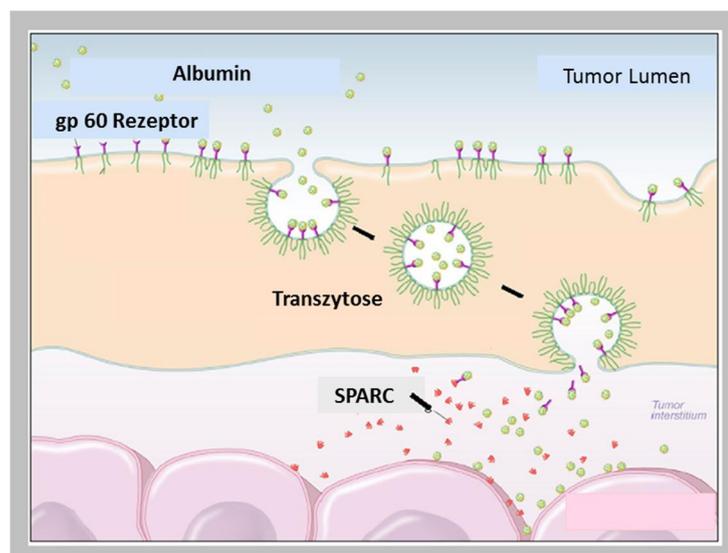


Abb. 1.3: Aufnahme von Albumin in Tumorgewebe. Albumin bindet an den gp60 Rezeptor auf der Oberfläche des Gefäßendothels und wird mittels Transzytose ins Interstitium transportiert. Dort wird es durch das Protein SPARC gebunden und festgehalten, bis es in die Tumorzellen aufgenommen wird (modifiziert nach [35]).

Albumin ist in der Lage, lipophile Stoffe und Metallkationen physikalisch in dessen Bindungstaschen zu binden. Die extrem hohe Plasmaeiweißbindung verschiedener Substanzen kann in Tumordiagnostik und Therapie ausgenutzt werden. Injiziert man einer Maus beispielsweise den Farbstoff Evans blue (T-1884), bindet dieser an das Plasmaalbumin und reichert sich in soliden Tumoren an, wodurch diese blau werden [36]. Erste Ansätze zum Einsatz dieses Effektes in der photodynamischen Therapie (mehr dazu im Abschnitt 1.2) werden zurzeit untersucht. Es konnten Squarain Photosensibilisatoren, die eine extrem hohe Plasmaeiweißbindung haben, in Tumoren von Mäusen angereichert werden [37]. In Zellkultur wurde allerdings gezeigt, dass es nach einer gewissen Inkubationszeit zu einer Umverteilung des

nicht-kovalent gebundenen Photosensibilisators von der Bindungsstelle am Albumin in die Zellmembran kommt (siehe Diplomarbeit Kathrin Butzbach [38]). Um unspezifische toxische Effekte auszuschließen, die durch die nicht-kovalent gebundene Beladung des Albumins ausgelöst werden könnten, ist deshalb eine kovalente Bindung des Arzneistoffs an das Protein sinnvoll. Albumin ist an der Oberfläche an zahlreichen Aminosäureresten einfach kovalent modifizierbar. Ein Beispiel für ein Zytostatikum, bei dem der EPR Effekt bereits über die kovalente Bindung an Albumin erfolgreich ausgenutzt wird ist Abraxane®. Es ist seit einigen Jahren in der Behandlung von Brust-, Lungen- und Pankreaskrebs zugelassen [39]. Dabei handelt es sich um ein Konjugat aus Albumin und dem Mitosehemmstoff Paclitaxel. Dieses Konjugat bildet Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 130 nm. Durch diese Formulierung ist es möglich dem Patienten dieselbe Dosis des hochwirksamen Paclitaxels zu verabreichen, aber damit deutlich weniger Nebenwirkungen zu verursachen. Dies führt zu einer gesteigerten Überlebensprognose bei deutlich verbesserter Lebensqualität. Ein weiterer Ansatz, die kovalente Bindung von Zytostatika an Serumalbumin auszunutzen, ist die Bindung von Thiol-bindenden Prodrugs an im Körper zirkulierendes Albumin. Das Protein kann in der Blutbahn am Cystein34 modifiziert werden. Aktuell befindet sich die Substanz Aldoxorubicin (DOXO-EMCH ein (6-Maleinimidcaproyl)hydrazon Derivat von Doxorubicin) in klinischen Studien [40]. Die säurelabile Bindung zwischen Doxorubicin und dem Maleinimid wird nach intravenöser Gabe des Arzneistoffes in der Blutbahn gespalten und das Doxorubicin bindet an das Cytein34 des Albumins. Von diesem Punkt an kann der EPR auf dieselbe Weise ausgenutzt werden wie im Fall von Abraxane®.

Außer zur Erhöhung der Tumorspezifität findet Albumin auch auf andere Weise therapeutisch Anwendung. Bei der Volumensubstitution nach starkem Blutverlust oder bei Schockzuständen, wie zum Beispiel Verbrennungen, werden unter anderen Albumin-Lösungen eingesetzt [41]. Des Weiteren sind Insulin-Formulierungen auf dem Markt, die kovalent an Albumin gebunden sind, wodurch deren Halbwertszeit verlängert wird. Beispiele hierfür sind Insulin detemir (Levemir®) und Insulin degludec (Tresiba®) [42].

In der vorliegenden Arbeit, soll ein kationischer Photosensibilisator (siehe Abschnitt 1.2.1.1) kovalent an die Oberfläche des Albumins gebunden werden. Anschließend wird dieses Konjugat mit Folsäure verknüpft, um sowohl den EPR als auch den Folsäure-Rezeptor zum spezifischen Targeting von Tumorzellen auszunutzen.

1.1.2.2 Dextran als Transportvehikel

Dextran ist ein aus Glucose aufgebautes Homopolysaccharid. Es wird seit Jahrzehnten in verschiedenen medizinischen Anwendungen eingesetzt und gilt als gut verträglich. Seit einiger Zeit wird Dextran als potentielles Transportvehikel für kleine Moleküle oder Vektoren für die Gentherapie [43] untersucht. Hierfür muss das ursprüngliche Polymer durch Acetalisierung so modifiziert werden, dass die Polymerketten hydrophober werden. Durch die *single emulsion* Technik lagern sich die acetalisierten Dextrane (AcDex) in wässriger Lösung zu Partikeln mit definierter Größe zusammen (siehe Abb. 1.5). Vorher kann AcDex weiter modifiziert werden, indem Spermin an das Molekül gekoppelt wird (SpAcDex). Ursprünglich wurde diese Modifikation eingeführt, um siRNA über elektrostatische Wechselwirkungen fest in den Partikel zu binden [44]. Durch die freien Aminogruppen können die resultierenden Partikel aber auch an der Oberfläche kovalent modifiziert werden.

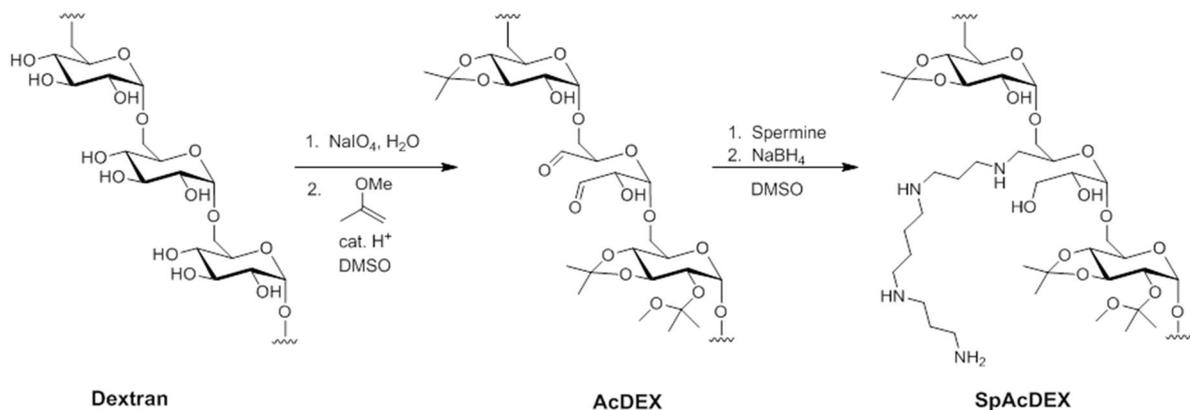


Abb. 1.4: *Dextran-Modifikation zum lipophilen AcDEX und zum SpAcDEX. Dextran wird quantitativ acetalisiert, wodurch es hydrophober wird. Anschließend wird es mit Spermin modifiziert. Dadurch wird es an den freien Aminogruppen funktionalisierbar.*

Ist in der Ausgangslösung eine lipophile Substanz vorhanden, wird diese bei der Partikelbildung ins Innere des Partikels eingeschlossen. In unserem Fall handelt es sich dabei um einen extrem lipophilen Photosensibilisator (siehe Abschnitt 1.2.1.2).

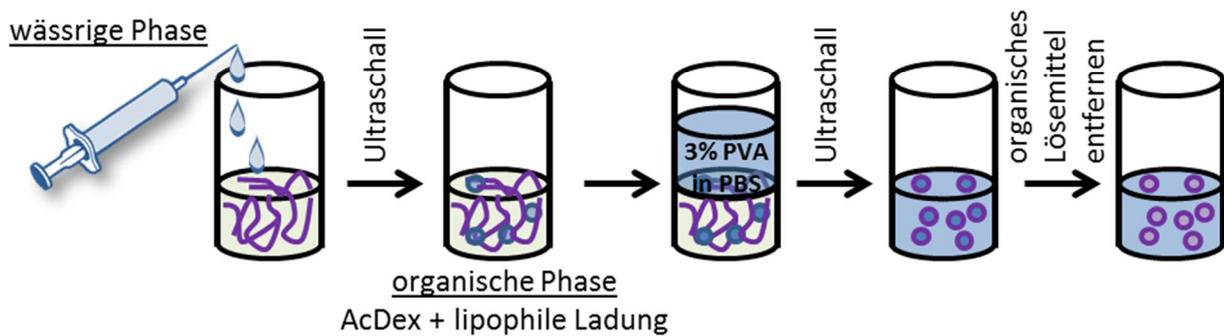


Abb. 1.5: *Single emulsion Technik zur Herstellung von Dextran Partikeln.* Das hydrophobe Dextran (AcDex oder SpAcDex) wird in Dichlormethan (DCM) gelöst. Unter Ultraschall wird Puffer tropfenweise zugegeben, wodurch sich eine Emulsion bildet. Nachdem der Puffer (plus 3 % Polyvinylalkohol (PVA)) vollständig zugegeben wurde, wird DCM restlos evaporiert.

Ein großer Vorteil aller acetalisierten Dextran-Partikel ist, dass sie säurelabil sind [45]. Bei einem pH-Wert < 6 werden die Acetale gespalten, die Polymere werden hydrophiler und der Partikel zerfällt. Wird der Partikel in Zellen aufgenommen und gelangt in saure Zellkompartimente, gibt er seine Beladung gezielt erst dort ab. Die bereits erwähnte Modifikation mit Spermin eröffnet mehrere Möglichkeiten. Da sich dadurch viele primäre und auch sekundäre Aminogruppen auf der Oberfläche des Partikels befinden, ist er unter physiologischen Bedingungen positiv geladen. Nicht nur, dass dieser Umstand, wie bereits in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, den EPR Effekt unterstützt, er begünstigt auch unspezifische Endozytose der Partikel [33]. Außerdem sind diese Aminogruppen leicht zu modifizieren, so dass zum Beispiel Folsäure an die Oberfläche geknüpft werden kann, um zusätzlich zum EPR auch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme über den FR α zu nutzen.

Wie in Tabelle 1.1 zu sehen ist, unterscheiden sich AcDex und SpAcDex in ihrer Größe nicht. Der Einschluss des Photosensibilisators führt in beiden Fällen allerdings zu einer geringeren Partikelgröße. Durch Quantifizierung der freien Aminogruppen vor und nach Folsäure-Kupplung, sowie der Bestimmung der Folsäure-Absorption im Überstand vor und nach der Reaktion kann die Anzahl der gebundenen Folsäure-Moleküle auf ca. 100 – 150 pro Partikel festgelegt werden. Die Kupplung von Folsäure an die Oberfläche der Partikel ändert die Größe so gut wie nicht.

Tab. 1.1: *Verwendete Dextran-Partikel und deren durchschnittlicher Durchmesser. Die gezeigten Werte wurden mittels dynamic light scattering (DLS) von der kooperierenden Arbeitsgruppe Wich (Institut für Pharmazie und Biochemie der Universität Mainz) bestimmt.*

Partikel	Durchschnittlicher Durchmesser [nm]
SpAcDex	215
SpAcDex-FA	240
SpAcDex-TPP	145
SpAcDex-TPP-FA	340
AcDex	216
AcDex-TPP	210

Dextran-Partikel wurden bereits in verschiedener Form mit verschiedenen Beladungen getestet. Dazu gehört unter anderem die bereits erwähnte siRNA [44]. Außerdem konnte die Effizienz der Insulinaufnahme durch Einschluss in Vitamin B12 gelabelte Dextran-Partikel deutlich verbessert werden [46].

1.1.2.3 Andere Transportvehikel

Neben den bereits beschriebenen Transportsystemen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, gibt es zahlreiche andere Möglichkeiten Partikel herzustellen, die als Transportvehikel für Medikamente eingesetzt werden können. Die zwei wichtigsten Hauptgruppen sind Liposomen und Partikel aus organischen Polymeren. Liposomen sind Partikel aus Lipiden, die sich im wässrigen Milieu als Sphären anordnen, wobei sich die hydrophilen Gruppen außen und der hydrophobe Kohlenwasserstoff-Anteil innen befindet. In diesem System können im Inneren hydrophobe Moleküle transportiert werden. Sie haben an und für sich schon eine gewisse Tumorspezifität, da Tumorzellen oft auch den LDL-Rezeptor überexprimieren, aber auch Liposomen können an der Oberfläche modifiziert werden, um durch kationische Ladung oder Bindung tumorspezifischer Liganden eine gesteigerte oder spezifischere Aufnahme zu erreichen. In näherer Vergangenheit wurde den Partikeln aus organischen Polymeren allerdings mehr Aufmerksamkeit geschenkt, da diese in Größe, Lipophilie und Ladung leichter zu variieren sind. Außerdem haben sie oft sogenannte *Stealth* Eigenschaften, die durch wasserlösliche Polymere, wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG), auf der Oberfläche des Partikels vermittelt werden, wodurch ihre Halbwertszeit verlängert wird [47]. Einige Beispiele für Partikelklassen aus organischen Polymeren sind Nanogelee, Nanokapseln oder Polymerosomen [48]. Ein weiterer Ansatz sind Mizellen. Dabei werden Kopolymere mit einem lipophilen, und einem hydrophilen Teil verwendet. Im wässrigen

Milieu lagert sich der lipophile Teil zusammen und es entsteht eine hydrophile Hülle. Auch hier können lipophile Substanzen im Kern der Mizelle eingeschlossen werden. Eine sehr interessante Variante von Mizellen entsteht durch die Verwendung von DNA-Block-Kopolymeren. Dabei werden einzelsträngige Oligonukleotide an Polypropylenoxid gebunden. Nach Bildung der Mizellen, können alle Arten von Molekülen an den Komplementärstrang des verwendeten Oligonukleotides gebunden und über Hybridisierung an der Mizelle befestigt werden [49], [50]. Etwas exotischer im Bereich des Medikamenten Transports sind Nanopartikel aus Metallionen [51], wie Gold und Silber, und Nanoröhren [52]. Auch hieran wird umfassend geforscht.

1.1.3 Andere Ansätze zum spezifischen Transport von Medikamenten

Neben den bereits ausführlich beschriebenen Wegen des spezifischen Transports gibt es noch zahlreiche andere Ansätze zum Tumortargeting. Zum Beispiel befindet sich ein Galaktosamin-funktionalisiertes Doxorubicin-Polymer in präklinischen Studien [53]. Desweiter gibt es Ansätze, die Aptamere oder Proteine verwenden oder die tumorspezifische Epitope mit Antikörpern adressieren. Die bestehenden Möglichkeiten sind in zahlreichen Reviews zusammengefasst, von denen hier nur einige genannt werden [48], [53], [54].

Ein gänzlich anderer Weg ist die Ausnutzung von Magnetismus. Hierfür werden magnetische Eisenoxid Partikel an das Medikament gekoppelt und durch Anlegen eines magnetischen Feldes um den Tumor herum im gewünschten Gewebe angereichert [55].

1.2 Photodynamische Therapie (PDT)

Als photodynamische Therapie (PDT) bezeichnet man den therapeutischen Einsatz von Photosensibilisatoren und Licht. Die dabei verursachte Energieübertragung soll dazu genutzt werden Zellen spezifisch zu töten. Das Konzept wurde zum ersten Mal bereits im frühen 20. Jahrhundert beschrieben [56], gewann aber erst in den letzten 20 Jahren immer mehr an Bedeutung. Sie kann bei vielen verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt werden. Dazu zählen die Makuladegeneration, aktinische Keratose, Warzen, Neurodermitis und auch verschiedene Arten von Krebs, wie Basaliome, Harnblasen- und Speiseröhrenkrebs oder Krebs im Bereich des Urogenitaltraktes [57]–[60].

1.2.1 Photosensibilisatoren in der photodynamischen Therapie

Photosensibilisatoren (PS) sind Substanzen, die in der Lage sind, die Energie von Licht aufzunehmen, um so Elektronen auf ein höheres Energieniveau zu heben. Diese angeregten Elektronen sind wiederum in der Lage die aufgenommene Energie auf umliegende Moleküle zu übertragen. Der Photosensibilisator geht dabei unverändert aus dieser Reaktion hervor (siehe dazu Abbildung 1.7). Das angeregte Molekül befindet sich zu Beginn noch im Singulettzustand $^1\text{PS}^*$ und hat nun mehrere Möglichkeiten, die aufgenommene Energie wieder abzugeben. Die Energie kann wieder emittiert werden, wodurch das Molekül direkt in seinen Grundzustand zurückfällt. Die elektromagnetische Strahlung, die abgegeben wird, wird als Fluoreszenz bezeichnet. Da ein Teil der Energie, die vom Molekül aufgenommen wurde, aber immer in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wird, entspricht die Emissionswellenlänge nicht der Excitationswellenlänge, sondern ist etwas langwelliger, also energieärmer. Dieses Phänomen bezeichnet man als *Stokes Shift*. Statt einen Großteil der Energie ungenutzt wieder zu emittieren, kann das angeregte Molekül $^1\text{PS}^*$ aber auch ins sogenannte *Intersystem Crossing* (ISC) eingehen, wobei es innerhalb des Moleküls zu einer Spinumkehr von Elektronen kommt. Dadurch geht das Molekül in den etwas energieärmeren Triplettzustand $^3\text{PS}^*$ über. Auch von diesem Energieniveau aus kann das Molekül unter Emission von Licht wieder in den Grundzustand zurückfallen, was dann als Phosphoreszenz bezeichnet wird. Da der Triplettzustand langlebiger als der Singulettzustand ist, kann er mit Molekülen in der direkten Umgebung zwei Typen von Reaktionen eingehen [61]:

Typ 1: Hierunter versteht man den direkten Elektronentransfer von einem Substratmolekül auf den Photosensibilisator, wodurch ein hochreaktives kationisches Substratradikal $X^{\cdot+}$ und ein anionisches Photosensibilisatorradikal $PS^{\cdot-}$ entstehen. $PS^{\cdot-}$ kann mit molekularem Triplett-Sauerstoff 3O_2 reagieren, und durch Elektronenübertragung wird der PS im Grundzustand zurückerhalten, während aus 3O_2 ein Superoxidradikal $O_2^{\cdot-}$ entsteht, das enzymatisch katalysiert durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) weiterreagiert. Dies wiederum kann entweder enzymatisch durch Katalase zu H_2O und O_2 gespalten werden oder in Gegenwart von zweiwertigem Eisen mittels Fenton Reaktion zu Hydroxidradikalen $HO^{\cdot-}$ zerfallen (siehe Abb. 1.6).

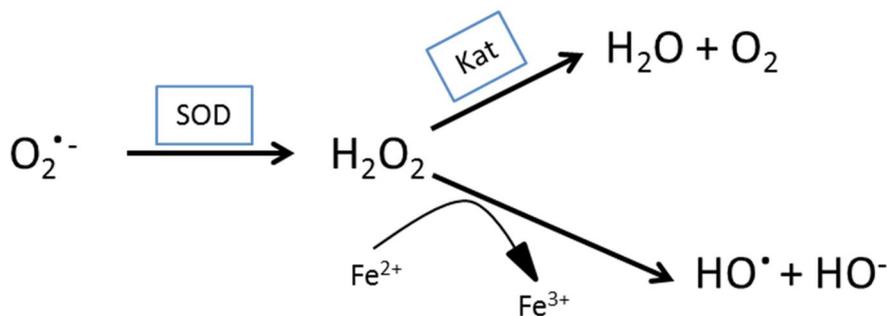


Abb. 1.6: *Reaktive Sauerstoffspezies aus einer Typ 1 Photoreaktion.* Umwandlung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid durch SOD und anschließende Umwandlung des Wasserstoffperoxids. Oben: enzymatisch durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff. Unten: Unter Einwirkung zweiwertiger Metallionen in der Fenton-Reaktion zu einem Hydroxylradikal und einem Hydroxylanion.

Typ 2: Hierbei wird die Triplettenergie von $^3PS^*$ direkt auf 3O_2 übertragen, wodurch der energiereiche und hochreaktive Singulett-Sauerstoff 1O_2 entsteht.

Der Anteil der absorbierten Photonen, die über den angeregten Singulettzustand und ISC zum Triplettzustand führen, nennt man die Triplett-Quantenausbeute. Der Teil der absorbierten Photonen, der zur Bildung von 1O_2 führt, wird als Singulett-Sauerstoff Ausbeute bezeichnet. Der Anteil der absorbierten Photonen, der in Form von elektromagnetischer Strahlung direkt aus dem Singulettzustand emittiert wird, wird als Fluoreszenz Quantenausbeute bezeichnet. Das bis hier hin beschriebene Energieschema wird als Jablonski Diagramm bezeichnet und ist in Abbildung 1.7 zu sehen.

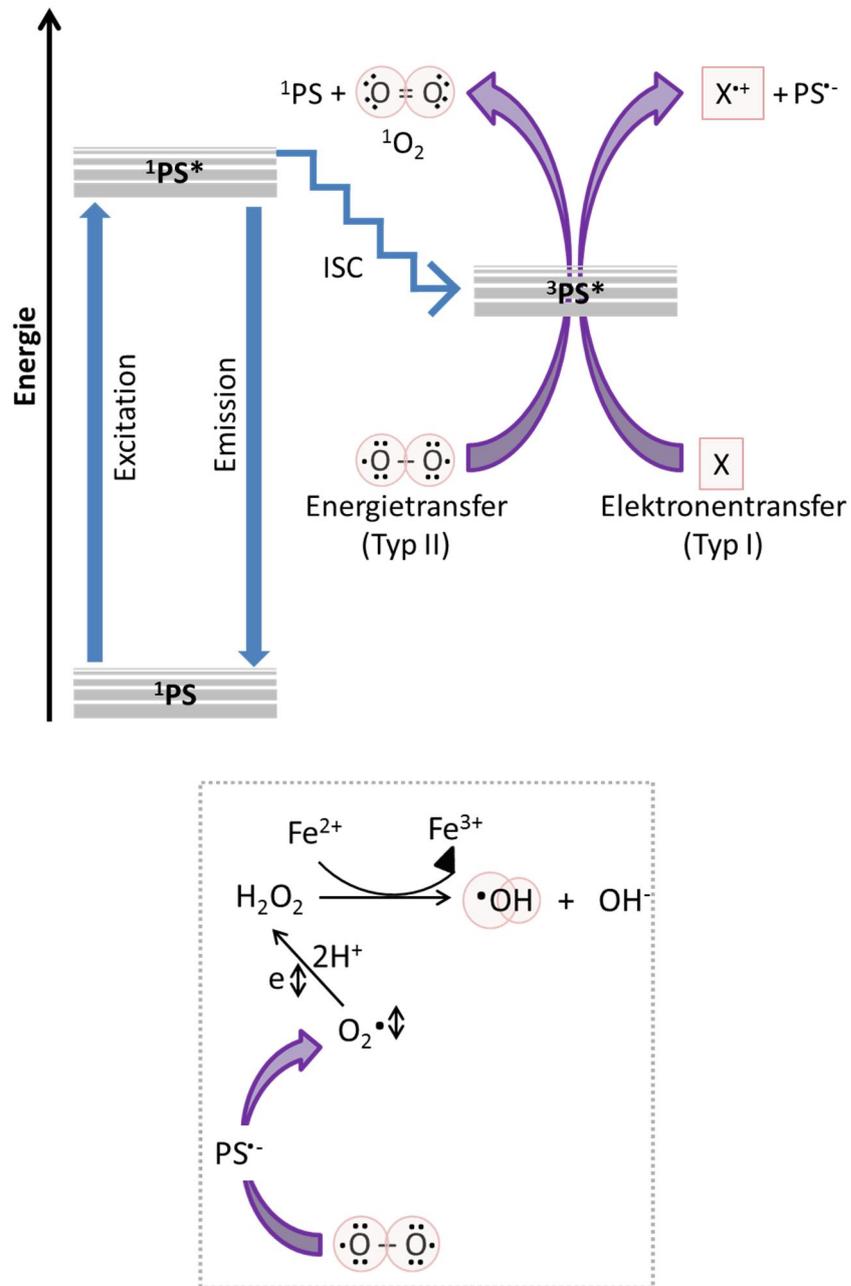


Abb. 1.7: Jablonski Diagramm Oben: Energieschema nach Anregung eines Photosensibilisators (PS) mit Licht. Der angeregte Photosensibilisator kann ein Intersystem crossing (ISC) eingehen und seine Triplettenergie auf Sauerstoff oder andere Moleküle übertragen. Unten: Typ I Reaktion im Detail.

Die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und sonstigen Radikale aus Typ 1 und Typ 2 Reaktion sollen in der PDT genutzt werden, um Zellen im bestrahlten Areal zu töten. Um als Photosensibilisator in der PDT einsetzbar zu sein, müssen verschiedene Kriterien erfüllt werden. Zum einen ist eine hohe Triplett-Quantenausbeute unabdingbar, da der Singulettzustand in der

Regel zu kurzlebig ist, um zu chemischen Reaktionen zu führen. Je nach Applikationsform muss das Molekül eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen. Besonders in der Therapie von Tumoren muss er eine ausreichende Wasserlöslichkeit haben, da die Applikation hier entweder systemisch oder durch intratumorale Injektion erfolgt. Ein weiterer Punkt, der bei der Auswahl eines Photosensibilisators eine wichtige Rolle spielt ist dessen Absorptionswellenlänge. Langwelliges Licht ist in der Lage Gewebe tiefer zu penetrieren als kurzwelliges Licht, deswegen sollte ein Absorptionsmaximum des verwendeten Photosensibilisators zwischen 600 – 800 nm liegen [62]. Gleichzeitig darf das Molekül keinerlei Dunkeltoxizität verursachen. Ein Beispiel, das viele Kriterien erfüllt und bereits in der PDT eingesetzt wird, ist das Hematoporphyrin (Hp) (siehe Abb. 1.8). Mit mehreren Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm, einer relativ guten Löslichkeit in polaren Lösemitteln und einer Triplet-Quantenausbeute von, je nach Lösemittel, zwischen 0,2 und 0,7, sind die Voraussetzungen für die PDT annähernd ideal und Hp wird als Reinsubstanz oder acetyliert als Photofrin® angewandt [63].

Hp gehört zu den Photosensibilisatoren der ersten Generation. Zu den sogenannten Photosensibilisatoren der zweiten Generation gehört zum Beispiel Foscan®. Sie zeichnen sich durch Absorptionsmaxima > 650 nm aus, sind aber häufig immer noch lipophile Substanzen, die im Blut aggregieren und dadurch oft unzureichend bioverfügbar sind. Außerdem führt die Aggregation häufig zu einer niedrigeren Triplet-Quantenausbeute [64], [65]. Um dieses Problem zu lösen, wird an Photosensibilisatoren der dritten Generation gearbeitet. Dabei handelt es sich sowohl um sehr gut wasserlösliche Moleküle, als auch um Konjugate mit Photosensibilisatoren der älteren Generationen, die das Photosensibilisatormolekül gezielt transportieren sollen [66].

Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren detailliert eingegangen.

1.2.1.1 β -Carbolin-Derivate

β -Carboline (β C) sind Alkaloide mit einem *9H*-pyrido[3,4-*b*]-indol Ringsystem. Sie kommen natürlich in vielen Pflanzen vor, aber auch in Insekten und Würmern, sowie in kleinsten Mengen im Blutplasma von Säugern. Viele verschiedene Derivate sind bereits auf deren photophysikalische Eigenschaften und deren phototoxisches Potential untersucht worden [67]–[69]. β Cs absorbieren in einem Bereich von 320 – 380 nm. Das macht sie für einen Einsatz in der photodynamischen

Krebstherapie zwar ungeeignet, sie können hier aber als Modellsubstanz eingesetzt werden, um Albumin als potentielles Transportvehikel zu testen. Von Kooperationspartnern aus dem Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) in Argentinien wurden die Derivate Norharman (nHo) und Harmin (Ha) in der Position 2 mit Propansäure substituiert, wodurch die Substanzen Carboxyethylnorharman (cnHo) und Carboxyethylharmin (cHa) erhalten wurden (siehe Abb. 1.8). cnHo und cHa haben beide eine reaktive Carboxylgruppe, die über eine aliphatische Kette an den Chromophor gebunden ist, so dass sie leicht an Albumin zu koppeln sind. Außerdem entsteht durch die Substitution am Heterozyklus ein quarternisierter Stickstoff. Die positive Ladung delokalisiert über den gesamten Ring, wodurch das Molekül wasserlöslich wird. Es ist dringend notwendig, eine geladene Substanz zur Bindung an Albumin zu verwenden. Ist der eingesetzte Photosensibilisator nämlich zu lipophil, ergibt sich das Problem, dass Albumin große Mengen davon unspezifisch und nicht-kovalent bindet. Diese freien Substanzmoleküle können sich nach längerer Inkubationszeit durch Diffusion in Zellmembranen umverteilen, so dass es nach Bestrahlung zu unspezifischer Rezeptor-unabhängiger Zytotoxizität kommt. In Vorversuchen wurde aus diesem Grund verschiedene Squaraine (siehe Diplomarbeit Kathrin Butzbach [38]) und Hp als für dieses System ungeeignete Photosensibilisatoren erkannt.

Die Eigenschaften von cnHo und cHa sind unterschiedlich und können für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt werden. Während cnHo mit 0,05 eine extrem niedrige Triplett-Quantenausbeute hat, ist die Fluoreszenz Quantenausbeute etwas höher als die von cHa ($\phi_F(\text{cnHo}) = 0,58$). Deswegen ist diese Substanz wegen der extrem niedrigen ROS Produktion für Zytotoxizitätsstudien nicht geeignet, aber durch die starke Fluoreszenz ist sie gut in bildgebenden Verfahren wie der Fluoreszenzmikroskopie anwendbar. Auf der anderen Seite hat cHa eine dreifach höhere Triplett-Quantenausbeute. Für Zytotoxizitätsstudien wird deswegen dieses Derivat verwendet (siehe dazu auch Tab. 5.1).

1.2.1.2 Tetraphenylporphyrin (TPP)

Tetraphenylporphyrin (TPP) (Abbildung 1.8) ist ein hochsymmetrisches Porphyrinderivat mit mehreren Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm. Die Triplett-Quantenausbeute liegt bei ca. 0,11 in DMSO. Da TPP in Wasser völlig unlöslich ist, ist es ohne ein geeignetes Vehikel in der

PDT nicht anwendbar. TPP wird in dieser Arbeit als Modellsubstanz eingesetzt, um modifizierte Dextran-Partikel (siehe Abschnitt 1.1.2.2) als Transportvehikel zu testen.

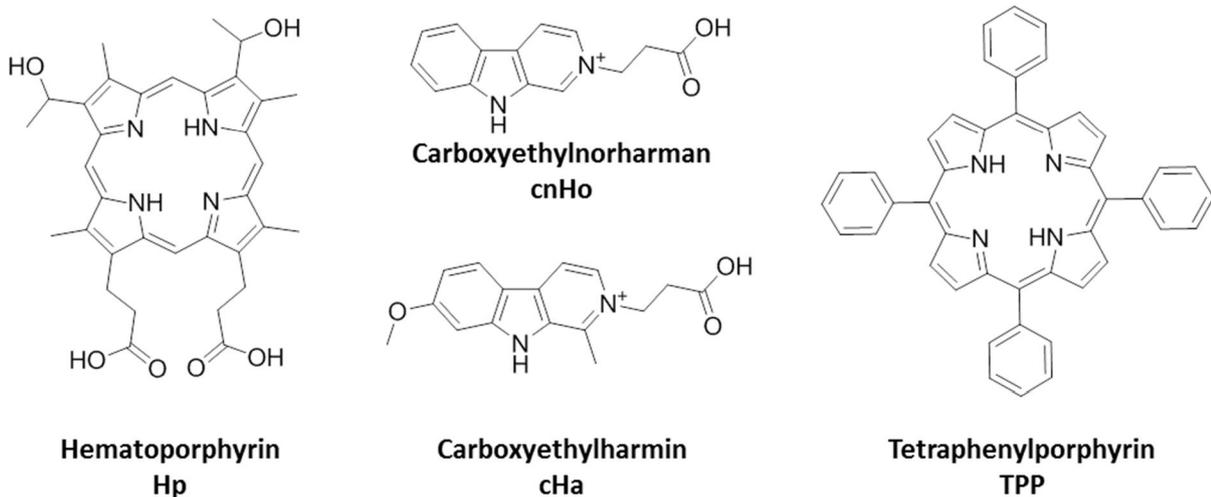


Abb 1.8: *Strukturen von Hämatoporphyrin und weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Photosensibilisatoren. Hp: Modellsubstanz, die in Forschung und Klinik bereits in der PDT eingesetzt wird. cnHo: β-Carbolin-Derivat mit hoher Fluoreszenz Quantenausbeute. cHa: β-Carbolin-Derivat mit hoher Triplett-Quantenausbeute. TPP: Stark hydrophobes Porphyrin-Derivat.*

1.2.2 Anwendungen von Photosensibilisatoren in der photodynamischen Therapie

In der PDT wird dem Patienten eine photosensibilisierende Substanz verabreicht. Dies kann bei dermatologischen Indikationen topisch geschehen, aber auch systemisch, wie häufig im Fall der Tumorthherapie. Nach Applikation des Photosensibilisators wird gewartet, bis er sich auf die eine oder andere Weise im zu behandelnden Gewebe angereichert hat, und bestrahlt dieses Areal anschließend mit einer Lichtquelle geeigneter Wellenlänge. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erklärt, wird wegen der besseren Penetrationsfähigkeit langwelliges sichtbares Licht bevorzugt. Oberhalb von ca. 850 nm hat das Licht nicht mehr genug Energie, um über Anregung des Photosensibilisators eine Produktion von Singulett-Sauerstoff zu bewirken [70].

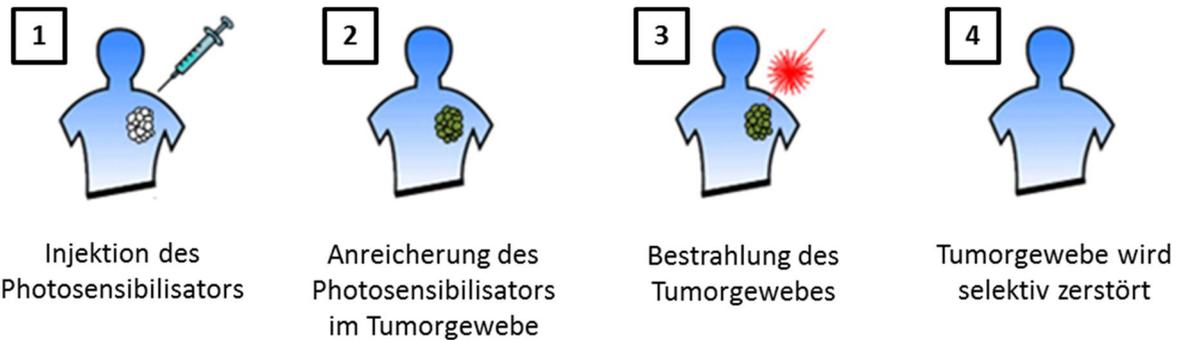


Abb. 1.9: *Prinzip der Photodynamischen Therapie von Krebs.* Der Photosensibilisator wird dem Patienten injiziert (1). Anschließend wird gewartet, bis sich die Substanz im Tumorgewebe angereichert hat (2). Dann wird das Areal, in dem der Tumor sich befindet mit einer Lichtquelle passender Wellenlänge bestrahlt (3). Dieses führt zu einer selektiven Zerstörung des Tumorgewebes (4) (modifiziert nach [71]).

Für eine optimale Energieausnutzung und wegen der leichteren Berechenbarkeit der eingesetzten Energie, wird bevorzugt mit monochromatischen Lichtquellen wie Lasern gearbeitet. Die ROS, die bei der Bestrahlung in Gegenwart von Photosensibilisatoren entstehen haben oft eine kurze Lebensdauer (10 – 130 ns). Der besonders kurzlebige Singulett-Sauerstoff kann in Zellen deswegen auch nur 10 – 100 nm diffundieren, bevor er mit einem der umgebenden Molekülen reagiert [72]–[74]. Die anderen ROS und weiterhin entstehenden Radikale sind etwas stabiler. Je nach Art und Lokalisation der verursachten Oxidationen kann die Zelle auf drei verschiedene Arten auf den Schaden reagieren: Apoptose, Nekrose und Autophagie. Dies hängt außer von der Zellart, der verwendeten Lichtintensität und der chemischen Struktur des Photosensibilisators unter anderem auch von der Art der Applikation und der Verwendung von Transportvehikeln ab. Handelt es sich um ein lipophiles Photosensibilisatormolekül, das frei in die Membran diffundiert, wird durch Schädigung der äußeren Abgrenzungen der Zelle zu einem großen Teil Nekrose ausgelöst. Dabei werden intrazelluläre Bestandteile in den Extrazellularraum freigesetzt. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung des Immunsystems und der Gefahr von schweren Entzündungen im Bereich des Tumors [75]. Durch gezielten Transport des Photosensibilisators ins Zellinnere kann das Verhältnis Richtung Apoptose verschoben werden. Durch Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran (Freisetzung von Proteinen der Bcl-2 Familie) oder Schädigung der DNA (direkte Aktivierung von Caspasen) wird der programmierte Zelltod ausgelöst [76]. Auf diese Weise werden Zellen organisiert und kontrolliert abgebaut. Durch die Expression kleiner Mengen Zytokine und Chemokine werden Makrophagen angelockt, die die Überreste der Zellen beseitigen ohne eine weiterführende Immunreaktion auszulösen. Kommt es zu weitreichenden

intrazellulären Schäden, ohne Auslösung der Apoptose, kann die Zelle geschädigte Bestandteile durch Autophagie abbauen und wiederverwerten. Dadurch kann deren Viabilität entweder wieder hergestellt werden oder sie geht an den Folgen der Schädigung zugrunde [77].

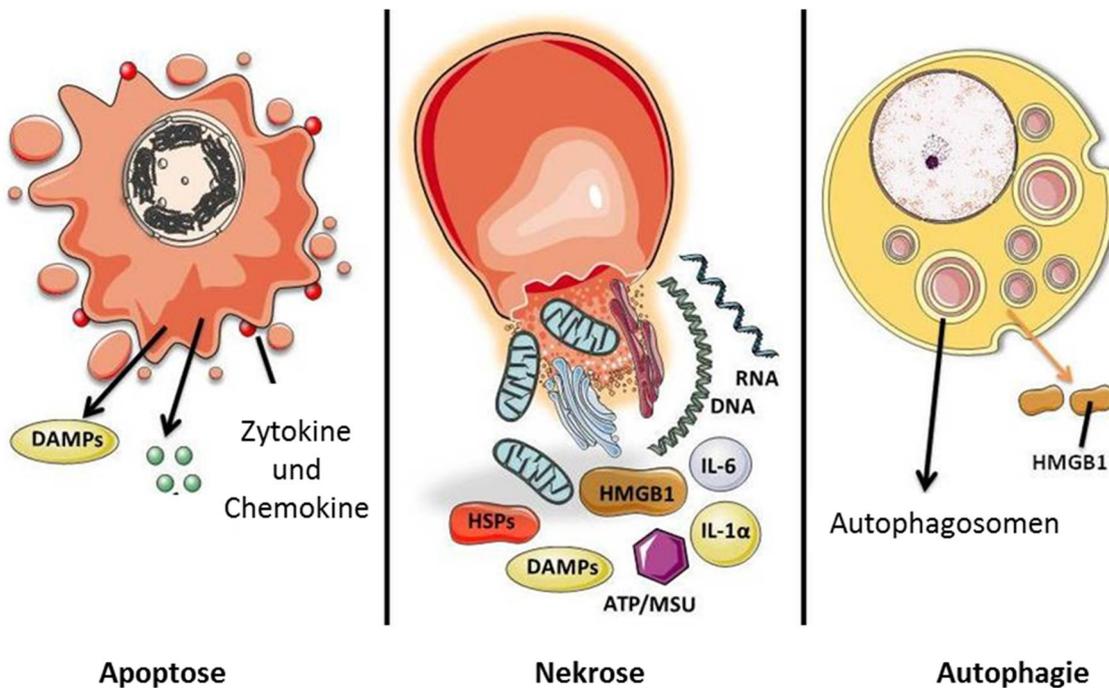


Abb. 1.10: Mögliche Folgen für die Zelle nach der Photodynamischen Therapie. **Apoptose:** die Zelle wird kontrolliert abgebaut und anschließend phagozytiert. **Nekrose:** intrazelluläre Bestandteile gelangen nach außen, wodurch eine unkontrollierte Immunreaktion ausgelöst wird. **Autophagie:** beschädigte Zellkompartimente werden abgebaut und unter Umständen wiederverwertet. Dadurch kann entweder die Zellviabilität zurück erlangt werden oder die Zelle stirbt anschließend. (modifiziert nach [57])

Auf welche Weise die Zelle letztendlich zugrunde geht, hängt aber neben Art und Applikation des Photosensibilisators auch von der Art der Zelle ab [78], was unter anderem auch an der unterschiedlichen Ausstattung mit antioxidativen Molekülen wie GSH und SOD liegt. Besonders Krebszellen haben extrem unterschiedliche Spiegel dieser protektiven Moleküle, und dieser Umstand sorgt dafür, dass es eine sehr große Variabilität in der Sensitivität gegenüber PDT gibt [79]. Interessanterweise sind Endothelzellen offensichtlich besonders sensitiv gegenüber PDT [80]. Dies führt in soliden Tumoren durch die weiter gesteigerte Gefäßpermeabilität zuerst zu einem verstärkten EPR und schließlich zum Zusammenbruch der Tumordurchblutung [81].

1.2.2.1 Photodynamische Krebstherapie in der Praxis

Der gängigste eingesetzte Photosensibilisator ist Photofrin[®], ein Porphyrin-Derivat, das sowohl topisch, als auch systemisch breite Anwendung findet. Ein Nachteil von Photofrin[®] ist jedoch eine langanhaltende Photosensibilisierung der Haut. Diese kann schon nach moderater Lichteinstrahlung zu schweren und schmerzhaften Sonnenbränden führen. Außerdem ist das Mutationsrisiko in den betroffenen Zellen deutlich erhöht. Um diese sehr unangenehmen und gefährlichen Nebenwirkungen zu vermeiden, ist gezieltes Targeting von Photosensibilisatoren in den Tumor notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorselektivität von Photosensibilisatoren durch Konjugation an Liganden tumorspezifischer Strukturen (wie zum Beispiel Folsäure) deutlich verbessert werden kann [82]. Außerdem wurden einige der im vorherigen Kapitel erwähnten Transportvehikel bereits mit Photosensibilisatoren beladen, um eine verbesserte Anreicherung im Tumorgewebe zu erreichen (Review [64]). Einer der ersten Photosensibilisatoren dritter Generation ist eine liposomale Formulierung von Foscan[®] (Foslip[®] [83]). Dabei zeigt die liposomale Formulierung eine deutlich verbesserte Effizienz bei niedrigeren unspezifischen Schäden.

Um ein einfacheres System zu erhalten, wird an Strukturen in Nanometer-Größe geforscht, die selbst einen photosensibilisierenden Effekt auslösen. Dazu zählen unter anderem die sogenannten *Quantum Dots*. Sie haben den zusätzlichen Vorteil, dass sie in der Lage sind, ionisierende Strahlung auf eine bestimmte Region zu konzentrieren, wodurch die niedrige Penetrationsfähigkeit langwelligeren sichtbaren Lichtes umgangen wäre [84].

Es wird mit Nachdruck an verschiedensten Ansätzen zur Optimierung der spezifischen PDT geforscht. Das resultierende Produkt muss eine lange Halbwertszeit haben, um eine Anreicherung im Tumor über den EPR zu gewährleisten. Gleichzeitig darf keine unspezifische Toxizität im Dunkeln auftreten.

1.3 Folsäure

Folsäure (FS) ist ein essentielles Vitamin, das besonders häufig in Hülsenfrüchten und Getreidekeimen vorkommt. Es besteht aus einer Pterin-Einheit, die an Aminobenzoesäure gebunden ist. Die Säurefunktion ergibt sich aus Glutamat, das ein Säureamid mit der Benzoesäure bildet. Die Löslichkeit in Wasser bei physiologischem pH ist relativ niedrig (1,6 mg/L bei 25° C \pm 3,6 mM). Das tiefgelbe Pulver ist instabil gegenüber Licht.

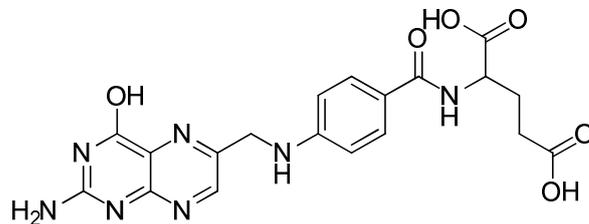


Abb. 1.11: Strukturformel der Folsäure

1.3.1 Physiologischer Nutzen der Folsäure

FS und dessen Derivate zirkulieren durch die Blutbahn und dienen dem Körper als Kofaktoren in der DNA-Basen de novo Synthese. Die Plasmakonzentration liegt bei ca. 6 – 30 nM [85]. Sie kann auf drei verschiedenen Wegen in die Zelle gelangen: über den ubiquitär exprimierten *Reduced folate carrier* (RFC) [11], den Protonen gekoppelten Folat Transporter (PCFT), der besonders in saurem Milieu aktiv ist [86], und den Folat Rezeptor (FR) (siehe dazu Abschnitt 1.1.1.1 und Review [87]). Während der FR α ein endozytischer Rezeptor ist und deswegen auch größere an FS gebundene Moleküle aufnehmen kann, handelt es sich beim RFC und beim PCFT um Transporter, die FS und dessen Abkömmlinge nur frei transportieren können. Während es sich im Falle vom RFC um aktiven ATP-abhängigen Transport handelt, ist der PCFT ein Protonen-gekoppelter Synporter. Im Zytosol wird FS durch die hochaffine Dihydrofolatreduktase (DHFR) metabolisiert, wobei sie innerhalb von zwei Schritten zuerst zur Dihydrofolsäure (DHF) und dann zur Tetrahydrofolsäure (THF) reduziert wird (siehe Abbildung 1.12). THF wird als Kofaktor

(Kohlenstoffdonor) in der de novo Synthese von DNA Basen benötigt und ist notwendig bei der Umsetzung von Homocystein zu Methionin.

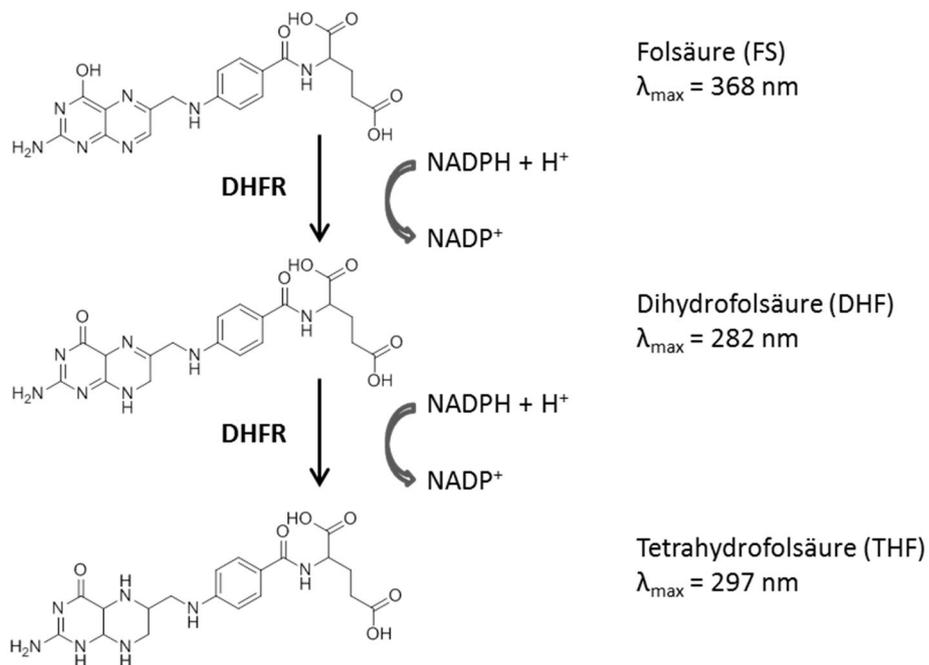


Abb. 1.12: Metabolismus der Folsäure Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) reduziert die Folsäure in zwei Schritten zuerst zur Dihydrofolsäure (DHF) dann zur Tetrahydrofolsäure (THF). Dabei wird das Absorptionsmaximum kurzwelliger. [88]

Der Bedarf an FS ist in Krebszellen durch die gesteigerte Proliferationsrate und den dadurch ausgelösten höheren Nährstoffbedarf signifikant höher als in normalen Zellen und wird häufig durch die Hochregulation des FR α gedeckt. FS kommt wegen seiner Instabilität gegenüber Licht nur in Spuren in Lebensmitteln vor. Deutlich häufiger ist die bereits reduzierte Form 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-methyl-THF) in Hülsenfrüchten, Getreiden und Gemüsen zu finden.

Folsäuremangel kann unangenehme und sogar schwerwiegende Folgen haben. Gängige Symptome sind Konzentrationsstörungen und depressive Verstimmung. Außerdem steigt durch Folsäuremangel die Homocysteinkonzentration im Blut, was die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie Arteriosklerose begünstigt [89]. Da FS ein wichtiger Kofaktor während der Zellteilung darstellt, ist sie während des Wachstums besonders wichtig. Vor und während einer Schwangerschaft sollten Frauen deshalb FS supplementieren, um Neuralrohr Defekten oder anderen schweren Fehlbildungen des Neugeborenen vorzubeugen [90]. Gleichzeitig darf dabei

nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei THF um ein Methylierungsmittel handelt, was die Vermutung nahelegt, dass es in der frühkindlichen Entwicklung Einfluss auf epigenetische Faktoren nehmen kann [91], [92]. Es gibt Studien, die belegen, dass eine höhere FS Konzentration im mütterlichen Blut sowohl mit einer erhöhten Prävalenz für Insulinresistenz [93] und atopischer Dermatitis [94] beim Neugeborenen als auch mit einem erhöhten Asthmarisiko im Kleinkindalter [95] korreliert.

In den Folsäurestoffwechsel kann auch therapeutisch eingegriffen werden. Um Zellwachstum zu inhibieren, kann die DHFR mit Methotrexat (MTX) inhibiert werden. Dadurch wird die Reduktion der FS verhindert und THF steht nicht mehr als Kofaktor zur Verfügung. Auf diese Weise kann die Proliferation von Tumorzellen bei Krebserkrankungen oder von T- und B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen verlangsamt und sogar gestoppt werden [96], [97]. Dabei ist die Affinität von MTX zur DHFR ungefähr vergleichbar zu der von FS, aber deutlich höher als die von DHF. Auch wenn die Verwendung von MTX und anderer sogenannter Antifolate eine gängige und erfolgreiche Methode in der Krebstherapie darstellt, konnte auf der anderen Seite gezeigt werden, dass FS Mangel in Mäusen eine erhöhte Darmkrebsinzidenz zur Folge hat [98]. Eine mögliche Erklärung ist, dass FS eine wichtige Rolle in der Regulation der Polymerase β (Pol β) nach Basenoxidentationen spielt. Durch Folsäuremangel kommt es deswegen zu einem Ungleichgewicht in der Basen Excisionsreparatur (BER). Dies hat eine schlechtere DNA-Reparatur und somit eine höhere Anfälligkeit für Mutationen zur Folge [99]. Die Möglichkeit, dass Folsäuremangel ein gesteigertes Krebsrisiko zur Folge hat, wird kontrovers diskutiert.

1.3.2 Photochemie der Folsäure

FS ist ein intensiv gelbes Pulver. Wie aus Abbildung 1.13 zu entnehmen, liegt ein Absorptionsmaximum in neutraler wässriger Lösung bei 368 nm. Dieses Maximum wird durch die Pterin-Untereinheit des Moleküls verursacht. Das Absorptionsmaximum der Aminobenzoessäure-Untereinheit liegt bei 280 – 290 nm [100].

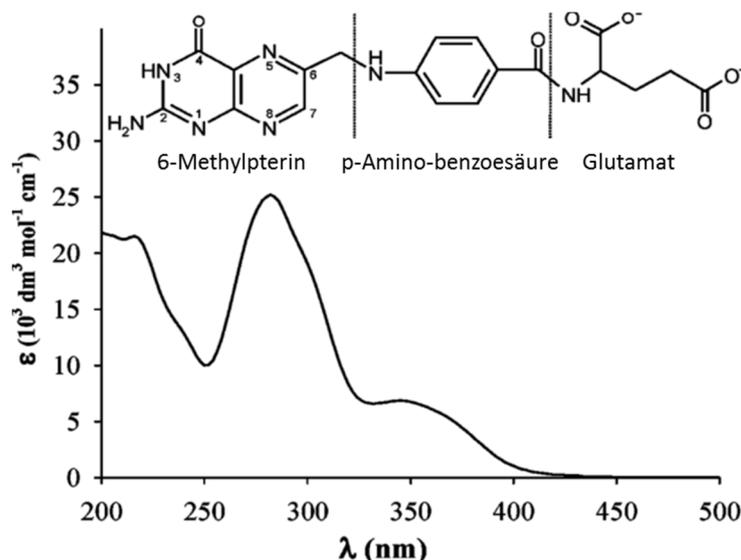


Abb. 1.13: Absorptionsspektrum von Folsäure (modifiziert nach [101])

Wie bereits erwähnt, ist FS instabil gegenüber Licht, was bedeutet, dass es besonders in Lösung schnell zu photoinduzierten Reaktionen kommt. Bei Bestrahlung mit UVA in Gegenwart von Sauerstoff kommt es zu einer Oxidationsreaktion. Die Aminbindung zwischen Pterin und Aminobenzoesäure wird gespalten, wobei 6-Formylpterin (6-Fop) entsteht. Das aromatische System bleibt dabei intakt, und 6-Fop hat eine höhere Quantenausbeute ($\phi = 0,04$), als FS ($\phi = 0,025$). Anschließend kommt es während der Bestrahlung zu einer weiteren Oxidationsreaktion zum 6-Carboxypterin (6-Cap), dessen Quantenausbeute wieder niedriger ist. Als Nebenprodukt des zweiten Oxidationsschrittes entsteht Wasserstoffperoxid. In Abwesenheit von Sauerstoff finden diese Reaktionsschritte nicht statt und das Folsäuremolekül bleibt unverändert [102]. Die Entstehung des Wasserstoffperoxides im zweiten Oxidationsschritt hat eine interessante Auswirkung auf die Lichtreaktion der Folsäure, da es katalytisch auf den ersten Oxidationsschritt wirkt. Während die Oxidation von FS zu 6-Fop zuerst relativ langsam verläuft, und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist, geschieht die Oxidation zu 6-Cap sehr schnell. Durch das Wasserstoffperoxid wird die anfänglich langsam verlaufende Reaktion autokatalytisch beschleunigt [101] (siehe Abb. 1.14).

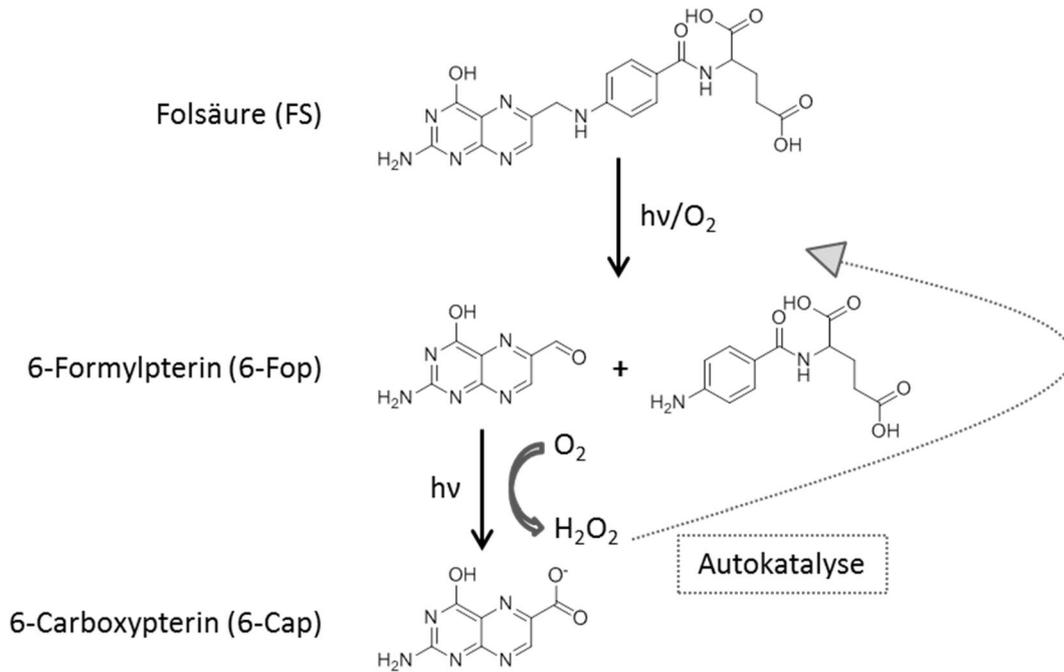


Abb. 1.14: *Photolyse der Folsäure* Unter Bestrahlung mit Licht von ca. 370 nm wird Folsäure (FS) erst zur 6-Formylpterin (6-Fop) und dann zu 6-Carboxypterin (6-Cap) oxidiert. Im zweiten Oxidationsschritt entsteht Wasserstoffperoxid, das autokatalytisch auf die erste Reaktion wirkt.[88]

Neben dem Wasserstoffperoxid entstehen während der Reaktion noch andere ROS, wie zum Beispiel Superoxidradikale, als Nebenprodukte, die in der Lage sind umliegende Moleküle zu oxidieren (siehe dazu auch Abschnitt 1.2.2). Es konnte gezeigt werden, dass unter UVA Bestrahlung in Gegenwart verschiedener Pterin-Derivate Plasmid-DNA oxidiert wird [103] während ohne Bestrahlung kein Effekt zu erkennen war [104]. In Zellen wurde dies bis dato noch nicht gezeigt. Deswegen werden in dieser Arbeit unter anderem die photogeno- und photozytotoxischen Wirkungen der Folsäure untersucht.

2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein System zu entwickeln, um Photosensibilisatoren gezielt in Folsäure-Rezeptor α (FR α) überexprimierende Zellen zu transportieren, wobei gleichzeitig die Voraussetzungen erfüllt sein sollen, um später in einem krebsbefallenem Organismus den *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) Effekt ausnutzen zu können. Trotz umfassender Forschung auf dem Gebiet des Medikamenten-*Targetings* in der PDT wurde bisher noch keine Kombination aus einem Folsäure-Albumin-Konjugat und einem Photosensibilisator veröffentlicht. Auch die hier untersuchten Dextran-Partikel wurden noch nicht für die aktive Adressierung von Tumorgewebe und den spezifischen Transport von Photosensibilisatoren eingesetzt. In dieser Arbeit sollen beide Systeme auf deren FR α spezifische Zellaufnahme und dadurch vermittelte bestrahlungsabhängige Zytotoxizität hin untersucht werden. Außerdem werden photochemische Parameter bestimmt.

Durch den therapeutischen Einsatz von Folsäure-gekoppelten Nanopartikeln, die mit Photosensibilisatoren beladen sind, soll Tumorspezifität durch die Größe des Moleküls, Zellspezifität durch den FR α und Ortspezifität durch ausschließliche Bestrahlung des tumornahen Gewebes erreicht werden. Sind diese drei Anforderungen erfüllt, sollte dadurch eine extrem milde Chemotherapie mit minimalen Nebenwirkungen möglich werden.

Zusätzlich zu den Eigenschaften der Folsäure als Targeting Molekül sollen die potentiell adversen Wirkungen von großen Dosen Folsäure unter Lichteinfluss auf DNA und verschiedene Zelllinien untersucht werden. Hierzu werden dessen Photozyto- und Photogenotoxizität bestimmt.

3 Materialien:

3.1 Verwendete Geräte:

Brutschränke CO₂-Inkubator BB16,

BB6060 O₂ und Hera-Cell

Heraeus Instruments; Hanau

Z2™ Coulter Counter®

Beckman Coulter Inc.; Fullerton, USA

Cytospin 3

Shandon by Thermo Fisher Scientific; Osterode

Durchflusscytometer (FACScalibur™)

BD Bioscience; Heidelberg

Fluorimeter LS 45

Perkin Elmer; Rodgau

Fluoreszenzmikroskop (nicht konfokal)

Eclipse E400 mit Kamera DS-Qi1MC + DS43

mit NIS-Elements BR 3.2 Software

Nikon Instruments Europe B.V.; Düsseldorf

Fluoreszenzmikroskop (konfokal) TCS SP5

mit Leica Application Suite X software

Leica Microsystems; Wetzlar

GelDoc XR+ mit Image Lab™ Software

Bio-Rad; Hercules, USA

Lampe: Videolight 6

Kaiser Phototechnik GmbH und Co KG; Buchen

mit 1000 W Halogenlampe GX 6,35

Osram GmbH; Augsburg

Lampe: UVA HQV 125 W

Osram GmbH; Augsburg

Lichtmikroskop Telaval 31

Zeiss; Oberkochen

Magnetrührer

Ikamag® Ret-G

MALDI-TOF MS Axima-CFR mit gepulstem	
Stickstofflaser ($\lambda=337$ nm, 3 ns)	Shimazu Deutschland GmbH; Duisburg
Microplatereader Victor™ X5	Perkin Elmer; Rodgau
pH-Meter MultiCal® WTW	Labotec; Wiesbaden
Photometer Biowave S2100	Biochrom; Camebridge, England
Pipetus-akku® Pipettierhilfe	Hirschmann™ Laborgeräte; Eberstadt
Power Pac 300	Bio-Rad; Hercules, USA
Präzisionsküvetten: 10 mm 114-QS und	
1,5 mm 105.252-QS	Hellma GmbH und Co., KG; Mühlheim
Schwenker GFL 3015	Hartenstein Laborversand; Würzburg
Spectrofluorometer FP-6500	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH; Umstadt
Spectrophotometer V-650	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH; Umstadt
Vortexer Genie 2, Model G-560°	Scientific Industries, INC, Bohemia; N.Y., USA
Präzisions-Waage PB 602	Mettler Toledo; Gießen
Analysen-Waage AG 245	Mettler Toledo; Gießen
Analysen-Waage Excellence Plus	Mettler Toledo; Gießen
Sterile Werkbank LaminAir® HB 2472	
und HB 2448	Heraeus Instruments GmbH; Hanau
Universal 320R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen
Universal K25 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen
Optima LE-80K Ultra-Zentrifuge	Beckmann Instruments Inc.; Palo Alto, USA
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf; Hamburg

3.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon Tubes 15 mL und 50 mL	Greiner Bio-ONE; Frickenhausen
Deckgläschen (Nr. 1,5)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 30 kDa, Breite 25 mm)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Objektträger	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Polycarbonatfilter: Isopore Membranfilter (2,0 µm)	Merck Millipore; Schwalbach
Zentrifugationsmembran Centriprep® Centrifugal Filter 30 kD	Merck Millipore; Schwalbach
Zentrifugationsmembran Amicon Ultra® 0,5 mL 30 kDa	Merck Millipore; Schwalbach
6-, 12-Well-Platten	Nunc GmbH & Co. KG; Wiesbaden
96-Well-Platten (flatbottom)	Nunc GmbH & Co. KG; Wiesbaden
25 cm ² -, 75 cm ² -, 175 cm ² -Zellkulturflaschen	Greiner Bio-ONE; Frickenhausen

3.3 Chemikalien:

Agarose	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad Lab. GmbH; Hercules, USA
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ * 2 H ₂ O)	Merck KGaA; Darmstadt
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe

1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl)- carbodiimid (CMC)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Dinatriummethyldiamintetraessigsäure (Na ₂ H ₂ EDTA)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA; Darmstadt
Ethanol, absolut	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Folsäure	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Glucose	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat Dihydrat (KH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ * 6 H ₂ O)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Sephadex G15	Pharmacia Fine Chemicals AB, S
Sephadex G75	Pharmacia Fine Chemicals AB, S
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad Lab. GmbH; Hercules, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe

3.4 Puffer und Arbeitslösungen

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	Rotiphorese Gel 30® Carl Roth GmbH; Karlsruhe
BE ₁	2,423 g Tris, 5,844 g NaCl, 0,2922 g EDTA auf 1 L Wasser, Einstellung mit HCl konz. auf pH 7,5
BE ₁₅	2,423 g Tris, 5,844 g NaCl, 4,3836 g EDTA auf 1 L Wasser, Einstellung mit HCl konz. auf pH 7,5
BioRad® Farbreagenz	BioRad Laboratories GmbH; Hercules, USA
DMEM, High Glucose	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Elutionspuffer (alkalische Elution)	5,84 g EDTA auf 1 L Wasser, Einstellung mit TEAH-Lösung 20 % auf pH 12,1 – 12,2 (ca. 60 mL; 24 h rühren, bis pH- Wert konstant)
Fällungsreagenz	95 mL Ethanol; 5 mL 2,5 M Natriumacetat-Lösung, Eingestellt auf pH 7,2
Foetal Bovine Serum "GOLD"	Gibco by Life Technologies; Darmstadt
Immersionsöl	Nikon Instruments Europe B.V.; Düsseldorf
L-Glutamin 200 mM	Gibco by Life Technologies; Darmstadt

Ladepuffer	2 mL Tris HCl pH 8,5; 8 mL 20 % SDS; 5 mL Glycerol; 1,6 mL beta-Mercaptoethanol; 3,4 mL H ₂ O dest.; 50 mg Bromphenolblau; auf 20 mL H ₂ O dest.
Lysepuffer (alkalische Elution)	20 g SDS, 7,5 g Glycin, 7,44 g Na ₂ H ₂ EDTA auf 1 L Wasser, Einstellung mit 10 N NaOH auf pH 10 (nicht autoklavieren)
LysoTracker® Red	Life Technologies, Darmstadt
Non-essential Aminoacids	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH; Schnelldorf
Marker PageRuler® prestained	Fermentas Life Sciences, Leon-Rot; Deutschland
Mounting Medium ProLong® Gold antifade regent	Life Technologies; Darmstadt
Mounting Medium mit DAPI	Vectashield; Petersborough, England
PBSCMF	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O auf 1 L Wasser, pH muss bei 7,4 liegen (+/- 0,1)
PBS	Lösung 1: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O auf 500 mL H ₂ O dest., einstellen auf pH 7,4 mit 1 N NaOH Lösung 2: 0,1325 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O, 0,1 g MgCl ₂ * 6 H ₂ O auf 500 mL H ₂ O dest. Lösungen nach Autoklavieren und Abkühlen vereinigen
PBS-Glucose	PBS plus: 1 g Glucose, 3,25 mL Natrium-Pyruvat-Lösung nach dem Autoklavieren zu Lösung 2 geben und in Lösung 1 steril filtrieren
Penicillin/Streptomycin	Gibco by Life Technologies; Darmstadt
Phosphatpuffer (pH 6,8; 8,4)	10 mM K ₂ HPO ₄ , 50 mM NaCl, pH einstellen mit NaOH
Phosphatpuffer pH 6,0 (alk. Elution)	12,12 g NaH ₂ PO ₄ , 2,17 g Na ₂ HPO ₄ ; pH-Wert muss nicht eingestellt werden
Phosphatpuffer pH 7,2 (alk. Elution)	3,86 g NaH ₂ PO ₄ , 12,82 g Na ₂ HPO ₄ ; pH-Wert muss nicht eingestellt werden
PM2-Puffer (PP 7,4)	10 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, einstellen auf pH 7,4
Pyruvat	Gibco by Life Technologies; Darmstadt
RPMI 1640 Medium	Gibco by Life Technologies; Darmstadt

TAE-Puffer (10x)	0,4 M Tris, 0,01 M Na ₂ EDTA, 0,2 M Essigsäure, Einstellen des pH auf 8,5 +/- 0,2
Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung (20 %) (TEAH)	Merck Millipore; Schwalbach
Trypsin-EDTA	Gibco by Life Technologies; Darmstadt
Ultra Tris (1,5 M pH 6,8)	36,3 g Tris Ultra auf 200 mL H ₂ O dest.
Waschpuffer (alkalische Elution)	7,44 g Na ₂ H ₂ EDTA, Einstellung mit 10 N NaOH auf pH 10
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim

3.5 Enzyme

	Substrat/Erkannte Läsionen	Bezogen von
Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Rohextrakt)	8-Hydroxyguanin (8-oxo-G), AP-Läsionen, Formamidopyrimidine (Fapy)	Expression im E.coli Stamm JM105 mit dem Plasmid pFPG239 [105]
Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (rein)	8-Hydroxyguanin (8-oxo-G), AP-Läsionen, Formamidopyrimidine (Fapy)	Prof. Boiteux, Fontenay aus Roses, Frankreich
Katalase	H ₂ O ₂ -> H ₂ O + O ₂	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH
Proteinase K	Serinprotease	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Superoxiddismutase	O ₂ ²⁻ -> H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH
T4-endonukleaseV	AP-Läsionen, Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD)	Expression im E.coli Stamm A32480 mit dem Plasmid ptac-denV [106]

3.6 Zelllinien:

3.6.1 KB

Humane Nasopharynxkarzinom-Zelllinie

Bezogen von CLS (cell line service), Eppelheim. Kultiviert in DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Verdopplungszeit ca. 24 h.

3.6.2 HeLa

Humane Zervixkarzinom-Zelllinie

Bezogen von der Arbeitsgruppe Prof. Wiesner, Universität Köln. Kultiviert in DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Verdopplungszeit ca. 20 h.

3.6.3 M2IV/04

Humane Melanom-Zelllinie

Bezogen von der Elbeklinik, Buxtehude. Kultiviert in RPMI-Medium supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Verdopplungszeit ca. 24 h.

3.6.4 HaCaT

Humane immortalisierte Keratinozyten Zelllinie

Bezogen von der Arbeitsgruppe von Prof. Fusenig, Universität Heidelberg. Kultiviert in DMEM supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Verdopplungszeit ca. 48 h.

3.7 Antikörper

Folate receptor α mAb (Mov18/Zel); ALX-804-439R100

Enzo Life Sciences, Lörrach

Gt anti-ms IgG1 (h & ms Ig adsorbed) (FITC);

ALX-211-200-C100

Enzo Life Sciences, Lörrach

4 Methoden

4.1 Grundlegende Techniken zum Arbeiten in Zellkultur

4.1.1 Kultivieren von Säugerzellen

Das Arbeiten mit Säugerzellen wird an einer Sterilbank mit sterilisierten Materialien durchgeführt. Deren Inkubation erfolgt in einem Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂. Die Zelllinien wurden in den oben angegebenen Medien kultiviert. Das Passagieren erfolgt nach spätestens vier Tagen oder bei Erreichen der Konfluenz. Dazu wird das Kulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit je derselben Menge warmen PBSCMF gewaschen und je nach Größe der Zellkulturflasche eine bestimmter Menge Trypsin-EDTA-Lösung (25 cm²: 1 mL; 75 cm²: 2 mL; 175 cm²: 5 mL) zugegeben. Nach kurzer Inkubation im Brutschrank – je nach Zelllinie 3 - 7 Minuten – sind die Zellen abgelöst und werden in frischem, warmem Kulturmedium aufgenommen, vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturflaschen aufgeteilt.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Um Zellen einzufrieren wurde diese wie oben beschrieben mit PBSCMF gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung versehen. Die abgelösten Zellen wurden mit kühlem Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 10 mL verdünnt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 4° C, 1200 rpm). Nach Abgießen den Überstandes wird das Pellet vorsichtig und langsam in kaltem Einfriermedium (Kulturmedium + 10 % DMSO) resuspendiert. Die Suspension wird in Aliquots von je ca. 1,8 mL in Einfrierröhrchen eingeteilt. Die Menge an Medium wird so gewählt, dass sich in jedem Aliquot ca. 2 Mio. Zellen befinden. Die Einfrierröhrchen werden zuerst zwei Stunden bei -20° C aufbewahrt, dann für ca. 24 h bei -70° C und dann zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wird eines der Aliquots schnell in ca. 20 mL kaltes Kulturmedium gegeben und abzentrifugiert (5 min; 4° C, 1200 rpm), um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wird abgeschüttet und das Zellpellet vorsichtig in 5 mL warmen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben.

4.2 Darstellung der BSA- β -Carbolin- und der BSA- β -Carbolin-Folat-Konjugate

4.2.1 BSA- β -Carbolin-Konjugate (A β C)

BSA (Endkonzentration 10 mg/mL equivalent zu 150 μ M) wurde in Wasser gelöst und in der Gegenwart von 1,5 mM N²-Carboxyethyl-norharman (cnHo) bzw. N²-Carboxyethyl-harmin (cHa) mit jeweils 5 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 5 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) für 24 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend gegen PBS dialysiert (Ausschlussgröße MW > 30 kDa) und dann über eine Centriprep[®] Membran aufkonzentriert (Ausschlussgröße MW > 30 kDa) und mehrfach mit PBS gewaschen. Nachdem das Filtrat keine β -Carbolin-Fluoreszenz mehr aufwies, wurde das Produkt mit Wasser gewaschen und lyophilisiert bei 4° C aufbewahrt.

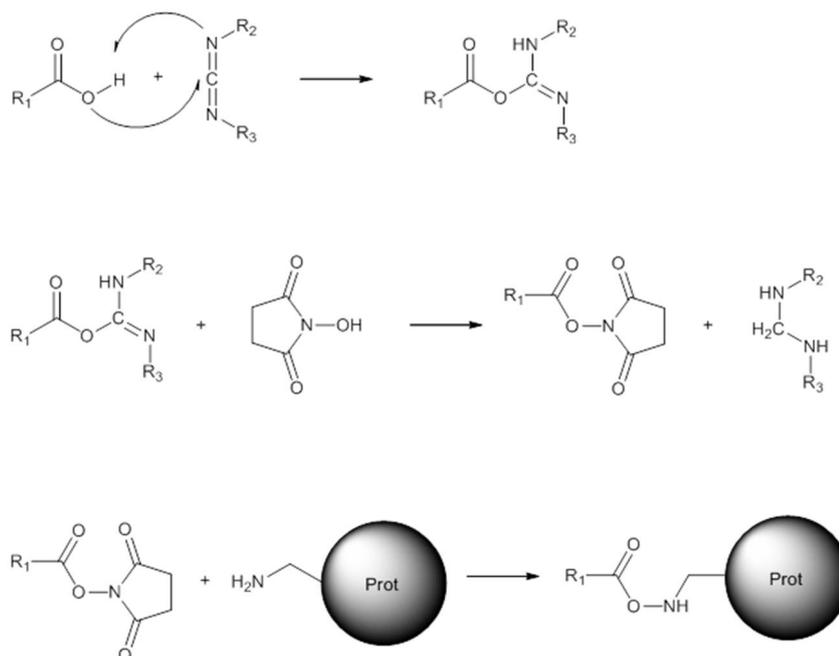


Abb. 4.1: *Carbodiimid Kupplung Mechanismus der Bindungsbildung zwischen einer Carbonsäure und einem primären Amin mit einem Carbodiimid als Kupplungsreagenz*

4.2.2 BSA- β -Carbolin-Folat-Konjugate (A β CF)

A β C wurde nach der Vorschrift von Fischer et. al [107] mit Folsäure konjugiert. Hierfür wurde A β C in Wasser gelöst (20 mg/mL) und mit 30 Äquivalenten Folsäure (5 mg/mL Endkonzentration; gelöst in der minimalen Menge 0,1 N NaOH) versetzt. Der pH wurde auf ca. 6,5 eingestellt und die Lösung anschließend mit 45 Äquivalenten *N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide-metho-*p*-toluenesulfonat (CMC) (gelöst in der minimalen Menge Wasser) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde gegen PBS dialysiert (Ausschlussgröße MW > 30 kDa) und dann über eine Centriprep® Membran aufkonzentriert (Ausschlussgröße MW > 30 kDa) und mehrfach mit PBS gewaschen. Nachdem das Filtrat keine Folsäure-Absorption mehr aufwies, wurde das Produkt mit Wasser gewaschen und lyophilisiert bei 4° C aufbewahrt.

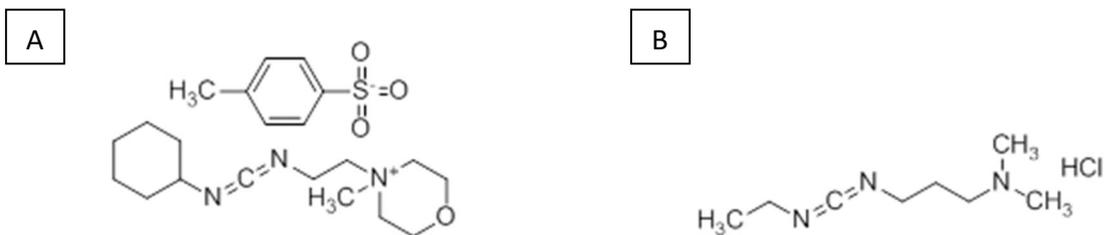


Abb. 4.2: *Verwendete Carbodiimid-Derivate zur Kupplung von Folsäure und β -Carbolinen an Albumin.* A: *N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate (CMC) B: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)

4.3 Analytik der BSA-Konjugate

4.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgt mittels einer Kalibriergerade mit BSA. Dafür werden Lösungen angesetzt, die 0 bis 10 μ g BSA pro 800 μ L Wasser enthalten. Diese werden mit je 200 μ L Biorad-Farbreagenz versetzt intensiv homogenisiert und ca. 5 Minuten inkubiert. Das Farbreagenz bildet mit Proteinen einen blauen Komplex. Die Blaufärbung ist proportional zur Proteinmenge, was eine quantitative, photometrische Bestimmung bei 595 nm möglich macht. Von der zu bestimmenden Probe werden verschiedene Verdünnungen angesetzt und davon jeweils 800 μ L

mit 200 μL Farbreagenz versehen. Mithilfe der Kalibriergrade kann der Proteingehalt in der Probenlösung berechnet werden.

4.3.2 Photometrische Folat-Bestimmung

Zur Bestimmung der Folsäure-Menge in den Proben wurde ebenfalls eine Kalibriergrade verwendet. Es wurden Lösungen mit Konzentrationen von 0 bis 300 μM angefertigt und deren Absorption bei 368 nm aufgenommen. Von den Probelösungen wurden verschiedene Verdünnungen angefertigt und deren Absorption gemessen. Anhand der Kalibriergrade konnte der Folsäure-Gehalt der Proben bestimmt werden. Durch Vergleichen des BSA-Gehaltes mit dem Folsäure-Gehalt konnte die Anzahl an Folat-Resten pro Molekül BSA bestimmt werden.

4.3.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die lyophilisierten Proben wurden in Acetonitril/TFA 0,1 % (1:1) in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst. 5 μL dieser Probenlösung wurden mit 25 μL der Matixlösung ($c = 10 \text{ mg/mL}$) vermischt. Als Matrix diente Sinapinsäure. Die Messungen wurden mit einem Shimadzu Axima CFR MALDI-TOF Massenspektrometer mit gepulsten Stickstofflaser ($\lambda=337 \text{ nm}$, 3 ns) durchgeführt.

4.4 Bestimmung der Zelltoxizität

4.4.1 Proliferation

Durch Bestimmung des Proliferationsfaktors von Zellen kann die zytotoxische Wirkung von Substanzen quantifiziert werden. Hierfür wurden KB Zellen in 6 Well Platten ausgestreut (150.000 pro Well) und über Nacht kultiviert. Zum Zeitpunkt der Schädigung wurde auf einer Kontrollplatte die Zellzahl zu Beginn der Proliferation bestimmt. Für die Schädigung mit Folsäure wurden die Zellen zuerst gewaschen und dann in aufsteigende Folsäure-Konzentrationen in PBSCMF versehen. Die Zellen wurden zusammen mit der Lösung 15 min im Brutschrank inkubiert und

anschließend mit oder ohne Cut-Off-Filter (<400 nm) mit sichtbarem Licht bestrahlt (Halogenlampe, 1000W; 33 cm, 15 min, auf Eis), während die Dunkelkontrolle in diesem Zeitraum im Dunkeln auf Eis stand. Teilweise wurden Vorinkubation und Bestrahlung in Gegenwart von Katalase (315 U/mL) durchgeführt. Um die Wirkung von Methotrexat (MTX) zu testen, wurde vor der Inkubation mit Folsäure zuerst eine Stunde mit MTX (100 µM) in PBS inkubiert. Der Rest der Schädigung erfolgte wie bereits beschrieben. Anschließend wurden die Zellen wieder gewaschen und mit Vollmedium versehen. Nach 72 h wurden die Zellen gezählt und der Proliferationsfaktor aus Start- und Endzellzahl bestimmt. Zum Zählen der Zellen wird das Medium abgenommen, mit jeweils 2 mL PBSCMF gewaschen und mit 450 µL Trypsin-Lösung versetzt. Nach 3 – 5 min Inkubation im Brutschrank bei 37° C sind die Zellen abgelöst und das Well wird mit jeweils 550 µL Medium versetzt. Die Zellen in jedem Well werden gründlich resuspendiert und die Zellzahl am Coulter Counter® bestimmt.

4.4.2 WST-1 Assay

Der WST-1-Assay ist ein Assay zur Bestimmung der Zellvitalität. Im WST-1 Reagenz befindet sich ein hell rotes Tetrazolium-Salz in phosphatgepufferter steriler Lösung. Das Testprinzip beruht darauf, dass das leicht rote Tetrazolium-Salz in Gegenwart intakter mitochondrialer Enzyme in das gelbe Formazan gespalten wird:

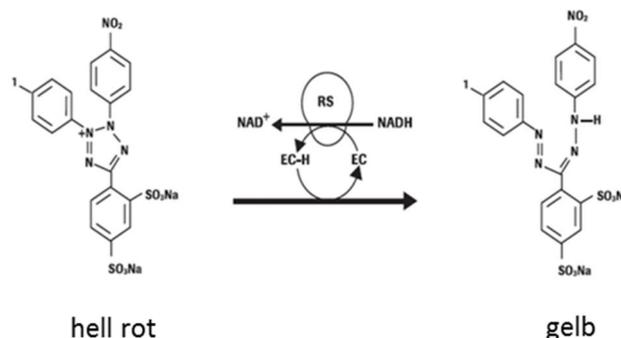


Abb. 4.3: Enzymatische Reaktion des WST-1-Reagenz zum gelben, detektierbaren Formazan

Sind viele vitale Zellen vorhanden, kommt es zu verstärkter Formazanbildung und somit zur Farbvertiefung. Die Absorption bei 450 nm ist somit direkt proportional zur Zahl der vitalen Zellen. Der Assay wird in 96 Well-*flatbottom*-Platten durchgeführt, und das Auslesen der Platten erfolgt an einem ELISA *Microplate Reader*.

Schädigung mit β -Carbolin und dessen Konjugaten: Es wurden 7000 KB Zellen pro Well ausgestreut und über Nacht kultiviert. Zur Schädigung wird das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und mit aufsteigenden Konzentrationen β -Carbolins oder dessen Konjugaten in PBS versehen. Nach 90 min (bzw. 30 oder 180 min) Vorinkubation wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen erneut gewaschen und in sauberem PBSCMF mit UVA bestrahlt (365 nm, 10 cm, 20 min, auf Eis; äquivalent zu 338 kJ/m²; siehe Abb. 4.4). Der Versuch wurde sowohl ohne als auch mit 1 mM Folsäure in der Vorinkubationslösung durchgeführt.

Schädigung mit Dextran-Partikeln: Es wurden 5000 KB Zellen pro Well ausgestreut und über Nacht kultiviert. Zur Schädigung wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und mit aufsteigenden Konzentrationen der unterschiedlichen Dextran-Partikel in Vollmedium versehen. Dies geschah 24 h, 6 h und 1,5 h vor der Bestrahlung. Anschließend wurden von allen Wells gleichzeitig die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und die Platten in sauberem Medium mit sichtbarem Licht bestrahlt (Halogenlampe, 1000W; 33 cm, 15 min, auf Eis; äquivalent zu 338 kJ/m²). Der Versuch wurde sowohl ohne als auch mit 1 mM Folsäure in der Vorinkubationslösung durchgeführt.

Schädigung mit Folsäure: Es wurden 7000 KB Zellen pro Well ausgestreut und über Nacht kultiviert. Zur Schädigung wird das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und mit aufsteigenden Konzentrationen Folsäure in PBS versehen. Die Zellen wurden zusammen mit der Lösung 15 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit oder ohne Cut-Off-Filter (<400 nm) mit sichtbarem Licht bestrahlt (Halogenlampe, 1000W; 33 cm, 15 min, auf Eis). Teilweise wurden Vorinkubation und Bestrahlung in Gegenwart von Katalase (315 U/mL) durchgeführt. Um die Wirkung von Methotrexat (MTX) zu testen, wurde vor der Inkubation mit Folsäure zuerst eine Stunde mit MTX (100 μ M) in PBS inkubiert. Der Rest der Schädigung erfolgte wie oben beschrieben.

In jedem der beschriebenen Fälle wurde eine Dunkelkontrolle angefertigt, die sich während der Bestrahlung im Dunkeln auf Eis befand. Nach den jeweiligen Schädigungen wurden die Zellen erneut gewaschen und mit WST-1 Reagenz in serumfreiem und phenolrotfreiem Medium

versehen. Die Absorption wurde direkt nach der Schädigung und exakt zwei Stunden nach der ersten Messung erfasst und miteinander verrechnet.

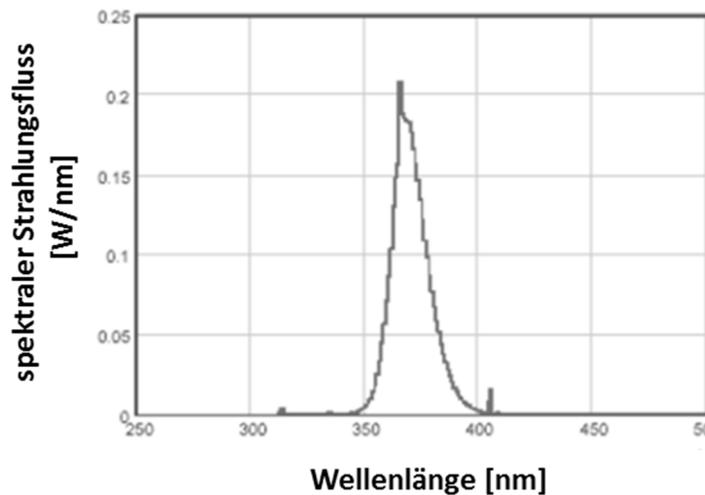


Abb. 4.4: Emissionsspektrum der verwendeten UVA Lampe Osram HQV 125

4.5 Fluoreszenzmikroskopie

4.5.1 Nicht-konfokal

Mittels nicht-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie können fluoreszierende Substanzen innerhalb von Zellen sichtbar gemacht werden.

KB Zellen wurden in 12 Well Platten auf Deckgläschen ausgetreut (10^5 pro Well) und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit PBSCMF gewaschen und mit den entsprechenden Partikellösungen in Medium versehen und inkubiert. Nach Ende der Vorinkubationszeit wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen mit PBSCMF gewaschen und mit eiskaltem Paraformaldehyd (PFA, 4 % in PBSCMF) fixiert (10 min, 4 °C). Das PFA wurde abgenommen und die Präparate ein weiteres Mal mit PBSCMF gewaschen. Für jedes Präparat wurde ein Objektträger vorbereitet und mit 10 μ L Mounting Medium mit DAPI versehen. Die fixierten Deckgläschen

wurden aus den 12 Well Platten entnommen und mit den Zellen nach unten auf den Objektträger gelegt und über Nacht unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert.

Verwendet wurde ein Eclipse E400 Fluoreszenzmikroskop. Die Anregung erfolgt mittels einer Quecksilberdampfampe und Bandenfiltern. DAPI wurde mit einem Excitationsfilter angeregt, der Licht im Bereich von 330 - 380 nm passieren lässt. TPP und FITC wurden mit Licht von 460 - 490 nm angeregt. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mittels der Kamera-Software am Mikroskop (NIS-Elements BR 3.2) und Image J.

4.5.2 Konfokal

Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie können Aufnahme und Lokalisation fluoreszierender Konjugate in Zellen und mittels Immunofluoreszenz gefärbte Strukturen wie der Folsäure-Rezeptor sichtbar gemacht werden. Hierbei können Bilder mit höherer Auflösung erhalten werden, als bei der nicht-konfokalen Mikroskopie, da hier nur das Licht einer bestimmten Ebene detektiert wird.

KB Zellen wurden in 12 Well Platten auf Deckgläschen ausgetreut (10^5 pro Well) und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit PBSCMF gewaschen und mit den entsprechenden Konjugatlösungen in PBS versehen und inkubiert. Nach Ende der Vorinkubationszeit wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen mit PBSCMF gewaschen und mit eiskaltem Paraformaldehyd (PFA, 4 % in PBSCMF) fixiert (10 min, 4 °C). Das PFA wurde abgenommen und die Präparate ein weiteres Mal mit PBSCMF gewaschen. Die letzten 30 min vor der Fixierung wurden die Proben mit LysoTracker® Red Lösung versehen (50 nM), wobei darauf geachtet werden musste, dass die Konjugat Konzentration dabei konstant blieb. Für jedes Präparat wurde ein Objektträger vorbereitet und mit 10 µL Mounting Medium ProLong Gold® Antifade versehen. Die fixierten Deckgläschen wurden aus den 12 Well Platten entnommen und mit den Zellen nach unten auf den Objektträger gelegt. Die Präparate werden zum Aushärten 48 h unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert.

Verwendet wurde ein konfokales TCS SP5 Fluoreszenzmikroskop mit Leica Application Suite X Software. Zur Anregung der β -Carbolin-Fluoreszenz wurde der 405 nm Laser verwendet, für LysoTracker® Red der Laser mit 566 nm. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mittels der Kamera-Software am Mikroskop und Image J.

4.6 Quantifikation von DNA-Schäden

4.6.1 PM2 Assay

Beim PM2 Assay wird die DNA-schädigende Wirkung von Substanzen gemessen. Dazu wird die DNA des Bakteriophagen PM2 verwendet [108]. Werden durch die Testsubstanz Einzelstrangbrüche verursacht, geht die PM2-DNA von der superhelikalen Form in die relaxierte offen zirkuläre Form über. Die superhelikale Form läuft im Agarosegel weiter als die offen zirkuläre, wodurch die Quantifizierung von Einzelstrangbrüchen möglich ist. Um andere DNA-Modifikationen quantifizieren zu können, wird das Plasmid nach der Schädigung mit Reparaturoendonukleasen inkubiert, die die DNA an ihrem Substrat einschneiden und so einen Einzelstrangbruch erzeugen [109].

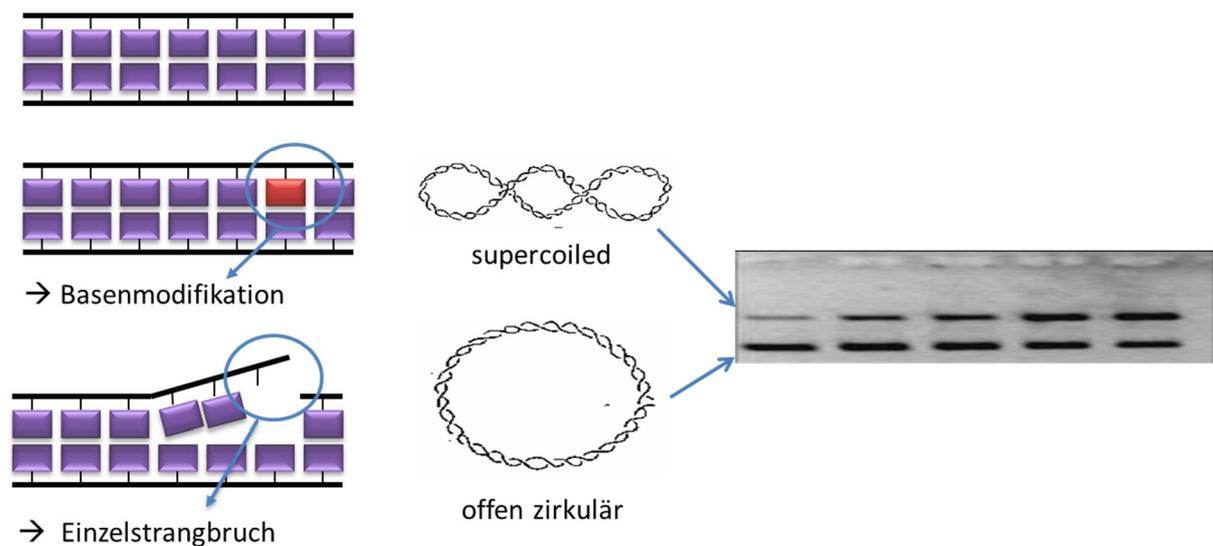


Abb. 4.5: Prinzip des PM2 DNA-Relaxationsassays

Die DNA-Konzentration in Phosphatpuffer (PPI $\frac{1}{2}$) während der Schädigung beträgt $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. Für jede Spur, die im Gel analysiert werden soll, werden $0,2 \mu\text{g}$ DNA eingesetzt.

Schädigung mit β -Carbolin und dessen Konjugat: Die PM2 DNA wird in Gegenwart aufsteigender β -Carbolin- oder Konjugat-Konzentrationen mit UVA bestrahlt (365 nm, 10 cm, 20 min, auf Eis; äquivalent zu $30 \text{ kJ}/\text{m}^2$; siehe Abb. 4.4). Für die Schädigung mit dem mit Proteinase K verdauten

Konjugat wurde eine kleine Menge Konjugat-Lösung (40 μM) zusammen mit Proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für eine Stunde bei 37° C inkubiert und dann aufgekocht, um die Aktivität der Proteinase K zu beenden. Diese Lösung wurde dann 10 μM verwendet und zusammen mit PM2 DNA bestrahlt.

Schädigung mit Folsäure (Konzentrationsabhängigkeit): Die PM2 DNA wurde in Gegenwart aufsteigender Folsäure-Konzentrationen sowohl mit sichtbarem Licht (Halogenlampe, 1000W; 33 cm, 15 min, auf Eis; äquivalent zu 338 kJ/m^2), als auch mit UVA (365 nm, 10 cm, 20 min, auf Eis; äquivalent zu 30 kJ/m^2 ; siehe Abb. 4.4) bestrahlt.

Schädigung mit Folsäure (Zeitabhängigkeit): Die PM2 DNA wurde in Gegenwart von 20 μM Folsäure mit sichtbarem Licht für unterschiedliche Zeiträume bestrahlt (Halogenlampe, 33 cm, auf Eis). Derselbe Versuch wurde in Gegenwart von Katalase (315 U/mL) in der Bestrahlungslösung durchgeführt.

In allen Versuchen wurden zusätzlich Dunkelkontrollen angefertigt, die während der jeweiligen Bestrahlung im Dunkeln auf Eis gelagert wurden.

Im Anschluss an die Schädigungen wurde zu den Probelösungen die 2,5 fache Menge einer Fällungslösung gegeben (1,25 M Natriumacetat in Ethanol) und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert, wobei die DNA ausfällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (14000 rpm, 20 min, 4° C) und mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, um das schädigende Agens abzutrennen. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden in BE1-Puffer aufgenommen (DNA-Konzentration 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), sorgfältig resuspendiert und in verschiedene Ansätze zu je 20 μL aufgeteilt. Die Ansätze für die verschiedenen Enzyminkubationen wurden mit jeweils 10 μL des gewünschten Enzyms mit einer Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in BE1/BSA (0,1 mg/mL) bzw. BE15/BSA (0,1 mg/mL) im Falle der T4 Endonuklease V versehen. Die Caps zur Bestimmung der direkten Einzelstrangbrüche wurden mit 10 μL reinem BE1/BSA (0,1 mg/mL) versetzt. Alle Caps wurden für 30 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 μL Stoppuffer (0,5 % SDS) zugegeben und die Proben auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt. Über das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Bande der superhelikalen Form zur offen zirkulären Form kann die Anzahl der vorhandenen Einzelstrangbrüche quantifiziert werden. Dazu geht man davon aus, dass die Verteilung der Einzelstrangbrüche in der DNA einer Poisson-Verteilung folgt. Über die Fluoreszenz-Intensitäten

der auftretenden Banden kann über folgende Formeln die durchschnittliche Anzahl N der Einzelstrangbrüche pro PM2-Molekül bestimmt werden:

$$N = -\ln \alpha$$

$$\alpha = \frac{\text{superhelikale DNA}}{(\text{relaxierte DNA} \times (1 \div 1,4)) + \text{superhelikale DNA}}$$

4.6.2 Alkalische Elution

Die Alkalische Elution ist eine Methode zur Detektion intrazellulärer DNA Einzelstrangbrüche [110]. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass einzelsträngige DNA je nach Anzahl der vorhandenen Einzelstrangbrüche unterschiedlich lange Stücke bildet, die dann durch einen Polycarbonatfilter (2 μm Porengröße) eluiert werden. Kürzere Stücke, und somit stärker geschädigte DNA, werden schneller eluiert als längere Stücke. Die Menge an DNA in den aufgefangenen Fraktionen kann anschließend in gepufferter Bisbenzimid-Lösung (Hoechst 33258) fluorimetrisch bestimmt und anhand dessen die Elutionsgeschwindigkeit errechnet werden. Durch Modifikation der Methode mit verschiedenen Reperaturendonukleasen können nicht nur direkte Einzelstrangbrüche quantifiziert werden, sondern auch unterschiedliche Basenmodifikationen, die von den Enzymen erkannt und in einen Einzelstrangbruch überführt werden [111]. Die Methode ist extrem sensitiv und kann Einzelstrangbrüche bis zu einer unteren Nachweisgrenze von ca. 0,05 Läsionen/ 10^6 Basenpaaren detektieren.

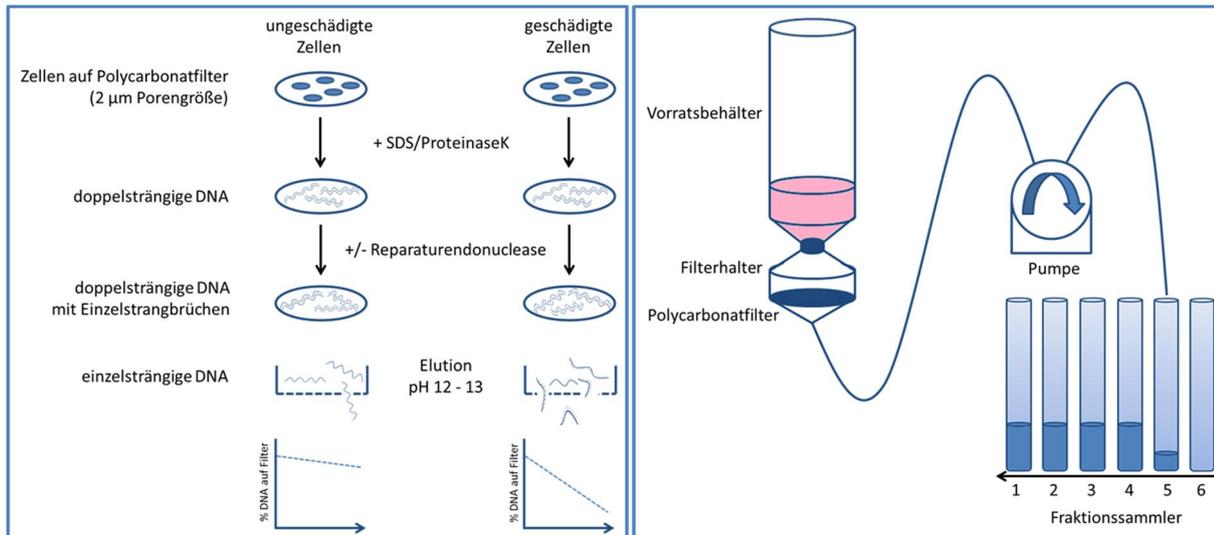


Abb. 4.6: *Prinzip der alkalischen Elution*

Um die Anzahl der intrazellulären DNA Läsionen quantifizieren zu können, werden 1 – 1,5 Mio der zu untersuchenden Zellen in Suspension in einen Vorratsbehälter gegeben, der am unteren Ende mit dem Polycarbonatfilter in einem Filterhalter verbunden ist. Angestrebt wird eine Menge von 10 µg DNA pro Filter. Durch langsames Abpumpen des Mediums werden die Zellen gleichmäßig auf den Filter gesaugt und mit PBSCMF gewaschen. Die Zellen werden nun mit einem SDS (2 %) und Proteinase K (400 mg/L)-haltigen Lysepuffer (pH 10) über 90 min bei 25° C lysiert. Die nun frei vorliegende doppelsträngige DNA muss vor der Enzyminkubation von allen Rückständen des Lysepuffers befreit werden und wird deshalb mehrmals mit PBSCMF gewaschen. Anschließend wird mit einer Endonuklease-Lösung (1 µg/mL) in BE1/BSA (0,5 mg/mL) für 50 min bei 37° C inkubiert. Ausnahme bildet die T4 EndonukleaseV, die in BE15/BSA (0,5 mg/mL) gelöst wird. Als Vergleich wird ein weiterer Filter mit identischen Zellen nur mit Puffer inkubiert, um die Anzahl der direkten Einzelstrangbrüche quantifizieren zu können. Die nun vorliegende DNA weist nun Enzym induzierte Einzelstrangbrüche an den Stellen auf, an denen sich vorher eine DNA Modifikation befunden hat. Sie wird mit Waschpuffer (pH 10) gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer (pH 12 - 13) versehen. Durch den hohen pH-Wert wird die DNA einzelsträngig und die unterschiedlich großen Stücke werden nun bei konstanter Geschwindigkeit langsam durch den Filter in sechs Fraktionen eluiert. Die Filter werden ausgebaut und in der sechsten Fraktion für 90 min bei 60° C geschüttelt, um die großen, nicht eluierten DNA Stücke in Lösung zu bringen. Diese Fraktionen werden nach abgeschlossener Elution und Auswaschen der Filter mit einem Phosphatpuffer (pH 6) neutralisiert, wobei sich die vorliegenden Einzelstränge zu Doppelsträngen

zusammenlagern. Anschließend wird Bisbenzimid-Lösung (H33258) in Phosphatpuffer (pH 7,2) hinzugegeben, das in die DNA interkaliert. Die fluorimetrische Messung erfolgt bei einer Excitation von 360 nm und einer Emission von 450 nm. Eine Kalibrierung mit γ -Strahlen (6 Gy = 1 Läsionen/ 10^6 Basenpaare) (KOHN et al. 1976) ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Schäden.

Es wurden in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) 3 Mio Zellen pro Flaschen ausgestreut und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und mit aufsteigenden Folsäure-Konzentrationen in PBS versehen. Sie wurden zusammen mit der Lösung 15 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit sichtbarem Licht bestrahlt (Halogenlampe, 1000W; 33 cm, 15 min, auf Eis; äquivalent zu 338 kJ/m²). In den meisten Fällen wurden Vorinkubation und Bestrahlung in Gegenwart von Katalase (315 U/mL) durchgeführt. Um den Einfluss von Methotrexat (MTX) zu bestimmen, wurde vor der Inkubation mit Folsäure zuerst eine Stunde mit MTX (100 μ M) in PBS inkubiert. Der Rest der Schädigung erfolgte wie gehabt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen unmittelbar gewaschen, mit Trypsin abgelöst, gezählt und auf die alkalische Elution aufgetragen.

4.7 Bestimmung von Mikrokernen

KB Zellen wurden in 6-Well Platten ausgestreut (400.000 Zellen pro Well) und über Nacht inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und mit steigenden Folsäure-Konzentrationen in Gegenwart von Katalase (315 U/mL) versehen. Sie wurden zusammen mit der Lösung 15 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit sichtbarem Licht bestrahlt (Halogenlampe, 1000W; 33 cm, 15 min, auf Eis; äquivalent zu 338 kJ/m²). Um den Einfluss von Methotrexat (MTX) zu untersuchen, wurde vor der Inkubation mit Folsäure zuerst eine Stunde mit MTX (100 μ M) in PBS inkubiert. Der Rest der Schädigung erfolgte wie in vorangegangenen Abschnitten beschrieben. Außerdem wurden jeweils entsprechende Dunkelkontrollen angefertigt, die während der Bestrahlung der korrespondierenden Proben im Dunkeln auf Eis gelagert wurden. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen erneut gewaschen, mit Vollmedium versehen und ca. 24 h (entspricht ca. einer Zellteilung) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und in einem Gesamtvolumen von 1 mL Medium resuspendiert. Ein Tropfen der Suspension wurde mittels Cytospin auf Objektträger aufgeschleudert. Die Objektträger wurden in ein eiskaltes Methanolbad

überführt und die Zellen somit fixiert. Die DNA wurde mittels Bisbenzimid (H33258) sichtbar gemacht. Am Fluoreszenzmikroskop konnte die Anzahl der Mikrokerne pro tausend Kerne bestimmt werden [67].

4.8 Proliferationskurven

Es wurden von jeder Zelllinie in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²) jeweils 200.000 Zellen pro Flasche ausgestreut und 6 h kultiviert. Danach wurden alle Flaschen entweder für 1 mit MTX (100 µM) in PBS oder in reinem PBS inkubiert. Jeweils eine Flasche wurde als Startzellzahl gezählt, die anderen wurden mit Vollmedium versehen und im Brutschrank inkubiert. Alle 24 h wurde von jedem Ansatz jeweils eine Zellzahl mittels Coulter Counter bestimmt und mit Hilfe der Startzellzahl der Proliferationsfaktor berechnet.

4.9 Durchflusszytometrie

4.9.1 Quantifizierung des FR α

Es wurden 3 Mio Zellen aus einer Zellsuspension entnommen, abzentrifugiert, in 600 µL eiskaltem PBSCMF aufgenommen und dann mit 600 µL eiskaltem PFA (4 %) versehen. Die Zellen standen 15 min auf Eis und wurden dann erneut abzentrifugiert und in PBSCMF aufgenommen. Die Ansätze wurden gedrittelt, um folgende Inkubationen durchführen zu können:

- Kontrolle ohne Antikörper
- Nur sekundärer Antikörper
- Primärer und sekundärer Antikörper

Der Primärantikörper gegen den FR α (ALX-804-439R100) wurde 1:500 verdünnt eingesetzt. Pro Pellet wurden 500 µL angewendet und die Proben 30 min auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet mit PBSCMF gewaschen. Der FITC-konjugierte Sekundärantikörper gegen IgG (ALX-211-200-C100) wurde 1:100 verdünnt eingesetzt. Zu jedem Pellet wurden 200 µL gegeben und erneut 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden zweimal gewaschen, in Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer auf deren FITC-Fluoreszenz quantifiziert.

4.9.2 Quantifizierung der intrazellulären TPP-Fluoreszenz

KB Zellen wurden in 6 Well Platten ($3 \cdot 10^5$ pro Well) ausgestreut und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit PBSCMF gewaschen und mit den entsprechenden Partikellösungen (SpAcDex-TPP, SpAcDex-TPP-FA, AcDex-TPP; 10 µg/mL) in Medium versehen und für 0,5 h, 1,5 h und 3 h inkubiert. Nach Ende der Vorinkubationszeit wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen abgelöst, vereinzelt und mit eiskaltem Paraformaldehyd (PFA, 4 % in PBSCMF) fixiert. Das PFA wurde abzentrifugiert und abgenommen und die Präparate ein weiteres Mal mit PBSCMF gewaschen. Die Proben wurden in PBSCMF mit dem Durchflusszytometer FACScalibur™ vermessen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mittels eines Argon Lasers. Die Emission wurde im Kanal FL3 (670 nm LP) aufgefangen.

5 Ergebnisse

5.1 Aufnahme von Photosensibilisatoren in Zellen über den Folsäure-Rezeptor α (FR α)

Der Folsäure-Rezeptor α (FR α) ist ein endozytotischer Rezeptor, der auf vielen Tumor-Zellen überexprimiert wird, um deren erhöhten Bedarf an Folsäure zu decken (siehe Abschnitt 1.1.1.1). Durch Bindung von therapeutisch interessanten Molekülen oder Nanopartikeln an Folsäure ist es deshalb möglich, diese Tumorzellen spezifisch zu adressieren. Durch die Kupplung großer Moleküle kann im Organismus zusätzlich zum Rezeptor-vermittelten Transport vorher der EPR-Effekt ausgenutzt werden (siehe Abschnitt 1.1.2). Bisher wird diese Art des Targetings zwar für verschiedene Zytostatika angewandt, wird aber noch nicht in der Photodynamischen Therapie (PDT; siehe Abschnitt 1.2) eingesetzt. Ziel der in diesem Abschnitt 5.1 beschriebenen Experimente war es Albumin- β -Carbolin-Konjugate und Tetraphenylporphyrin (TPP)-beladenen Dextran-Partikel an Folsäure zu koppeln und deren Rezeptor-vermittelte Aufnahme in Zellen, sowie deren DNA-schädigendes und zytotoxisches Potential zu untersuchen.

5.1.1 FR α vermittelte Aufnahme von Albumin- β -Carbolin-Konjugaten

β -Carboline sind photoreaktive Naturstoffe, die in vielen Pflanzen und auch im Organismus von Säugern vorkommen. Ihr Absorptionsmaximum liegt mit 320-380 nm im UVA Bereich. Durch Substitution am Stickstoff an Position 2 im Molekül wird dieser quarternisiert, und die daraus resultierende positive Ladung über das gesamte Molekül delokalisiert. Verwendet wurden *N*²-Carboxyethyl-norharman (cnHo) und *N*²-Carboxyethyl-harmin (cHa). Diese Moleküle haben eine reaktive Carboxylgruppe, um eine Kupplung an Albumin zu ermöglichen, und sind geladen, sodass keine unspezifischen Bindungen durch hydrophobe Wechselwirkungen am Albumin zu erwarten sind. Dadurch sind unspezifische Effekte des Photosensibilisators auszuschließen (siehe Abschnitt 1.1.2.1).

5.1.1.1 Herstellung und Analytik der Albumin- β -Carbolin-Konjugate

Im ersten Schritt wurde jeweils das β -Carbolin in einer Reaktion zu einem Aktivester mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) umgewandelt und dann mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) an das Albumin gekuppelt. Das entstehende Produkt wurde anschließend mit Folsäure in Gegenwart von 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl)-carbodiimid (CMC) als Kupplungsreagenz umgesetzt (siehe dazu auch: „Bioconjugation Techniques“, Greg T. Hermanson, Sec. Edition [112] und Abschnitt 4.2). Die entstandenen Konjugate und deren im Folgenden verwendeten Kurznamen sind schematisch in Abb. 5.1 gezeigt.

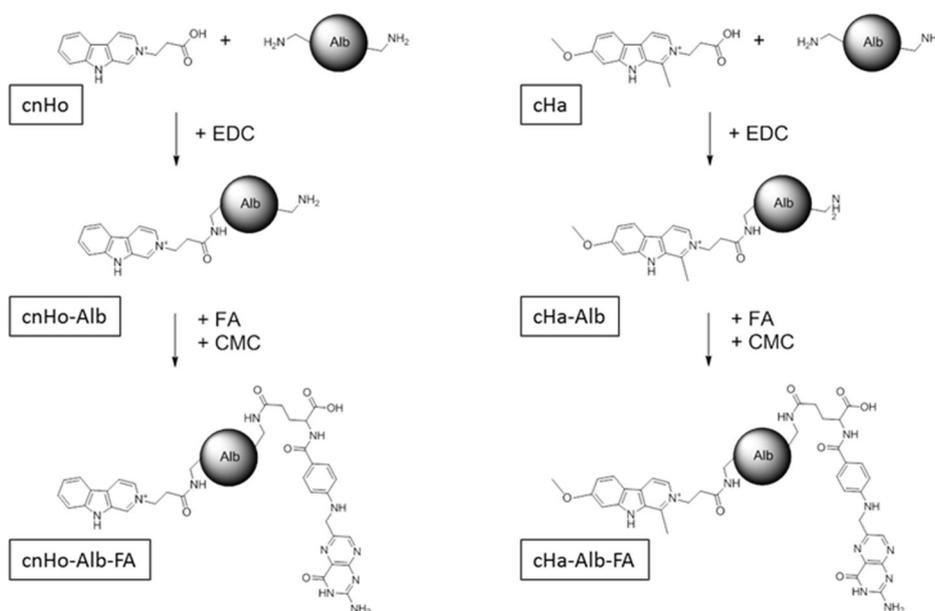


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Konjugat-Synthese. Die β -Carboline wurden jeweils mit dem Kupplungs-Reagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) an Albumin gekoppelt. Dabei entstanden cnHo-Alb und cHa-Alb. Im zweiten Schritt wurde unter Zuhilfenahme von 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl)-carbodiimid (CMC) die Folsäure an die zuvor entstandenen Konjugate gekoppelt, woraus danach cnHo-Alb-FA und cHa-Alb-FA entstanden.

Die vier entstandenen Konjugate sollten auf deren Beladungsverhältnisse hin untersucht werden. Hierfür wurden Proben gefriergetrocknet und mittels MALDI-TOF-MS auf deren Größe untersucht. Die erhaltenen Werte wurden mit reinem Albumin verglichen. Die aufgenommenen Spektren und mittleren Molekülmassen sind in Abb. 5.2 zu sehen.

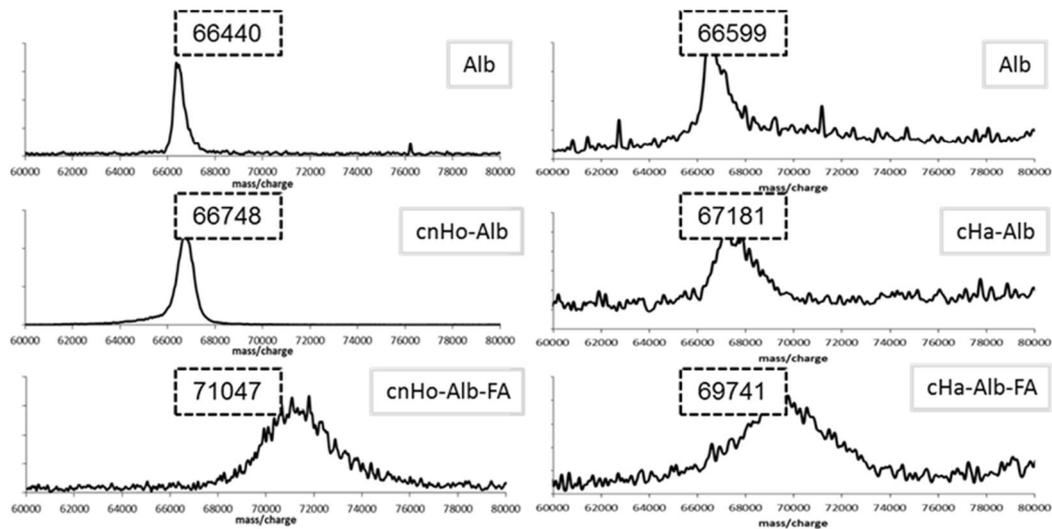


Abb. 5.2: MALDI-TOF-MS der hergestellten Konjugate

Anhand der Massenspektren kann man sehen, dass an jedem Molekül nur ein bis zwei β -Carbolin-Moleküle ($M(\text{cnHo}) = 241,26 \text{ g/mol}$; $M(\text{cHa}) = 285,32 \text{ g/mol}$) gebunden haben. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch die delokalisierte Ladung im Molekül nur ein bis zwei Lysin-Reste auf der Oberfläche des Albumins elektrostatisch zugänglich sind. Pro Molekül Albumin- β -Carbolin binden 6 – 9 Moleküle Folsäure ($M(\text{FS}) = 441,4 \text{ g/mol}$). Dieser Befund stimmt auch mit der photometrischen Quantifikation überein. Hierfür wurde die Protein Konzentration nach Bradford bestimmt und diese mit der photometrisch bestimmten Folsäure Konzentration verglichen. Die β -Carbolin-Konzentration konnte nicht über Absorption oder Fluoreszenz quantifiziert werden, da das Absorptionsmaximum des β -Carbolins mit der Absorption des Albumins überlappt und die Fluoreszenz durch Anwesenheit von Protein gequencht wird. Die aus der MALDI Messung ermittelten Bindungsverhältnisse sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Wegen des großen Fehlers der MALDI Messung bei Molekülen dieser Größe sind die erhaltenen Verhältniszahlen nur als Näherungswerte zu betrachten.

Tab. 5.1: *Bindungsverhältnisse von Folsäure und des verschiedenen β -Carboliden in den verschiedenen Konjugaten.* Die Verhältnisse sind berechnet aus der Differenz zwischen den ermittelten Massen der Konjugate zu deren korrespondierender Albumin-Kontrolle. Dabei wurden folgende Molmassen verwendet: $M(\text{cnHo}) = 241,26 \text{ g/mol}$; $M(\text{cHa}) = 285,32 \text{ g/mol}$; $M(\text{FS}) = 441,4 \text{ g/mol}$.

	β -Carbolin	Folsäure
cnHo-Alb-FA	1,3	9,5
cHa-Alb-FA	2,0	5,8

Die Herstellung der Konjugate aus den beiden verschiedenen β -Carboliden ist deswegen sinnvoll, weil diese unterschiedliche photochemische und photophysikalische Eigenschaften mitbringen (siehe Abschnitt 1.2.1.1). cnHo hat eine höhere Fluoreszenz Quantenausbeute und Lebensdauer bei einer vergleichsweise niedrigen Triplet-Quantenausbeute. Durch die starke Fluoreszenz können die Konjugate mit cnHo für diagnostische und bildgebende Verfahren, wie die Mikroskopie, eingesetzt werden. cHa wiederum hat eine niedrigere Fluoreszenz Quantenausbeute, aber die Triplet-Quantenausbeute ist höher (siehe Tabelle 5.2). Durch die höheren Triplet-Quantenausbeuten von cHa ist bei Bestrahlung eine stärkere ROS-Produktion und daraus folgend eine höhere Zytotoxizität zu erwarten, weshalb für die Zellviabilitätsstudien im WST-1 Assay diese Konjugate verwendet wurden.

Tab. 5.2: *Photophysikalische Daten der verwendeten β -Carbolin-Derivate* Die Werte wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Cabrerizo (Argentinien) bestimmt.

	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Flu}}$ [nm]	ϕ_{F}	τ_{F} [ns]	ϕ_{Δ}
cnHo	374	485	$0,58 \pm 0,02$	$21,9 \pm 0,1$	$0,05 \pm 0,02$
cHa	326	425	$0,42 \pm 0,02$	$6,8 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,02$

5.1.1.2 Mikroskopische Untersuchungen der FR α vermittelten Zellaufnahme

Für die Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Folsäure-gekoppelten Albumin- β -Carbolin-Konjugate am Fluoreszenzmikroskop wurden FR α überexprimierende KB Zellen verwendet. Für alle folgenden Experimente am Mikroskop wurden die Konjugate mit dem stärker fluoreszierenden Norharman-Derivat (cnHo) (siehe Abb. 5.1) eingesetzt. Die Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit $20 \mu\text{M}$ cnHo-Alb und cnHo-Alb-FA für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit eiskaltem PFA (4 %) fixiert, bevor

sie auf Objektträger überführt und am Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Zur Anregung der cnHo Fluoreszenz wurde ein 405 nm Laser verwendet. Detektiert wurde die Emission von 420 – 520 nm. Die erhaltenen Bilder sind in Abb. 5.3 gezeigt.

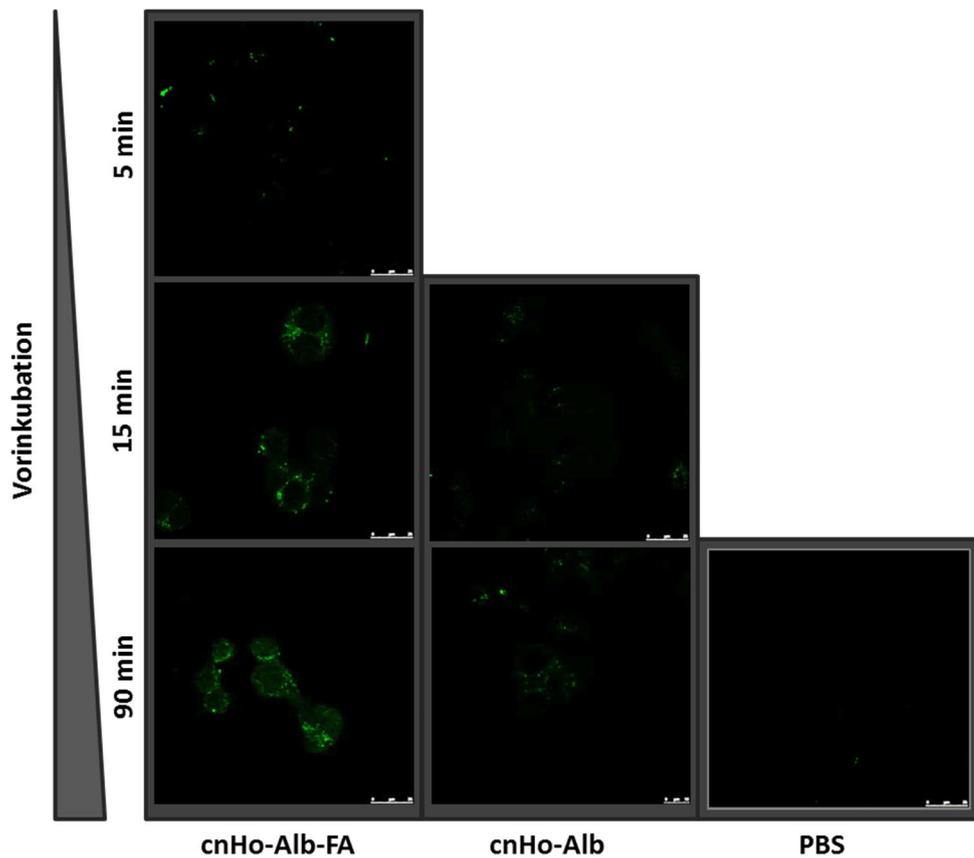


Abb. 5.3: *Mikroskopische Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von cnHo-Alb und cnHo-Alb FA über die Zeit.* KB Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und unterschiedlich lang mit 20 μ M Lösungen von cnHo-Alb oder cnHo-Alb-FA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PFA (4 %) fixiert. Fotografiert wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen TCS SP5 Fluoreszenzmikroskops.

Mit steigender Vorinkubationszeit in Gegenwart von cnHo-Alb-FA war in den KB-Zellen ein deutlicher werdendes Fluoreszenzsignal zu erkennen. Gleichzeitig nahm die Fluoreszenz in den Zellen, die mit cnHo-Alb inkubiert wurden, nicht zu und ist vergleichbar mit der Eigenfluoreszenz der Kontrollzellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine folsäure- und zeitabhängige Aufnahme des Konjugates in die Zellen stattgefunden hat. Außerdem ist zu erkennen, dass sich die detektierte β -Carbolin-Fluoreszenz in punktförmigen Strukturen anreichert. Um der Lokalisation

des endozytotisch aufgenommenen Konjugates auf den Grund zu gehen, wurde basierend auf den bisherigen Ergebnissen ein Folgeversuch durchgeführt, in dem die verwendeten Zellen 90 min lang mit 20 μ M cnHo-Alb und cnHo-Alb-FA inkubiert wurden, während gleichzeitig die Lysosomen der Zellen mit LysoTracker® Red angefärbt wurden. Der *LysoTracker*® färbt saure Zellkompartimente, also hauptsächlich späte Endosomen und Lysosomen. Anschließend wurde wieder mit eiskaltem PFA (4 %) fixiert. Zur Anregung von *LysoTracker*® Red wurde am Mikroskop ein Laser mit 560 nm verwendet. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind gezeigt in Abb. 5.4.

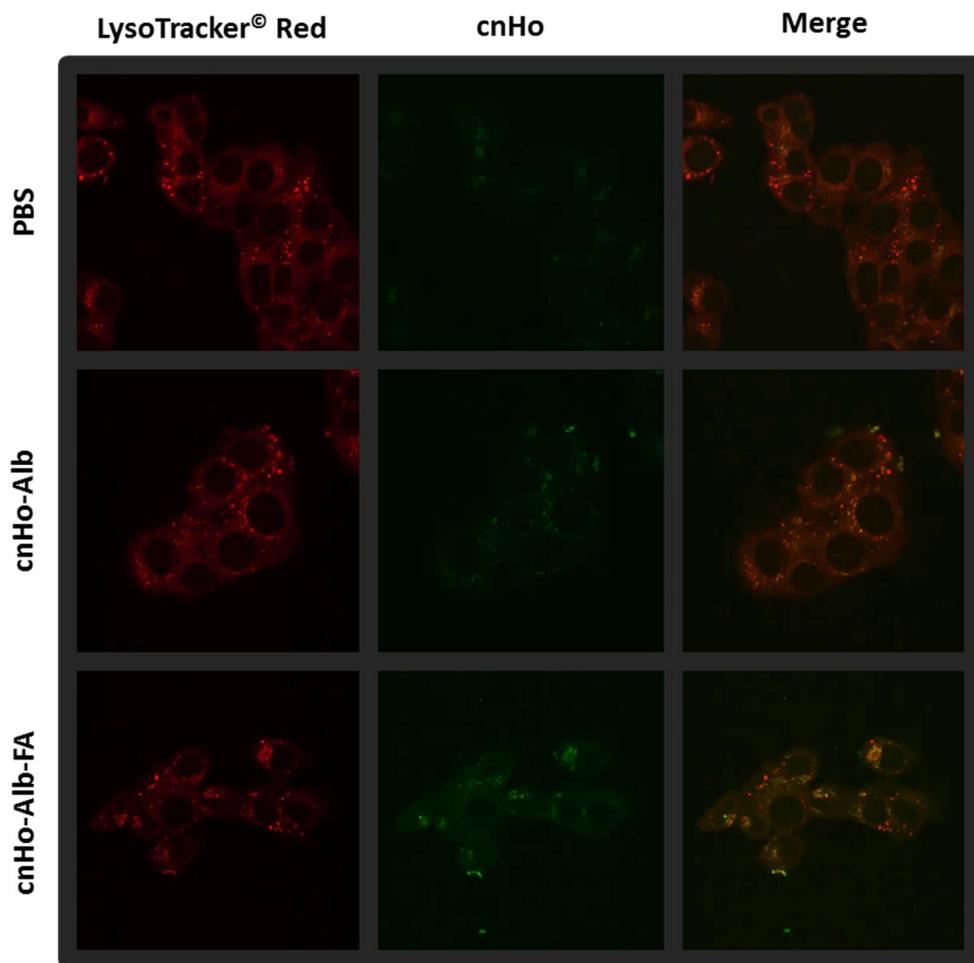


Abb. 5.4: Mikroskopische Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von cnHo-Alb und cnHo-Alb-FA und dessen Kolokalisation mit Lysosomen KB Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 90 min lang mit 20 μ M Lösungen von cnHo-Alb, cnHo-Alb-FA oder reinem PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PFA (4 %) fixiert. 30 min vor der Fixation wurden 50 nM LysoTracker® Red hinzugegeben. Fotografiert wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen TCS SP5 Fluoreszenzmikroskops.

Die am Mikroskop gemachten Aufnahmen aus diesem Versuch bestätigen, dass die Fluoreszenz der Zellen, die mit cnHo-Alb inkubiert wurden, bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm in etwa der Fluoreszenz der Kontrollzellen entspricht, was bedeutet, dass keine nennenswerte Aufnahme des Konjugates stattgefunden hat. Die Zellen, die mit cnHo-Alb-FA inkubiert wurden zeigen hingegen deutliche Fluoreszenz, die sich aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Akkumulation des β -Carbolins im Zellinneren zurückführen lässt. In den Bildern, in denen die Aufnahme des β -Carbolin-Kanals und der des *LysoTrackers*[®] überlagert wurden (*Merge*), ist zu erkennen, dass die β -Carbolin-Fluoreszenz teilweise mit der Fluoreszenz des *LysoTrackers*[®] kolokalisiert (orange-gelbe Färbung). Dieser Befund ist auf Basis der Literatur schwierig zu erklären, da es sich beim FR α um ein Glykosylinositolphosphat verankertes Protein (GPI-AP) handelt. Dessen Endozytose führt üblicherweise über sogenannten CLIC-Weg (*Clathrin independent carrier*) und GEECs (*GPI-AP-enriched endosomal compartments*). GEECs geben normalerweise schnell zellrelevante Ladung wie Folsäure ins Cytosol ab, um das GPI-AP zu recyceln und zurück an die Oberfläche bringen zu können [23]. Da die Akkumulation des Konjugates in der Zelle mit einhergehender Kolokalisation mit *LysoTracker*[®] Red ungewöhnlich ist, wurde um sicher zu gehen, dass die Akkumulation der Fluoreszenz in der Zelle trotzdem auf die FR α -vermittelte Aufnahme von cnHo-Alb-FA zurückzuführen ist, ein weiterer Versuch durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 90 min lang mit 20 μ M cnHo-Alb-FA inkubiert. Bei einem Ansatz wurde während der Vorinkubationszeit zusätzlich 1 mM Folsäure hinzugegeben, die mit cnHo-Alb-FA um den FR α konkurriert und die Aufnahme des Konjugates verhindern sollte. Die extrem hohe Folsäure-Konzentration wurde deswegen gewählt, da sich durch ein Bindungsverhältnis von bis zu neun Folsäure-Molekülen pro Konjugat und einer Konjugat-Konzentration von 20 μ M ca. 180 μ M Konjugat-gebundene Folsäure in der Lösung befinden. Außerdem wurde auch hier wieder *LysoTracker*[®] Red hinzugefügt, um die Lysosomen anzufärben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit eiskaltem PFA (4 %) fixiert und auf einen Objektträger überführt. Das Resultat ist in Abb. 5.5 abgebildet.

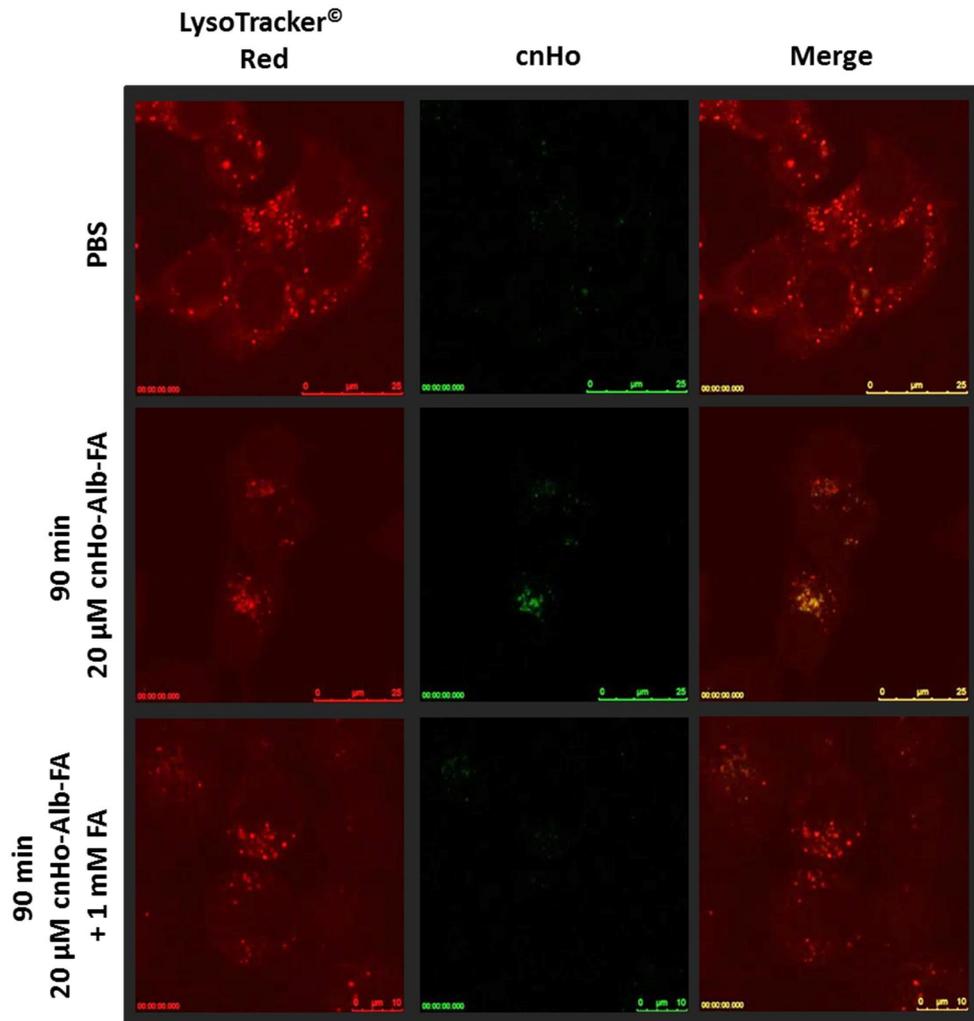


Abb. 5.5: Mikroskopische Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von *cnHo-Alb-FA* in Konkurrenz mit einem Überschuss Folsäure. KB Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 90 min lang mit 20 μM Lösungen von *cnHo-Alb-FA* mit und ohne Folsäure (1 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PFA (4 %) fixiert. 30 min vor der Fixation wurden 50 nM LysoTracker® Red hinzugegeben. Fotografiert wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen TCS SP5 Fluoreszenzmikroskops.

Auch hier ist die Aufnahme des Konjugates nach 90 min zu erkennen. Außerdem ist auch hier wieder eine teilweise Kolo-kalisation der β -Carbolin-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz von LysoTracker® Red erkennbar. Die Zellen, die in Gegenwart eines großen Folsäure-Überschusses mit *cnHo-Alb-FA* inkubiert worden sind, weisen jedoch überhaupt keine intrazelluläre β -Carbolin-Fluoreszenz auf und sind mit den Kontrollzellen, die mit reinem PBS vorinkubiert wurden, vergleichbar. Da eine Aufnahme des Konjugates nur dann fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden konnte, wenn das Konjugat Folsäure beinhaltet (*cnHo-Alb-FA*), aber nicht bei dem Konjugat ohne Folsäure (*cnHo-Alb*), und weil die Konkurrenz mit einem Überschuss freier

Folsäure die Aufnahme von cnHo-Alb-FA verhindert, kann geschlossen werden, dass die Aufnahme FR α -vermittelt ist und endozytotisch verläuft. Außerdem kann aus den mikroskopischen Aufnahmen geschlossen werden, dass das aufgenommene Konjugat in der Zelle in punktförmigen Strukturen akkumuliert, die teilweise mit den Lysosomen kolokalisieren. Um zu prüfen, ob dieser Aufnahmeweg für eine selektive Abtötung von Zellen ausgenutzt werden kann, wurden im Folgenden die photogenotoxischen Eigenschaften der beiden β -Carbolin-Derivate miteinander verglichen und das photozytotoxische Potential quantifiziert.

5.1.1.3 Extrazelluläre DNA-schädigende Wirkung der β -Carboline

Um besser einschätzen zu können, wie sich die unterschiedlichen Quantenausbeuten der β -Carbolin-Derivate quantitativ auf die ROS-Produktion und somit auch auf die potentielle Schadensinduktion auswirken, wurden beide Derivate im PM2 Assay getestet. Hierfür wurden aufsteigende Konzentrationen cnHo und cHa gelöst in Phosphatpuffer PPI1/2 zusammen mit PM2 Plasmid-DNA mit UVA (365 nm, 30 kJ/m²) bestrahlt. Anschließend wurde die DNA gefällt und eine Fraktion jedes Ansatzes mit Fpg-Protein inkubiert. Dabei handelt es sich um das bakterielle Homolog der menschlichen 8-Oxo-guanin-Glykosylase (OGG1). Es wird eingesetzt, um induziertes 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-Oxo-guanin; 8-oxoG) und andere Basenmodifikationen nachzuweisen (siehe Abschnitt 3.5), die durch die bei der Bestrahlung entstehenden ROS induziert werden. Induzierte Einzelstrangbrüche (SSB) und Fpg-sensitive Läsionen sind für beide Derivate in Abb. 5.6 aufgetragen.

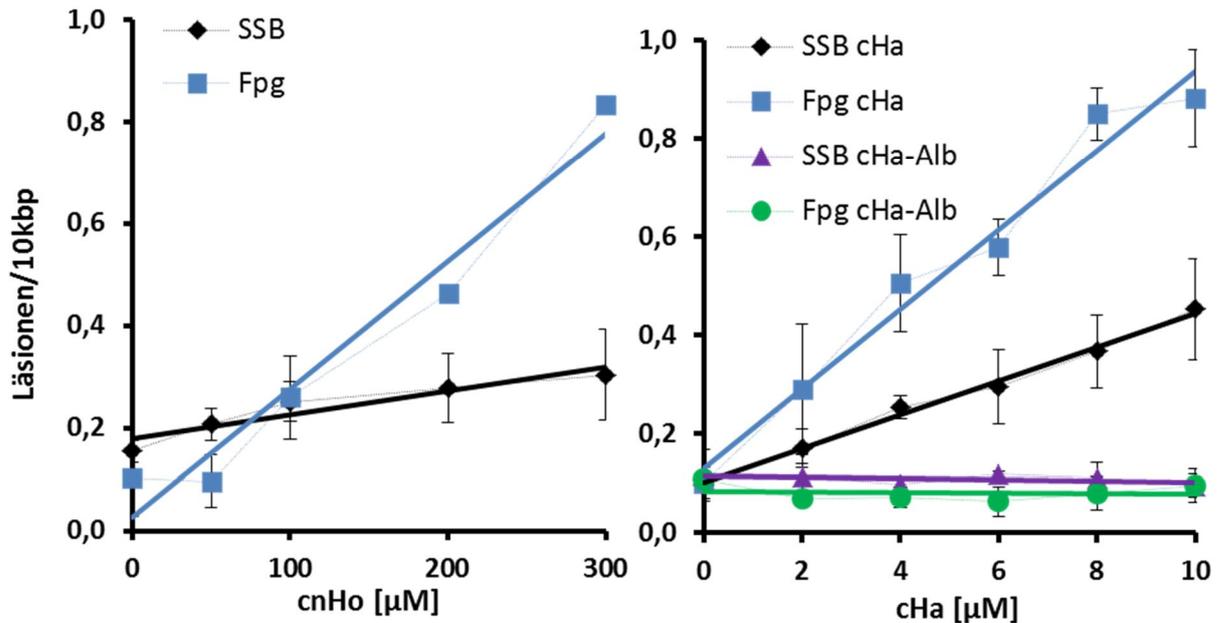


Abb. 5.6: Quantifizierung von zellfrei durch β -Carboline induzierte DNA-Schäden (PM2-Assay). Anzahl der DNA-Schäden (schwarz: SSB, blau: Fpg-sensitive Läsionen) nach Behandlung von PM2-DNA mit steigenden β -Carbolin-Konzentrationen (links: cnHo, rechts: cHa) und UVA Licht (365 nm, 30 kJ/m²). Außerdem wurde die DNA-schädigende Wirkung von cHa-Alb getestet. Die aufgetragene Konzentration des Konjugates entspricht der cHa-Konzentration. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Für sowohl cnHo (linkes Diagramm), als auch cHa (rechtes Diagramm) existiert eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Schadensinduktion für SSB und Fpg-sensitive Läsionen unter UVA Bestrahlung. Im Dunkeln war keinerlei Schadensinduktion durch die verwendeten β -Carbolin Derivate zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Wie aus Tabelle 5.3 zu entnehmen ist, führt die Bestrahlung mit UVA allein unter den verwendeten Bedingungen nur zu einer minimalen Induktion von SSB während keine Fpg-sensitiven Schäden induziert werden.

Tab. 5.3: SSB und Fpg-sensitive Läsionen nach UVA-Bestrahlung (30 kJ/m²). PM2 Plasmid-DNA wurde mit UVA bestrahlt (365 nm, 30 kJ/m²). Von diesen Proben und der Dunkelkontrolle wurden die Schäden (SSB, Fpg-sensitive Läsionen) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen (\pm SD). Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet (**p < 0,05).

	SSB (pro 10 kbp)	Fpg-sensitive Läsionen (pro 10 kbp)
UVA Bestrahlung	0,120 \pm 0,031	0,110 \pm 0,078
Dunkelkontrolle	0,068 \pm 0,016**	0,073 \pm 0,018

Besonders auffällig ist der Unterschied in der Höhe der induzierten Schäden durch cnHo und cHa. Betrachtet man nur die Fpg-sensitiven Schäden, benötigt man von cnHo eine dreißigfach höhere Dosis als von cHa, um denselben Schaden zu generieren. Für die Induktion von SSB ist dieses Verhältnis sogar noch weitaus höher. Unterschiede zeigen sich auch, wenn man das Verhältnis der Steigungen der Trendlinien für SSB und Fpg-sensitive Läsionen vergleicht. Bei cnHo ist die dosisabhängige Induktion Fpg-sensitiver Schäden etwa 15-fach höher als die der SSB, während die Steigung für die Fpg-sensitiven Schäden bei cHa nur etwa doppelt so hoch ist wie die für die induzierten SSB. Die erhaltenen Ergebnisse sind in gutem Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Harmin- und Norharman-Derivate. Zusätzlich zur höheren Triplett-Quantenausbeute weisen Harmin-Derivate auch eine höhere DNA-Bindungskonstante auf, als Norharman-Derivate [67]. Die durch die stärkere nicht-kovalente Bindung verursachte erhöhte räumliche Nähe zwischen Photosensibilisator und DNA, ist zusätzlich zu den unterschiedlichen Quantenausbeuten eine weitere Erklärung für die gezeigten Unterschiede in der Schadensinduktion.

Da hier das deutlich höhere Schädigungspotential von cHa verglichen mit cnHo gezeigt werden konnte, wurde für die später beschriebenen Zytotoxizitätsversuche ausschließlich cHa-Alb-FA und nicht cnHo-Alb-FA verwendet. Auf die Tatsache, dass das Konjugat cHa-Alb so gut wie keine Schäden in freier DNA induziert (siehe Abbildung 5.6, rechtes Diagramm) wird im späteren Verlauf dieses Abschnittes näher eingegangen.

Zur näheren Charakterisierung des Schädigungsmechanismus und zur besseren Einschätzung des verursachten Schadens wurde im Folgenden ein PM2 Assay mit cHa sowohl in Gegenwart von Katalase und SOD, als auch in D₂O haltigem Puffer durchgeführt. Während Katalase Wasserstoffperoxid und SOD Superoxid-Radikale abfangen, verlängert D₂O die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Vergleich zu H₂O ca. 10fach [113]. Durch relativen Vergleich der induzierten Schäden unter Zuhilfenahme von Katalase, SOD und D₂O mit der Schädigung des reinen schädigenden Agens, können Rückschlüsse auf die beteiligten reaktiven Sauerstoffspezies geschlossen werden. Der Versuch wurde mit 10 und 20 µM cHa durchgeführt und die relativen Ergebnisse vereinigt. Die in diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 5.7 gezeigt.

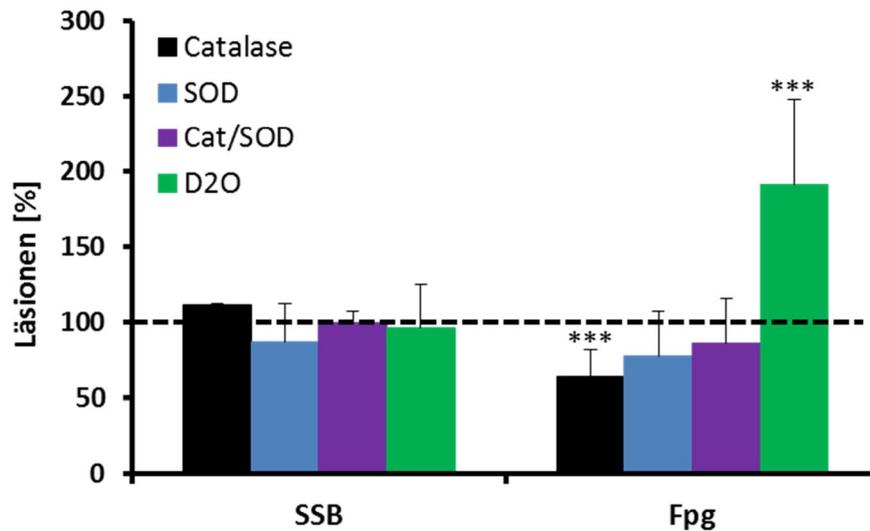


Abb. 5.7: *Relatives Ausmaß induzierter DNA-Schäden nach Bestrahlung von cHa in Gegenwart von Katalase, SOD und D₂O.* cHa (10 und 20 µM) wurde zusammen mit PM₂-DNA mit UVA bestrahlt (365 nm, 30 kJ/m²). Sowohl in Phosphatpuffer mit und ohne Katalase (315 U/mL) und/oder SOD (200 µg/mL), als auch in D₂O-haltigem Phosphatpuffer. Die aufgetragenen Werte sind relativ zu dem Fpg-sensitiven Schaden von Folsäure allein (abzüglich korrespondierender SSB und Grundschaden). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 6 unabhängigen Versuchen ± SD. Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet (***) $p < 0,005$.

Katalase, SOD und D₂O haben danach keine Auswirkung auf die Induktion von SSB. Die Fpg-sensitiven Läsionen werden durch die Anwesenheit von Katalase signifikant um ca. 40 % gesenkt und durch D₂O um ca. 100 % gesteigert. Das bedeutet, dass Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff bei der Oxidation der PM₂ DNA eine größere Rolle spielen als Superoxid-Radikale. Da die in Abbildung 5.7 gezeigte Inhibition der Fpg-sensitiven Schäden durch Katalase nicht vollständig und der Effekt von D₂O eher moderat ist, ist ein Teil der DNA-Modifikation sehr wahrscheinlich auf eine direkte Reaktion von cHa mit der DNA zurückzuführen, verläuft also nicht über ROS.

Um eine vorläufige Einschätzung treffen zu können, wie sich das Konjugat unter UVA Bestrahlung verhält, wurde der PM₂ Assay mit äquivalenten Konzentrationen cHa-Alb durchgeführt (Abb. 5.6, rechtes Diagramm; auf die Durchführung dieses Versuches mit cnHo-Alb wurde wegen den großen benötigten Substanzmenge verzichtet). Bestrahlt man dieselbe Menge Albumin-gebundenes cHa, wie zuvor freies, ist im untersuchten Konzentrations- und Lichtdosis-Bereich keinerlei Schadensinduktion in der PM₂ DNA zu erkennen. Die Vermutung liegt nah, dass das Albumin-gebundene cHa nach Bestrahlung zwar reaktive Sauerstoffspezies generiert, diese aber nur mit

dem umliegenden Protein reagieren. Da der angeregte Chromophor keine Möglichkeit hat mit der DNA in Kontakt zu kommen, kann auch die vermutete direkte Reaktion des Photosensibilisators mit der DNA nicht stattfinden, so dass die DNA ungeschädigt bleibt. Diese Annahme sollte mit einem Versuch untermauert werden. Hierfür wurde eine kleine Menge der cHa-Alb Lösung (40 μM) für eine Stunde bei 37° C mit Proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubiert, um das Albumin weitestgehend zu verdauen. Anschließend wurde die Probe aufgeköcht, um die Proteinase K Aktivität zu stoppen. Aus dieser Probe wurde ein weiterer PM2 Assay durchgeführt, bei dem 10 μM cHa-Alb und die äquivalente Menge der Proteinase K behandelten Probe mit der Kontrolle (bestrahlt ohne Konjugat) nach UVA Bestrahlung verglichen wurden. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 5.8 gezeigt.

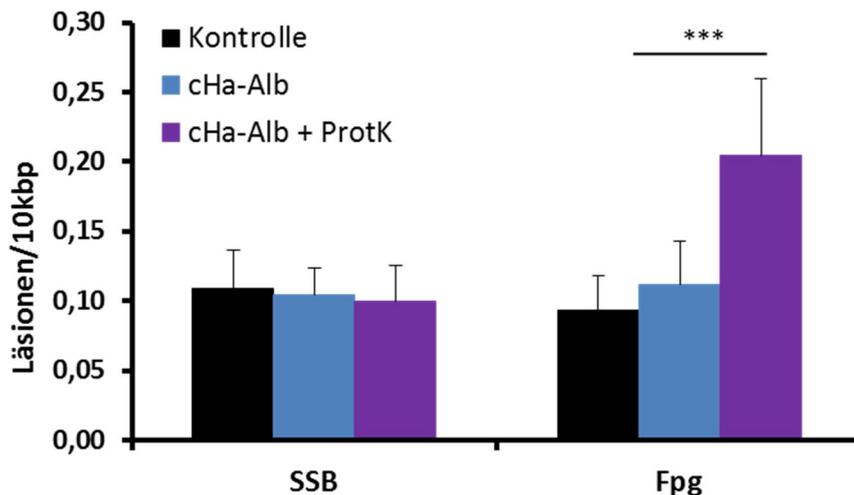


Abb. 5.8: *PM2-Assay mit cHa-Alb nach Proteinase K-Verdau.* Eine Probe der cHa-Alb-Lösung wurde 1 h lang bei 37° C mit Proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubiert. Anschließend wurde die Probe aufgeköcht. Für den anschließenden PM2-Assay wurden 10 μM cHa-Alb und die äquivalente Konzentration der Proteinase K behandelten Probe mit UVA bestrahlt (365 nm, 30 kJ/m^2). Bei der Kontrolle handelt es sich um PM2 DNA, die ohne Konjugat bestrahlt wurde. Die aufgetragenen Werte sind der Mittelwert aus 6-9 Versuchen (+SD). Die Signifikanzberechnung erfolgte nach Student's t-Test (***) $p < 0,05$ und bezieht sich auf den Unterschied zwischen cHa-Alb mit und ohne Proteinase K-Behandlung.

In diesem Versuch wurde bestätigt, dass die Bestrahlung von 10 μM cHa-Alb zusammen mit PM2 DNA weder SSB noch Fpg-sensitive Läsionen induziert. Nach Verdau des Albumins mit Proteinase K und anschließender Bestrahlung, konnte zwar nicht die gleiche Schadensinduktion von reinem cHa zurückerlangt werden, trotzdem ist eine signifikante Erhöhung der Anzahl Fpg-sensitiver

Läsionen zu erkennen. Möglicherweise war der Verdau nicht vollständig und cHa ist immer noch zu einem Großteil an Peptidfragmente gebunden oder frei gewordenes cHa wurde an denaturiertes Proteinase K gebunden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die thermische Inaktivierung der Proteinase K nicht vollständig war und deshalb das Fpg-Protein zumindest teilweise verdaut wurde, was das Ergebnisse verfälscht haben könnte. Nichtsdestotrotz wird durch dieses Ergebnis belegt, dass die Bindung des β -Carbolins an das Albumin dafür verantwortlich ist, dass durch cHa-Alb im untersuchten Bereich kein DNA-Schaden unter UVA Bestrahlung ausgelöst wurde, da die Freisetzung des β -Carbolins aus dem Konjugat zu einem signifikanten Anstieg induzierbarer Fpg-sensitiver Schäden führt.

5.1.1.4 Zytotoxizität der Albumin- β -Carbolin-Konjugate

Auch wenn DNA-Schädigung durch den Photosensibilisator nicht zwingend für eine effiziente Zytotoxizität vonnöten ist, macht es der Befund, dass cHa-Alb keine DNA-schädigende Wirkung gezeigt hat, fragwürdig, ob cHa-Alb-FA nach Rezeptor-vermittelter Aufnahme und anschließender Bestrahlung zytotoxisch ist. Auch hier können vom Albumin verursachte Quenching Effekte auftreten. Aber da durch Abbau des Albumins mittels Proteinase K die Phototoxizität des β -Carbolins zumindest teilweise wiedererlangt wurde und sich Teile des endozytotisch aufgenommenen Konjugates in den Lysosomen wiederfinden, besteht die Möglichkeit, dass sich durch Albumin-Abbau in den Lysosomen auch in der Zelle eine ausreichend phototoxische Menge freien cHa's anreichern lässt. Um dies zu testen wurde ein WST-1 Assay mit KB Zellen zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen von cHa-Alb, cHa-Alb-FA und freiem cHa in PBS für 90 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um etwaige phototoxische Effekte von außen zu vermeiden, und in frischem, Konjugat-freiem Puffer mit UVA bestrahlt (365 nm, 30 kJ/m²). Nach der Bestrahlung wurde WST-1 Reagenz auf die Zellen gegeben und der Umsatz des Formazans direkt nach der Schädigung und exakt zwei Stunden später bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.2). Abb. 5.9 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Die aufgetragenen relativen Werte wurden dabei auf die bestrahlte Kontrolle ohne Substanz bezogen.

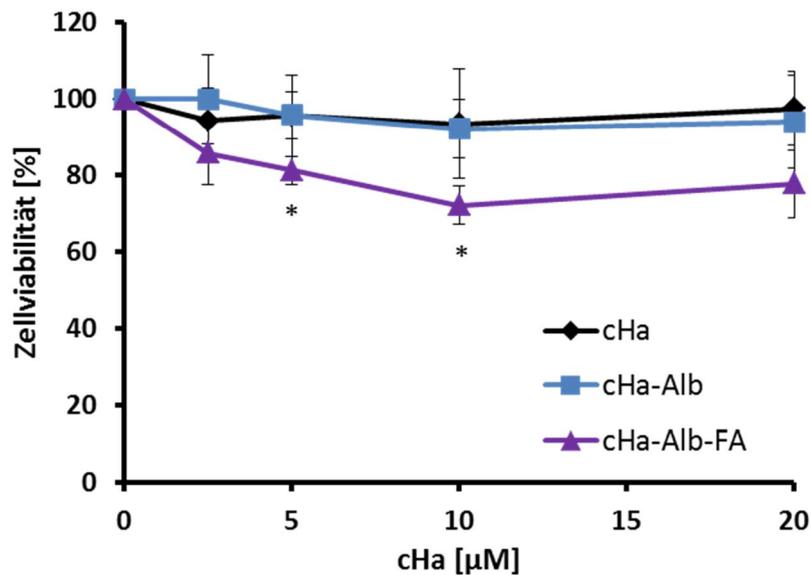


Abb. 5.9: *Relative Zellviabilität nach Bestrahlung von KB Zellen in Gegenwart von cHa und dessen Konjugaten.* KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 90 min mit steigenden Konzentrationen von cHa, cHa-Alb und cHa-Alb-FA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in reinem PBS mit UVA (365 nm, 30 kJ/m²) bestrahlt. Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 – 6 unabhängigen Versuchen (±SD). Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (*p > 0,05) und bezieht sich jeweils auf den korrespondierenden Datenpunkt des Konjugates ohne Folsäure.

cHa und cHa-Alb zeigten im untersuchten Bereich, in Übereinstimmung mit der Annahme, dass cHa-Alb wegen seiner Größe nicht in die Zelle eindringen kann und cHa wegen der delokalisierten positiven Ladung nicht durch die Membran diffundiert, keinerlei Zytotoxizität. cHa-Alb-FA allerdings zeigte nach 90 min Vorinkubation eine moderate, aber signifikante, dosisabhängige Zytotoxizität nach Bestrahlung mit UVA (365 nm, 30 kJ/m²), während die Zellviabilität der Dunkelkontrolle unverändert blieb. Diese wurde äquivalent zu den bestrahlten Proben 90 min mit steigenden Konzentrationen cHa, cHa-Alb und cHa-Alb-FA inkubiert und anschließend parallel zu Bestrahlung 20 min in sauberem Puffer im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellviabilität der unbestrahlten Proben ist in Abbildung 5.10 für cHa, cHa-Alb und cHa-Alb-FA aufgetragen.

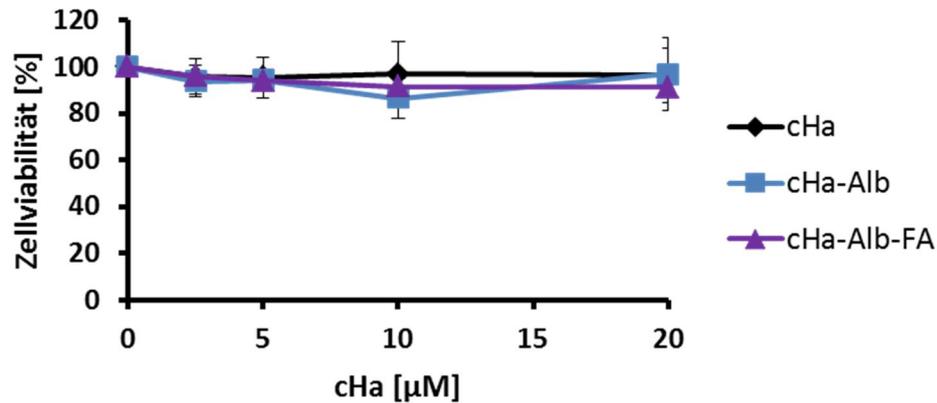


Abb. 5.10: Zellviabilität der Dunkelkontrolle nach Behandlung mit cHa und dessen Konjugaten. KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 90 min mit steigenden Konzentrationen von cHa, cHa-Alb und cHa-Alb-FA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten sind der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Im Vergleich zur Schadeninduktion im PM2 Assay hat die Bestrahlung mit UVA auf die Zellviabilität keinerlei Einfluss. Mittelt man die absoluten Werte der Formazan Absorption (abzüglich der Hintergrundabsorption) der Dunkelkontrolle ohne Substanz und der bestrahlten Zellen ohne Substanz erhält man folgende, in Tabelle 5.4 aufgelisteten Werte.

Tab. 5.4: Gemittelte Formazan-Absorption der Kontrollen aus allen gezeigten WST-1 Assays. Verwendet wurden alle Absolutwerte der Formazan Absorption (abzüglich der Hintergrundabsorption) ohne Konjugat mit und ohne Bestrahlung. ($n > 30$; \pm SD)

	Mittelwert	SD
bestrahlt	0,54	0,15
Dunkelkontrolle	0,54	0,17

Die ermittelte Zytotoxizität, die in Abbildung 5.9 aufgetragen ist, wurde direkt nach der Schädigung bestimmt. Deswegen wird möglicherweise nur die Nekrose gemessen und der Anteil der Apoptose an der zytotoxischen Wirkung wurde nicht oder nicht vollständig detektiert. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurde ein weiterer Zytotoxizitätstest durchgeführt. Die Schädigung wurde hierbei analog zu den Versuchen aus Abbildung 5.9 durchgeführt. Allerdings wurden die Zellen anschließend für 24 h bei 37° C weiter kultiviert und erst dann die Zellviabilität

mittels WST-1 Reagenz bestimmt. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden in Abbildung 5.11 aufgetragen.

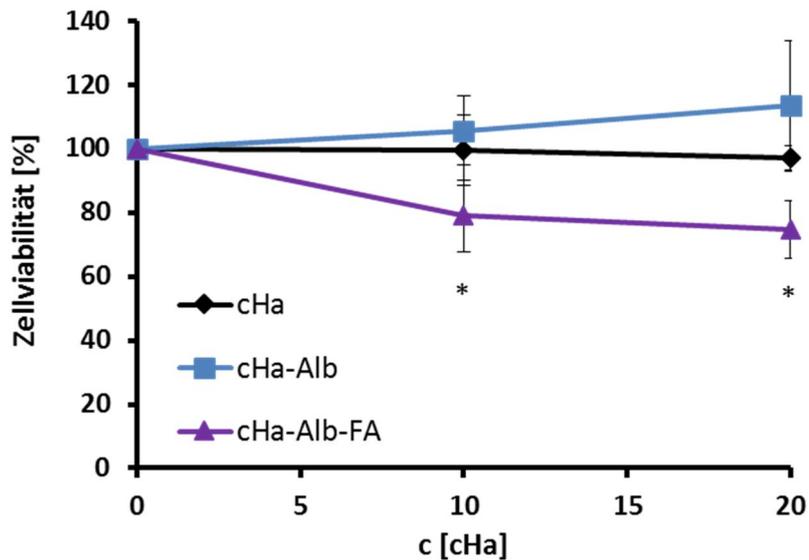


Abb. 5.11: *Relative Zellviabilität nach Bestrahlung und anschließender Inkubation von KB Zellen in Gegenwart von cHa und dessen Konjugaten.* KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 90 min mit steigenden Konzentrationen von cHa, cHa-Alb und cHa-Alb-FA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in reinem PBS mit UVA (365 nm, 30 kJ/m²) bestrahlt. Die Viabilität der Zellen wurde 24 h nach der Behandlung mittels des WST-1 Assays bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten sind der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen (\pm SD). Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (* $p > 0,05$) und bezieht sich jeweils auf den korrespondierenden Datenpunkt des Konjugates ohne Folsäure.

Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen war auch in diesem Experiment eine moderate aber signifikante Toxizität des Folsäure-gekoppelten Konjugates zu erkennen während das Konjugat ohne Folsäure und das frei β -Carbolin keine zytotoxische Wirkung zeigten. Der Effekt ist vergleichbar mit der Zytotoxizität, die direkt nach der Schädigung gemessen wurde. Diese Ergebnisse sind auf verschiedene Wiesen zu interpretieren. Hierauf wird in der Diskussion detailliert eingegangen.

Um zweifelsfrei zu klären, ob es sich bei der von cHa-Alb-FA verursachten Zytotoxizität tatsächlich um einen FR α vermittelten Effekt handelt, wurde vergleichbar mit den mikroskopischen Experimenten aus Abschnitt 5.1.1.2 wiederum ein Wettbewerbsversuch durchgeführt, bei dem das Konjugat (20 μ M) in An- und Abwesenheit von 1 mM Folsäure verschieden lang vorinkubiert

wurde. Die Folsäure soll hierbei mit dem Konjugat um den Rezeptor konkurrieren und die Aufnahme des Konjugates verhindern, wie es bereits im Mikroskopieversuch in Abbildung 5.5 gezeigt wurde. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen gewaschen, um etwaige phototoxische Effekte von außen zu vermeiden, und in sauberem, Konjugat-freiem Puffer mit UVA bestrahlt (365 nm, 30 kJ/m²). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 5.12 aufgetragen. Die relativen Werte sind auch hier wieder auf deren korrespondierende bestrahlte Kontrolle ohne Substanz bezogen.

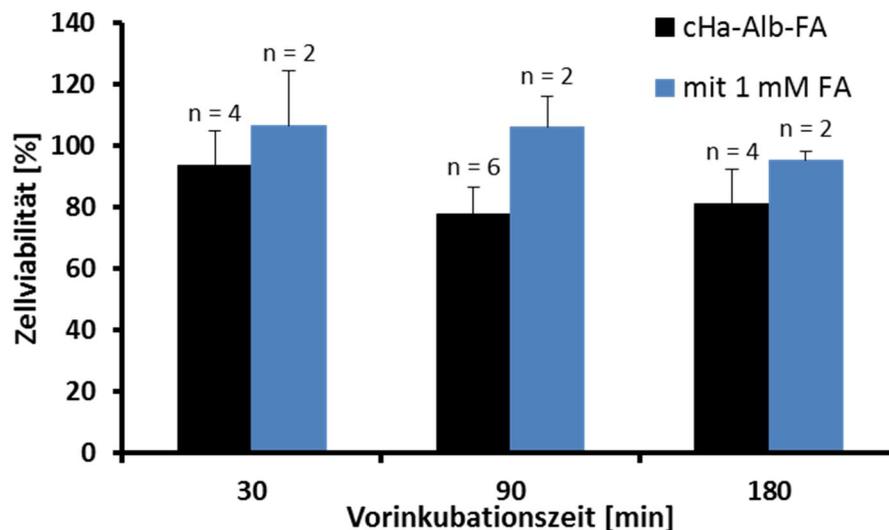


Abb. 5.12: *Relative Zellviabilität nach Bestrahlung von KB Zellen in Gegenwart von cHa-Alb-FA in An- und Abwesenheit von Folsäure.* KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und für verschieden lange Inkubationszeiten mit 20 µM cHa-Alb-FA in An- und Abwesenheit von 1 mM Folsäure inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS mit UVA (365 nm, 30 kJ/m²) bestrahlt. Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assay bestimmt. Die relative Viabilität errechnet sich aus der bestrahlten Kontrolle ohne cHa-Alb-FA. Die Daten sind der Mittelwert aus 2 – 6 unabhängigen Versuchen (+SD).

Bei der Inkubation mit cHa-Alb-FA in Abwesenheit von Folsäure sieht man, dass die Zellviabilität nach 90 min Vorinkubation niedriger ist als nach 30 min Vorinkubation. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der Mikroskopie-Versuche aus Abbildung 5.3, da bereits dort eine zeitabhängige Anreicherung des Konjugates in der Zelle gezeigt wurde (siehe Abschnitt 5.1.1.2). Bei einer längeren Vorinkubationszeit ist aber keine weitere Verstärkung der Zytotoxizität mehr zu erkennen. Führt man die Vorinkubation der Zellen mit Konjugat in Gegenwart eines Folsäure-Überschusses durch, kommt es zu überhaupt keiner licht- oder zeitabhängigen Zytotoxizität. Dies lässt den Schluss zu, dass die gefundene lichtabhängige Zytotoxizität von cHa-Alb-FA tatsächlich

FR α vermittelt ist. Da es sich bei den blauen Balken in Abb. 5.12 nur um zwei unabhängige Versuche handelt, war eine statistische Auswertung der Einzelpunkte nicht sinnvoll. Deswegen wurde eine Multiregressionsanalyse durchgeführt, die für den Einfluss von Folsäure auf die Zytotoxizität einen hochsignifikanten p-Wert von 0,004 ergab.

Nach den Wettbewerbsversuchen mit Folsäure wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um die spezifische, Rezeptor-vermittelte Aufnahme zu bestätigen. Hierfür wurde ein weiterer Zellviabilitätsassay mit HaCaT Zellen durchgeführt. Diese spontan immortalisierten menschlichen Keratinozyten exprimieren so gut wie keine Folsäure-Rezeptoren (siehe [88] und Abbildung 5.28). Das Experiment wurde analog zu den Experimenten, die in den Abbildungen 5.9 und 5.10 aufgetragen sind, durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 5.13 aufgetragen.

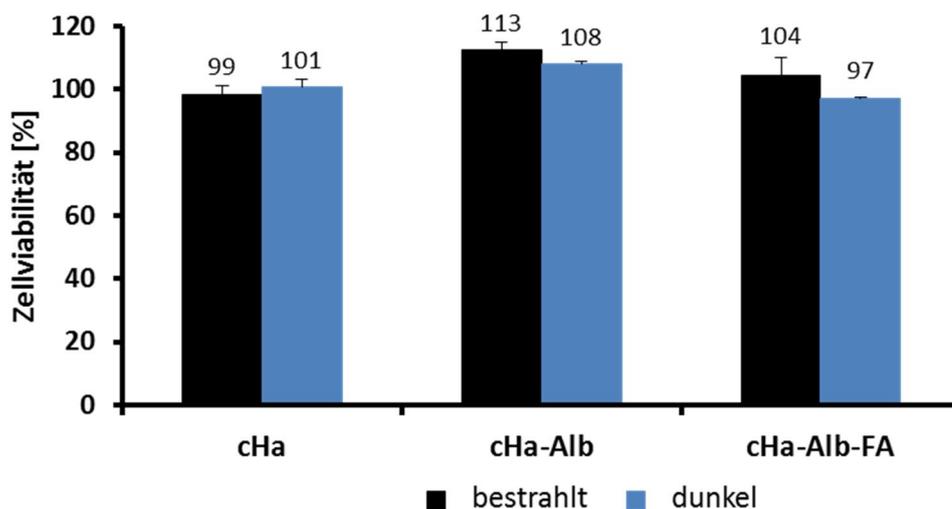


Abb. 5.13: Zellviabilität von HaCaT Zellen nach Behandlung mit cHa und dessen Konjugaten. HaCaT Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 90 min mit 20 μ M cHa, cHa-Alb und cHa-Alb-FA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS mit UVA (365 nm, 30 kJ/m²) bestrahlt oder für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assay bestimmt. Die Werte sind auf die jeweils korrespondierende Probe ohne Substanz bezogen. Die Daten sind der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Die Ergebnisse aus Abbildung 5.13 zeigen, dass die Bestrahlung von FR α negativen HaCaT Zellen nach cHa-Alb-FA Inkubation keinen toxischen Effekt hat.

Somit konnte bewiesen werden, dass cHa-Alb-FA in der Lage ist, FR α vermittelt Zytotoxizität auszulösen. Diese wird ausschließlich durch Bestrahlung mit UVA verursacht, während das Konjugat im Dunkeln völlig untoxisch ist. Außerdem ist die Toxizität sowohl dosis- als auch zeitabhängig. Im Vergleich hierzu werden weder das Konjugat ohne Folsäure noch das frei β -Carbolin-Derivat in die Zellen aufgenommen, weshalb diese auch mit Bestrahlung völlig untoxisch sind. Mit Hilfe der verwendeten Albumin-Folsäure-Konjugate konnte somit eine spezifisch FR α -vermittelte Aufnahme eines Photosensibilisators in FR α überexprimierende Zellen erfolgreich gezeigt werden. Zudem konnte ein spezifischer zytotoxischer Effekt der Photosensibilatoren nach Bestrahlung mit UVA nachgewiesen werden.

5.1.2 FR α vermittelte Aufnahme von Tetraphenylporphyrin (TPP) beladenen Dextran-Partikeln

5.1.2.1 Zytotoxizitätsstudien

Ein weiteres potentiell Transportvehikel für Photosensibilisatoren sind Dextran-Partikel. Dabei handelt es sich um Dextranpolymerketten, deren Lipophilie durch Acetalisierung erhöht wurde (siehe Abbildung 1.4). Weiterhin wurden diese Dextranpolymere mit Spermin derivatisiert, wodurch modifizierbare Aminogruppen zur Verfügung stehen. Die lipophilen Dextrane lagern sich in Emulsion zu Partikeln zusammen. Dabei können lipophile Substanzen, wie in unserem Fall der Photosensibilisator Tetraphenylporphyrin (TPP) (siehe Abbildung 1.8), in den Partikel eingeschlossen werden. Anschließend kann mittels Carbodiimid-Reaktion Folsäure-NHS-Aktivester hergestellt werden, der an die Aminogruppen an der Oberfläche des Partikels bindet. Die verschiedenen Partikel wurden von unserem Kooperationspartner (Arbeitsgruppe Dr. Wich) bereitgestellt und im Folgenden auf FR α -vermittelte Photozytotoxizität untersucht. Hierfür wurden mit TPP beladene, Folsäure-gelinkte Partikel (Dex-TPP-FA) in aufsteigender Konzentration 1,5 h, 6 h und 24 h in Vollmedium mit KB Zellen inkubiert. Der Versuch wurde in An- und Abwesenheit von 1 mM Folsäure durchgeführt, die als Konkurrent am FR α die erwartete Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Partikel verlangsamen soll. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in reinem, Partikel-freiem PBS mit sichtbarem Licht bestrahlt (15 min, 33 cm; äquivalent zu 338 kJ/m²). Die Zellviabilität wurde mittels WST-1 Reagenz bestimmt. Die relativen Werte wurden jeweils auf die bestrahlte Kontrolle ohne Partikel bezogen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb 5.14 aufgetragen.

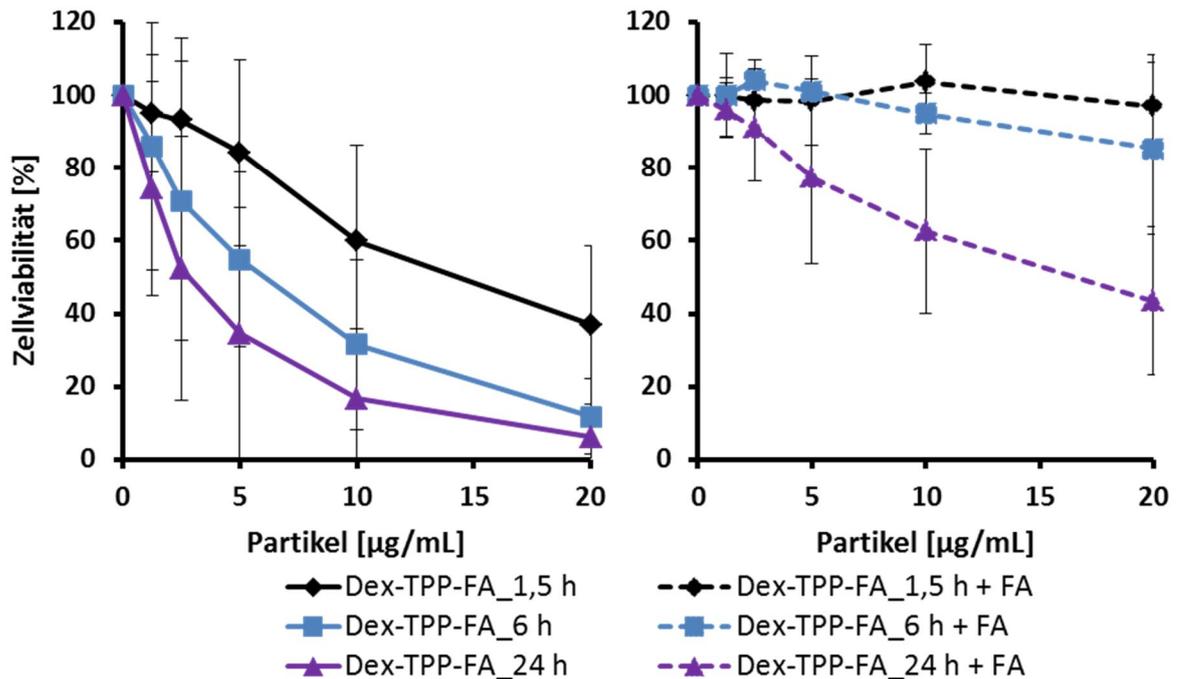


Abb. 5.14: Zytotoxizität von Dex-TPP-FA Partikeln nach unterschiedlich langer Inkubation und anschließender Bestrahlung. KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann für 1,5 h, 6 h und 24 h mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen von Dex-TPP-FA in Vollmedium in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von Folsäure (1 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS mit sichtbarem Licht bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt. Die Daten sind der Mittelwert aus 3-7 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Aus Abbildung 5.14 (linkes Diagramm) lässt sich zunächst eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität ablesen. Zusätzlich geht daraus hervor, dass der zytotoxische Effekt mit steigender Vorinkubationsdauer zunimmt. Allein dieser Befund zeigt, dass es zu einer zeitabhängigen Anreicherung des toxischen Agens in der Zelle gekommen sein muss. Betrachtet man im Vergleich dazu den Versuch, bei dem die Vorinkubation mit Dex-TPP-FA gleichzeitig in Gegenwart von 1 mM Folsäure durchgeführt wurde (Abbildung 5.14; rechtes Diagramm), sieht man auch hier eine steigende Zytotoxizität mit steigender Vorinkubationszeit. Jedoch ist die konzentrationsabhängige Zytotoxizität verglichen mit den Proben ohne Folsäure-Kompetition deutlich geringer (rechtes Diagramm). Die zeitabhängige Anreicherung des toxischen Agens in der Zelle ist in diesem Versuchsaufbau als FR α -vermittelt anzunehmen.

Um mit Sicherheit sagen zu können, dass die ausgelöste Toxizität ausschließlich durch TPP vermittelt wird, wurden als Kontrolle unbeladene Dextran-Partikel (Dex) und unbeladene

Folsäure-gelinkte Dextran-Partikel (Dex-FA) auf deren Einfluss auf die Zellviabilität untersucht. Der Versuchsaufbau war identisch zu dem für Abb. 5.14. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.15 aufgetragen.

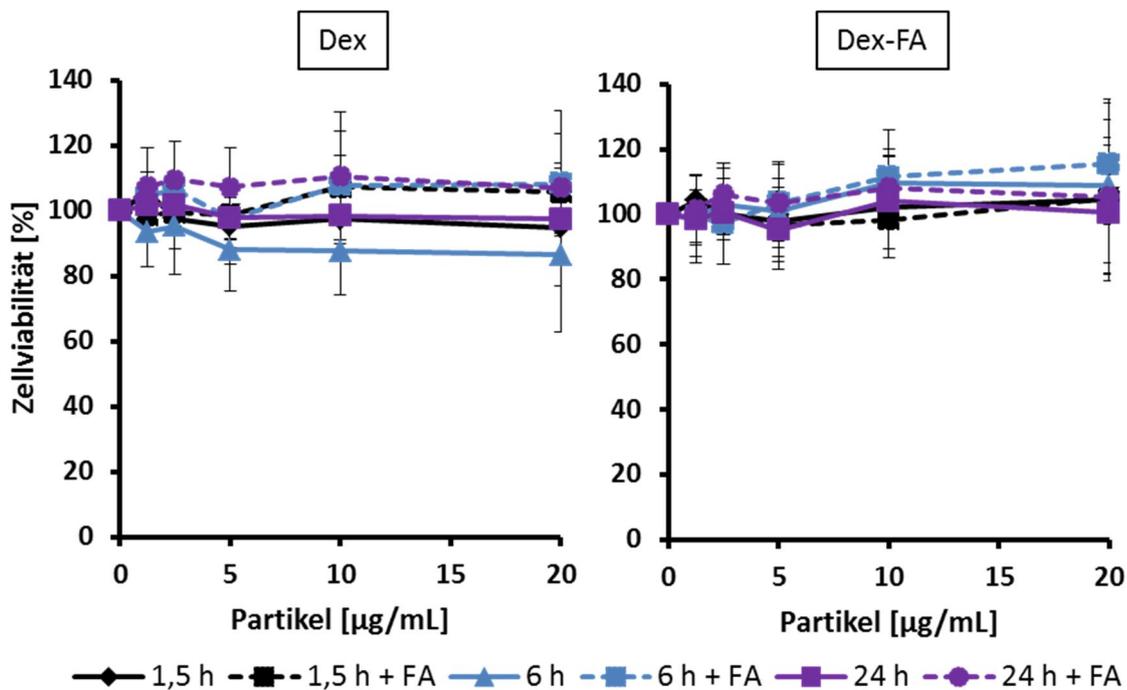


Abb. 5.15: Zellviabilität nach Dex und Dex-FA Inkubation und anschließender Bestrahlung. KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 1,5 h, 6 h und 24 h mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen von Dex (links) und Dex-FA (rechts) in Vollmedium in An- und Abwesenheit von Folsäure (1 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS mit sichtbarem Licht bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt. Die Daten sind der Mittelwert aus 3-7 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Weder Dex (linkes Diagramm) noch Dex-FA (rechtes Diagramm) zeigten nach Bestrahlung im untersuchten Konzentrationsbereich einen Einfluss auf die Zellviabilität der KB Zellen. Die vorher detektierte zeit- und konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Dex-TPP-FA (Abbildung 5.14) wird also ausschließlich durch TPP verursacht.

Um sicher zu gehen, dass die gefundene Toxizität nur nach Bestrahlung auftritt, wurden Kontrollen ohne Bestrahlung (Dunkelkontrollen) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.16 dargestellt.

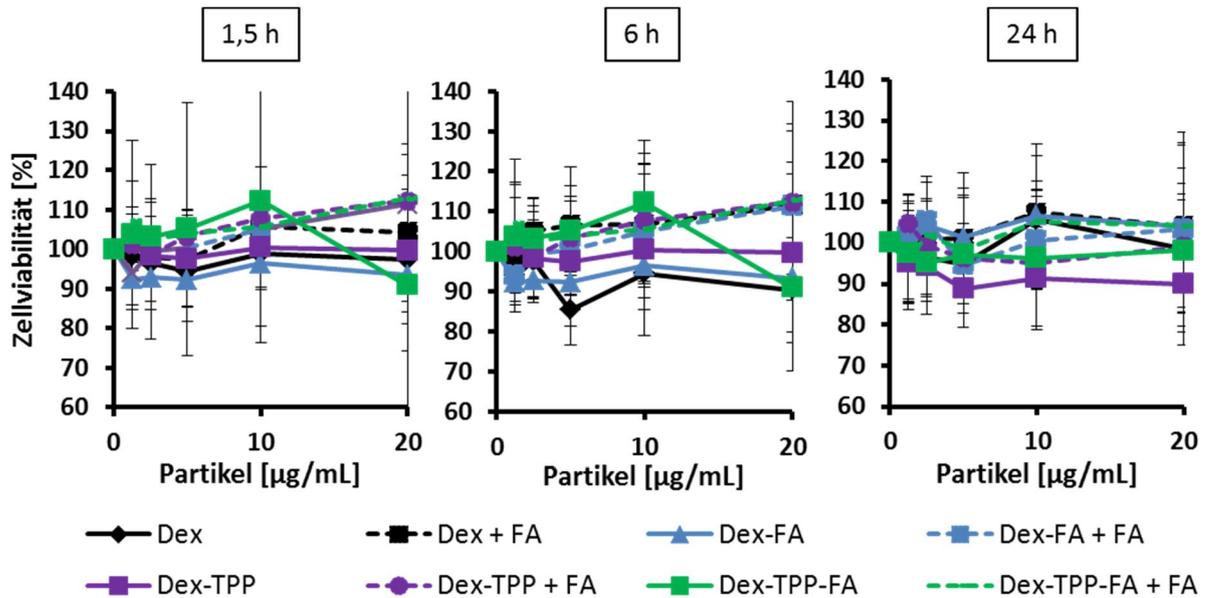


Abb. 5.16: Zellviabilität der Dunkelkontrollen nach Behandlung mit Dextran-Partikeln. KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 1,5 h (links), 6 h (Mitte) und 24 h (rechts) mit verschiedenen Konzentrationen von Dex und Dex-FA in Vollmedium sowie in An- und Abwesenheit von Folsäure (1 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten sind der Mittelwert aus 3-7 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Unabhängig von Partikel, Konzentration oder Vorinkubationszeit schwanken alle Werte der gemessenen Zellviabilität mit kleinen Abweichungen um 100 % Zellviabilität (relativ zur Kontrolle ohne Partikel). Das bedeutet, dass im untersuchten Bereich keiner der untersuchten Partikelarten, auch nicht die TPP-beladenen, ohne Lichteinfluss einen zytotoxischen Effekt hat. Folglich ist bewiesen, dass die ausgelöste Zytotoxizität von Dex-TPP-FA sowohl Rezeptor-vermittelt als auch lichtabhängig erfolgt.

Zusätzlich zu den bisher gezeigten Kontrollen wurde außerdem TPP-beladenes Dextran ohne Folsäure (Dex-TPP) untersucht. Da Rezeptor-vermittelte Aufnahme in diesem Fall nicht möglich ist, ist nach bisheriger Kenntnis keine Zytotoxizität zu erwarten ist. Auch hier war der Versuchsaufbau unverändert. Die ermittelten relativen Zellviabilitäten sind in Abb. 5.17 gezeigt.

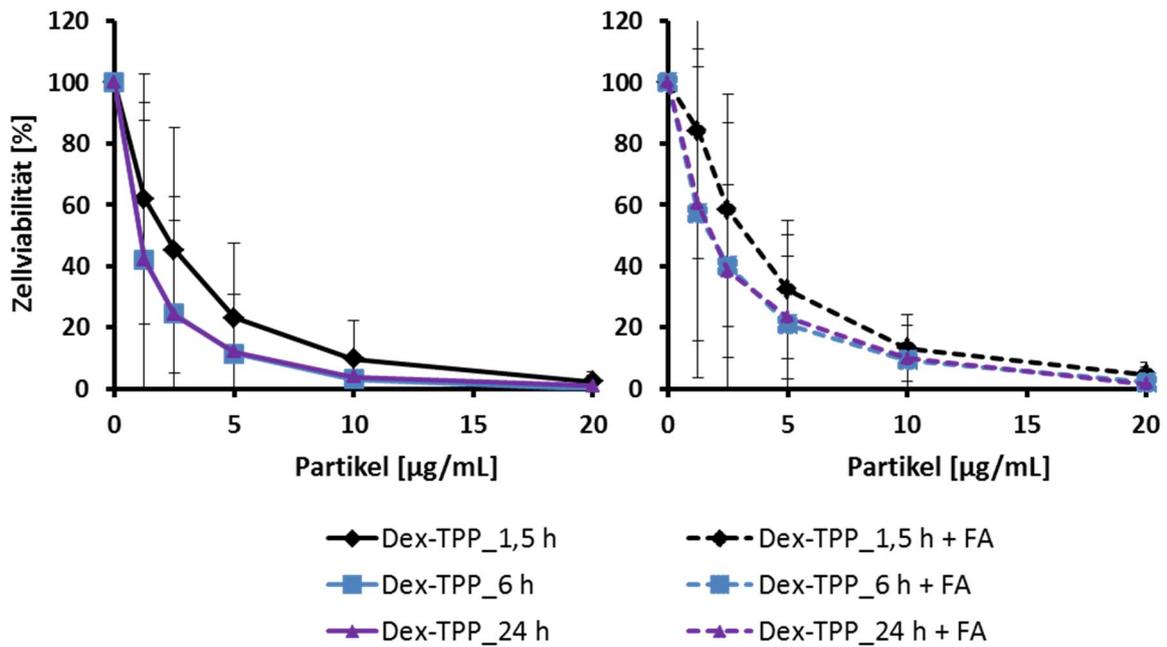


Abb. 5.17: Zellviabilität nach Dex-TPP Inkubation und anschließender Bestrahlung. KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 1,5 h, 6 h und 24 h mit steigenden Konzentrationen von Dex-TPP in Vollmedium in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von Folsäure (1 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS mit sichtbarem Licht bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten sind der Mittelwert aus 3-7 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Das erhaltene Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen. Die Partikel ohne Folsäure auf der Oberfläche zeigen nach Bestrahlung starke dosisabhängige Zytotoxizität (linkes Diagramm), deren Maximum schon nach erheblich kürzerer Vorinkubationszeit erreicht ist, als bei den Partikeln mit Folsäure auf der Oberfläche. Selbstverständlich steht dieser Effekt nicht im Zusammenhang mit dem FR α , wie auch im Versuch mit Folsäure-Überschuss bestätigt wurde (rechtes Diagramm). Auch bei Konkurrenz am Rezeptor zeigt sich dasselbe Ergebnis. Wie in Abb 5.16 bereits gezeigt wurde haben auch diese Partikel im Dunkeln keinerlei toxisches Potential. Das bedeutet, dass sich das phototoxische TPP aus den verwendeten Partikeln sehr schnell auf einem rezeptorunabhängigen Weg in den Zellen anreichert. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass das sehr lipophile Molekül ohne die hydrophile Schale aus Folsäure leichter in benachbarte Zellmembranen diffundieren kann, wodurch schnell unspezifische Phototoxizität ausgelöst werden würde. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Partikel wegen ihres kationischen Charakters über einen unspezifischen Endozytoseweg aufgenommen werden [33], während bei Dex-TPP-FA die freien Amine auf der Oberfläche weitgehend abgesättigt sind. Um dieser Frage auf den Grund

zu gehen, wurden TPP beladene Partikel aus acetalisiertem Dextran ohne Spermin-Modifikation hergestellt. Diese wurden mit den Spermin-modifizierten verglichen. Um diese beiden unterschiedlichen Partikel in Bezug auf die TPP-Anreicherung und daraus folgende Zytotoxizität vergleichen zu können, wurde hier auf die TPP-Konzentration und nicht auf die Konzentration der Partikel normiert. Diese wurde fluorimetrisch in DMF ermittelt und ist in Tabelle 5.5 gezeigt. In diesem Versuch werden zwei verschiedene Dex-TPP Partikel miteinander verglichen, deswegen wird für den folgenden Abschnitt auf folgende Kurznamen zurückgegriffen: Spermin-modifizierte Partikel = SpAcDex-TPP; nicht modifizierte Partikel = AcDex-TPP.

Tab. 5.5: *TPP-Konzentration in den verschiedenen Dextran-Partikeln*

	Konzentration Partikel	Konzentration TPP
SpAcDex-TPP	1 mg/mL	7,6 μ M
AcDex-TPP	1 mg/mL	5,4 μ M

KB Zellen wurden auch hier wieder für 1,5 h und 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen der Partikel inkubiert, anschließend gewaschen und in PBS mit sichtbarem Licht bestrahlt. Die Ergebnisse des darauf folgenden WST-1 Assays sind in Abb. 5.18 zu sehen.

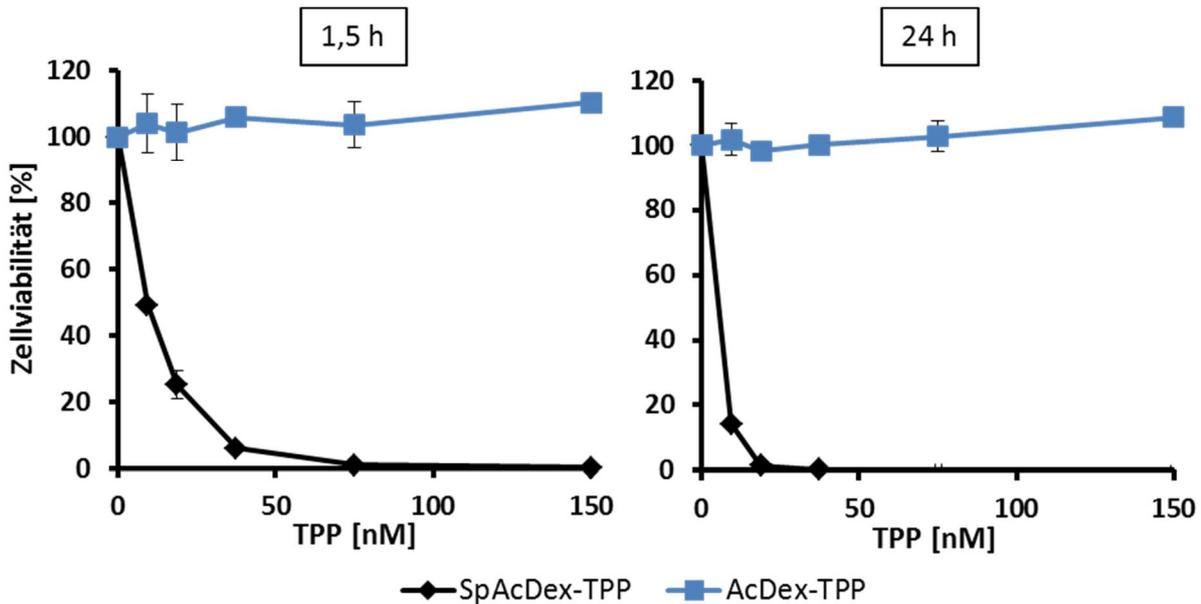


Abb. 5.18: Zellviabilität nach Inkubation und Bestrahlung mit TPP-beladenen SpAcDex- und AcDex-Partikeln. KB Zellen wurden über Nacht kultiviert, gewaschen und dann 1,5 h (links) und 24 h (rechts) mit steigenden Konzentrationen von SpAcDex-TPP und AcDex-TPP in Vollmedium in An- und Abwesenheit von Folsäure (1 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen gewaschen und in PBS mit sichtbarem Licht bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Viabilität der Zellen nach der Behandlung wurde mittels des WST-1 Assays bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Daten sind der Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Die Ergebnisse für SpAcDex-TPP aus den vorangegangenen Versuchen wurden durch diesen Versuch bestätigt. Da die hier verwendeten Konzentrationen fast identisch sind zu den Konzentrationen aus den anderen Versuchen, sind die Ergebnisse direkt vergleichbar. AcDex-TPP zeigt im untersuchten Konzentrationsbereich gleichzeitig überhaupt keine Zytotoxizität. Folglich kann Diffusion als Ursache für die schnell auftretende Toxizität ausgeschlossen werden. Stattdessen ist anzunehmen, dass die kationischen SpAcDex-TPP Partikel sehr schnell durch unspezifische Endozytose aufgenommen werden bis die Zellen damit abgesättigt sind, während die ungeladenen AcDex-TPP Partikel nicht in die Zelle eindringen können und deshalb keinerlei lichtinduzierte Zytotoxizität im untersuchten Konzentrationsbereich vermitteln.

5.1.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Zellaufnahme von TPP-beladenen Dextran-Partikeln

Um die unterschiedliche Aufnahme der verschiedenen Partikel in die Zellen näher zu charakterisieren, wurde ein Mikroskopie-Versuch durchgeführt. Hierfür wurden KB Zellen jeweils mit 10 µg/mL SpAcDex-TPP, SpAcDex-TPP-FA und AcDex-TPP in Medium versehen und für 30 min, 90 min oder 6 h inkubiert. In diesem Konzentrations- und Inkubationsbereich war in den vorangegangenen Studien bereits deutliche lichtabhängige Zytotoxizität der Spermin-modifizierten Partikel sichtbar, während die Partikel ohne Spermin keine Toxizität zeigten. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit PFA (4 %) fixiert und unter dem nicht-konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellen wurden außerdem mit DAPI gefärbt, um den Kern sichtbar zu machen. (Siehe Abbildung 5.19)

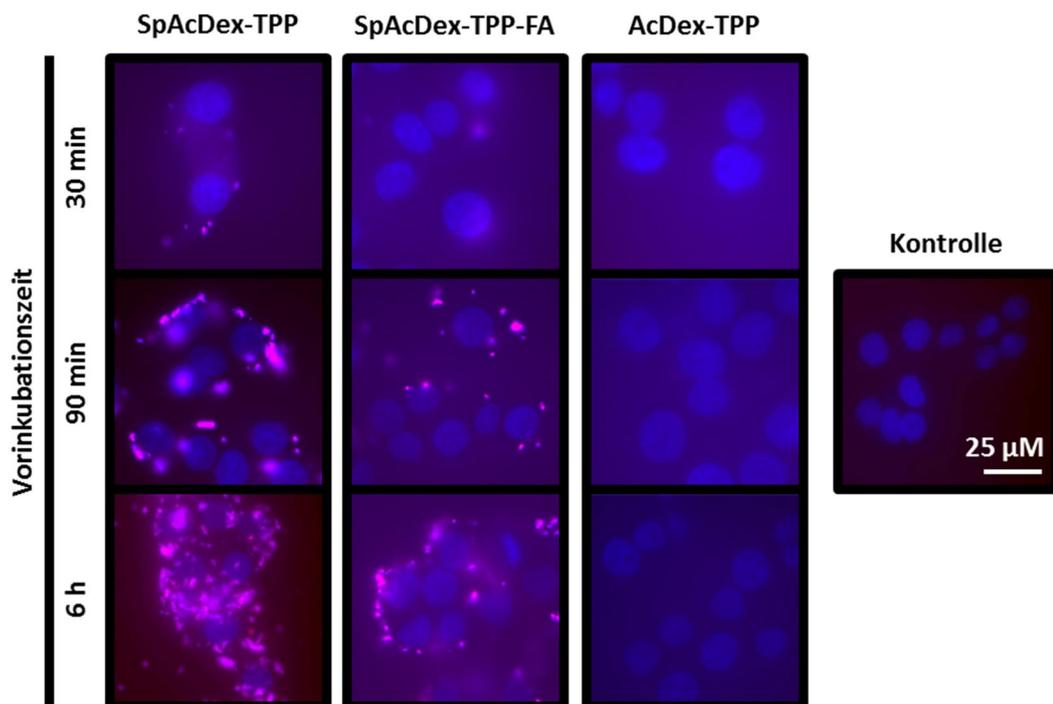


Abb. 5.19: Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme verschiedener Dextran-Partikel in KB Zellen. KB Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und unterschiedlich lang mit 10 µg/mL Lösungen von SpAcDex-TPP, SpAcDex-TPP-FA und AcDex-TPP inkubiert. Bei der Kontrolle handelt es sich um unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PFA (4 %) fixiert. Fotografiert wurden die Zellen mit Hilfe eines nicht-konfokalen Eclipse E400 Fluoreszenzmikroskops. Zu sehen sind die Fluoreszenz von DAPI (blau) und die Fluoreszenz von TPP (rot).

In der Abbildung ist zu erkennen, dass sich bei den Spermin-modifizierten Partikeln die TPP Fluoreszenz mit steigender Vorinkubationszeit in der Zelle anreichert, während nach Inkubation mit Partikeln ohne Spermin keine TPP Fluoreszenz in den Zellen zu sehen ist. Die Folsäure gekoppelten Partikel führen dabei zu einer langsameren Akkumulation als die kationischen Partikel ohne Folsäure. Die hier gezeigten Ergebnisse decken sich mit den Befunden aus den Zytotoxizitätsstudien, da die Partikel ohne Folsäure Kupplung schneller zu signifikanter lichtabhängiger Zytotoxizität geführt haben, als die Partikel mit Folsäure Kupplung.

Auch wenn die Auflösung des hier verwendeten Mikroskops nicht so hoch ist, wie in den vorangegangenen Versuchen in Abschnitt 5.1.1.1, ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenz innerhalb der Zelle in abgegrenzten Kompartimenten vorliegt. Während sie nach Folsäure-vermittelter Aufnahme geordnet in Vesikeln entlang der Oberfläche auftritt, scheint die Verteilung in der Zelle nach unspezifischer Endozytose eher diffus zu sein.

5.1.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellaufnahme von TPP-beladenen Dextran-Partikeln

Zusätzlich zur Visualisierung der intrazellulären TPP-Fluoreszenz unter dem Mikroskop sollte eine Quantifizierung der Aufnahme mittels Zytometrie erfolgen. Hierfür wurden KB Zellen jeweils mit 10 µg/mL SpAcDex-TPP, SpAcDex-TPP-FA und AcDex-TPP in Medium versetzt und für 30 min, 90 min oder 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, vereinzelt und mit PFA (4 %) fixiert. Die Anregung der TPP Fluoreszenz erfolgte im Durchflusszytometer mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Die bestimmte mittlere Fluoreszenz in den Zellen (670 nm LP) ist in Abbildung 5.20 aufgetragen.

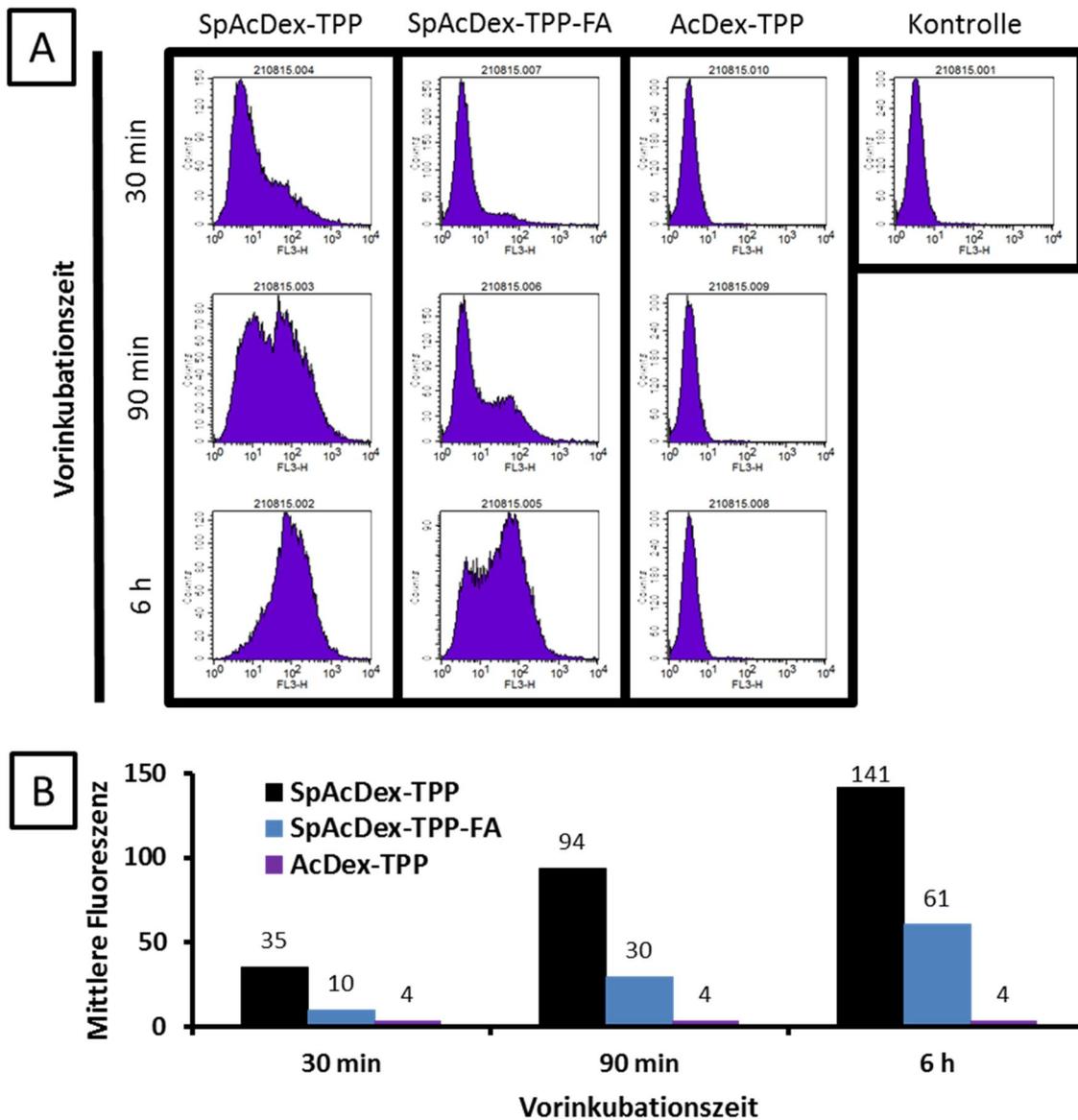


Abb. 5.20: Durchflusszytometrische Untersuchung der Aufnahme verschiedener Dextran-Partikel in KB Zellen. KB Zellen wurden unterschiedlich lang mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lösungen von SpAcDex-TPP, SpAcDex-TPP-FA und AcDex-TPP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, vereinzelt und mit PFA (4 %) fixiert. **A:** Histogramm: Counts (Zellzahl) gegen FL3 (Emission 670 nm LP). Berücksichtigt wurde die Hauptpopulation im forward scattering (FSC: Größe der Zellen) gegen aufgetragen gegen das sideward scattering (SSC: Granularität der Zellen). **B:** Mittlere Fluoreszenz aufgetragen gegen Vorinkubationszeit.

Die Ergebnisse, die mittels Durchflusszytometrie erhoben wurden, bestätigen die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsstudien und der Mikroskopie. Die intrazelluläre Fluoreszenz steigt mit der Vorinkubation bei SpAcDex-TPP und SpAcDex-TPP-FA an, während die intrazelluläre Fluoreszenz nach Inkubation mit AcDex-TPP auf dem Niveau der Kontrollzellen bleibt. Bemerkenswert ist, dass

sich nach Inkubation mit den Spermin-modifizierten Partikeln jeweils zwei Zellpopulationen bilden. Eine Population bleibt zuerst unverändert und zeigt ungefähr dieselbe Fluoreszenz wie die Kontrollzellen, während die zweite offenbar bereits TPP aufgenommen hat. Das Gleichgewicht zwischen diesen Populationen verschiebt sich mit längerer Vorinkubation in Richtung der Zellen, die eine deutliche intrazelluläre Fluoreszenz aufweisen. Auf mögliche Ursachen dieses Effektes wird in der Diskussion näher eingegangen. Im Fall der SpAcDex-TPP Partikel sind nach 6 h annähernd keine Zellen ohne TPP-Fluoreszenz nachweisbar. Bei den SpAcDex-TPP-FA geht dieser Prozess langsamer von statten.

5.2 Phototoxizität der Folsäure

Während der Studien zur Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Folsäure-Konjugate und Partikel wurde mehrfach mit einem Überschuss an Folsäure als Konkurrent am FR α gearbeitet. Bei diesen Versuchen wurde zu Anfang auch in Gegenwart dieses Folsäureüberschusses bestrahlt. Dabei stießen wir auf die hohe photochemische Aktivität der Folsäure und haben diese sowie die parallel beobachtete Photogeno- und Photozytotoxizität im Folgenden näher untersucht.

5.2.1 Extrazelluläre DNA schädigende Wirkung von Folsäure

Das Absorptionsmaximum von Folsäure liegt bei 368 nm. Zur Bestrahlung der Proben können also sowohl eine UVA Lampe mit einem Emissionsmaximum von 365 nm (siehe Abbildung 4.4), als auch eine Halogenlampe verwendet werden, deren Emissionsspektrum von ca. 340 bis 800 nm reicht. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der Bestrahlung von Folsäure ROS und weitere photoaktive Zerfallsprodukte entstehen (siehe Abschnitt 1.3.2) Zur Quantifizierung der durch Folsäure in Gegenwart von Licht induzierten DNA-Schäden wurde mit beiden Bestrahlungsarten ein PM2 Assay mit steigender Folsäure-Konzentration durchgeführt (siehe Abschnitt 4.6.1). Quantifiziert wurden die direkten Einzelstrangbrüche, die Fpg-sensitiven und die T4-endoV-sensitiven Läsionen (8-oxoG und AP-Läsionen bzw. Cyclobutanpyrimidindimere CPD und AP-Läsionen; siehe Abschnitt 3.5). Die Ergebnisse sind in Abb. 5.21 aufgetragen.

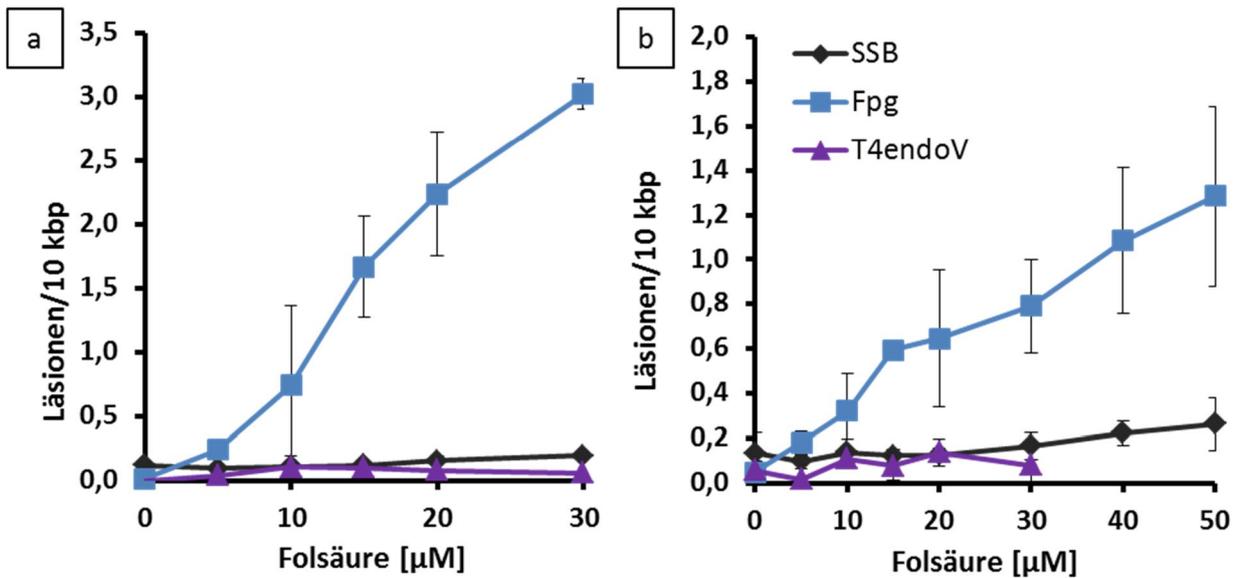


Abb. 5.21: PM2-Assay in Gegenwart steigender Folsäure-Konzentrationen. Anzahl induzierter DNA-Schäden (schwarz: SSB, blau: Fpg-sensitive Läsionen, violett: T4-endoV-sensitive Läsionen) in Gegenwart steigender Folsäure-Konzentrationen und **(a)** UVA Licht (365 nm, 30 kJ/m²) oder **(b)** Licht einer Halogenlampe (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 4 – 6 unabhängigen Versuchen ± SD.

Bei beiden Bestrahlungsarten ist ein dosisabhängiger Anstieg der induzierten Fpg-sensitiven Läsionen zu beobachten. Da weder SSB noch T4-endoV-sensitive Läsionen gebildet werden, ist davon auszugehen, dass durch die Behandlung überwiegend 8-oxoG gebildet wird. Im Dunkeln zeigte Folsäure keine DNA-schädigende Wirkung (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lässt sich anhand des bekannten Mechanismus der Fotodegradation von Folsäure (siehe Abbildung 1.14 und [102]) erklären, da während der Bestrahlung verschiedene ROS entstehen, die DNA oxidieren können. Aus dieser ROS Produktion ergibt sich ein interessanter Aspekt der Photochemie von Folsäure. Durch die Bestrahlung von Folsäure entsteht unter anderem das Zerfallsprodukt 6-Formylpterin (6-Fop), das eine höhere Triplett-Quantenausbeute hat als Folsäure selbst. Dieses photoaktive Zwischenprodukt reagiert unter Bestrahlung weiter zu 6-Carboxypterin (6-Cap). Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, das einerseits mit umliegenden Molekülen reagieren kann, aber auch in einer autokatalytischen Reaktion die Degradation von Folsäure zu 6-Fap beschleunigt (siehe dazu Abschnitt 1.3.2).

Weiterhin wurde ein PM2-Assay mit konstanter Folsäure-Konzentration (20 µM) aber steigender Bestrahlungszeit durchgeführt. Hierbei ist zu erwarten, dass durch vermehrte 6-Fap Bildung das

photogenotoxische Potential trotz konstanter Folsäure-Konzentration mit steigender Bestrahlungszeit exponentiell zunimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.22 aufgetragen.

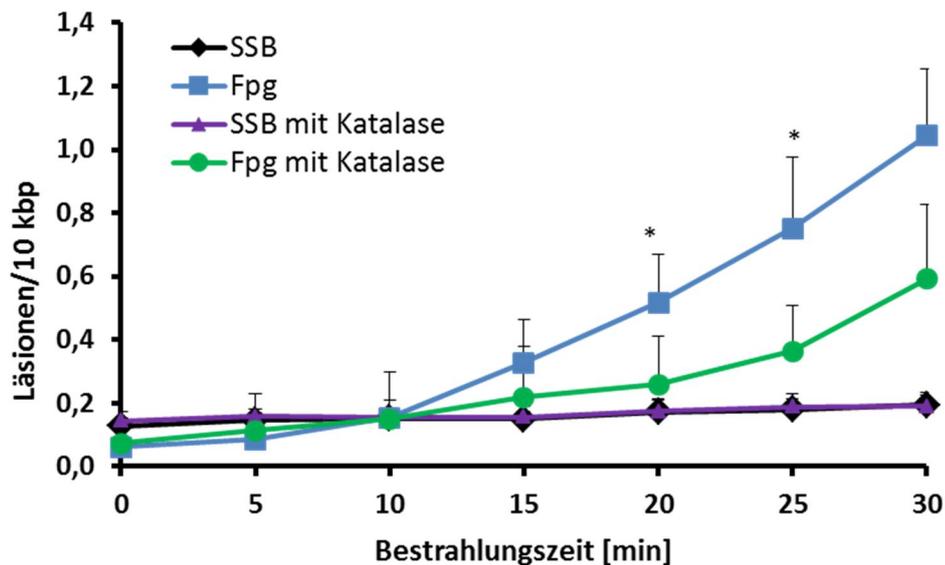


Abb. 5.22: *PM2-Assay in Gegenwart von Folsäure mit steigender Bestrahlungszeit.* Anzahl induzierter DNA-Schäden (SSB und Fpg-sensitive Läsionen) in Gegenwart von 20 μM Folsäure und sichtbarem Licht (33 cm; Bestrahlungszeiten: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min). Der Versuch wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von Katalase (315 U/mL) durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 4 – 6 unabhängigen Versuchen \pm SD. Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet und bezieht sich auf den korrespondierenden Datenpunkt mit Katalase (* $p < 0,05$).

Es wurde wie erwartet keine lineare sondern eine exponentielle Abhängigkeit der induzierten Fpg-sensitiven Läsionen von der Bestrahlungszeit gefunden. Bei kurzen Bestrahlungszeiten ist die moderate Induktion von 8-oxoG vermutlich noch auf die wenig photoaktive Folsäure zurückzuführen. Mit steigender Bestrahlungszeit entstehen größere Mengen des photoaktiveren Zerfallsproduktes 6-Fop, wodurch mehr Schäden induziert werden. Die 6-Fop-Entstehung wird weiterhin durch die H_2O_2 -Bildung in der Reaktion beschleunigt, wodurch die Induktion von 8-oxoG in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit einen exponentiellen Kurvenverlauf annimmt. Durch Zugabe von Katalase wurde der Anstieg Fpg-sensitiver Läsionen mit der Bestrahlungszeit signifikant verlangsamt (siehe Abbildung 5.22), womit der Einfluss des in der Reaktion entstehenden H_2O_2 auf den Verlauf der Kurve gezeigt werden konnte.

Nachdem die Anwesenheit von Katalase während der Bestrahlung mit Folsäure einen solch deutlichen Effekt gezeigt hatte, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem der Einfluss von Katalase, SOD und D_2O bei konstanter Bestrahlungszeit (Halogenlampe, 15 min, 33 cm; 338 kJ/m^2) durchgeführt wurden. Dabei zersetzt Katalase anwesendes H_2O_2 und SOD anwesende Superoxid-Radikale. Singulett-Sauerstoff hat in deuteriertem Wasser (D_2O) eine etwa 10fach längere Lebensdauer als in H_2O [113] und kann deswegen mehr Schäden generieren. Durch die relative Veränderung der entstehenden Fpg-sensitiven DNA-Schäden können Rückschlüsse auf die entstehenden ROS gezogen werden. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ Folsäure wurden vereinigt und sind in Abb. 5.23 aufgetragen.

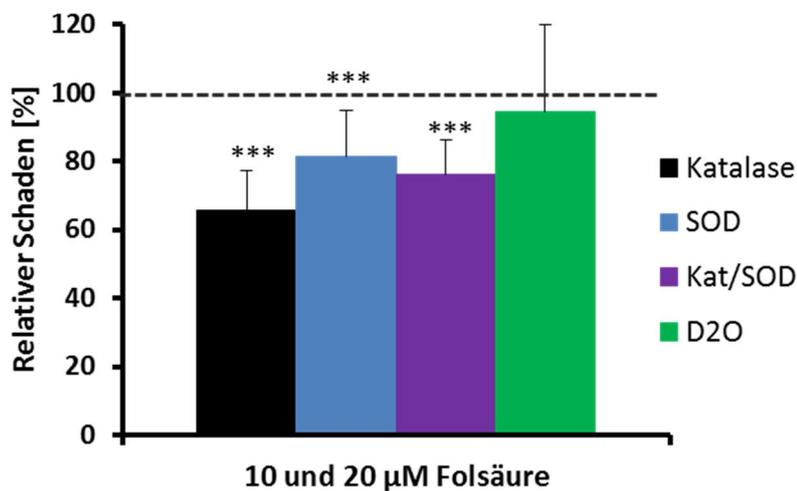


Abb. 5.23: *Relativer Fpg-sensitiver DNA-Schaden nach Bestrahlung von Folsäure in Gegenwart von Katalase, SOD und D_2O . Folsäure (10 und $20 \mu\text{M}$) wurde zusammen mit PM2-DNA mit sichtbarem Licht bestrahlt (33 cm , 15 min ; 338 kJ/m^2), sowohl in Phosphatpuffer mit und ohne Katalase (315 U/mL) und/oder SOD ($200 \mu\text{g/mL}$), als auch in D_2O -haltigem Phosphatpuffer. Die aufgetragenen Werte beziehen sich auf die Anzahl der durch Folsäure allein unter den Bestrahlungsbedingungen induzierten Fpg-sensitiven Läsionen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 6 unabhängigen Versuchen \pm SD. Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet ($***p < 0,005$).*

Im Einklang mit dem oben beschriebenen Mechanismus der Schadensinduktion ist zu erkennen, dass die induzierten Fpg-sensitiven Schäden in Gegenwart von Katalase und/oder SOD signifikant erniedrigt sind. Das bestätigt die Annahme, dass bei der Photodegradation von Folsäure in großem Maße H_2O_2 , aber auch Superoxid-Radikale und O_2^- entstehen. Diese werden durch die Anwesenheit der Enzyme zersetzt und es kommt zu geringerer Schadensinduktion. D_2O zeigt

hingegen keinen Effekt, was die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff bei der DNA-Schädigung durch Folsäure ausschließt.

5.2.2 Zytotoxizität von Folsäure

Um auch die intrazelluläre, phototoxische Wirkung von Folsäure zu charakterisieren, wurden Zytotoxizitätsstudien durchgeführt. Dafür wurden KB-Zellen verwendet, die den FR α in hohem Maße exprimieren. Diese wurden 15 min lang in Gegenwart steigender Folsäure-Konzentrationen inkubiert und anschließend bestrahlt. Da in den zellfreien Versuchen beide Bestrahlungsarten gute Ergebnisse geliefert haben, wurde wegen der einfacheren Handhabung bei den Zytotoxizitätsstudien die Halogenlampe verwendet. Die Bestrahlung wurde in dieser Versuchsreihe in Gegenwart der Inkubationslösungen durchgeführt. Da Folsäure auch oberhalb von 368 nm absorbiert, wurde außerdem getestet, wie viel Einfluss Licht oberhalb von 400 nm auf die Photoaktivität der Folsäure hat. Hierfür wurde der Versuch in An- und Abwesenheit eines *Cut-Off*-Filter durchgeführt, der nur Licht oberhalb von 400 nm passieren lässt. Zusätzlich wurde die unbestrahlte Dunkelkontrolle mitgeführt und im Diagramm aufgetragen. Als Endpunkt wurde die Proliferation nach 72 h bestimmt und die Ergebnisse in Abb. 5.24 abgebildet.

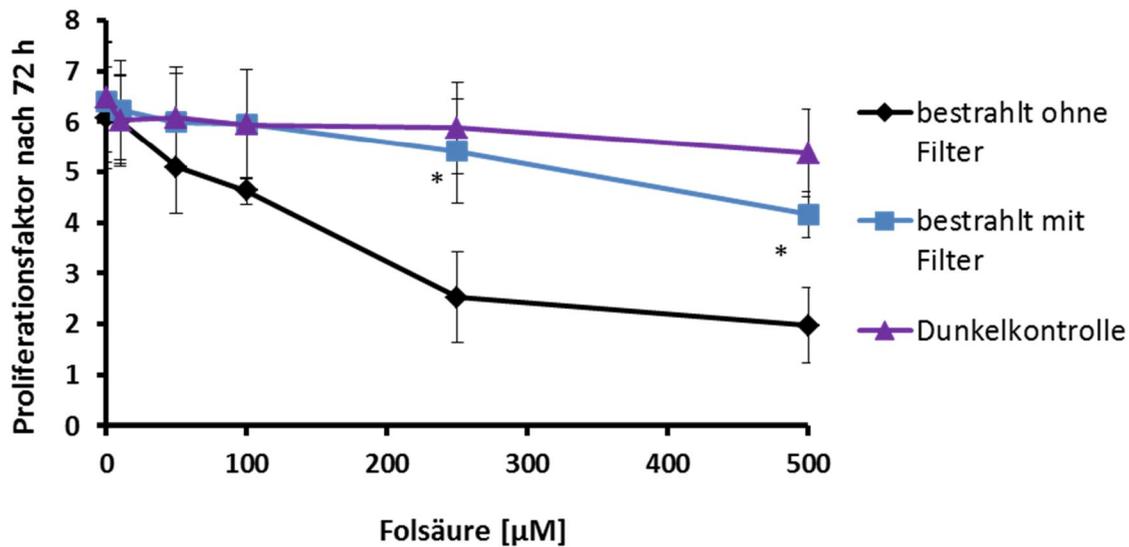


Abb. 5.24: Zellproliferation nach Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure. Aufgetragen ist der Proliferationsfaktor der Zellen 72 h nach der Bestrahlung gegen die Folsäure-Konzentration. Die Zellen wurden 48 h kultiviert, dann mit den Folsäure-Lösungen versehen und mit der Halogenlampe (33 cm, 15 min; 338 kJ/m²) mit und ohne Cut-Off-Filter bestrahlt. 72 h nach der Bestrahlung wurde der Proliferationsfaktor bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen \pm SD. Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet und bezieht sich auf den korrespondierenden Datenpunkt ohne Filter (* $p < 0,05$).

Ohne Filter war eine dosisabhängige Phototoxizität zu erkennen, die durch die Anwesenheit des Filters signifikant verringert wurde. Erst bei sehr hohen Folsäure-Konzentrationen trat hier eine sichtbare Zytotoxizität ein. Ohne Bestrahlung zeigte die Folsäure keinen zytotoxischen Effekt. Das bedeutet, dass für die Photoaktivität der Folsäure hauptsächlich UVA Strahlung verantwortlich ist.

Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob die lichtinduzierte Zytotoxizität der Folsäure durch extra- oder intrazelluläre Schädigung verursacht wurde. Hierfür wurde der Versuch in Abwesenheit und Anwesenheit von Katalase (315 U/mL) im Bestrahlungsmedium wiederholt. Katalase setzt H₂O₂ in Wasser und Sauerstoff um. Da das Enzym die Zellmembran nicht passieren kann, wird ausschließlich extrazelluläres H₂O₂ entfernt. Des Weiteren wurden Versuche mit dem Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Inhibitor Methotrexat (MTX) durchgeführt. Da Folsäure intrazellulär sehr schnell metabolisiert wird (siehe Abbildung 1.12), wird auf dieses Hilfsmittel zurückgegriffen, um den Effekt intrazellulärer, nicht metabolisierter Folsäure auf die lichtabhängige Zytotoxizität zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen zuerst 1 h mit 100 μM MTX inkubiert, bevor die Bestrahlungslösungen (Folsäure + Katalase) hinzugegeben wurden. Während der Bestrahlung befand sich kein MTX auf den Zellen, da es selbst ähnlich photoaktiv wie Folsäure

ist. Auch hier wurde als Endpunkt zum einen die Proliferation nach 72 h und zusätzlich die Zellviabilität direkt nach der Bestrahlung, mithilfe des WST-1 Assays bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 5.25 gezeigt.

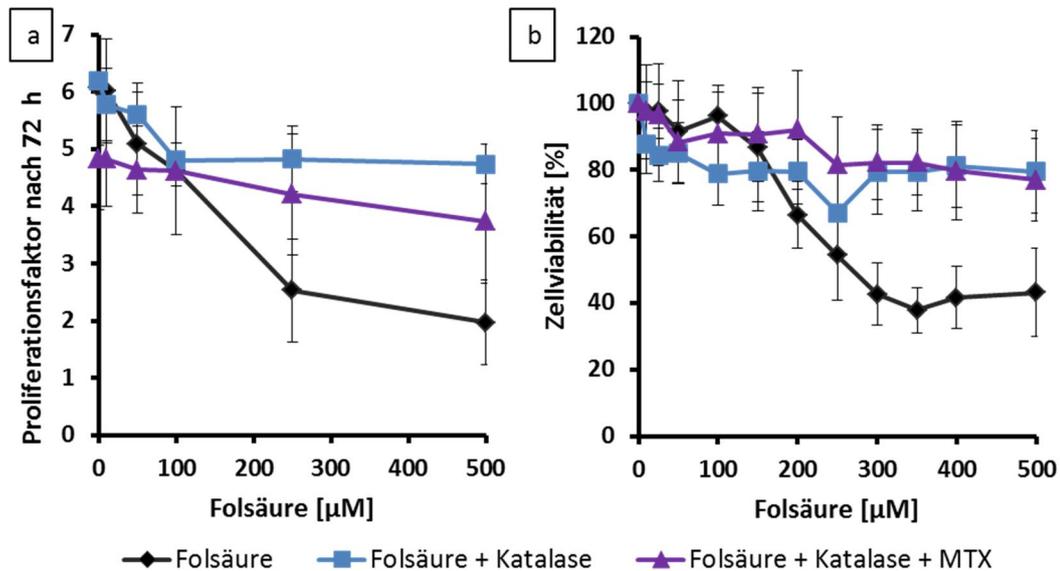


Abb. 5.25: Zellproliferation und Viabilität nach Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure.
 a) Aufgetragen ist der Proliferationsfaktor der Zellen nach 72 h gegen die Folsäure-Konzentration. Die Zellen wurden erst 48 h und kultiviert, dann mit den Folsäure-Lösungen versehen, 15 min bei 37° C inkubiert und mit der Halogenlampe (33 cm, 15 min; 338 kJ/m²) bestrahlt. Nach 72 h wurde der Proliferationsfaktor bestimmt. b) Aufgetragen ist die Zellviabilität direkt nach der Bestrahlung gegen die Folsäure-Konzentration. Die Zellen wurden erst 24 h kultiviert, dann mit den Folsäure-Lösungen versetzt, 15 min bei 37° C inkubiert und mit der Halogenlampe (33 cm, 15 min; 338 kJ/m²) bestrahlt. Die Werte wurden relativ zu den Kontrollwerten (bestrahlt ohne Folsäure) bestimmt. Es wurden jeweils Lösungen mit Folsäure, Folsäure + Katalase (315 U/mL) und Folsäure + Katalase (315 U/mL) + MTX (100 μM) eingesetzt. MTX wurde 1 h vor der Bestrahlung zu den Zellen gegeben. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 3 - 6 unabhängigen Versuchen ± SD.

Die Zytotoxizität von Folsäure ist nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht bei beiden gemessenen Endpunkten (Proliferation und Zellviabilität) vergleichbar. Durch Anwesenheit von Katalase in den Bestrahlungslösungen wurde dieser zytotoxische Effekt in beiden Fällen sehr stark reduziert, wenn nicht sogar komplett verhindert. Da Katalase nicht in die Zelle eindringen kann und deshalb nur extrazelluläres H₂O₂ abfängt, kann man aus diesem Befund schließen, dass die beobachtete lichtabhängige Zytotoxizität von Folsäure durch extrazellulär produzierte ROS zustande kommt,

die die Zellen von außen beschädigen. Folsäure wird nach Aufnahme in die Zelle sehr schnell von der hochaffinen DHFR zu Tetrahydrofolsäure (THF) metabolisiert (siehe Abbildung 1.12), wodurch sie ihre Aromatizität und somit auch die Photoaktivität verliert. Durch Inhibition der DHFR durch MTX konnte keine gesteigerte Zytotoxizität, verglichen mit den Werten ohne MTX-Vorinkubation, gezeigt werden. Es konnte trotz DHFR-Inhibition offenbar nicht genug unmetabolisierte Folsäure in der Zelle angereichert werden, um einen zytotoxischen Effekt auszulösen. Allerdings wird durch MTX die Proliferation leicht gehemmt, wie in Abb. 5.25a am niedrigeren Proliferationsfaktor der bestrahlten Kontrollzellen mit MTX-Vorinkubation, verglichen mit den bestrahlten Kontrollzellen ohne MTX-Vorinkubation, zu erkennen ist (siehe Datenpunkte auf der Ordinatenachse).

5.2.3 Intrazelluläre DNA schädigende Wirkung von Folsäure

Um die DNA-schädigende (also genotoxische) Wirkung von Folsäure unter Bestrahlung in Zellen zu untersuchen, wurden Versuche mit der alkalischen Elution durchgeführt (siehe Abschnitt 4.6.2). Hierfür wurden die Zellen über Nacht kultiviert, bevor sie mit den jeweiligen Inkubationslösungen versehen wurden. Auch bei diesen Versuchen wurde wegen der einfacheren Handhabung die Bestrahlung mit der Halogenlampe durchgeführt. Nach Vorinkubation und Bestrahlung (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²) wurden die Zellen abgelöst und jeweils 1 Mio. auf jede Filterspur aufgetragen. Die Zellen wurden lysiert, die DNA mit Fpg inkubiert und die resultierenden DNA-Stücke eluiert. Die Quantifizierung der Schäden erfolgte mittels Bisbenzimid Fluoreszenz in den einzelnen Elutionsfraktionen.

Zuerst wurden KB Zellen 15 min mit steigenden Folsäure-Konzentrationen in PBS inkubiert und anschließend in Gegenwart der Inkubationslösungen ohne *Cut-Off* Filter bestrahlt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 5.26 gezeigt.

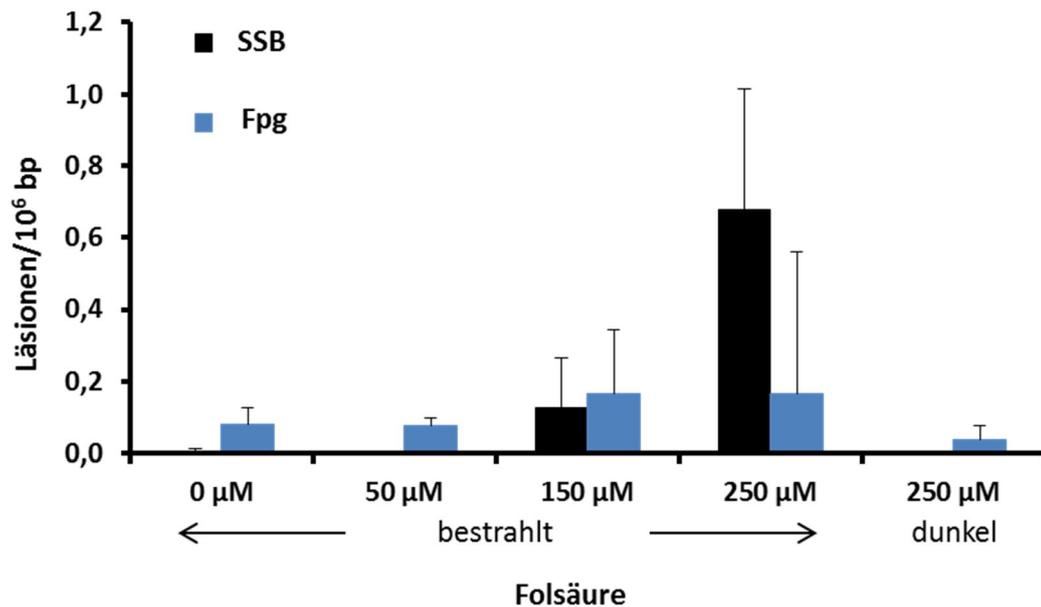


Abb. 5.26: Induktion intrazellulärer DNA-Schäden durch Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure. KB-Zellen wurden über Nacht kultiviert, 15 min lang mit verschiedenen Folsäure-Konzentrationen in PBS inkubiert und anschließend mit einer Halogenlampe in Gegenwart der Folsäure-Lösungen bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Zellen wurden abgelöst und die intrazellulären DNA-Schäden mittels alkalischer Elution bestimmt. Aufgetragen sind die induzierten Läsionen (SSB und Fpg-sensitive Läsionen) pro 1 Mio. Basenpaaren gegen die Folsäurekonzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen (+SD).

Mit steigender Folsäure-Konzentration ist ein deutlicher Anstieg der SSB zu erkennen, während die Anzahl der Fpg-sensitiven Läsionen gleich bleibt. Bei 50 μM Folsäure wurden noch keine zusätzlichen SSB induziert. Der hier erhaltene Befund deckt sich mit den Daten, die im Abschnitt 5.2.2 für die Phototoxizität der Folsäure gezeigt wurden. Bei 50 μM wurde nur eine milde Zytotoxizität ausgelöst, entsprechend ist hier noch kein Anstieg der Einzelstrangbrüche zu erkennen. Bei Dosen, die bereits eine deutliche lichtabhängige Zytotoxizität zeigen (siehe Abbildung 5.21), können die detektierten SSB auch durch Mechanismen erklärt werden, die zum Zelltod führen, wie zum Beispiel Apoptose, bei der in großen Mengen SSB (aber keine oxidierten Basen) entstehen. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der beobachteten SSB ist, dass extrazellulär generiertes H₂O₂ zur DNA diffundiert und dort in einer Fenton-Reaktion SSB generiert. Aus diesen Gründen lässt das beschriebene Ergebnis noch keinen endgültigen Rückschluss auf eine DNA-schädigende Wirkung von intrazellulärer Folsäure zu. Hierfür wurde der Versuch unter Zusatz von Katalase wiederholt. Dazu wurden Folsäure-Konzentrationen bis zu

250 μM eingesetzt, die, wie oben beschrieben, in Gegenwart von Katalase keine signifikante Zytotoxizität zeigten (siehe Abb. 5.25.). Außerdem wurde die DNA-Schädigung nach MTX-Vorinkubation und anschließender Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure bestimmt. Hierfür wurden die Zellen wie bereits für die Zytotoxizitätsversuche (Abbildung 5.24) 1 h lang mit 100 μM MTX in PBS inkubiert, gewaschen und dann mit den Folsäure-Lösungen in Gegenwart von Katalase bestrahlt. Diese Proben wurden von da an genauso behandelt wie die Proben ohne MTX-Vorinkubation. Für eine bessere Einschätzung der Ergebnisse wurden zusätzlich zu den KB Zellen außerdem zwei weitere Zelllinien untersucht. Hierfür wurden Zellarten gewählt, die im Organismus tatsächlich sichtbarem Licht ausgesetzt sind. M2IV/04 Zellen sind Zellen eines malignen Melanoms. HaCaT Zellen sind eine Zelllinie aus spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (p53 defizient). Die mit diesen drei Zelllinien erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 5.27 zusammengefasst.

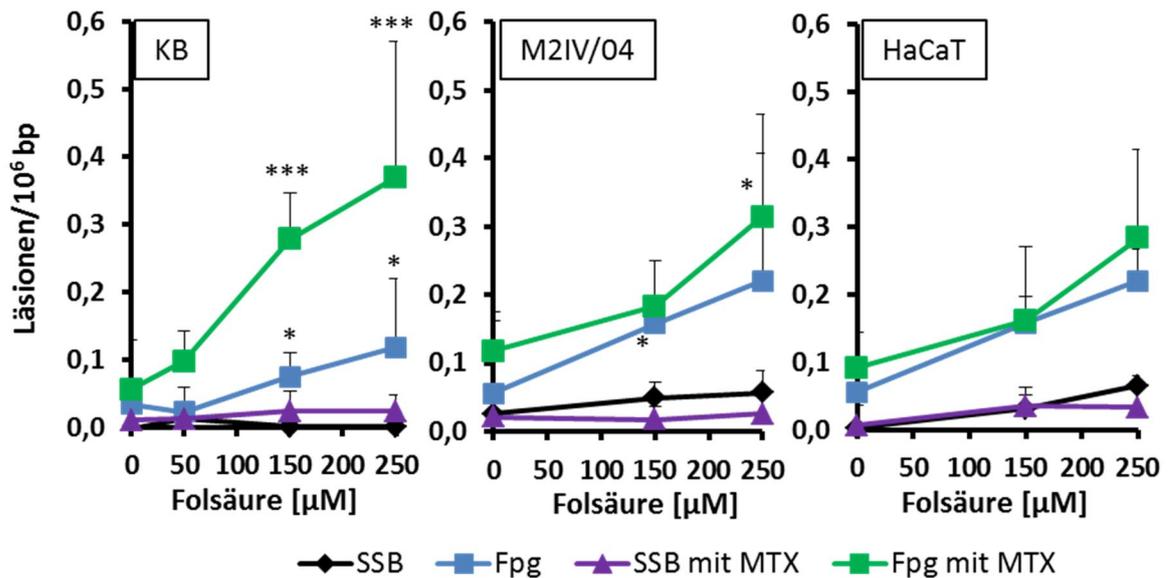


Abb. 5.27: Induktion intrazellulärer DNA-Schäden nach Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure mit und ohne MTX-Vorinkubation. KB-, M2IV/04- und HaCaT-Zellen wurden über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden entweder 1 h lang mit 100 μM MTX in PBS vorinkubiert oder in Medium weiter kultiviert. Dann wurden sie 15 min lang mit verschiedenen Folsäurekonzentrationen in PBS inkubiert und anschließend mit der Halogenlampe in Gegenwart von Katalase bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Die Zellen wurden abgelöst und die intrazellulären DNA-Schäden mittels alkalischer Elution bestimmt. Aufgetragen sind die induzierten Läsionen (SSB und Fpg-sensitive Läsionen) pro 1 Mio. Basenpaaren gegen die Folsäurekonzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 – 6 unabhängigen Versuchen (±SD). Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet und bezieht sich jeweils auf die korrespondierende Kontrolle, die ohne Folsäure bestrahlt wurde (*p < 0,05; ***p < 0,005).

Es ist bei allen drei Zelllinien zu erkennen, dass es nach Bestrahlung mit Folsäure keinen dosisabhängigen Anstieg induzierter SSB gibt, wenn das extrazellulär entstandene H₂O₂ durch die zugesetzte Katalase abgefangen wird. Dies erhärtet die Vermutung, dass die SSB, die in den Versuchen ohne Katalase beobachtet wurden (Abbildung 5.26), durch indirekte, eventuell Zelltod-assoziierte Mechanismen entstehen. Gleichzeitig ist ein leichter, aber teilweise signifikanter (bezogen auf die jeweils korrespondierende Kontrolle ohne Folsäure), dosisabhängiger Anstieg Fpg-sensitiver Läsionen zu beobachten. Dabei handelt es sich um eine Art von Schaden, der typisch für die direkte Schädigung durch Folsäure (siehe Abbildung 5.21) ist und nicht für H₂O₂. Durch die vorherige Inkubation mit MTX ändert sich die Anzahl der induzierten Schäden in den M2IV/04 und den HaCaT Zellen so gut wie nicht, während in den KB Zellen ein deutlicher Anstieg der Anzahl oxidierter Basen im Vergleich zu den Proben ohne MTX zu erkennen ist. Durch die Inhibition der DHFR durch MTX konnte in dieser Zelllinie deutlich mehr unmetabolisierte Folsäure akkumulieren,

um durch Bestrahlung eine signifikant erhöhte DNA-schädigende Wirkung in Zellen zu verursachen. Ohne Bestrahlung zeigte in keiner der drei Zelllinien auch die höchsten Folsäure-Konzentrationen einen Effekt auf die DNA-Schadensinduktion (Daten nicht gezeigt). Der Grund für den Unterschied in den untersuchten Zelllinien könnte eine unterschiedliche Rezeptordichte des FR α auf der Zelloberfläche sein. Deshalb wurde die Rezeptordichte mittels Immunostaining und darauffolgende Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.28 dargestellt. Sie zeigen, dass HaCaT und M2IV/04 Zellen im Vergleich zu KB Zellen nur sehr wenig FR α exprimieren.

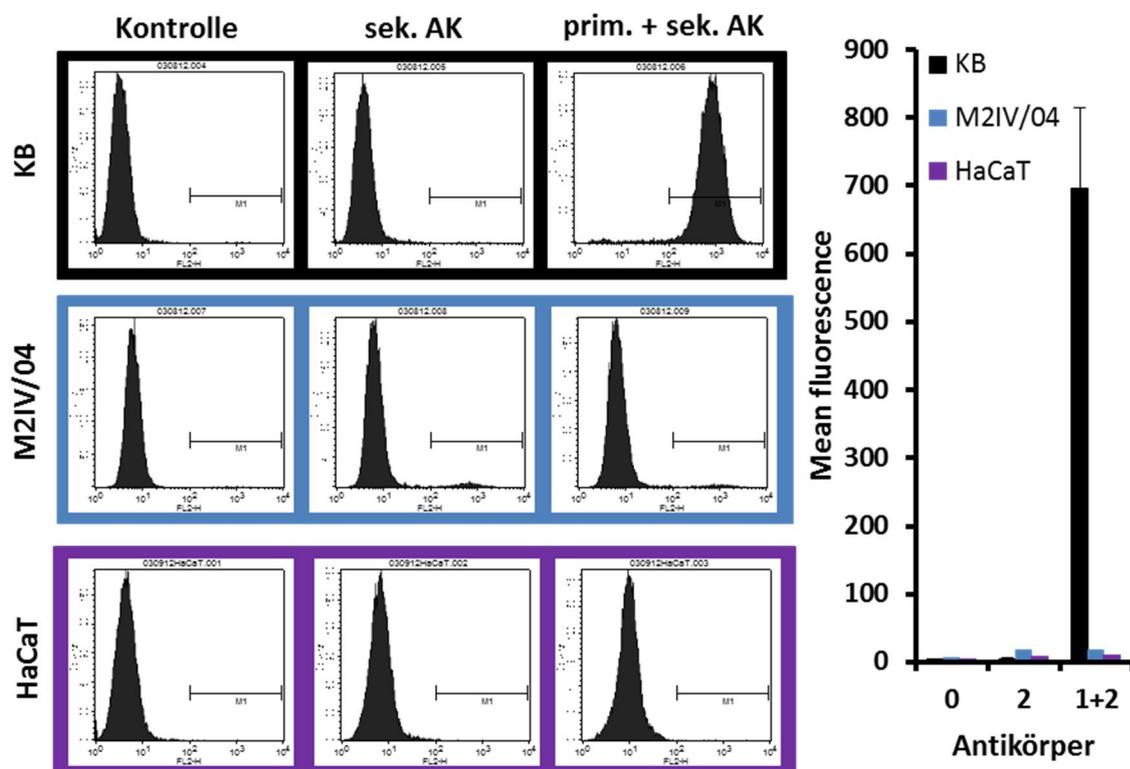


Abb. 5.28: Quantifizierung des FR α auf der Zelloberfläche der verwendeten Zelllinien mittels Immunostaining. Die Zellen wurden abgelöst und mit einem murinen IgG AK gegen den human FR α inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem FITC-markierten goat-anti-mouse IgG AK versehen. Nach dem waschen wurden die Zellen mit eiskaltem PFA (4 %) fixiert und die FITC Fluoreszenz im Durchflusszytometer aufgenommen. Als Kontrolle wurden unmarkierte Zellen und Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper behandelt wurden verwendet.

Mit diesem Ergebnis lassen sich die bisherigen Befunde am besten wie folgt interpretieren. In allen drei Zelllinien werden direkt DNA-Schäden durch Folsäure und Licht induziert. Die hierfür verwendete Folsäure kann von den HaCaT und M2IV04 Zellen über den *reduced folate carrier*

(RFC) aufgenommen werden. Durch die hohe FR α Dichte auf der Oberfläche der KB Zellen, können allerdings größere Mengen Folsäure in die Zelle transportiert werden. Auch MTX hat als Folsäure-Analogon eine hohe Affinität zum FR α , wodurch auch dessen Aufnahme durch die Rezeptordichte beeinflusst wird. Den M2IV/04 und den HaCaT Zellen steht fast ausschließlich der RFC zur Verfügung. Dadurch können diese zwei Zelllinien in der begrenzten Zeit weder genug MTX, noch genug unmetabolisierte Folsäure im Zellinneren anreichern, um eine erhöhte DNA-schädigende Wirkung nach Bestrahlung durch Hemmung der DHFR zu verursachen.

Die in Abbildung 5.27 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch ohne Folsäure durch die Bestrahlung allein DNA-Schäden induziert werden (Datenpunkte auf der Ordinate). Dies wurde bereits früher für verschiedene Zellarten beobachtet. Diese wurden aus allen durchgeführten Versuchen gemittelt und sind in Abb. 5.29 dargestellt. In den vorangegangenen Abbildungen wurden die Daten jeweils abzüglich des Hintergrunds (*steady state*: Gleichgewichtslevel der Schäden ohne Licht- oder Substanz-vermittelte Induktion) aufgetragen, der jeweils in den unbehandelten Dunkelkontrolle gemessen wurde. Hier sind die Daten inklusive *steady state* gezeigt.

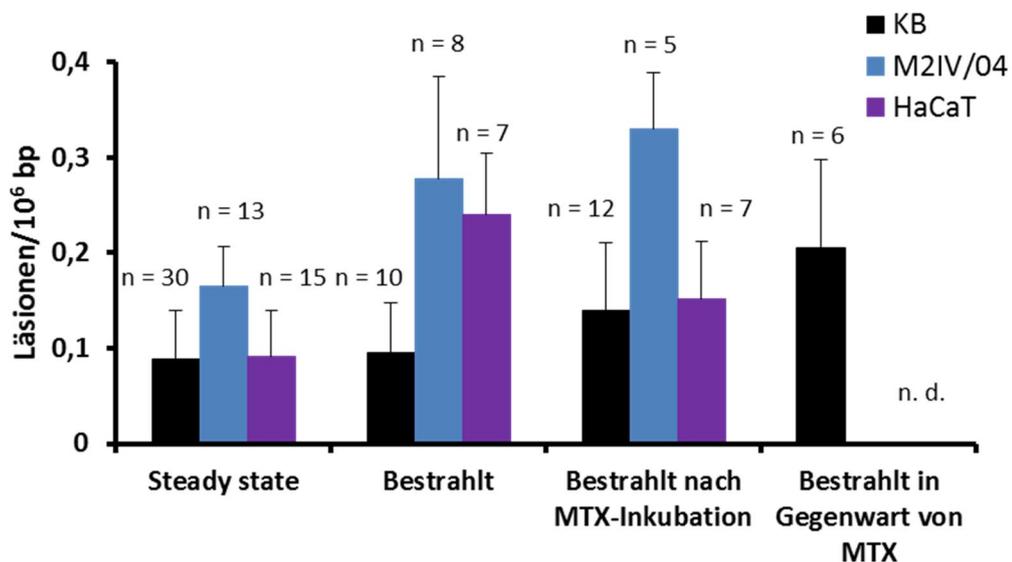


Abb. 5.29: *Fpg-sensitive Schadenslevel der verwendeten Zelllinien ohne Induktion und nach verschiedenen Behandlungen ohne Folsäure.* Aufgetragen ist die Gesamtzahl der Fpg-sensitive Läsionen (a) ohne Behandlung (basale Schäden; steady state level), (b) nach Bestrahlung, (c) nach Bestrahlung nach MTX-Vorinkubation und (d) nach Bestrahlung in Gegenwart von MTX. Die dargestellten Werte sind der Mittelwert aus 5 – 30 unabhängigen Versuchen (+SD).

KB Zellen zeigen eine ausgesprochene Unempfindlichkeit gegenüber der Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die induzierten Grundschäden durch Licht und Licht + MTX-Vorinkubation unterscheiden sich nur wenig vom *steady state* Level. Lediglich die Bestrahlung in Gegenwart von MTX, die nur bei KB Zellen durchgeführt wurde, führte zu einer leichten Erhöhung des Fpg-sensitiven Schadens. Dies lässt sich dadurch erklären, dass MTX eine sehr ähnliche Struktur wie Folsäure hat und deswegen auch eine ähnliche Photoaktivität aufweist. M2IV/04 hat von den drei untersuchten Zelllinien den höchsten Fpg-sensitiven *steady state* Level. Außerdem kommt es zu einer deutlichen Schadensinduktion durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht ohne den Einfluss von Folsäure und/oder MTX. Die relativ zum *steady state* Level stärkste Schadensinduktion durch sichtbares Licht ist bei den HaCaT Zellen zu beobachten. Deren Lichtempfindlichkeit wurde bereits publiziert [111]. Die Erklärung für die sehr unterschiedliche Lichtempfindlichkeit der verschiedenen Zellen könnte entweder an einer unterschiedlichen Konzentration endogener Photosensibilisatoren, wie zum Beispiel Porphyrin, liegen oder an einer unterschiedlichen Ausstattung an Antioxidantien. Für letzteres spricht, dass auch bei der Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure zu erkennen ist, dass bei M2IV/04 und HaCaT ohne MTX Vorinkubation ein steilerer dosisabhängiger Anstieg Fpg-sensitiver Läsionen zu erkennen war, als bei den KB Zellen.

5.2.4 Mutagenität von Folsäure

Nachdem das DNA-schädigende Potential von Folsäure in Gegenwart von Licht nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob damit auch eine signifikante Mutagenität und damit ein erhöhtes Krebsrisiko verbunden sind. Als besonders empfindlicher Indikator für Mutagenität gilt die Bildung von Mikrokernen (siehe Abschnitt 4.7). Dabei handelt es sich um kleine DNA-Fragmente, die vom eigentlichen Kern entfernt liegen und mit einer eigenen Kernhülle versehen sind. Die Menge an Mikrokernen ist ein Maß für die Mutagenität. Zum Nachweis von Mikrokernen wurden KB Zellen wie in den vorangegangenen Versuchen mit steigenden Konzentrationen an Folsäure (+ Katalase) in PBS für 15 min inkubiert und anschließend mit sichtbarem Licht (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²) bestrahlt. Teilweise wurde auch hier vor der Folsäure-Zugabe eine Vorinkubation mit MTX (1 h, 100 µM) vorgenommen. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen gewaschen, mit Medium versehen und für 24 h (ca. ein Zellzyklus) im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, im Cytospin auf Objektträger aufgebracht und in Methanol fixiert. Die DNA wurde

mit Bisbenzimid angefärbt und die Anzahl der Mikrokern bestimmt. Das Ergebnis der Mikrokern Quantifizierung nach Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure ist in Abb. 5.30 aufgetragen.

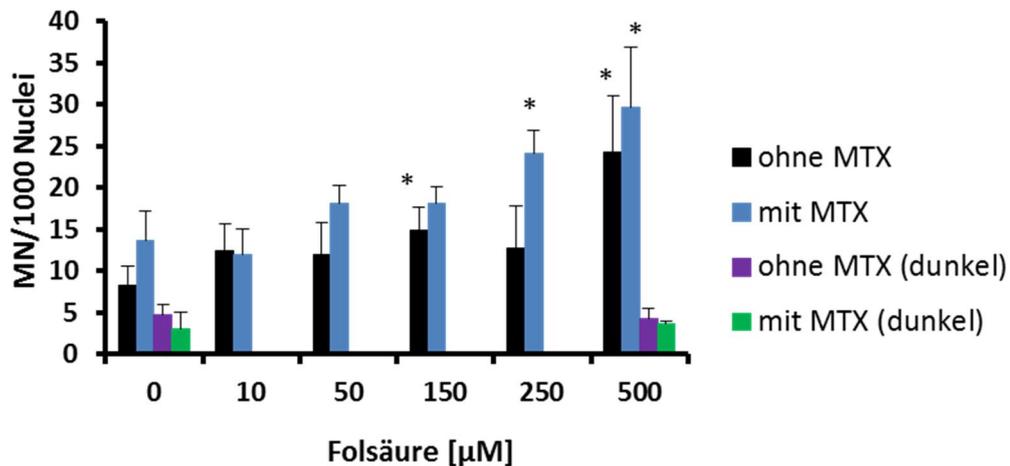


Abb. 5.30: *Induktion von Mikrokernen nach Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure mit und ohne MTX-Vorinkubation.* Aufgetragen ist die Anzahl der Mikrokern (MN) pro 1000 Kerne gegen die Folsäure-Konzentration. Die Zellen wurden 15 min mit Folsäure und Katalase inkubiert und in diesen Lösungen bestrahlt (15 min, 33 cm; 338 kJ/m²). Der Versuch wurde ohne und mit MTX Vorinkubation (100 μM , 1 h in PBS) durchgeführt. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen (+SD). Die Signifikanz wurde nach dem Student's t-Test berechnet und bezieht sich jeweils auf die korrespondierende Kontrolle, die ohne Folsäure bestrahlt wurde (* $p < 0,05$).

Bei der Bestrahlung der Zellen ohne MTX Vorinkubation ist erst bei einer Konzentration von 500 μM Folsäure ein signifikanter Anstieg der Anzahl von Mikrokernen zu erkennen. Diese Konzentration wurde in der alkalischen Elution bereits nicht mehr eingesetzte (siehe Abbildung 5.27). Bei den Ergebnissen mit MTX Vorinkubation fällt auf, dass bereits die Proben, die ohne Folsäure bestrahlt wurden, eine erhöhte Schadensinduktion haben. Zusätzlich ist nach MTX-Vorinkubation ein dosisabhängiger Anstieg der Anzahl an Mikrokernen nach Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure zu erkennen. Ohne Bestrahlung zeigten weder Folsäure noch MTX einen Einfluss auf die Mikrokernbildung. Folsäure führt in hohen Konzentrationen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht also nicht nur zu einer gesteigerten DNA-schädigenden Wirkung, sondern auch zu einer gesteigerten Mutagenität in KB Zellen. Dieser Effekt wurde durch Inhibition des Folsäuremetabolismus noch verstärkt.

Da es sich bei MTX um einen Antimetaboliten handelt, der die Zellproliferation inhibiert, und die Zellteilung eine Voraussetzung für den Mikrokerntest ist, wurde der Effekt auf die Zellproliferation durch die angewandte MTX-Vorinkubation getestet. Hierfür wurden Zellen ausgestreut, 6 h kultiviert und dann entweder 1 h mit MTX in PBS oder reinem PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit Medium versehen, im Brutschrank kultiviert, alle 24 h gezählt und jeweils der Proliferationsfaktor bestimmt. Die resultierenden Proliferationskurven sind in Abb 5.31 gezeigt.

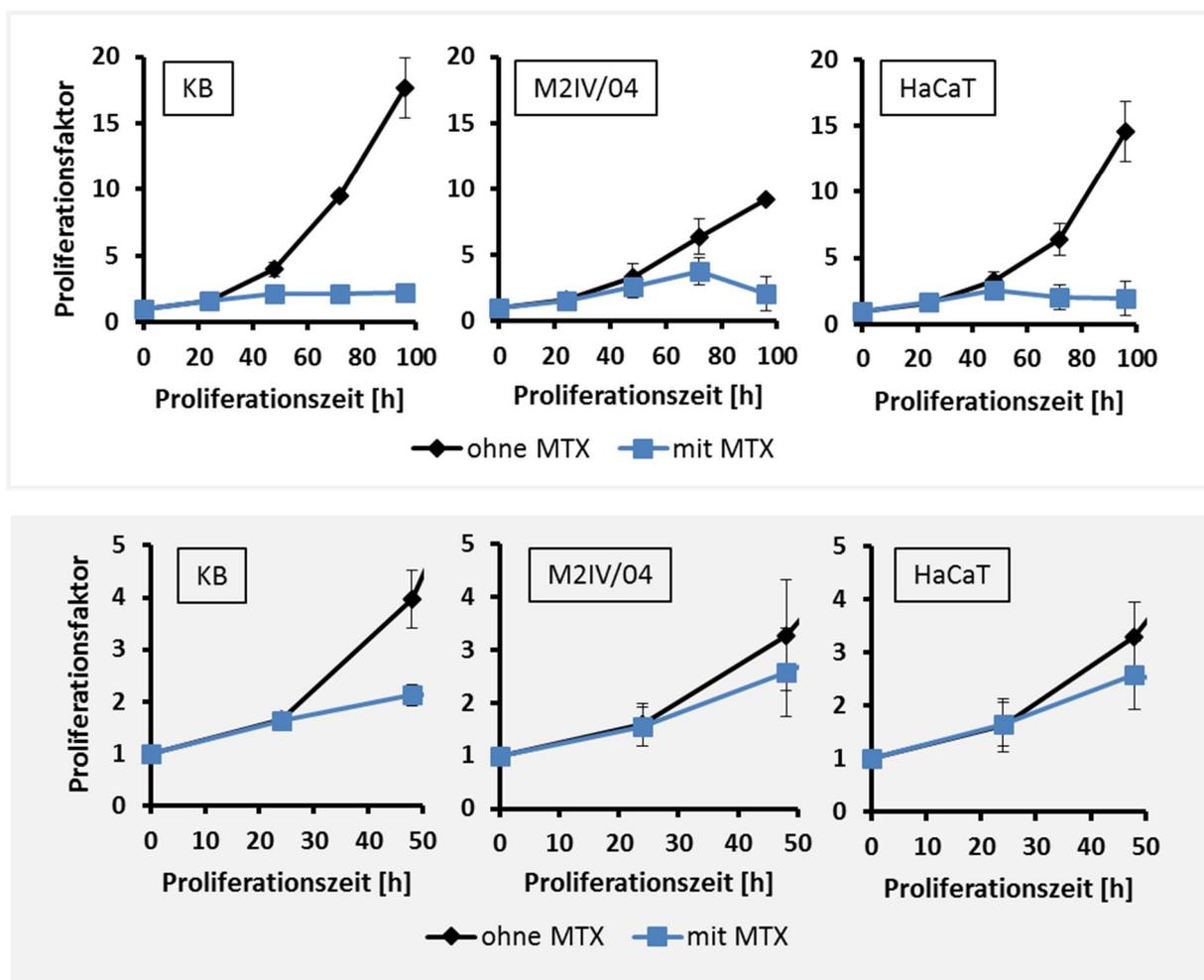


Abb. 5.31: Wachstumskurven der verwendeten Zelllinien mit und ohne MTX. KB-, M2IV/04- und HaCaT-Zellen wurden 6 h kultiviert. Die Zellen wurden entweder 1 h lang mit 100 μ M MTX in PBS in reinem PBS vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium versehen und alle 24 h die Zellzahl und der daraus resultierende Proliferationsfaktor bestimmt. Aufgetragen ist der Proliferationsfaktor gegen die Zeit für den gesamten gemessenen Zeitraum (oben) und - in vergrößertem Maßstab - die ersten 48 h (unten). Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen (\pm SD).

Bei den drei verwendeten Zelllinien ist durch die einstündige MTX-Inkubation eine deutliche Proliferationshemmung zu erkennen, die zwischen 24 h und 48 h einsetzt (siehe Abbildung 5.31, unten). MTX hemmt die Purin-Basen de-novo-Synthese. Ein möglicher Grund für die verzögerte Wirkung von MTX auf das Zellwachstum könnte sein, dass der proliferationshemmende Effekt erst eintritt, wenn die Speicher für die DNA-Basen aufgebraucht sind, deswegen findet bei allen drei Zelllinien mindestens noch die erste Zellteilung statt. Die Ergebnisse der Mikrokern-Quantifizierung mit und ohne MTX-Vorinkubation sind deswegen direkt miteinander vergleichbar.

6 Diskussion

6.1 Folsäure-vermittelte Zellaufnahme von Konjugaten und Partikeln

6.1.1 Albumin-Folsäure-Konjugate für die Rezeptor-vermittelte PDT

6.1.1.1 Albumin bildet mit Folsäure und β -Carbolinen Konjugate fester Stöchiometrie

Die Verwendung von Albumin als Transportvehikel für die photodynamische Therapie (PDT) hat viele Vorteile, wie die vernachlässigbare Immunogenität und die Ausnutzung des EPR Effektes bei vergleichsweise kleiner Größe, aber auch einige Nachteile. Dazu zählt unter anderem die Fähigkeit lipophile Substanzen mit hoher Affinität unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen zu binden. Deswegen ist es äußerst schwer solche Substanzen kovalent an das Protein zu koppeln und anschließend den nicht-kovalent gebundenen Überschuss abzutrennen. Die angestrebte Tumorspezifität dieses Konjugates wird durch die nicht-kovalent gebundene Fraktion automatisch gesenkt. Zum einen würde die Anwesenheit von Molekülen, die eine ähnliche oder höhere Plasmaeiweißbindung haben, als der verwendete Photosensibilisator, dazu führen, dass der Überschuss aus den Bindungstaschen des Albumins, den sogenannten Sudlow Sites [114] (siehe Abbildung 6.1), verdrängt wird und sich unspezifisch verteilt. Außerdem würde sich der lipophile Photosensibilisator nach kurzer Zeit in jede beliebige Zellmembran umverteilen. Dieses Problem wurde bereits umfassend untersucht und beschrieben (siehe Diplomarbeit Kathrin Butzbach [38]) und in hier nicht gezeigten Vorversuchen mit Hematoporphyrin bestätigt. Um deshalb eine vollständige und einfache Abtrennung freier Photosensibilisatormoleküle zu gewährleisten, sollte dieser hydrophil oder sogar geladen sein. Dadurch wird verhindert, dass größere Mengen nicht-kovalent an Albumin binden. Außerdem kann das freie Molekül nicht in Zellen diffundieren und dort seine phototoxische Wirkung entfalten. Hierfür wurden in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen β -Carbolin-Derivate verwendet, die durch Substitution am aromatischen Stickstoff eine delokalisierte positive Ladung haben. Wie in Abbildung 5.2 zu erkennen ist, bilden sich nach Carbodiimid Kupplung Konjugate mit einem bis zwei β -Carbolinen pro Albumin Molekül. Dies lässt die Vermutung zu, dass es auf der Oberfläche des Albumins nur einen oder zwei Lysin-Reste gibt, die elektrostatisch für das geladene β -Carbolin-Molekül zugänglich sind. Jedes der Albumin- β -Carbolin Konjugate bindet durch Carbodiimid Kupplung wiederum 6 – 9 Folsäure-Moleküle.

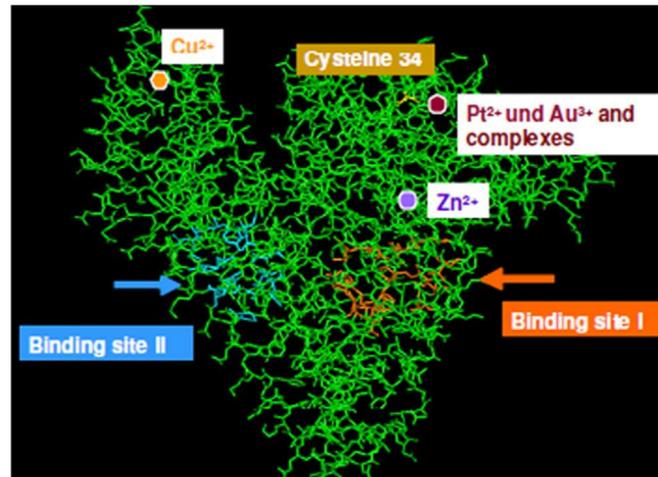


Abb. 6.1: **Bindungsstellen am Albumin.** Albumin hat zwei Bindungsstellen für lipophile Moleküle, die hochaffin ein breites Spektrum von Substanzen über nicht-kovalente Wechselwirkungen binden können. Diese Bindungsstellen werden nach ihrem Entdecker auch Sudlow Sites genannt. Außerdem gibt es spezifische Bindungsstellen für verschiedene Metallionen. (Abbildung übernommen aus [35])

6.1.1.2 β -Carbolin-beladene Albumin-Folsäure Konjugate werden FR α vermittelt aufgenommen und gelangen ins Lysosom

In den gezeigten Mikroskopie-Aufnahmen (siehe Abbildung 5.3 – 5.5) ist zu sehen, dass Konjugate mit Folsäure zeitabhängig in KB Zellen aufgenommen werden, Konjugate ohne Folsäure tun dies aber nicht. Die Aufnahme kann durch Zugabe großer Mengen Folsäure während der Inkubation gehemmt werden. Außerdem sieht man teilweise eine Kollokalisierung der β -Carbolin-Fluoreszenz mit den angefärbten Lysosomen.

Die durch den *Clathrin-independent carrier* (CLIC) Weg vermittelte Endozytose verläuft üblicherweise über das schnelle Ansäuern von *GPI-AP enriched endosomal compartments* (GEECs) und anschließendem Recycling der Folsäure-Rezeptoren. Dieser Mechanismus erklärt allerdings nicht die Befunde dieser Arbeit. Verschiedene Publikationen lieferten bereits Hinweise, dass die multivalente Bindung und damit einhergehende Quervernetzung mehrerer Folsäure Rezeptoren (FR α) auf der Zelloberfläche zu einer anderen Form der Prozessierung führen [21]–[24]. Hier wird beschrieben, dass die betroffenen endozytotischen Vesikel stattdessen den Caveolin-abhängigen Endozytose-Weg einschlagen. Hier wird das frühe Endosom langsam angesäuert, wodurch es zum späten Endosom wird. Dieses verschmilzt mit Lysosomen, wodurch der Inhalt des Endosoms

lysosomal abgebaut werden kann. Aufbauend auf den Informationen aus der Literatur und den Ergebnissen dieser Doktorarbeit postulieren wir das in Abbildung 6.2 dargestellte Modell zur Aufnahme und Prozessierung multivalenter Folsäure-Konjugate.

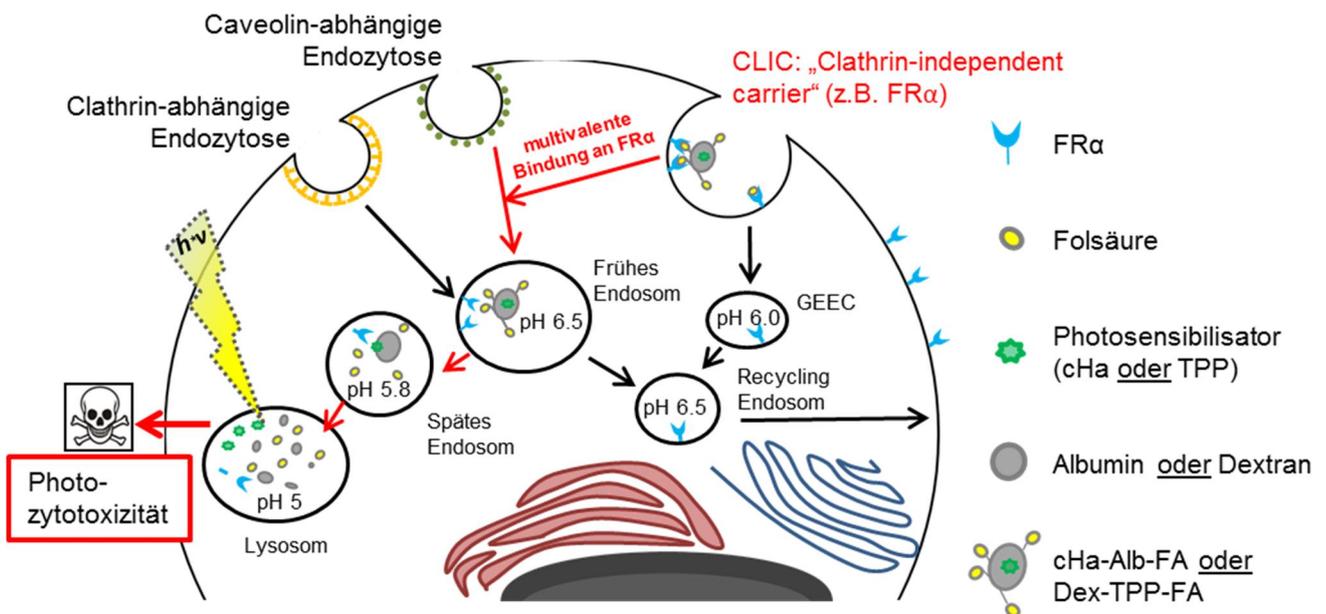


Abb. 6.2: *Prozessierung multivalenter Folsäure-Konjugate nach Endozytose.* Die Albumin-Folsäure-Konjugate mit gebundenem β -Carbolin werden, anders als freie Folsäure, nicht über GEECs zu Recycling Endosomen transportiert, sondern gehen in den Caveolin-abhängigen Endozytoseweg ein und gelangen so nach Ansäuerung in Lysosomen.

6.1.1.3 Albumin-Bindung verhindert die DNA-schädigende Wirkung des β -Carbolins

Wie in Abbildung 5.6 zu erkennen ist zeigen beide β -Carbolin Derivate ein dosisabhängiges DNA-schädigendes Potential durch Bestrahlung mit UVA. Das deutlich höhere Schadensausmaß, das durch cHa ausgelöst wird lässt sich anhand der höheren Triplet-Quantenausbeute dieses Derivates erklären. Die Tatsache, dass N_2 -Carboxyethyl-harmin (cHa) eine 30fach höhere Effizienz zeigt als N_2 -Carboxyethyl-norharman (cnHo), obwohl die Triplet Quantenausbeute nur dreimal so hoch ist, könnte durch die höhere DNA-Bindungskonstante von Harminen verglichen mit Norharmanen, und folglich einer größeren räumlichen Nähe zum DNA-Strang, erklärt werden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit bereits publizierten Daten anderer Norharman- und Harmin-Derivate [67]. Anhand Abbildung 5.7 kann geschlossen werden, dass die relevanten

reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) H_2O_2 und zu einem kleinen Teil Singulett-Sauerstoff sind. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass ein großer Teil des DNA Schadens durch direkte Triplet-Triplett-Wechselwirkungen generiert wird. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass dieselbe Menge cHa an Albumin konjugiert keine DNA-schädigende Wirkung nach Bestrahlung zeigte. Dies liegt vermutlich daran, dass die Photoaktivität des β -Carbolins durch die Anwesenheit des Albumins gequencht wird. Außerdem reagieren entstehende ROS bei Bestrahlung durch die räumliche Nähe wahrscheinlich bevorzugt mit dem Albumin statt mit der DNA. Außerdem werden potentielle Triplet-Triplett-Wechselwirkungen dadurch unterbunden, dass das cHa durch Bindung an das voluminöse Albumin keine räumliche Nähe mit der DNA aufnehmen kann. Dass die Albumin-Bindung die Ursache für den Rückgang der DNA-schädigenden Wirkung ist, konnte in Abbildung 5.8 gezeigt werden. Hier wurde das Konjugat mit Proteinase K inkubiert und somit das Albumin verdaut. Nach anschließender Hitzedeaktivierung des Enzyms konnte der schädigende Effekt teilweise wieder erlangt werden. Ursachen dafür, warum das cHa anschließend nicht das volle Schädigungspotential wiedererlangt hat, könnten sein, dass das Albumin nicht vollständig verdaut wurde oder die Proteinase K nicht komplett deaktiviert wurde, wodurch das für die Detektion der oxidativen DNA-Schäden notwendige Fpg Enzym verdaut werden würde.

6.1.1.4 β -Carbolin-beladene Albumin-Folsäure Konjugate lösen nach Bestrahlung FR α spezifische Zytotoxizität aus

Die durchgeführten Zytotoxizitätsstudien zeigen eine moderate, aber signifikante lichtabhängige Toxizität von cHa-Alb-FA nach 90 min Vorinkubation, während cHa-Alb und cHa allein keinerlei Effekt zeigten (siehe Abbildung 5.9). Dieser toxische Effekt konnte, wie schon bei den mikroskopischen Untersuchungen, durch Zugabe einer großen Menge Folsäure als Konkurrenz am Rezeptor aufgehoben werden (siehe Abbildung 5.12). Außerdem zeigt das Konjugat in FR α negativen HaCaT Zellen ebenfalls keinen Effekt (siehe Abbildung 5.13). Durch das Ergebnis aus den Studien mit zellfreier PM2 DNA war das lichtinduzierte zytotoxische Potential der Albumin-Konjugate fraglich. Anhand der ermittelten Ergebnisse aus den Mikroskopie-Studien konnte aber gezeigt werden, dass Albumin-Folsäure Konjugate nach kurzer Zeit ins Lysosom gelangen (siehe Abbildung 5.4). Dort wird das Albumin vermutlich, vergleichbar mit den Versuchen mit Proteinase K, abgebaut und das cHa aus dem Konjugat freigesetzt. Nach Bestrahlung mit UVA kann das β -Carbolin durch Generierung von ROS sein phototoxisches Potential entfalten (siehe

Abbildung 5.9). Der Umstand, dass erst ein lysosomaler Abbau stattfinden muss, um einen Effekt zu erzielen, kann als weiterer Selektionsfilter betrachtet werden, da durch eine Bestrahlung des Konjugates außerhalb der Zielzelle keine Zytotoxizität zu erwarten ist.

Die in Abbildung 5.9 gezeigten Ergebnisse zeigen die Messung der Zytotoxizität unmittelbar nach Bestrahlung. Um sicher zu gehen, dass hier nicht nur die Nekrose der bestrahlten Zellen erfasst wurde, wurde dasselbe Experiment wiederholt, wobei dieses Mal die Zellvitalität 24 h nach Bestrahlung gemessen und in Abbildung 5.11 aufgetragen wurde. Dabei sollten auch die Zellen erfasst werden, die erst nach der Bestrahlung durch Apoptose absterben. Das Ergebnis beider Experimente ist vergleichbar. Dies kann möglicherweise dadurch zustande kommen, dass die Zellen ausschließlich durch Nekrose sterben. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass im WST1 Assay die apoptotischen Zellen bereits unmittelbar nach der Bestrahlung erfasst werden, da dieser Assay die Zellvitalität durch die Aktivität mitochondrialer Enzyme determiniert. Kam es durch die Bestrahlung in Gegenwart des Konjugates zur Induktion von Apoptose ist es durchaus möglich, dass diese Enzyme zum Zeitpunkt der Messung bereits nicht mehr ordnungsgemäß arbeiten.

Der moderate, wenn auch signifikante zytotoxische Effekt von cHa-Alb-FA, der in Abschnitt 5.1.1.4 gezeigt und beschrieben wurde, könnte sich in der praktischen Anwendung durchaus als Vorteil herausstellen, da zwar nur 20 % der Zellen pro Anwendung getötet wurden, dies aber eine kontrollierte und saubere Beseitigung der untergegangenen Tumorzellen im Organismus ermöglichen würde und die Gefahr einer überschießenden Immunreaktion minimiert würde.

6.1.1.5 Potentielle Optimierung des Albumin-Folsäure Systems

Um den *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) Effekt optimal auszunutzen, sollte das verwendete Vehikel größer als 40 kDa sein und der Durchmesser zwischen ca. 10 und 200 nm liegen. Albumin stellt jedoch einen Sonderfall dar, da es sich zwar am unteren Ende des erforderlichen Größenspektrums befindet, aber eine erhöhte Tumorspezifität über den gp60 Rezeptor besitzt (siehe dazu auch Abschnitt 1.1.2.1). Um in der praktischen Anwendung eine bessere Effizienz mit Albumin-gekoppelten Photosensibilisatoren zu erreichen, können aus den Albumin-Molekülen Aggregate hergestellt werden, wodurch das gesamte Molekül größer werden würde. Dadurch würde der EPR Effekt besser ausgenutzt werden können. Diese Technik wird bereits beim Arzneistoff Abraxane® angewandt [39].

Ein weiterer Punkt, der die Effizienz der untersuchten Albumin-Konjugate verbessern könnte, ist die Optimierung der stöchiometrischen Verhältnisse des verwendeten Photosensibilisators und der Folsäure. Nachdem die verwendeten β -Carbolin-Derivate an das Albumin gekuppelt waren, wurde mittels MALDI-TOF-Messungen festgestellt, dass nur maximal zwei β -Carboline pro Albumin binden. Eine mögliche Erklärung für die geringe Zahl gebundenen β -Carbolins am Albumin ist, dass durch die delokalisierte kationische Ladung nur ein bis zwei Lysin-Reste auf der Oberfläche des Albumins elektrostatisch zugänglich sind, während pro Molekül 6 – 9 Moleküle Folsäure gebunden werden können. Trotz der schlechten Bindungseffizienz ist die Ladung des Photosensibilisators zur Vermeidung unspezifischer Effekte durch nicht kovalent gebundene Photosensibilisator-Moleküle dennoch sehr wichtig.

Es ist auffällig, dass in den gezeigten Daten in Abschnitt 5.1.1.4 nach Erreichen einer bestimmten Vorinkubationszeit und Konjugat-Konzentration kein weiterer Anstieg in der Zytotoxizität zu erkennen ist. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen an diesem Punkt ihre maximale Aufnahmekapazität für das Konjugat erreicht haben und kaum neues Konjugat aufnehmen können. Würde man einen Photosensibilisator finden, der sowohl die oben beschriebenen Anforderungen erfüllt als auch eine höhere Kupplungseffizienz hat, könnten sich mit derselben Konjugat-Dosis mehr Photosensibilisator Moleküle in der Zelle anreichern. Dadurch würde mit derselben Dosis eine deutlich höhere Effizienz erreicht werden. Eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen, wäre es den aliphatischen Linker zwischen konjugiertem System und reaktiver Carboxylgruppe zu verlängern, um die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem geladenen Teil des Moleküls und dem Protein zu minimieren. Des Weiteren kann die Bindung der Folsäure optimiert werden. Hier geht es weniger, um die Anzahl der Folsäure-Moleküle auf dem Konjugat als um deren Zugänglichkeit. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung von Spacermolekülen zwischen Folsäure und Partikel die Aufnahme-Effizienz erhöhen kann [115]. Die FR α Moleküle auf der Zelloberfläche wären dadurch sterisch besser von mehreren voluminösen Molekülen gleichzeitig zugänglich, weil sich diese gegenseitig weniger blockieren, als wenn die Folsäure direkt an den Partikeln gebunden ist.

Trotz notwendiger Optimierungen ist Albumin als Transportvehikel in der Rezeptor-vermittelten PDT ein vielversprechendes Molekül.

6.1.2 Folsäure-konjugierte Dextran-Partikel für die Rezeptor-vermittelte PDT

6.1.2.1 Folsäure-konjugierte Dextran-Partikel können lipophile Substanzen FR α spezifisch transportieren

Dextran ist ein Homopolysaccharid, das durch Acetalisierung lipophil gemacht werden kann. Durch gängige Emulsionstechniken (siehe dazu auch Abbildung 1.4 und 1.5) lagert sich das lipophile Polymer zu Partikeln definierter Größe zusammen, wobei lipophile Substanzen im Inneren eingeschlossen werden können. In unserem Fall wurde der Photosensibilisator Tetraphenylporphyrin (TPP) verwendet. Des Weiteren sind die fertigen Partikel durch Spermin-Konjugation auf der Oberfläche funktionalisierbar, was hier ausgenutzt wurde, um Folsäure an die Partikel zu binden. In Abbildung 5.14 wurde die dosisabhängige Photozytotoxizität durch die TPP-beladenen und Folsäure-modifizierten Partikel (SpAcDex-TPP-FA) gezeigt. Gleichzeitig wirkten weder die Partikel ohne TPP noch die unbestrahlten Partikel mit TPP zytotoxisch. Dabei konnte sowohl eine Konzentrations- als auch Zeitabhängigkeit festgestellt werden. Die Anwesenheit von Folsäure als Konkurrenz am Rezeptor führte zu einer Verzögerung des Effektes. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die ausgelöste Photozytotoxizität von SpAcDex-TPP-FA FR α vermittelt und damit hoch spezifisch ist.

Ein großer Vorteil der verwendeten Partikel ist, dass die Acetalisierung an den Dextranketten bei niedrigem pH schnell hydrolysiert wird. Dadurch wird das Polymer hydrophil und der Partikel zerfällt, um seine Ladung freizugeben. Aufbauend auf den Ergebnissen des ersten Abschnittes zum Thema Albumin-Folsäure Konjugate ist davon auszugehen, dass die Partikel ebenfalls über den in Abbildung 6.2 beschriebenen Endozytoseweg aufgenommen werden. Hierbei wird deren Umfeld Schritt für Schritt vom frühen zum späten Endosom und dann zum Lysosom hin angesäuert. Erst im Laufe dieses Prozesses wird die Ladung des Partikels freigesetzt. Da TPP nicht wasserlöslich ist, ist nicht zu erwarten, dass das Molekül im physiologischen Umfeld aus dem Partikel heraus diffundiert, so lange dieser intakt ist. Es ist deshalb bei der Verwendung von SpAcDex-TPP-FA nicht mit unspezifischer Phototoxizität zu rechnen.

6.1.2.2 Spermin-modifizierte Dextran-Partikel ohne Folsäure-Modifikation transportieren lipophile Substanzen unspezifisch in Zellen

Da durch die Folsäure-gekoppelten Dextran-Partikel FR α spezifische Zytotoxizität induziert wurde, lag die Vermutung nahe, dass dieselben Partikel ohne Folsäure keine Zytotoxizität vermitteln. Diese Annahme wurde durch Abbildung 5.17 widerlegt. Es wurde eine deutlich schnellere und selbstverständlich auch nicht FR α spezifische Zytotoxizität induziert. Gleichzeitig wurden Partikel ohne Spermin-Modifikation mit TPP beladen (AcDex-TPP) und auf die gleiche Weise getestet (Abbildung 5.18). Während sich die Zytotoxizität von SpAcDex-TPP-FA zwischen 1,5 und 6 h Vorinkubation ca. verdoppelt, ist bei SpAcDex-TPP bereits nach 1,5 h annähernd eine Sättigung erreicht. Gleichzeitig zeigt AcDex-TPP unter denselben Bedingungen (Normierung auf TPP-Konzentration) keinerlei lichtinduzierte Zytotoxizität. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Aufnahme der Spermin-modifizierten Partikel über unspezifische Endozytose aufgrund deren kationischen Charakters [33]. Dieser kationische Charakter geht durch die Folsäure-Kupplung weitestgehend verloren, da der Großteil der frei zugänglichen Aminogruppen auf der Partikeloberfläche mit Folsäure annähernd abgesättigt ist. Die Partikel, die nicht mit Folsäure modifiziert wurden, sind wegen ihrer unspezifischen Aufnahme als Kontrolle für die Folsäure-gekoppelten Partikel zwar nutzlos, trotzdem ist es interessant, dass diese Partikel in der Lage sind, hoch lipophile Substanzen, die sonst absolut nicht bioverfügbar wären, hocheffizient in Zellen zu transportieren.

Die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsstudien konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop und mittels Durchflusszytometrie plausibel gemacht werden. Anhand der Aufnahme der Fluoreszenzmikroskopie und der Histogramme, die mittels Durchflusszytometrie erhoben wurden, kann man sehen, dass die TPP-Fluoreszenz in der Zelle bei allen drei Partikel-Arten im gleichen Maße zunimmt wie die Zytotoxizität. Die Histogramme aus der Durchflusszytometrie zeigen den interessanten Effekt, dass es zwei verschiedene Gruppen von Zellen gibt, die die Partikel unterschiedlich schnell aufnehmen. Dies gilt sowohl für SpAcDex-TPP, als auch für SpAcDex-TPP-FA. In beiden Fällen verschiebt sich das Gleichgewicht mit steigender Vorinkubationszeit zur stärker fluoreszierenden Gruppe. Im Fall der Folsäure-modifizierten Partikel ist dieser Effekt leicht zu erklären, da die Verteilung und Anzahl des FR α mit dem Zellzyklus zusammenhängt. Deswegen ist die Aufnahmegeschwindigkeit der Partikel davon abhängig in welcher Zyklusphase sich die Zelle befindet. Im Fall der unmodifizierten Partikel tritt dieser Effekt trotz der rezeptorunabhängigen Aufnahme auf. Allerdings ist er weniger ausgeprägt. Auch hier kommen Zellzyklus-bedingte

Unterschiede als Ursache in Frage. Dies müsste jedoch in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden.

6.1.2.3 Potentielle Optimierung des Dextran-Partikel Systems

Die Dextran-Partikel zeigen in ersten Versuchen eine deutlich höhere phototoxische Effizienz als die Formulierung mit Albumin. Bei einer Folsäure-Konzentration von ca. 200 nmol/mg Partikel kann von ca. 100 – 150 Folsäure-Resten pro Partikel ausgegangen werden. Gleichzeitig transportiert 1 mg Dextran-Partikel 5,5 – 7,5 nmol TPP. Aus der Tatsache, dass 20 µg/mL SpAcDex-TPP-FA nach 24 h Vorinkubation bereits zu fast vollständiger FR α -vermittelter Zytotoxizität führen und dieselbe Konzentration ohne vorherige Bestrahlung keinen Effekt zeigt (siehe Abb. 5.16), kann man schließen, dass es sich bei den verwendeten Folsäure-modifizierten Dextran-Partikeln um ein hochpotentes und selektives Transportvehikel handelt.

Ein letztes Problem stellt die positive Ladung des Partikels vor der Folsäure-Modifikation dar, wodurch die potentielle Gefahr von unspezifischer Endozytose entsteht. In zukünftigen Experimenten soll auf ein alternatives Synthese-Verfahren zurückgegriffen werden, wobei der Spermin-*Spacer* umgangen und die Folsäure direkt an das oxidierte Dextran gekuppelt werden soll. Die Partikel ohne Folsäure-Modifikation wären dann nicht positiv geladen und würden nicht unspezifisch in die Zellen aufgenommen werden, wie die Experimente mit AcDex-TPP bereits bewiesen haben.

6.1.3 Partikel-vermittelte PDT

Im Unterschied zur klassischen PDT mit frei vorliegenden Photosensibilisatoren führt die Partikel vermittelte PDT zu einer anderen Form der Photosensibilisator-Aufnahme in die Zellen. Bei der klassischen PDT gelangt der Photosensibilisator durch Diffusion oder Transporter ins Zellinnere und beschädigt dort unspezifisch verschiedenste Zellkompartimente und die äußere Zellmembran. Durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme und den anschließenden Transport in die Lysosomen, den die gezeigten Daten belegen, ist nach der Bestrahlung die Wahrscheinlichkeit sogenannter *lysosomal disruption* sehr hoch, da die lysosomale Membran durch die entstehenden ROS oxidiert, geschädigt und permeabilisiert wird. Dies führt unter anderem zur Freisetzung von

Cathepsin und anschließender Spaltung des proapoptotischen Proteins Bid wodurch die apoptotische Kaskade ausgelöst wird [116]. Bei dieser Art des Zelltodes handelt es sich um eine sehr viel vorteilhaftere Art der Tumorbeseitigung als bei der unspezifischen Nekrose, da ein hoher Anteil an nekrotischen Zellen zu einer Aktivierung des Immunsystems und folglich zu Entzündungen im Tumorgewebe führen würde.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Photosensibilisatoren in der Krebstherapie dazu führt, dass der EPR verstärkt wird [117]. Zellen des Gefäßendothels scheinen besonders empfindlich auf Photosensibilisierung zu reagieren, was dazu führt, dass die Fenestrierung der Gefäße verstärkt wird. Setzt man in der PDT also einen Nanopartikel als Transportsystem ein, löst man mit jeder Bestrahlung einen sich selbst verstärkenden Effekt aus, da es durch den vergrößerten EPR Effekt auch zu einer vermehrten Anreicherung des Photosensibilisators im Tumorgewebe kommt [81], [118]. Sowohl die Folsäure gekoppelten Albumin- β -Carbolin-Konjugate, als auch die TPP-beladenen Dextran-Partikel erfüllen durch ihre Größe die Voraussetzungen, um Vorteil aus dieser Besonderheit zu ziehen.

Ein Problem von hochmolekularen Zytostatika-Formulierungen ist die ausgeprägte Hepatotoxizität und Nephrotoxizität. Sowohl Leber als auch Niere haben fenestrierte Gefäße [119], [120] und sind mit einer Vielzahl von Kanälen und Transportern ausgestattet [121]. Dies führt dazu, dass große Moleküle hier häufiger ins Gewebe übertreten, als in anderen Geweben. Da der zytotoxische Effekt der untersuchten Konjugate und Partikel in der PDT aber erst durch Bestrahlung verursacht wird, wie in der vorliegenden Arbeit in den Abbildungen 5.10 und 5.16 gezeigt wird, ist eine Anreicherung der untersuchten Moleküle in Leber und Niere aus phototoxischer Sicht nicht bedenklich. Des Weiteren hilft die Folsäure Konjugation einer Anreicherung vorzubeugen, da eine spezielle FR α Untergruppe im Nierenepithel zur Transzytose führt. Dabei wird die Ladung, die durch den Folsäure-Rezeptor in die Zelle aufgenommen wird auf der basolateralen Seite der Zellen durch Exozytose ausgeschleust, wodurch eine Anreicherung des Folsäure-gebundenen Arzneistoffes in den Nierenzellen verhindert wird [25]–[27].

Die Verwendung von Partikeln als Vehikel für den eingesetzten Photosensibilisator kann also auf verschiedene Weisen zu einer erhöhten Spezifität und Effizienz der PDT beitragen.

6.1.4 Eignung der eingesetzten Photosensibilisatoren

Die Anforderungen an einen perfekten Photosensibilisator für die PDT sind über die Jahre erweitert, spezifiziert und teilweise auch modifiziert worden. Die gute Bioverfügbarkeit zum Beispiel setzt eine gewisse Wasserlöslichkeit voraus. Diese Anforderung kann nun durch Transportsysteme, wie zum Beispiel das hier gezeigte Dextran umgangen werden.

Des Weiteren werden in der PDT Photosensibilisatoren mit möglichst langen Absorptionswellenlängen eingesetzt. Beide von uns angewandten Photosensibilisatoren weisen eine zu niedrige Absorptionswellenlänge auf, um für den Einsatz in der PDT optimal geeignet zu sein. Um dieses Problem anzugehen, wird intensiv an sogenannten *Upconversion* Nanopartikeln geforscht. Dabei handelt es sich um anorganische Substanzen, die in der Lage sind langwelliges Licht zu absorbieren und mittels *Anti-Stokes-Shift* kürzer welliges Licht zu emittieren [122]. Durch die Verwendung von zum Beispiel $\text{NaYF}_4\text{Yb}^{3+}$ in Kombination mit Lanthanoiden-Kationen als *Upconversion* Plattform kann Licht aus dem nahen infraroten Bereich (NIR Licht) bis hin zum UVA Bereich verkürzt werden [123]. Dadurch wird die Penetrationstiefe des NIR Lichts ausgenutzt und durch Emission der verwendeten Plattform der gleichzeitig verwendete Photosensibilisator angeregt. Durch Verwendung solcher *Upconversion* Plattformen können sowohl TPP als auch cHa für den Einsatz in der PDT von Interesse sein.

Eine weitere Möglichkeit ist die Zwei-Photonen PDT (2P-PDT). Dabei wird sich zunutze gemacht, dass manche Photosensibilisatoren in den angeregten Singulett-Zustand gelangen können, indem sie sukzessive zwei oder sogar drei Photonen absorbieren [124]. In den üblicherweise durchgeführten Quantifizierungsmethoden für die Singulett-Sauerstoff Ausbeute und Triplett-Quantenausbeute wird die durch zwei Photonen photosensibilisierte Generierung von Singulett-Sauerstoff nicht erfasst. Im Fall von cHa steigt die absolute Triplett-Quantenausbeute durch das Einbeziehen der Zwei-Photonen Photosensibilisierung deutlich an (unveröffentlichte Daten).

6.2 Phototoxizität der Folsäure

6.2.1 Folsäure ist photozytotoxisch durch extrazellulär entstehendes H₂O₂

Folsäure zeigt nach Bestrahlung mit einer Wellenlänge < 400 nm eine dosisabhängige Zytotoxizität. Wie in Abbildung 5.25 gezeigt wurde, wird diese Zytotoxizität durch extrazellulär generiertes H₂O₂ ausgelöst. Aus der Literatur ist bekannt, dass Folsäure unter Bestrahlung zu den ebenfalls photoaktiven Zerfallsprodukten 6-Formylpterin (6-Fop) und im weiteren Verlauf zu 6-Carboxypterin (6-Cap) reagiert [102]. 6-Fop hat dabei die höchste Triplet-Quantenausbeute und zerfällt unter der Produktion von H₂O₂ zu 6-Cap (siehe auch Abbildung 1.14). Fängt man dieses extrazellulär generierte H₂O₂ ab kommt es im untersuchten Konzentrationsbereich nicht zu zytotoxischen Effekten. Dies liegt vermutlich daran, dass intrazellulär vorliegende Folsäure schnell metabolisiert wird, wodurch das Produkt Tetrahydrofolsäure (THF) entsteht, das keine Photoaktivität mehr besitzt (siehe dazu Abbildung 1.13). Auch durch Inhibition dieses Metabolismus mittels Methotrexat (MTX) wurde in Anwesenheit von Katalase nach Bestrahlung keine Photozytotoxizität ausgelöst. Vermutlich kann auch durch Inhibition der Dihydrofolatreduktase (DHFR) intrazellulär nicht genug unmetabolisierte Folsäure angereichert werden, um die Zellen durch Licht-induzierte Oxidation so stark zu schädigen, dass der Schaden zum Zelltod führt.

6.2.2 Folsäure ist photogenotoxisch

Mittels PM2 Assay wurde das photogenotoxische Potential der Folsäure zuerst unter zellfreien Bedingungen untersucht. Es konnte in Abbildung 5.21 gezeigt werden, dass Folsäure dosisabhängig und lichtinduziert Fpg-sensitive DNA-Läsionen generiert. Da in diesem Versuchsaufbau die Folsäure nicht durch Metabolisierung inaktiviert wird, sind in dem hier verwendeten Assay deutlich niedrigere Konzentrationen vonnöten als in den Zytotoxizitätsstudien. Durch den Einsatz von Katalase, SOD und D₂O im PM2 Assay konnte gezeigt werden, dass H₂O₂ und Superoxidradikale nur für einen Teil der oxidativen DNA-Basenmodifikationen verantwortlich sind. Singulett-Sauerstoff spielt im extrazellulären Umfeld keine Rolle (siehe Abbildung 5.23).

Eine Besonderheit der Photodegradationsreaktion der Folsäure ist, dass das entstehende H_2O_2 im zweiten Reaktionsschritt den ersten Reaktionsschritt beschleunigt. In Abbildung 5.22 konnte gezeigt werden, dass die Entstehung Fpg-sensitiver Läsionen bei konstanter Folsäurekonzentration und aufsteigender Bestrahlungszeit einen exponentiellen Kurvenverlauf annimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass zuerst die wenig photoaktive Folsäure zu 6-Fop zersetzt wird, dieses führt wiederum verstärkt zu oxidativen DNA-Schäden und beschleunigt dabei durch H_2O_2 Produktion die weitere 6-Fop Entstehung. Bestätigt wird diese Annahme dadurch, dass sich der exponentielle Anstieg der Fpg-sensitiven Läsionen durch Zugabe von Katalase signifikant verlangsamen lässt.

Weiterhin wurde das intrazellulär photogenotoxische Potential der Folsäure in drei verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierfür wurden außer den $FR\alpha$ positiven KB Zellen auch M2IV/04 und HaCaT Zellen, die den $FR\alpha$ kaum exprimieren, verwendet (siehe Abbildung 5.28). Die letzten beiden Zellarten sind in ihrer ursprünglichen Lokalisation in der menschlichen Haut tatsächlich sichtbarem Licht ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass in allen drei Zelllinien eine dosisabhängige Induktion Fpg-sensitiver Basenmodifikationen durch Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure zu beobachten war (siehe Abbildung 5.27). Diese ist in den KB Zellen etwas weniger ausgeprägt, als in den anderen beiden Zelllinien.

Das verhältnismäßig geringe Schadensausmaß, verglichen mit der extrazellulären DNA-Schadensinduktion, lässt sich unter anderem durch den schnellen Metabolismus der Folsäure in der Zelle erklären. Durch die Inhibition der DHFR mit MTX konnte in den KB Zellen eine signifikante Erhöhung oxidativer DNA Schäden durch Bestrahlung in Gegenwart von Folsäure erreicht werden. In den anderen beiden Zelllinien hatte dies keinen Effekt. Dieser Unterschied kann zum einen durch die unterschiedliche $FR\alpha$ Ausstattung auf der Oberfläche der verschiedenen Zelllinien verursacht sein, da die große Anzahl auf den KB Zellen sowohl mehr Folsäure als auch MTX in die Zelle transportieren kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Zellen unterschiedlich gut mit der DHFR ausgestattet sind. Dies müsste allerdings in weiteren Versuchen verifiziert werden.

Ein weiterer Mechanismus, der das niedrige intrazelluläre Schadensausmaß erklären könnte ist die Ausstattung der Zellen mit antioxidativen Enzymen wie zum Beispiel Katalase oder Molekülen wie Glutathion. Diese würden das oxidative Potential der Folsäure unter Bestrahlung abschwächen. Da die antioxidative Ausstattung von Zelllinie zu Zelllinie variiert, könnte dies unter

anderem auch die unterschiedlich hohe Schadensinduktion in den verschiedenen Zelllinien erklären. Um diesen Mechanismus auf den Grund zu gehen, müssten allerdings weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Aufbauend auf die Daten zur DNA-schädigenden Wirkung der Folsäure und Licht wurde ein Mikrokerntest durchgeführt, der einen sehr sensitiven Nachweis für Chromosomenschäden und somit für Mutationen darstellt. Die Anzahl an Mikrokerneln steigt nach Bestrahlung von KB Zellen erst bei einer Folsäure Konzentration an, die in der alkalischen Elution nicht mehr berücksichtigt wurde und auch bereits leicht zytotoxisch wirkte (500 μM). Nach Inhibition der DHFR mit MTX und anschließender Bestrahlung der Zellen in Gegenwart von Folsäure, war ein moderater, dosisabhängiger Anstieg der induzierten Mikrokerne zu erkennen. Das bedeutet, dass in KB Zellen Folsäure unter Bestrahlung nicht nur DNA-schädigendes, sondern auch mutagenes Potential hat.

6.2.3 Risikoeinschätzung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen ein licht- und dosisabhängiges DNA-schädigendes und mutagenes Potential der Folsäure besonders nach der Inhibition des Folsäure-Metabolismus. Da die hier verwendeten Konzentrationen aber weit über den physiologisch auftretenden Mengen von Folsäure liegen, ist eine Risikoeinschätzung, inwieweit Folsäure im Menschen gefährlich sein könnte, schwierig. Während die DHFR kleine Mengen Folsäure schnell und effizient reduziert und damit dessen Chromophor inaktiviert (Abbildung 1.13), kann die Hemmung dieses Enzyms zur kurzfristigen Akkumulation der photoaktiven Folsäure führen. Dabei hat die Folsäure selbst durch ihre niedrige Quantenausbeute ein gering einzuschätzendes Risikopotential. Deren Zerfallsprodukte 6-Fop und 6-Cap stellen allerdings eine größere Gefahr da. Eine Hypothese besagt, dass die evolutionär bedingte Verdunklung der menschlichen Haut unter anderem deshalb stattgefunden hat, um Folsäure vor Licht zu schützen und um die Entstehung photoaktiver Pterinderivate zu verhindern [125].

Trotz der Tatsache, dass eine Einschätzung des Risikos, das von physiologischen Folsäuremengen in Kombination mit einer normalen Lichtexposition ausgeht, aufbauend auf den Daten aus dieser Arbeit schwierig ist, zeigen sie nichtsdestoweniger, dass das mutagene und karzinogene Potential von UV-Licht nicht nur von UV-B verursacht wird, sondern dass auch UV-A in Kombination mit körpereigenen Chromophoren eine Rolle bei der Entstehung von Mutationen spielen könnte.

Die durch Folsäure verursachten Gefahren sind unter physiologischen Bedingungen höchstwahrscheinlich zu vernachlässigen und vermutlich hauptsächlich unter medikamentöser Behandlung zu beachten. Bei Gabe von MTX sollte auf hohe UVA Exposition, wie sie zum Beispiel in Solarien vorkommt, verzichtet werden. Bei der Supplementierung von Folsäure sollte sich außerdem, trotz der relativen Ungefährlichkeit, an die vorgegebene Dosierung gehalten werden. Der Effekt von, an nano- und makromolekulare Arzneistoffe gekuppelter Folsäure als Mittel zum *Drug Targeting* (siehe Abschnitt 6.1), ist bisher noch nicht unter diesem Gesichtspunkt untersucht worden.

7 Zusammenfassung

Ein aufstrebender Ansatz in der Tumorthherapie ist die Photodynamische Therapie (PDT), bei der Photosensibilisatoren eingesetzt werden, die nach Bestrahlung zell- und gewebsstoxische Moleküle, wie zum Beispiel reaktive Sauerstoffspezies (ROS), generieren. Dies führt jedoch oft zu Nebenwirkungen, wie systemischer Photosensibilisierung, Schäden im Tumor-nahen Gewebe sowie der Gefahr von Sekundärtumoren. Ziel der Arbeit war es deswegen Systeme zu entwickeln, die Tumorzellen gezielt adressieren, um Photosensibilisatoren spezifisch in diese zu transportieren. Hierfür sollte ausgenutzt werden, dass viele Krebszellen den Folsäure-Rezeptor α (FR α) überexprimieren, der Folsäure und alles was daran gebunden ist endozytotisch in die Zelle aufnimmt. Zum Transport der Photosensibilisatoren wurden dabei hochmolekulare Vehikel verwendet, insbesondere um für eine eventuelle spätere Anwendung zusätzlich den sogenannten *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) Effekt ausnutzen zu können. Dieser besagt, dass die Gefäße in soliden Tumoren stark fenestriert und für Moleküle bis zu einer gewissen Größe permeabel sind. Dies führt zu einer Anreicherung hochmolekularer Substanzen im Tumorgewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Transportsysteme charakterisiert: Im ersten System wurden Albumin-Folsäure-Konjugate kovalent an geladene Photosensibilisatoren gebunden. Exemplarisch wurde hier mit β -Carbolin Derivaten gearbeitet. Albumin wird in der Tumorthherapie bereits als Vehikel angewandt, um den EPR für Zytostatika auszunutzen. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die kovalente Bindung von Folsäure und einem Photosensibilisator an das Albumin zu einer FR α -spezifischen Aufnahme des gesamten Konstruktes in FR α -tragende KB Zellen (humanes Nasopharynx Karzinom) führt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte gezeigt werden, dass dieses nach der endozytotischen Aufnahme in die Zellen ins Lysosom gelangt. Dort wird das Albumin abgebaut und setzt den Photosensibilisator frei. Dementsprechend konnte durch Bestrahlung eine hochspezifische Rezeptor-vermittelte Photozytotoxizität induziert und mittels WST-1 Assay detektiert werden. Während das freie β -Carbolin und ein Albumin- β -Carbolin-Konjugat ohne Folsäure keinen zytotoxischen Effekt nach Bestrahlung zeigten, konnte mit dem Folsäure-modifizierten Konjugat die Zellvitalität nach Vorinkubation und anschließender Bestrahlung auf 70 % reduziert werden. Durch Competition mit Folsäure-Überschuss konnte dieser Effekt verhindert werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen, die mit den Albumin-Folsäure-Konjugaten erhoben wurden, wurden Folsäure-konjugierte Dextran-Partikel als weitere spezifische Transport-Vehikel charakterisiert. Sie sind in der Lage, große Mengen lipophiler Photosensibilisatoren einzuschließen. Hier wurde exemplarisch das Tetraphenylporphyrin (TPP) verwendet. Die hier verwendeten Dextran-Partikel sind säurelabil. Nach Aufnahme über den Rezeptor und Transport ins Lysosom fallen sie auseinander und geben den Photosensibilisator frei. Auch mit diesem System konnte im WST-1 Test eine hochspezifische FR α -vermittelte Photozytotoxizität gezeigt werden. Schon geringe Mengen (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) des Folsäure-konjugierten und TPP beladenen Partikels führen nach kurzer Inkubationszeit und anschließender Bestrahlung zu vollständiger Zytotoxizität. Dieselben Partikel zeigen keinen Effekt im Dunkeln und durch Konkurrenz mit einem Überschuss an Folsäure kann der zytotoxische Effekt im untersuchten Konzentrationsbereich fast komplett aufgehoben werden. Dieselben Partikel ohne Folsäure-Konjugation sind auf der Oberfläche kationisch geladen. Es wurde gefunden, dass diese Partikel lipophile Photosensibilisatoren hocheffizient, aber unspezifisch ins Zellinnere transportieren. Umgeht man hingegen die positive Ladung auf der Oberfläche der Partikel, wurden diese überhaupt nicht von Zellen aufgenommen und erwiesen sich deshalb trotz TPP-Beladung als vollkommen untoxisch.

Mit beiden Systemen konnte also gezeigt werden, dass sowohl über Albumin-Konjugate als auch über die untersuchten Dextran-Partikel eine hochspezifische FR α -vermittelte Aufnahme von Photosensibilisatoren in Zielzellen möglich ist. Diese könnte im Rahmen einer PDT durch die gezielte Aufnahme in FR α positive Tumorzellen bei der anschließenden Bestrahlung des erkrankten Areals zu einer Tumorthherapie mit minimalen Nebenwirkungen führen.

Während der Experimente zur Folsäure-Rezeptor-vermittelten Aufnahme stießen wir als interessanten Nebenbefund auf das photozyto- und photogenotoxische Potential der Folsäure selbst. Es konnte gezeigt werden, dass Folsäure unter Bestrahlung zellfrei und in Zellen dosisabhängig oxidative DNA-Schäden generiert. Dieser Effekt konnte durch die Inhibition des Folsäure-Metabolismus noch verstärkt werden. Außerdem wurde nach Inhibition dieses Metabolismus ein signifikantes mutagenes Potential von Folsäure plus Licht nachgewiesen. Dies liefert einen Anhaltspunkt, dass die bekannte kanzerogene Wirkung von UV-Licht nicht nur von dessen UV-B Anteil ausgelöst wird, sondern über endogene Chromophore, wie die Folsäure und dessen Abkömmlingen, auch vom UV-A Anteil, verursacht wird.

8 Literaturverzeichnis

- [1] "Todesursachen @ www.destatis.de."
- [2] D. Hanahan and R. a. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [3] P. Jiménez, J. Cantón, A. Collado, T. Cabrera, A. Serrano, L. M. Real, A. García, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido, "Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors," *Int. J. Cancer*, vol. 83, no. 1, pp. 91–97, 1999.
- [4] C. S. Fuchs, J. Tomasek, C. J. Yong, F. Dumitru, R. Passalacqua, C. Goswami, H. Safran, L. V. Dos Santos, G. Aprile, D. R. Ferry, B. Melichar, M. Tehfe, E. Topuzov, J. R. Zalberg, I. Chau, W. Campbell, C. Sivanandan, J. Pikiel, M. Koshiji, Y. Hsu, A. M. Liepa, L. Gao, J. D. Schwartz, and J. Taberero, "Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 383, no. 9911, pp. 31–39, 2014.
- [5] R. Sutherland, D. Delia, C. Schneider, R. Newman, J. Kemshead, and M. Greaves, "Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 7, pp. 4515–4519, 1981.
- [6] A. Widera, F. Norouziyan, and W. C. Shen, "Mechanisms of TfR-mediated transcytosis and sorting in epithelial cells and applications toward drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 11, pp. 1439–1466, 2003.
- [7] C. Chen, J. Ke, X. E. Zhou, W. Yi, J. S. Brunzelle, J. Li, E.-L. Yong, H. E. Xu, and K. Melcher, "Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors.," *Nature*, vol. 500, no. 7463, pp. 486–9, 2013.
- [8] A. C. Antony, "The biological chemistry of folate receptors.," *Blood*, vol. 79, no. 11, pp. 2807–2820, 1992.
- [9] W. Yan and M. Ratnam, "Preferred sites of glycosylphosphatidylinositol modification in folate receptors and constraints in the primary structure of the hydrophobic portion of the signal," *Biochemistry*, vol. 34, no. 44, pp. 14594–14600, 1995.
- [10] F. Shen, J. F. Ross, X. Wang, and M. Ratnam, "Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity.," *Biochemistry*, vol. 33, no. 5, pp. 1209–1215, 1994.
- [11] L. H. Matherly, Z. Hou, and Y. Deng, "Human reduced folate carrier: Translation of basic biology to cancer etiology and therapy," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 26, no. 1, pp. 111–128, 2007.
- [12] N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, and C. P. Leamon, "Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay," *Anal. Biochem.*, vol. 338, no. 2, pp. 284–293, 2005.
- [13] D. A. Microarrays, C. Evans, A. N. Young, M. R. Brown, D. J. Brat, J. S. Parks, A. S. Neish, and N. M. Oyesiku, "Novel Patterns of Gene Expression in Pituitary Adenomas Identified by Complementary," vol. 86, no. 7, 2001.
- [14] C. D. Chancy, R. Kekuda, W. Huang, P. D. Prasad, J. M. Kuhnel, F. M. Sirotnak, P. Roon, V. Ganapathy, and S. B. Smith, "Expression and differential polarization of the reduced-folate transporter-1 and the folate receptor ?? in mammalian retinal pigment epithelium," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 27, pp. 20676–20684, 2000.

-
- [15] M. Figini, R. Ferri, D. Mezzananza, M. Bagnoli, E. Luisson, S. Miotti, and S. Canevari, "Reversion of transformed phenotype in ovarian cancer cells by intracellular expression of anti folate receptor antibodies.," *Gene Ther.*, vol. 10, no. 12, pp. 1018–1025, 2003.
- [16] M. K. Y. Siu, D. S. H. Kong, H. Y. Chan, E. S. Y. Wong, P. P. C. Ip, L. Jiang, H. Y. S. Ngan, X. F. Le, and A. N. Y. Cheung, "Paradoxical Impact of Two Folate Receptors, FR α and RFC, in Ovarian Cancer: Effect on Cell Proliferation, Invasion and Clinical Outcome," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, pp. 1–11, 2012.
- [17] K. M. M. Kelley, B. G. Rowan, and M. Ratnam, "Modulation of the folate receptor alpha gene by the estrogen receptor: mechanism and implications in tumor targeting.," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 11, pp. 2820–2828, 2003.
- [18] T. Tran, A. Shatnawi, and X. Zheng, "Enhancement of Folate Receptor α Expression in Tumor Cells Through the Glucocorticoid Receptor : A Promising Means to Improved Tumor Detection and Targeting Enhancement of Folate Receptor A Expression in Tumor Cells Through the Glucocorticoid Receptor : A," *Cancer Res*, no. 28, pp. 4431–4441, 2005.
- [19] S. Sabharanjak and S. Mayor, "Folate receptor endocytosis and trafficking," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 8, pp. 1099–1109, 2004.
- [20] K. G. Rothberg, Y. Ying, J. F. Kolhouse, B. a. Kamen, and R. G. W. Anderson, "The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway," *J. Cell Biol.*, vol. 110, no. 3, pp. 637–649, 1990.
- [21] T. Fujimoto, "GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 44, no. 8, pp. 929–941, 1996.
- [22] S. Mayor, K. G. Rothberg, and F. R. Maxfield, "Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking.," *Science*, vol. 264, no. 5167, pp. 1948–1951, 1994.
- [23] B. D. Grant and J. G. Donaldson, "NIH Public Access," vol. 10, no. 9, pp. 597–608, 2011.
- [24] J. J. Turek, C. P. Leamon, and P. S. Low, "Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells.," *J. Cell Sci.*, vol. 106 (Pt 1), pp. 423–430, 1993.
- [25] Y. Kimata, Y. I. Kimata, Y. Shimizu, H. Abe, I. C. Farcasanu, M. Takeuchi, M. D. Rose, and K. Kohno, "Genetic Evidence for a Role of BiP / Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins," *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, no. June, pp. 2559–2569, 2003.
- [26] R. Polishchuk, A. Di Pentima, and J. Lippincott-Schwartz, "Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 297–307, 2004.
- [27] D. D. Gibbs, D. S. Theti, N. Wood, M. Green, F. Raynaud, M. Valenti, M. D. Forster, F. Mitchell, V. Bavetsias, E. Henderson, and A. L. Jackman, "BGC 945, a novel tumor-selective thymidylate synthase inhibitor targeted to ??-folate receptor-overexpressing tumors," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 24, pp. 11721–11728, 2005.
- [28] M. Luyckx, R. Votino, J. L. Squifflet, and J. F. Baurain, "Profile of vintafolide (EC145) and its use in the treatment of platinum-resistant ovarian cancer," *Int. J. Womens. Health*, vol. 6, no. 1, pp. 351–358, 2014.
- [29] Y. Matsumura, K. Maruo, M. Kimura, T. Yamamoto, T. Konno, and H. Maeda, "Kinin-generating cascade in advanced cancer patients and in vitro study.," *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 82, no. 6, pp. 732–741, 1991.

-
- [30] D. Kozłowska, P. Foran, P. MacMahon, M. J. Shelly, S. Eustace, and R. O’Kennedy, “Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 15, pp. 1402–1411, 2009.
- [31] H. Maeda, H. Nakamura, and J. Fang, “The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 71–79, 2013.
- [32] Y. Noguchi, J. Wu, R. Duncan, J. Strohalm, K. Ulbrich, T. Akaike, and H. Maeda, “Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues.,” *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 307–314, 1998.
- [33] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, and C. Yin, “Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3657–3666, 2010.
- [34] C. Tirupathi, W. Song, M. Bergenfeldt, P. Sass, and A. B. Malik, “Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 41, pp. 25968–25975, 1997.
- [35] B. Elsadek and F. Kratz, “Impact of albumin on drug delivery - New applications on the horizon,” *J. Control. Release*, vol. 157, no. 1, pp. 4–28, 2012.
- [36] F. Kratz, “Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles,” *J. Control. Release*, vol. 132, no. 3, pp. 171–183, 2008.
- [37] R. R. Avirah, D. T. Jayaram, N. Adarsh, and D. Ramaiah, “Squaraine dyes in PDT: from basic design to in vivo demonstration,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, no. 5, p. 911, 2012.
- [38] F. Chemie and P. Geowissenschaften, “Diplomarbeit,” no. April, 2010.
- [39] M. a. Socinski, I. Bondarenko, N. a. Karaseva, a. M. Makhson, I. Vynnychenko, I. Okamoto, J. K. Hon, V. Hirsh, P. Bhar, H. Zhang, J. L. Iglesias, and M. F. Renschler, “Weekly nab-Paclitaxel in Combination With Carboplatin Versus Solvent-Based Paclitaxel Plus Carboplatin as First-Line Therapy in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Final Results of a Phase III Trial,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 17, pp. 2055–2062, 2012.
- [40] F. Kratz, “DOXO-EMCH (INNO-206): the first albumin-binding prodrug of doxorubicin to enter clinical trials.,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 16, no. 6, pp. 855–866, 2007.
- [41] C. M. Mendez, C. J. McClain, and L. S. Marsano, “Albumin therapy in clinical practice.,” *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 20, no. 3, pp. 314–320, 2005.
- [42] F. Kratz, “A clinical update of using albumin as a drug vehicle - A commentary,” *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 331–336, 2014.
- [43] J. L. Cohen, S. Schubert, P. R. Wich, L. Cui, J. A. Cohen, L. Justin, and J. M. J. Fréchet, “siRNA Therapeutics,” vol. 22, no. 6, pp. 1056–1065, 2012.
- [44] P. R. Wich and J. M. J. Fréchet, “Degradable dextran particles for gene delivery applications,” *Aust. J. Chem.*, vol. 65, no. 1, pp. 15–19, 2012.
- [45] E. M. Bachelder, T. T. Beaudette, K. E. Broaders, J. Dashe, and M. J. Jean, “Material for Therapeutic Applications,” vol. 130, no. 32, pp. 10494–10495, 2009.

-
- [46] K. B. Chalasani, G. J. Russell-Jones, S. K. Yandrapu, P. V. Diwan, and S. K. Jain, "A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin," *J. Control. Release*, vol. 117, no. 3, pp. 421–429, 2007.
- [47] Z. Amoozgar and Y. Yeo, "Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 4, no. 2, pp. 219–233, 2012.
- [48] Y. Zhong, F. Meng, C. Deng, and Z. Zhong, "Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 6, pp. 1955–1969, 2014.
- [49] F. E. Alemdaroglu, N. C. Alemdaroglu, P. Langguth, and A. Herrmann, "Cellular uptake of DNA block copolymer Mizelles with different shapes," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 29, no. 4, pp. 326–329, 2008.
- [50] F. E. Alemdaroglu, N. C. Alemdaroglu, P. Langguth, and A. Herrmann, "DNA block copolymer Mizelles - A combinatorial tool for cancer nanotechnology," *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 5, pp. 899–902, 2008.
- [51] D. Hone, P. Walker, and R. Evans-Gowing, "Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy," *Langmuir*, no. 21, pp. 2985–2987, 2002.
- [52] Z. Zhu, Z. Zhu, Z. Tang, Z. Tang, J. a Phillips, J. a Phillips, R. Yang, R. Yang, H. Wang, H. Wang, W. Tan, and W. Tan, "Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes," vol. 130, no. 33, pp. 10856–10857, 2008.
- [53] B. L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hessewood, P. J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, and C. T. Committee, "Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer- Bound Doxorubicin," *Society*, vol. 20, no. 6, pp. 1668–1676, 2009.
- [54] B. Felice, M. P. Prabhakaran, A. P. Rodríguez, and S. Ramakrishna, "Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 41, pp. 178–195, 2014.
- [55] A. M. Nowicka, A. Kowalczyk, A. Jarzebinska, M. Donten, P. Krysinski, Z. Stojek, E. Augustin, and Z. Mazerska, "Progress in targeting tumor cells by using drug-magnetic nanoparticles conjugate," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 3, pp. 828–833, 2013.
- [56] H. V Tappeiner, "Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe)," *Ergebnisse der Physiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 698–741, 1909.
- [57] P. Agostinis, K. Berg, K. a Cengel, T. H. Foster, a W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, a Juzeniene, D. Kessel, M. Koberlik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. Wilson, and J. Golab, "Photodynamic Therapy of Cancer: an Update," vol. 61, no. 4, pp. 250–281, 2012.
- [58] P. Babilas, S. Schreml, M. Landthaler, and R. M. Szeimies, "Photodynamic therapy in dermatology: State-of-the-art," *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 26, no. 3, pp. 118–132, 2010.
- [59] S. B. Brown, E. a Brown, and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment.," *Lancet Oncol.*, vol. 5, no. 8, pp. 497–508, 2004.
- [60] R. Wormald, J. Evans, L. Smeeth, and K. Henshaw, "Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration (Review)," no. 4, 2007.
- [61] S. For, "Mechanisms 4," *Sci. York*, vol. 162, no. 3857, pp. 963–970, 1968.

-
- [62] A. Juzeniene, Q. Peng, and J. Moan, "Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 6, no. 12, pp. 1234–1245, 2007.
- [63] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, "Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1053–1074, 2009.
- [64] E. Paszko, C. Ehrhardt, M. O. Senge, D. P. Kelleher, and J. V. Reynolds, "Nanodrug applications in photodynamic therapy," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 8, no. 1, pp. 14–29, 2011.
- [65] M. O. Senge and J. C. Brandt, "Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) - A second-generation photosensitizer," *Photochem. Photobiol.*, vol. 87, no. 6, pp. 1240–1296, 2011.
- [66] L. B. Josefsen and R. W. Boyle, "Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer?," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 154, no. 1, pp. 1–3, 2008.
- [67] M. M. Gonzalez, M. Vignoni, M. Pellon-Maison, M. a. Ales-Gandolfo, M. R. Gonzalez-Baro, R. Erra-Balsells, B. Epe, and F. M. Cabrerizo, "Photosensitization of DNA by β -carboline: Kinetic analysis and photoproduct characterization," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, no. 9, p. 1807, 2012.
- [68] M. Vignoni, R. Erra-Balsells, B. Epe, and F. M. Cabrerizo, "Intra- and extra-cellular DNA damage by harmine and 9-methyl-harmine," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 132, pp. 66–71, 2014.
- [69] M. Vignoni, F. a. O. Rasse-Suriani, K. Butzbach, R. Erra-Balsells, B. Epe, and F. M. Cabrerizo, "Mechanisms of DNA damage by photoexcited 9-methyl- β -carboline," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 11, no. 32, p. 5300, 2013.
- [70] A. Juzeniene, K. P. Nielsen, and J. Moan, "Biophysical aspects of photodynamic therapy.," *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 7–28, 2006.
- [71] "Tech_PDT @ www.photolitec.org." .
- [72] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro.," *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, no. 11, pp. 2597–2616, 2005.
- [73] J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 549–553, 1991.
- [74] M. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 75, no. 4, pp. 382–91, 2002.
- [75] N. Vanlangenakker, N. Vanlangenakker, T. Vanden Berghe, T. Vanden Berghe, D. V Krysko, D. V Krysko, N. Festjens, N. Festjens, P. Vandenabeele, and P. Vandenabeele, "Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death," *Curr Mol Med*, vol. 8, no. 3, pp. 207–20, 2008.
- [76] D. Kessel and M. Castelli, "Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 2, pp. 318–322, 2001.
- [77] J. J. Reiners, P. Agostinis, K. Berg, N. L. Oleinick, and D. Kessel, "Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy," *Autophagy*, vol. 6, no. 1, pp. 7–18, 2010.
- [78] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1776, no. 1, pp. 86–107, 2007.

-
- [79] U. G. a Sattler and W. Mueller-Klieser, "The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis.," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 85, no. 11, pp. 963–971, 2009.
- [80] C. M. West, D. C. West, S. Kumar, and J. V Moore, "A comparison of the sensitivity to photodynamic treatment of endothelial and tumour cells in different proliferative states.," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 58, no. 1, pp. 145–156, 1990.
- [81] J. W. Snyder, W. R. Greco, D. a Bellnier, L. Vaughan, and B. W. Henderson, "Photodynamic Therapy : A Means to Enhanced Drug Delivery to Tumors Advances in Brief Photodynamic Therapy : A Means to Enhanced Drug Delivery to Tumors," vol. 1, no. 716, pp. 8126–8131, 2003.
- [82] H. You, H.-E. Yoon, P.-H. Jeong, H. Ko, J.-H. Yoon, and Y.-C. Kim, "Pheophorbide-a conjugates with cancer-targeting moieties for targeted photodynamic cancer therapy.," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 23, no. 7, pp. 1453–62, 2015.
- [83] T. Kiesslich, J. Berlanda, K. Plaetzer, B. Krammer, and F. Berr, "Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 6, no. 6, pp. 619–627, 2007.
- [84] P. Juzenas, W. Chen, Y. P. Sun, M. A. N. Coelho, R. Generalov, N. Generalova, and I. L. Christensen, "Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, pp. 1600–1614, 2008.
- [85] B. J. Venn, J. I. Mann, S. M. Williams, L. J. Riddell, a Chisholm, M. J. Harper, W. Aitken, and J. I. Rossaak, "Assessment of three levels of folic acid on serum folate and plasma homocysteine: a randomised placebo-controlled double-blind dietary intervention trial.," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 56, no. 8, pp. 748–754, 2002.
- [86] R. Zhao, S. H. Min, Y. Wang, E. Campanella, P. S. Low, and I. D. Goldman, "A role for the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) in folate receptor-mediated endocytosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 7, pp. 4267–4274, 2009.
- [87] M. D. A. Salazar and M. Ratnam, "The folate receptor: What does it promise in tissue-targeted therapeutics?," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 26, no. 1, pp. 141–152, 2007.
- [88] K. Butzbach and B. Epe, "Photogenotoxicity of folic acid," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 821–827, 2013.
- [89] Y. Xiao, X. Su, W. Huang, J. Zhang, C. Peng, H. Huang, X. Wu, H. Huang, M. Xia, and W. Ling, "Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2015.
- [90] Who, "Guideline : Intermittent iron and folic acid supplementation in non-anaemic pregnant women," pp. 1–31, 2012.
- [91] Y.-M. Chan, R. Bailey, and D. L. O'Connor, "Folate," *Am. Soc. Nutr.*, vol. 4, no. 1, pp. 123–125, 2013.
- [92] M. François, W. Leifert, R. Tellam, and M. Fenech, "G-quadruplexes: A possible epigenetic target for nutrition," *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 764, pp. 101–107, 2015.
- [93] D. Smith, Y. Kim, Y. Kim, H. Refsum, and H. Refsum, "Is folic acid good for everyone? 1,2," 2008.
- [94] J. C. Kiefte-de Jong, S. Timmermans, V. W. V. Jaddoe, a. Hofman, H. Tiemeier, E. a. Steegers, J. C. de Jongste, and H. a. Moll, "High Circulating Folate and Vitamin B-12 Concentrations in Women During Pregnancy Are Associated with Increased Prevalence of Atopic Dermatitis in Their Offspring," *J. Nutr.*, vol. 142, no. 4, pp. 731–738, 2012.

-
- [95] S. E. Håberg, S. J. London, H. Stigum, P. Nafstad, and W. Nystad, "Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health.," *Arch. Dis. Child.*, vol. 94, no. 3, pp. 180–184, 2009.
- [96] P. Cipriani, P. Ruscitti, F. Carubbi, V. Liakouli, and R. Giacomelli, "Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1519–1530, 2014.
- [97] M. Visentin, R. Zhao, and I. D. Goldman, "The Antifolates," *Hematol Oncol Clin North Am.*, vol. 26, no. 3, p. 629, 2012.
- [98] E. Knock, L. Deng, N. Krupenko, R. D. Mohan, Q. Wu, D. Leclerc, S. Gupta, C. L. Elmore, W. Kruger, M. Tini, and R. Rozen, "Susceptibility to intestinal tumorigenesis in folate-deficient mice may be influenced by variation in one-carbon metabolism and DNA repair," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 22, no. 11, pp. 1022–1029, 2011.
- [99] A. Unnikrishnan, T. M. Prychitko, H. V Patel, M. E. Chowdhury, A. B. Pilling, L. F. Ventrella-Lucente, E. V Papakonstantinou, D. C. Cabelof, and A. R. Heydari, "Folate deficiency regulates expression of DNA polymerase β in response to oxidative stress.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 50, no. 2, pp. 270–280, 2011.
- [100] C. Lorente and A. H. Thomas, "Photophysics and photochemistry of pterins in aqueous solution," *Acc. Chem. Res.*, vol. 39, no. 6, pp. 395–402, 2006.
- [101] M. L. Dántola, M. P. Denofrio, B. Zurbano, C. S. Gimenez, P. R. Ogilby, C. Lorente, and A. H. Thomas, "Mechanism of photooxidation of folic acid sensitized by unconjugated pterins.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 9, no. 12, pp. 1604–1612, 2010.
- [102] A. H. Thomas, G. Suárez, F. M. Cabrerizo, R. Martino, and A. L. Capparelli, "Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 135, no. 2–3, pp. 147–154, 2000.
- [103] K. Hirakawa, H. Suzuki, S. Oikawa, and S. Kawanishi, "Sequence-specific DNA damage induced by ultraviolet A-irradiated folic acid via its photolysis product," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 410, no. 2, pp. 261–268, 2003.
- [104] T. Bergström, C. Ersson, J. Bergman, and L. Möller, "Vitamins at physiological levels cause oxidation to the DNA nucleoside deoxyguanosine and to DNA - Alone or in synergism with metals," *Mutagenesis*, vol. 27, no. 4, pp. 511–517, 2012.
- [105] S. Boiteux, T. R. O'Connor, F. Lederer, A. Gouyette, and J. Laval, "Homogeneous Escherichia coli FPG protein: A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 7, pp. 3916–3922, 1990.
- [106] Y. Nakabeppu, K. Yamashita, and M. Sekiguchi, "Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V.," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 5, pp. 2556–2562, 1982.
- [107] C. Fischer, P. Rothenberg, and D. A. Costa, "Preparation of a Stable Folate-Sepharose Affinity Chromatography Complex for Affinity chromatography has facilitated the purification of many proteins which have a ligand binding site . The basic method first requires the coupling of the ligand to an inso," vol. 19, pp. 15–19, 1978.
- [108] M. Salditt, S. N. Braunstein, R. D. Camerini-Otero, and R. M. Franklin, "Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage," *Virology*, vol. 48, no. 1, pp. 259–262, Apr. 1972.
- [109] M. Häring, H. Rüdiger, B. Demple, S. Boiteux, and B. Epe, "Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 11, pp. 2010–2015, 1994.

-
- [110] K. W. Kohn, L. C. Erickson, R. A. Ewig, and C. A. Friedman, "Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution," *Biochemistry*, vol. 15, no. 21, pp. 4629–4637, 1976.
- [111] M. Pflaum, O. Will, and B. Epe, "Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases," *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 11, pp. 2225–2231, 1997.
- [112] G. T. Hermanson, *Microparticles and Nanoparticles*. 2008.
- [113] G. W. KOSICKI and P. A. SRERE, "Deuterium isotope rate effects with citrate-condensing enzyme.," *J. Biol. Chem.*, vol. 236, no. May, pp. 2566–70, Oct. 1961.
- [114] G. Sudlow, D. J. Birkett, and D. N. Wade, "Characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 11, no. 6, pp. 824–832, 1975.
- [115] J. M. Bennis, R. I. Mahato, and S. W. Kim, "Optimization of factors influencing the transfection efficiency of folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine," *J. Control. Release*, vol. 79, no. 1–3, pp. 255–269, 2002.
- [116] J. J. Reiners, J. a Caruso, P. Mathieu, B. Chelladurai, X.-M. Yin, and D. Kessel, "Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage.," *Cell Death Differ.*, vol. 9, no. 9, pp. 934–944, 2002.
- [117] V. H. Fingar, T. J. Wieman, S. a. Wiehle, and P. B. Cerrito, "The role of microvascular damage in photodynamic therapy: The effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion," *Cancer Res.*, vol. 52, no. 18, pp. 4914–4921, 1992.
- [118] B. Chen, B. W. Pogue, J. M. Luna, R. L. Hardman, P. J. Hoopes, and T. Hasan, "Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: Effects, mechanism, and therapeutic implications," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 3 I, pp. 917–923, 2006.
- [119] B. Najafian and M. Mauer, "Quantitating glomerular endothelial fenestration: An unbiased stereological approach," in *American Journal of Nephrology*, 2011, vol. 33, no. SUPPL. 1, pp. 34–39.
- [120] E. Barberá-Guillem and F. Vidal-Vanaclocha, "Sinusoidal structure of the liver.," *Revis. Biol. Celular*, vol. 16, pp. 1–34, 54–68, 1988.
- [121] J. Zhou, J. Xu, Z. Huang, and M. Wang, "Transporter-mediated tissue targeting of therapeutic molecules in drug discovery," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 5, pp. 993–997, 2015.
- [122] C. Wang, L. Cheng, and Z. Liu, "Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy," *Biomaterials*, vol. 32, no. 4, pp. 1110–1120, 2011.
- [123] Z. Hou, C. Li, P. Ma, Z. Cheng, X. Li, X. Zhang, Y. Dai, D. Yang, H. Lian, and J. Lin, "Up-Conversion Luminescent and Porous NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺@SiO₂ Nanocomposite Fibers for Anti-Cancer Drug Delivery and Cell Imaging," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 13, pp. 2713–2722, 2012.
- [124] I. E. Kochevar and R. W. Redmond, "Photosensitized production of singlet oxygen.," *Methods Enzymol.*, vol. 319, no. 5, pp. 20–28, 2000.

Appendix

Publikationen:

- 1) **Butzbach K**, Epe B.; "*Photogenotoxicity of folic acid.*" Free Radic Biol Med. 2013 Dec; 65:821-7
- 2) Vignoni M, Rasse-Suriani FA, **Butzbach K**, Erra-Balsells R, Epe B, Cabrerizo FM.; "*Mechanisms of DNA damage by photoexcited 9-methyl- β -carbolines.*"; Org Biomol Chem. 2013 Aug 28; 11(32):5300-9

Präsentationen auf Konferenzen und Workshops:

- | | |
|---------|---|
| 03/2015 | 81. DGPT Meeting in Kiel (Poster) |
| 03/2015 | 28. GUM Tagung in Düsseldorf (Poster) |
| 09/2014 | 16. International Congress on Photobiology in Córdoba, Argentinien (Poster) |
| 07/2014 | 43. EEMS Meeting in Lancaster, England (Poster) |
| 06/2014 | 2. GUM PhD Workshop "Nachwuchsförderung" in Düsseldorf (Vortrag) |
| 11/2013 | 11. ICEM Meeting in Foz do Iguassu, Brasilien (Poster) |
| 06/2013 | 1. GUM PhD Workshop "Nachwuchsförderung" in Mainz (Vortrag) |
| 09/2012 | 42. EEMS Meeting in Warschau, Polen (Poster) |
| 02/2012 | 26. GUM Tagung in Mainz (Poster) |

Wissenschaftliche Auslandsaufenthalte:

10/2012 - 11/2012	Besuch des Kooperationspartners am IIB-INTECH, Chascomús, Argentinien
04/2011 - 05/2011	Besuch des Kooperationspartners: NIIST, CSIR; Thiruvananthapuram, Indien
08/2010	Besuch des Kooperationspartners an der Universität Groningen, Holland
02/2010	Besuch des Kooperationspartners: NIIST, CSIR; Thiruvananthapuram, Indien

Stipendien und Preise:

05/2014	DAAD Reisestipendium, 16. ICP Meeting, Córdoba, Argentina
03/2014	GUM Reisestipendium, 43. EEMS Meeting, Lancaster, England
07/2013	GUM Reisestipendium, 11. ICEM Meeting, Foz do Iguassu, Brasilien
06/2013	Vortragspreis des 1. GUM PhD Workshops "Nachwuchsförderung"

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Anschrift: Am Zollhafen 2, 55118 Mainz

Telefon: 0176 62090916

e-mail: k.butzbach@web.de

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

geboren: 13.10.1981 in Bad Schwalbach

Ausbildung:

05/2010 – 10/2015 **Doktorarbeit** am Institut für Pharmazie und Biochemie, JGU Mainz

04/2005 - 04/2010 **Studium der biomedizinischen Chemie**, JGU Mainz

Abschluss: Diplom (Endnote 1,3)

Prüfungsfächer: Organische Chemie, Biochemie,
Pharmakologie/Toxikologie, Immunologie

Titel der Diplomarbeit: "Spezifischer Transport von Squarain-
Photosensibilisatoren in Folat-Rezeptor-positive Zellen"

08/1999 – 05/2001 **Abitur** an der IGS Obere Aar, Taunusstein Hahn (Endnote 2,3)

08/1992 – 07/1999 **Mittlere Reife** Gesamtschule Aarbergen Michelbach

Beruflicher Werdegang:

02/2004 – 03/2005 **tätig als Chemielaborant** bei sanofi im Industriepark Höchst, Frankfurt

09/2001 – 01/2004 **Ausbildung zum Chemielaborant** an der Provadis Akademie im Industriepark Höchst, Frankfurt

Weiterbildung:

Seit 2011 **Fortbildung zum DGPT Fachtoxikologen** (EUROTOX zertifiziert):

Versuchstierkunde, Immuntoxikologie, Organtoxikologie, Molekular Zelltoxikologie, Reproduktionstoxikologie, Fremdstoffmetabolismus, Ökotoxikologie, Lebensmitteltoxikologie, Epidemiologie, Chemische Kanzerogenese