

**Tumorzelllinien spezifische Aufnahme von HPMA
basierten Wirkstoffträgern - Einfluß der
tumorpathophysiologischen Parameter Azidose und
Hypoxie**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Daniel Gündel

geb. am 14.03.1981 in Rodewisch

Halle (Saale), d. 11.04.2018

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Thews (MLU Halle-Wittenberg)
 2. Prof. Dr. Karsten Mäder (MLU Halle-Wittenberg)
 3. Prof. Dr. Gerd Bendas (RFWU Bonn)

Erfolgreich verteidigt am 22.08.2018 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	5
2.1.	Definition von Krebs nach WHO	5
2.2.	Epidemiologie	5
2.3.	Solide Tumore	7
2.3.1.	Tumorinitiation, -progression und Tumolvaskularisation	7
2.3.1.1.	Tumorinitiation und -progression	7
2.3.1.2.	Tumolvaskularisierung	8
2.3.2.	Transvaskulärer (Extravasation) und interstitieller Transport von Molekülen im Tumorgewebe	10
2.3.3.	Das interstitielle Kompartiment und der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) in Tumoren	10
2.4.	Das Tumormikromilieu	11
2.4.1.	Tumoroxygenierung und Folgen der Hypoxie	11
2.4.2.	Azidose in Tumorgeweben	12
2.5.	Säulen der Tumorthherapie	14
2.5.1.	Einfluß der Hypoxie auf die Tumorthapien	15
2.5.1.1.	Einfluss der Tumorazidose auf die Tumorthapie	16
2.5.1.2.	Einfluß der Mikrozirkulation auf die Therapie	17
2.6.	Der Enhanced Permeation and Retention (EPR)-Effekt und dessen therapeutischer Nutzen	17
2.7.	Konzepte der makromolekularen Transportsysteme	18
2.7.1.	Wirkstoff-Polymer-Konjugate am Beispiel des Poly-N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (pHPMA)	20
2.7.2.	Endozytose von Makromolekularen Wirkstoffträgern	23
2.7.2.1.	Phagozytose	24
2.7.2.2.	Pinozytose	24
2.7.3.	Einfluß der physikochemischen Eigenschaften von makromolekularen Wirkstofftransportern auf die zelluläre Aufnahme	27
2.7.3.1.	Ladung und Löslichkeit	27
2.7.3.2.	Größe	28
2.8.	Voruntersuchungen zur Biodistribution verschiedener pHPMA-Polymer in vivo	28
3.	Fragestellungen	30
4.	Materialien und Methoden	31
4.1.	Abkürzungsverzeichnis der Hersteller	31

4.2. Materialien	33
4.3. Methoden	37
4.3.1. Zelllinien und Zellkultur	37
4.3.2. Tierversuche	37
4.3.3. Allgemeine <i>in vivo</i> Methoden	37
4.3.3.1. Angewendete Narkosearten	37
4.3.3.2. Tumormodelle und Tumorzellimplantation	38
4.3.3.3. Wachstumskurven der Tumore	38
4.3.3.4. Katheterisierung der Vena jugularis und Aorta carotis	39
4.3.3.5. Inspiratorische Hypoxie und Hyperoxie	39
4.3.3.6. Tumorgewebebegewinnung	39
4.3.3.7. Herstellung der Gewebedünnschnitte	40
4.3.3.8. Bestimmung des Gewebedruckes (Interstitieller Flüssigkeitsdruck, IFP)	40
4.3.3.9. Bestimmung der Extravasation	40
4.3.3.10. Analysen der Tumoroxygenierung	41
4.3.3.11. Messung der relativen Gewebedurchblutung	42
4.3.3.12. Bestimmung des intratumoralen pH-Wertes	43
4.3.3.13. Immunhistochemische Nachweise (IHC)	43
4.3.3.14. Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Tumorgewebe- dünnschnitten	44
4.3.3.15. Proteinkonzentrationsbestimmung	44
4.3.3.16. Pufferkalibrierung für Zellkulturversuche	44
4.3.3.17. HPMA-Polymere (pHPMAs)	45
4.3.3.18. pHPMA-Aufnahmestudien in 2D-Zellkulturansätzen	46
4.3.3.19. Quantifizierung der aktiven Zellaufnahme der HPMA-Polymere	46
4.3.3.20. Analyse der Endozytosewege	47
4.3.3.21. Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie	47
4.3.3.22. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes pH_i und der intrazellulären Kalziumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$	48
4.3.3.23. Statistik	49
5. Ergebnisse	50
5.1. Pathophysiologischen Charakterisierung der <i>in vivo</i> Tumormodelle AT-1 und Walker-256	50
5.1.1. Tumorwachstumskurven	50
5.1.2. Tumolvaskularisierung und Permeabilität der intratumoralen Blutgefäße	51
5.1.3. Der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP)	51
5.1.4. Bestimmung der intratumoralen Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) und der Einflüsse von inspiratorischer Hypoxie und Hyperoxie	52
5.1.4.1. Oxygenierungsmessung <i>ex vivo</i> mittels Pimonidazol	52
5.1.4.2. Invasive fluoro-optische pO_2 -Messung <i>in vivo</i>	53
5.1.4.3. Nicht-invasive Oxygenierungsmessungen <i>in vivo</i> mittels ESR	55

5.1.4.4.	Zusammenfassung der Methoden zur Bestimmung der pO_2 in AT-1 und Walker-256 Tumormodellen	57
5.1.5.	Einfluß der O_2 Konzentration im Atemgas auf den arteriellen Blutdruck, die Tumorperfusion und den relativen Gefäßwiderstand	59
5.1.6.	Bestimmung des intratumoralen pH_e	60
5.2.	Charakterisierung der Aufnahme von pHMPA basierten Medikamententrägern in AT-1 und Walker-256 in der Zellkultur	61
5.2.1.	Bestimmung der Zellzahl/mg Protein von AT-1 Zellen und Walker-256 Zellen	61
5.2.2.	Zeitabhängige Aufnahme der Polymere in AT-1 und Walker-256 Zellen	62
5.2.3.	Aufgenommene Polymermengen in AT-1 und Walker-256 Zellen nach 2 h unter physiologischen Milieubedingungen	64
5.2.3.1.	Einfluss der PEGylierung des großen p(HPMA)-b-p(LMA) auf die Polymerendozytose	66
5.2.3.2.	Einfluss der mittleren Molmasse (M_w) und des hydrodynamischen Radius (r_H) von pHMPAs auf deren aktive Aufnahme	67
5.2.3.3.	Einfluss des extrazellulären pH auf die Polymeraufnahme	68
5.2.3.4.	Einfluss von Hypoxie auf die zelluläre Aufnahme der Polymere	70
5.2.3.5.	Zusammenfassender Vergleich der Polymer-Aufnahme unter verschiedenen Milieubedingungen	72
5.2.4.	Charakterisierung der Endozytosewege von AT-1 und Walker-256 unter verschiedenen Milieubedingungen	73
5.2.4.1.	Bedeutung der Azidose und Hypoxie für die Aufnahme von 70 kDa Dextran als Marker der Makropinozytose	73
5.2.4.2.	Einfluss des extrazellulären pH-Wertes (pH_e) auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und den intrazellulären pH (pH_i)	75
5.2.4.3.	Einfluss des pH_i auf die Makropinozytose	77
5.2.4.4.	Einfluss des pH_e auf die Clathrin-vermittelten und Cholesterol-abhängigen Endozytose	80
5.2.4.5.	Einfluss der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Clathrin-vermittelte bzw. Cholesterol-abhängige Endozytose	81
5.2.5.	Bedeutung der verschiedenen Endozytosemechanismen für die Zellaufnahme der HPMA-basierten Polymervarianten	83
5.2.5.1.	Homopolymere	83
5.2.5.2.	p(HPMA)-co-p(LMA)	85
5.2.5.3.	p(HPMA)-b-p(LMA)	86
6.	Diskussion	88
6.1.	Vergleich der <i>in vivo</i> Tumormodelle	88
6.1.1.	Wachstum	88
6.1.2.	Gefäße	88
6.1.3.	Tumoroxygenierung und extrazellulärer pH	89

6.1.3.1.	Einfluß des O ₂ -Anteils im Atemgas auf die Oxygenierung der Tumoren _____	90
6.1.3.2.	Einfluß des inspiratorischen O ₂ Gehaltes auf den Blutdruck, die Tumorperfusion und den Gefäßwiderstand _____	94
6.1.3.3.	Der extrazelluläre pH in Walker-256 und AT-1 Tumoren _____	95
6.2.	Zelluläre Aufnahme von pHPMA _____	96
6.2.1.	Aufnahme der HPMA-basierten Polymere unter physiologischen Bedingungen _____	96
6.2.1.1.	Zeitabhängige Polymeraufnahme _____	98
6.2.2.	Einfluß einer extrazellulären Azidose und Hypoxie auf die Polymeraufnahme _____	98
6.3.	Endozytotische Routen der Polymeraufnahme _____	100
6.3.1.	Homo-Polymere _____	101
6.3.2.	p(HPMA)-co-p(LMA) _____	101
6.3.3.	p(HPMA)-b-p(LMA) _____	102
6.4.	Einfluss der extrazellulären Azidose und Hypoxie auf die Endozytosewege _____	102
6.4.1.	Makropinozytose _____	103
6.4.2.	Clathrin-vermittelte und Cholesterol-abhängige Endozytose _____	104
6.5.	Schlussfolgerungen und Ausblick _____	106
7.	Anhang _____	i
7.1.	Abbildungsverzeichnis _____	i
7.2.	Tabellenverzeichnis _____	iv
7.3.	Abkürzungsverzeichnis _____	v
7.4.	Literaturverzeichnis _____	viii
7.5.	Erklärung _____	xxii
7.6.	Lebenslauf _____	xxiii

1. Zusammenfassung

Krebserkrankungen gehören zu einer der häufigsten Erkrankungen mit Todesfolge. Dabei stellen die soliden Tumore die größte Gruppe dar. Zu den Standardtherapien gehören die Chemotherapeutika, welche aber neben schweren Nebenwirkungen zudem Resistenzmechanismen während der Tumorprogression fördern können, so dass der beabsichtigte Therapieerfolg nicht erzielt werden kann. Eine Möglichkeit um diese negativen Effekte weitestgehend zu umgehen stellt die Kopplung der Wirkstoffe an Transportsysteme dar. Dabei erwiesen sich makromolekulare Strukturen als potentielle Wirkstoffträger, welche durch den „Enhanced Permeation and Retention“ Effekt (EPR-Effekt) in soliden Tumoren akkumulieren. Auf diese Weise kann eine erhöhte Konzentration an Wirkstoffen im Tumor bei einer gleichzeitigen Reduktion von schwerwiegenden Nebenwirkungen und ein Umgehen von Resistenzmechanismen erreicht werden. Eines der am besten untersuchten Makromoleküle stellen Polymere aus N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (pHPMA), welche außerdem mit funktionellen Gruppen modifiziert werden können, selbst nicht toxisch, sehr gut wasserlöslich und nicht immunogen sind, dar.

In den syngen, heterotopen Tumormodellen der Prostatakarzinomzelllinie AT-1 und der Mammakarzinomzelllinie Walker-256 der Ratte zeigten sich in Voruntersuchungen Unterschiede bei den Akkumulationen von HPMA-Polymeren (Homopolymer, p(HPMA)-co-p(LMA) und p(HPMA)-b-p(LMA)) zwischen beiden Tumormodellen. Darauf aufbauend wurden in dieser Arbeit die beiden Tumormodelle genauer untersucht. Dabei wurden verschiedene physiologische Parameter, die einen Einfluss auf den konvektiven und diffusiven Transport der Polymere haben könnten, in den beiden Tumormodellen näher untersucht. Dies umfasste zum einem Gefäßparameter (z.B. die Dichte des Gefäßnetzes sowie die Permeabilität der Gefäße) sowie Parameter des interstitiellen Raums der Tumoren, wie der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP), der extrazelluläre pH und die Oxygenierung (pO_2 -Verteilung) in den Tumormodellen. Hierbei kamen für die Bestimmung des pO_2 eine invasive fluorooptische, eine nicht-invasive auf eine pO_2 -sensitive ESR-Sonde basierende und eine *ex vivo* Methode, welche auf die pO_2 abhängige intrazelluläre Anreicherung von Pimonidazoladdukten basierte, zum Einsatz. Die Bestimmung des intratumoralen pH-Wertes erfolgte mittels einer Mikroelektrode multipunktuell und der IFP konnte mittels in die Tumore eingebrachte drucksensitive Millarkatheter bestimmt werden. Die Gefäßdichte wurde von immunhistochemisch aufgearbeiteten Tumorpräparaten, sowie die Extravasation von i.v. applizierten Fluoreszenzmarkierten Dextranen durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Zudem wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MABP) und die pO_2 -abhängige Tumorperfusion erfasst. Dabei zeigte sich, dass die beiden Tumormodelle AT-1 und Walker-256 sich signifikant hinsichtlich der Gefäßdichte und der Oxygenierung unterschieden. Gegenüber Walker-256 Tumoren waren die AT-1 Tumoren stärker hypoxisch (ESR: $39,6 \pm 20,9$ mmHg vs. $1,7 \pm 0,7$ mmHg; fluorooptisch: $21,5 \pm 12,3$ mmHg vs. $1,1 \pm 2,1$ mmHg). Die mittleren pH-Werte waren dahingegen in beiden Tumormodellen vergleichbar (AT-1 Tumore: pH 7,05 und Walker-256 Tumore: pH 7,2),

wobei über 8,0 % beider Tumormodelle azidotische pH-Werte unter 6,7 aufwiesen. Zudem war die Gefäßdichte als wichtiger Parameter der Blutversorgung des Gewebes in Walker-256 Tumoren signifikant höher. Hinsichtlich des interstitiellen Gewebedrucks und der Extravasation von Makromolekülen zwischen beiden Tumormodellen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Da bekannt ist, dass der pH, sowie der pO_2 Einfluss auf Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber Therapeutika aufweisen können, sollte geklärt werden, welchen Einfluss diese tumorpathophysiologischen Parameter auf die aktive zelluläre Aufnahme der im Vorfeld *in vivo* untersuchten pHMA basierten Wirkstofftransporter haben. Diese stellt eine essentielle Voraussetzung für die intrazelluläre Freisetzung von transportierten Wirkstoffen dar. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Aufnahme von Fluoreszenzmarkierten HPMA Polymeren, in die AT-1 und Walker-256 Zellen in Zellkulturmodellen unter physiologischen Milieubedingungen ermittelt und der zellulären Aufnahme unter verschiedenen pH bzw. pO_2 -Bedingungen verglichen. In den Zellkulturversuchen unter physiologischen Bedingungen zeigte sich, dass die Endozytose je nach Polymertyp von der Molekülgröße, dem hydrodynamischen Radius aber auch von der untersuchten Tumorzelllinie abhängig war. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Polymermodifikationen, wie eine Pegylierung des HPMA-Gerüsts, welche eine Tumoranreicherung *in vivo* verbessern, die Aufnahme in die Tumorzellen auf der anderen Seite behindern können. Des Weiteren konnten hypoxische und azidotische Milieubedingungen die Tumorzellaufnahme der HPMA-basierten Polymere abhängig von der Zelllinie und der Polymerstruktur unterschiedlich beeinflussen. Unter azidotischen Bedingungen wurde z. B: die Aufnahme der p(HPMA)-co-p(LMA) in die AT-1 Zellen begünstigt, auf der anderen Seite die Aufnahme der p(HPMA)-b-p(LMA) in die Walker-256 Zellen signifikant reduziert. Hypoxische Milieubedingungen führten zu einer signifikanten Reduktion der Polymeraufnahme (mit Ausnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA)) in die Walker-256 Zellen, beeinflussten die Polymeraufnahme in die AT-1 Zellen aber nicht signifikant.

Da sich das extrazelluläre Milieu auch in den verwendeten Tumormodellen bezüglich des pH-Wertes und des pO_2 von Normalgeweben erheblich unterscheiden kann, wurde der Einfluss einer extrazellulären Azidose bzw. Hypoxie auf verschiedene Endozytosewege untersucht. Dafür wurde die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Endozytosewegmarkern mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es diente ein 70 kDa Dextran als makropinozytotischer Marker, Transferrin als Marker für die clathrinvermittelte Endozytose und Choleratoxin β als Marker für die cholesterolabhängigen Endozytosewege. Es stellte sich heraus das unter physiologischen Milieubedingungen in AT-1 Zellen mehr Dextran (Makropinozytose) und Choleratoxin β (cholesterolabhängige Endozytose), dahingegen aber weniger Transferrin im Vergleich zu den Walker-256 Zellen aufgenommen wurde. Eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes bei physiologischen extrazellulären pH führte dazu, dass das 70 kDa Dextran in die AT-1 und die Walker-256 Zellen schlechter

aufgenommen wurde. Es konnte auch gezeigt werden, dass unter extrazellulär azidotischen Bedingungen die Makropinozytose tumorzellabhängig signifikant behindert (AT-1 Zellen) oder aber signifikant gefördert (Walker-256) werden kann. Die beobachteten pH-abhängigen zelllinienspezifischen Aufnahmen des Makropinozytosemarkers zeigten zudem eine Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]$ im Medium. Eine pH-abhängige höhere Choleratoxin β Aufnahme konnte nur bei einem extrazellulären pH von 6,2 in die Walker-256 beobachtet werden. Dahingegen hatte der extrazelluläre pH weder Einfluss auf die Aufnahme des Choleratoxin β in die AT-1 Zellen, noch auf die Aufnahme des Transferrins in beide Zelllinien. Hypoxische Bedingungen beeinflussten die Makropinozytose der AT-1 Zellen negativ, hatten aber keinen Einfluss auf die Makropinozytose der Walker-256 Zellen. Eine hypoxiebezogene Beeinträchtigung der anderen Endozytosewege sollte in weiteren Studien erfolgen.

Dies führte zu der Frage ob die Polymeraufnahme über verschiedene Endozytosewege zelllinienspezifisch erfolgt und somit die vorher beobachteten Unterschiede der zellulären Aufnahme erklären können. In weiteren Analysen wurde daher untersucht, über welchen Endozytoseweg die unterschiedlichen Polymere in die AT-1 und Walker-256 Zelllinie aufgenommen werden. Dafür wurden selektive Endozytoseweginhibitoren eingesetzt. Die Makropinozytose wurde mittels Rottlerin, die clathrinvermittelte Endozytose mittels Chlorpromazin, dynamin-abhängige Endozytoseprozesse mittels Dynasor und die cholesterolabhängige Endozytose mittels Nystatin inhibiert. Hierbei zeigte sich, dass die präferierten Endozytoseweg in erster Linie von der Polymerstruktur abhängig waren. Hydrophile Homopolymere und p(HPMA)-*b*-p(LMA) Block-Co-Polymere zeigten eine unspezifische Aufnahme über alle untersuchten Endozytosewege (Makropinozytose, CME, Dynamin-abhängige Prozesse und Cholesterol-abhängige Endozytose). Die nach außen hin eher amphiphilen p(HPMA)-*co*-p(LMA) Random-Co-Polymere wurden dahingegen präferenziell über cholesterol- und dynaminabhängige Wege aufgenommen. Diese Endozytosewege waren in beiden Zelllinien weitestgehend unabhängig vom pH-Wert. Der Einfluss eines hypoxischen Milieus sollte in weiteren Studien untersucht werden. Bei den p(HPMA)-*co*-p(LMA) schien vor allem der Anteil an lipophilen und hydrophilen Gruppen die Endozytoseroute zu bestimmen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anforderungen an HPMA-basierte makromolekularen Wirkstofftransporter für eine effektive Anreicherung im Tumorgewebe *in vivo* über den EPR-Effekt an sich, nicht zwangsläufig mit einer effektiven Aufnahme in die Tumorzellen einhergehen müssen, sondern auch im Gegensatz stehen können. Der Einfluss eines hypoxischen und azidotischen Milieus kann zudem zelllinienspezifisch die zellulären Aufnahmeprozesse beeinflussen. Somit könnte das pathophysiologische Tumormilieu auch Einfluss auf das intrazelluläre Schicksal dieser Wirkstoff-Wirkstoffträger-Komplexe nehmen. Dies sollte in weiterführenden Experimenten geklärt und die hier gefundenen Ergebnisse mittels *in vivo* Modellen validiert werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass der intratumorale pH und pO_2 die Aufnahme der untersuchten HPMA-

basierten Polymere in die Tumorzellen an sich stark beeinträchtigen können. Somit spielen für die erfolgreiche Therapie letztendlich individuelle, an den Patienten und ebenso an dessen physiologischen Status der Tumorerkrankung angepasste Formulierungen solcher Wirkstoff-Wirkstoffträger-Komplexe eine große Rolle.

2. Einleitung

2.1. Definition von Krebs nach WHO

Der generischere Terminus Krebs steht für eine große Gruppe von Krankheiten, welche alle Gewebe und Organe betreffen können. Andere gebräuchliche Begriffe sind maligne Tumore bzw. Neoplasien. Zu den definierenden Merkmalen von Krebs zählt die schnelle unkontrollierte Vermehrung von Zellen, welche über die normalen Organgrenzen hinweg wachsen, in angrenzende Körperpartien eindringen und sich in andere auch weiter entfernte Organen ausbreiten können. Dieser Metastasierungsprozess stellt dabei meist die Hauptursache für einen tödlichen Verlauf einer Krebserkrankung dar [1].

2.2. Epidemiologie

Krebs gehört mit ca. 14 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr und 8,2 Millionen Toten pro Jahr zu den verbreitetsten Ursachen für Morbidität und Mortalität weltweit. Allein in Deutschland sind 2012 nach Schätzung des Zentrums für Krebsregisterdaten 478.000 Krebserkrankungen erstmalig diagnostiziert worden (252.100 Männer und 225.900 Frauen) [2]. Die am häufigsten diagnostizierten Krebsarten sind bei Männern Lungen- und Prostatakarzinome, bei Frauen Brust- und Kolorektaltumoren [3]. Die Inzidenzraten für Darmkrebs (13,4 %) waren 2012 bei Männern in Deutschland ähnlich hoch wie die Krebserkrankungen der Lunge mit 13,7 % (**Abb. 1**).

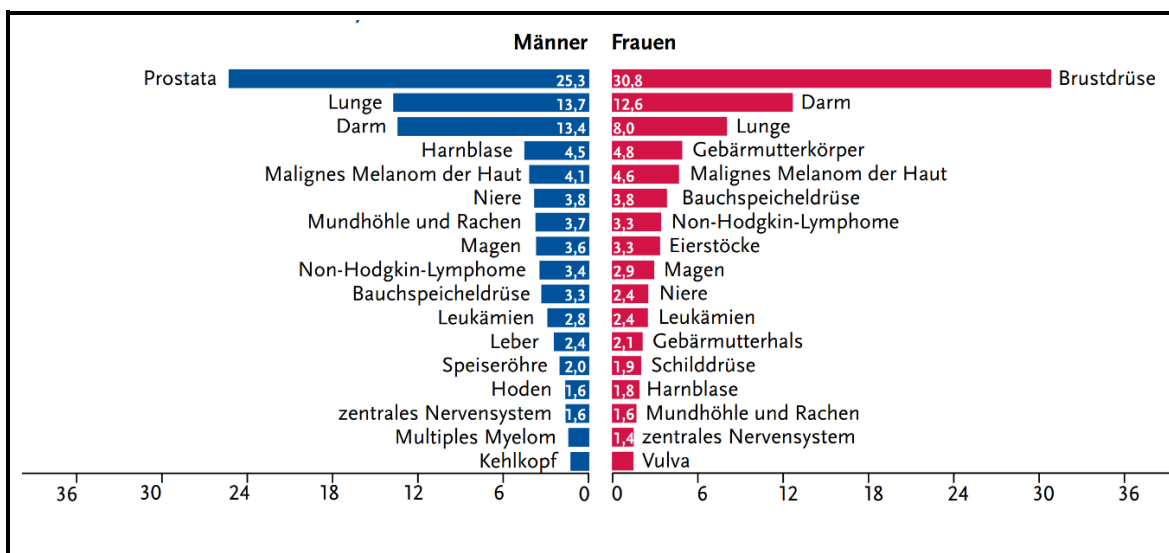


Abb. 1: Prozentuale Verteilung der Krebsinzidenzen 2012 in Deutschland.

Insgesamt 477.950 registrierte Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Für 2016 werden ca. 498.700 neue Krebserkrankungen erwartet. Entnommen aus [2].

Dabei korreliert das Risiko an Krebs zu erkranken mit zunehmendem Alter. Das Risiko an Krebs zu erkranken ist ab einem Alter von 45 bis 50 Jahren deutlich erhöht. Hierbei sind

Männer stärker betroffen als Frauen (**Abb.2, C**) [2]. Ausnahmen bilden nur einige wenige Tumorerkrankungen. So werden 85 % der Retinoblastome im Alter unter 2 Jahren [4, 5] und Hodenkrebs vor allem im Alter von 20 bis 50 [6] diagnostiziert.

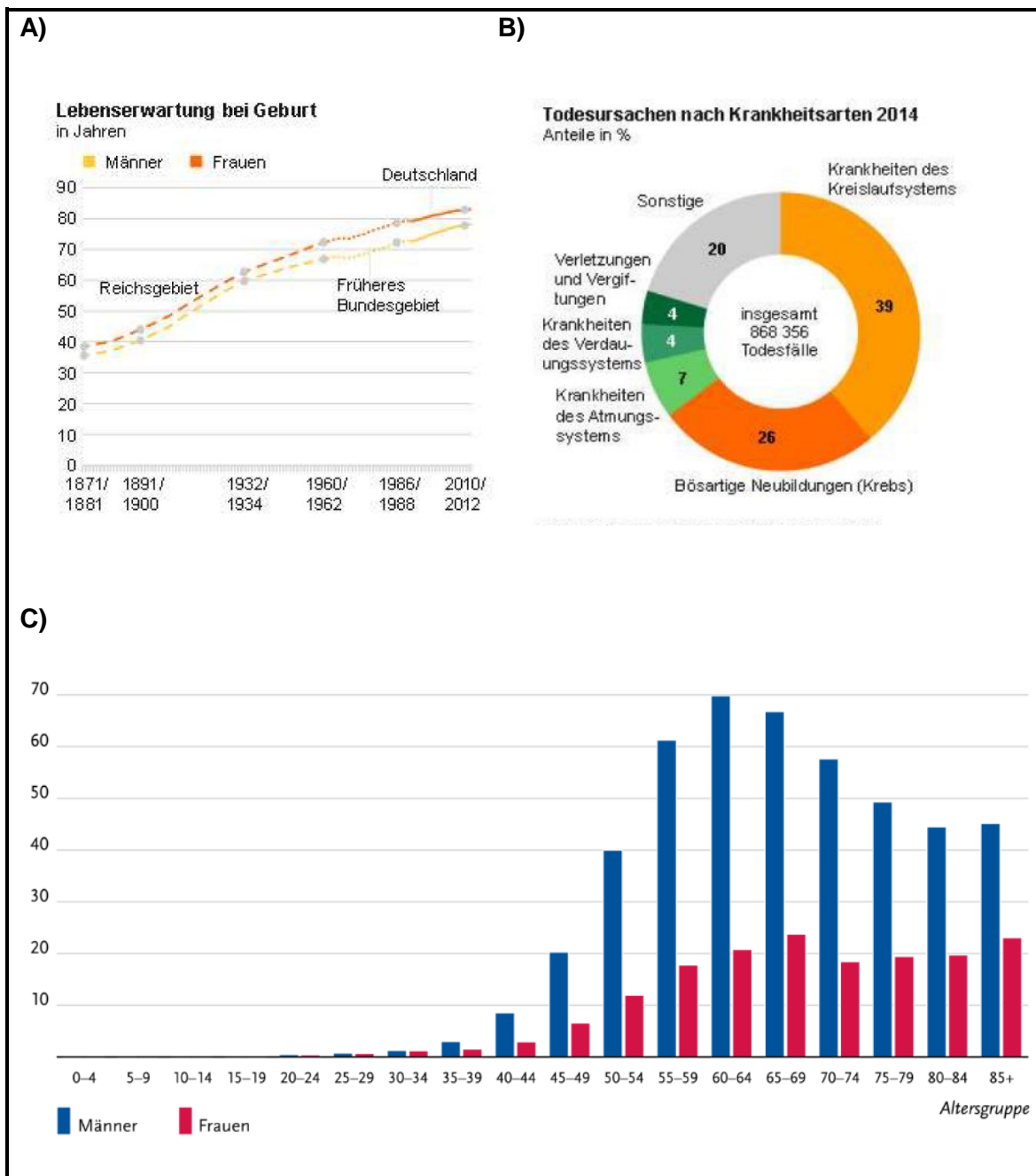


Abb. 2: Lebenserwartung, krankheitsbedingte Todesursachen und Krebsinzidenzraten in Deutschland.

A) Lebenserwartung bei Geburt von 1871 – 2012 in Jahren [7]; B) krankheitsbedingte Todesursachen 2014 [8]; C) altersbedingte Krebsinzidenzraten; ICD₁₀ C₀₀-C₁₄, prozentuale Darstellung der Altersgruppen pro 100.000 Einwohnern. Modifiziert nach [2].

Dazu kommt, dass mit einem besseren Lebensstandard und immer besser werdender medizinischer Versorgung die Lebenserwartung ansteigt (**Abb. 2 A**). So lag die mittlere Lebenserwartung von 1891 bis 1900 unter 40 Jahren und 2010 bei ca. 80 Jahren [7] (**Abb. 2 A**). Durch die ständig steigende Lebenserwartung stellen altersbedingte Krebserkrankungen also auch zukünftig eine große medizinische, aber auch volkswirtschaftliche Herausforderung dar. Von 2010 bis 2030 wird ein Anstieg der Krebsinzidenzrate um bis zu 20 % in Deutschland erwartet [2].

2.3. Solide Tumore

Krebserkrankungen lassen sich in zwei Gruppen gliedern. Die neuregistrierten Krebsfälle in Deutschland 2012 setzten sich dabei aus der weitaus häufigsten vorkommenden Gruppe der soliden Tumoren mit über 95 % und der kleineren Gruppe der Leukämien und Lymphome zusammen [2, 9]. Solide Tumore stellen zumindest anfangs feste und lokal begrenzte Wucherungen des differenzierten oder undifferenzierten körpereigenen Gewebes dar, wohingegen Leukämien (hämatopoetischer Ursprung) und Lymphome (lymphatischer Ursprung) systemische Erkrankungen darstellen. Gehen benigne (gutartige) Gewebewucherungen in einen malignen (bösartigen) Zustand über, indem sie das umgebende Gewebe infiltrieren und in weiterführenden Stadien vom Primärtumor in weiter entfernte Gewebe metastasieren, spricht man von Krebs. Solide Tumore lassen sich in drei Untergruppen gliedern: 1. Sarkome, welche aus mesenchymalen Geweben, wie Knochen oder Muskeln hervorgehen, 2. Karzinome, welche ihren Ursprung in epithelialen Zellen haben und 3. Blastome, welche während der Gewebe- oder Organentwicklung entstehen [10].

2.3.1. Tumorinitiation, -progression und Tumolvaskularisation

2.3.1.1. Tumorinitiation und -progression

Die meisten humanen Krebsformen entwickeln sich mehrstufig und häufig über viele Dekaden hinweg. Dabei kann ein ungünstiger genetischer Hintergrund die Wirkung von Karzinogenen verstärken. Ausgelöst werden Tumoren durch Karzinogene, die entweder physikalischen, chemischen oder biologischen Ursprungs sind. Diese können entweder mutagen wirken und zu genetischen Veränderungen führen oder aber tumorfördernde Eigenschaften besitzen ohne dabei direkt genetische Veränderungen hervorzurufen [11]. Wird die karzinogene Wirkung nicht mehr durch die zellulären Reparaturmechanismen kompensiert, kann es dadurch zu einer Dysregulation des Zellzyklusprogramms kommen. Dabei können Tumorsuppressorgene, wie das Gen *TP53* inaktiviert und Onkogene wie *KRAS* hyperaktiviert werden, wodurch es zu einer unkontrollierten Proliferation der betroffenen Zellen kommt [12, 13]. Während der Tumorprogression häufen sich genetische und epigenetische Veränderungen in verschiedenen Subzellpopulationen eines Tumors an,

wobei durch die progressiv steigende genetische Instabilität und epigenetische Plastizität die intratumorale Heterogenität gefördert wird. Durch Selektionsprozesse kann die Proliferation unterschiedlicher Subzellpopulationen begünstigt werden (klonale Expansion) [11].

Die tumortypischen biologischen Kennzeichen, die sich während der mehrstufigen Tumorprogression entwickeln und bei fast jedem Tumor zu finden sind, werden auch als „*Hallmarks of Cancer*“ bezeichnet und wurden 2000 von Hanahan und Weinberg beschrieben [14]. Diese umfassen die Wachstumsfaktoren-unabhängige Proliferation, die Insensitivität gegenüber proliferationshemmenden Faktoren, die Gewebeinvasivität und Ausbildung von Metastasen, ein unendliches Replikationspotential, das Umgehen der Apoptose und die kontinuierliche Angiogenese [14]. Weitere *Hallmarks* kamen 2013 hinzu und umfassen vor allem tumorsupportive Eigenschaften, wie die Modifikation bzw. Anpassung des Tumormetabolismus und die Möglichkeiten einer Zerstörung durch Immunzellen zu entgehen [15]. Erreicht das unkontrolliert proliferierende Zellaggregat eine kritische Größe, können nicht mehr alle Zellen ausreichend versorgt werden, so dass eine Blutgefäßneubildung (Neoangiogenese) notwendig wird.

2.3.1.2. Tumervaskularisierung

Ausgehend von einer einzelnen malignen transformierten Zelle entsteht durch Zellteilung zunächst ein avaskuläres Tumorzellaggregat mit einer Größe von ca. 1-2 mm (entspricht ca. 10^6 Zellen). Dieses Zellaggregat wird ausschließlich über Diffusion aus dem umgebenden Normalgewebe ernährt. Ist die diffusive Versorgung von gefäßfernen Zellen mit O_2 und Metaboliten über die normalen Blutgefäße nicht mehr ausreichend, beginnt eine hypoxieinduzierte Neoangiogenese (**Abb. 3 A**). Dieser „*Angiogenic Switch*“ wird durch eine vermehrte Ausschüttung pro-angiogener Faktoren (z. B. VEGF, FGF, usw.) und Inhibierung anti-angiogener Faktoren (z. B. Angiostatin, Endostatin, usw.) perivaskulärer und Tumorzellen ermöglicht, wodurch es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Signalmolekülen kommt. Es entsteht hierdurch ein neues, eigenes Blutgefäßsystem des Tumors. Die hierdurch verbesserte Versorgung der Tumorzellen ermöglicht so eine weitere Zunahme der Tumormasse [16–19].

Das Ungleichgewicht zwischen den pro- und anti-angiogenen Faktoren führt zu einer Hypervaskularisierung [16, 20]. Die neu gebildeten Tumorgefäße weisen einige Besonderheiten auf. Typische Merkmale sind der Verlust einer Gefäßhierarchie (**Abb. 3 B**), viele arteriell-venöse Shunts, teilweise blind endende und stark fenestrierte Gefäßendothelien, welche in einigen Tumorarten Fenestrierungen bis in den μm Bereich aufweisen können [21–25]. Tumore weisen einen Gefäßanteil zwischen 1% und 20% auf, welcher mit zunehmender Tumorgöße abnimmt [26].

Der konvektive Transport in den Tumormikrogefäßen ist wie im normalen Mikrogefäßsystemen direkt proportional zur Druckdifferenz zwischen arteriellen und

venösen Gefäßen, welche in Tumoren größer als in Normalgeweben ist, und umgekehrt proportional zum viskosen und geometrischen Gefäßwiderstand. Dabei hängt der viskose Blutgefäßwiderstand von der Anzahl der Blutzellen und deren Fließverhalten und von der Plasmaviskosität ab. Außerdem ist der Fahraeus-Lindqvist Effekt (Abnahme der scheinbaren Viskosität des Blutes bei abnehmendem Gefäßdurchmesser) in den dilatierten Tumormikrogefäßen geringer als in normalen Mikrogefäßen. Dies kann zu einer erhöhten Anzahl an Mikrogefäßen mit nur geringen oder gar keiner Blutperfusion in Tumoren führen. Der geometrische Gefäßwiderstand in Tumormikrogefäßen hingegen, wird hauptsächlich vom Perfusionsdruck (arteriell-venöse Blutdruckdifferenz) bestimmt [27, 28]. Die Vasomotion der Arteriolen in Tumoren ist zudem gestört oder gar nicht vorhanden was eine bedarfsgerechte Gewebepерfusion weiterhin erschwert [29].

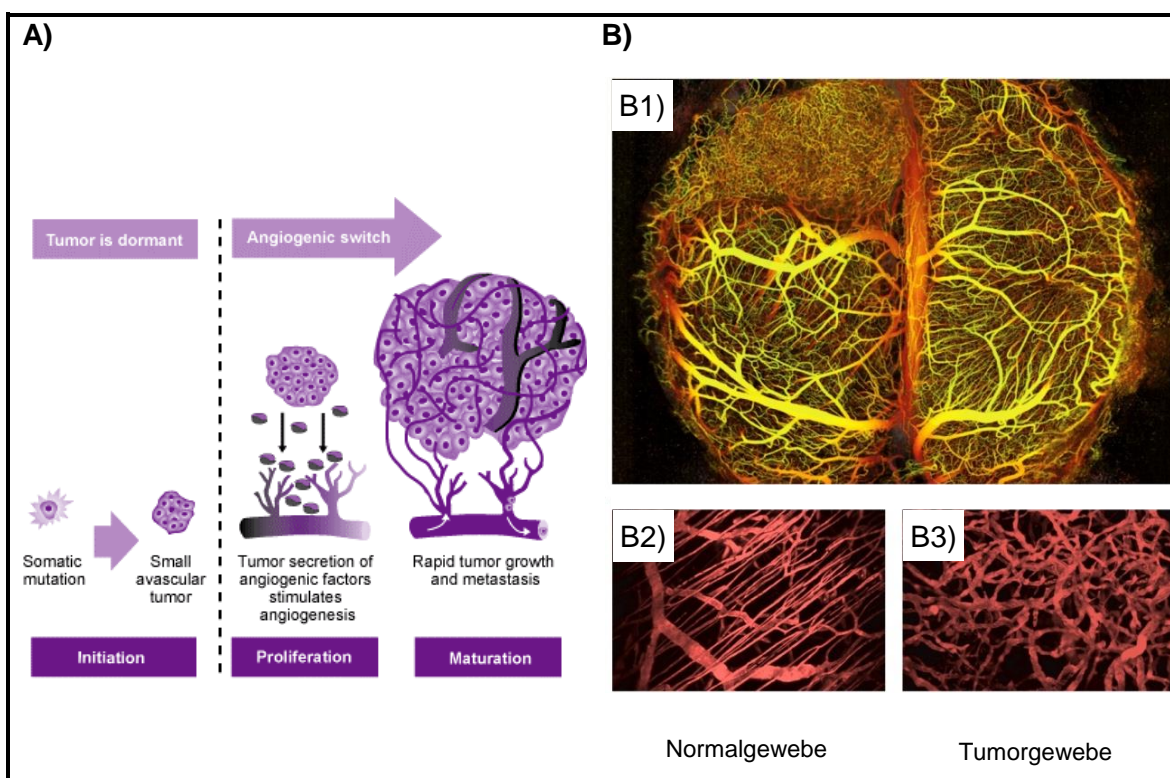


Abb. 3: Tumorprogression und Tumervaskularisation.

A) Stimulation der Neoangiogenese und Ausbildung eines eigenen Tumorgefäßnetzes durch angiogenetische Wachstumsfaktoren (nach [30]); B1) Intra-vital Multiphotonen Mikroskopie eines humanen Glioblastom-Xenografts im Mausmodell (roter Kreis) und in B2) die detaillierte Organisation einer normalen (B2)) bzw. in B3) eines neoplastischen Mikrogefäßnetzes im Maushirn (B39). Modifiziert nach [11].

Eben diese Besonderheiten sind es, welche zu größeren intervaskulären Abständen und somit zu einer Unterversorgung der Tumorzellen mit O_2 führen können (diffusionslimitierte oder chronische Hypoxie). Zusätzlich konnten räumliche und zeitliche Heterogenitäten der Mikrozirkulation, welche in dem chaotischen Gefäßsystem von Tumoren begründet sind, nachgewiesen werden. Diese Fluktuation im Blutfluss können dabei zu einer temporären perfusionslimitierten bzw. akuten Hypoxie führen [24, 31, 32]. Die hohe Gefäßpermeabilität,

führt zu einem erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck (IFP), ermöglicht aber auch die Extravasation von Blutzellen und Makromolekülen [20, 24]. Faktoren, welche zu dieser erhöhten Gefäßpermeabilität führen sind z. B. die erhöhte Ausschüttung von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF oder Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit, welche auch die Gefäßpermeabilität in entzündeten Geweben erhöhen. [33, 34]. Diese chaotische Versorgungsstruktur führt somit auch zu tumorpathophysiologischen und -metabolischen Besonderheiten des Tumormikromilieus, welche typisch für solide Tumore sind. Auf der anderen Seite können diese aber auch für auf makromolekulare Wirkstoffträgern basierende Therapiestrategien ausgenutzt werden [35, 36].

2.3.2. Transvaskulärer (Extravasation) und interstitieller Transport von Molekülen im Tumorgewebe

Dass eine Extravasation von makromolekularen Substanzen in das Tumorgewebe stattfindet, wurde mehrfach beschrieben, ebenso dass man diesen Umstand für tumorselektive Therapiestrategien ausnutzen kann [20, 23, 33]. Hierbei spielen transzytotische Vorgänge bei der Extravasation in den interstitiellen Raum des Tumorgewebes eine eher untergeordnete Rolle. Die Extravasation wird vielmehr von diffusiven und konvektiven Verteilungsvorgängen bestimmt welche wie *Swabb et al.*, 1974 zeigte vom Glycosaminoglycangehalt der Gewebe und dem Molekulargewicht (M_w) der gelösten Substanzen abhängig sein können. Dabei nimmt die hydraulische Konduktivität (Durchlässigkeit von kleinmolekularen Substanzen wie z. B. Wasser, usw.) mit zunehmenden Glycosaminoglycananteil und mit zunehmenden M_w der Diffusionskoeffizient ab [37]. Da Tumore meist einen sehr geringen interstitiellen Anteil an Glycosaminoglycanen haben, steht in vielen Tumoren eine konvektive Extravasation von makromolekularen Substanzen im Vordergrund. Hierbei spielt der interstitielle Flüssigkeitsdruck im Tumorgewebe eine besondere Rolle, da dieser durch das unausgereifte Gefäßsystem und dem oftmals fehlenden Lymphsystem höher als in Normalgeweben ist [38, 39].

2.3.3. Das interstitielle Kompartiment und der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) in Tumoren

Das interstitielle Tumorkompartiment ist generell durch einen deutlich größeren interstitiellen Raum gekennzeichnet, welcher bis zu einem Zweifachen des entsprechenden Normalgewebes sein kann. Der interstitielle Raum kann dabei in zwei funktionelle Räume unterteilt werden, welche zum einem aus einer kolloidreichen hydrophilen Gelmatrix (Kollagene, Hyalurone, Proteoglykane, usw.) und zum anderem aus der interstitiellen Flüssigkeit bestehen. Das Tumorinterstitium ist im Vergleich zu Normalgeweben durch hohe Kollagenkonzentrationen, wenig Glycosaminoglycane, einen hohen IFP, eine schlechte Lymphdrainage, einen hohen interstitiellen Diffusionskoeffizienten für Makromoleküle, ebenso eine hohe hydraulische Leitfähigkeit charakterisiert. [40]

Der IFP ist in Tumoren höher als im vergleichbaren Normalgewebe [41], so konnte gezeigt werden, dass z. B. der IFP in heterotop implantierten Walker-256 Tumoren zwischen 6 und 22 mmHg und im Vergleich dazu der IFP im Normalgewebe im Bereich von -0,1 bis 9 mmHg lag [42–45]. Gründe für den erhöhten IFP in Tumoren liegen neben der hohen Tumorgefäßdurchlässigkeit und der geringen Lymphdrainage, bei der interstitiellen Fibrose und der fibroblastenvermittelten interstitiellen Matrixkontraktion. Die Fibroblasten können dabei in die extrazelluläre Kollagenmatrix eindringen und mit dieser durch die auf der Fibroblastenmembran lokalisierten β -Integrine interagieren. Eine aktive Membrankontraktion der Fibroblasten kann dann ebenso eine Matrixkontraktion zur Folge haben [38, 46]. Im Normalgewebe ist der kapilläre Druck um 1-3 mmHg höher als der IFP, wodurch ein Flüssigkeitsstrom in das Gewebe gewährleistet wird und somit auch die Extravasation von Molekülen [38]. Ein hoher intratumoraler IFP, welcher den kapillären Druck übersteigt, kann somit der Anreicherung von Therapeutika entgegenwirken. Dies betrifft besonders die konvektionsabhängige Extravasation und interstitielle Verteilung von Makromolekülen. Niedermolekulare Substanzen ($M_w < 500$ g/mol) wie Glukose oder O_2 hingegen dringen durch Diffusion in das Tumorinterstitium ein [38, 47].

2.4. Das Tumormikromilieu

Das inadäquate Gefäßnetzwerk des Tumorgewebes führt zu einer unausgewogenen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, aber auch zu einer insuffizienten Entsorgung von Stoffwechselendprodukten. Dadurch ist in Tumoren meist ein besonderes metabolisches Tumormikromilieu anzutreffen, welches Besonderheiten im transvaskulären und interstitiellen Transport von Metaboliten, aber auch im bioenergetischen Status, der Oxygenierung und dem extrazellulären pH aufweist. [24]

2.4.1. Tumoroxygenierung und Folgen der Hypoxie

Wie in 2.3.1 bereits beschrieben, kann die anormale Gefäßstruktur in Tumoren auch zu einer insuffizienten O_2 Versorgung durch die Einschränkung der Perfusion und Diffusion im Tumorgewebe führen [24]. Von einer Hypoxie spricht man bei einem pO_2 von 0,2 mmHg bis 7 mmHg und unter 0,2 mmHg von Anoxie. Wie in **Abb. 4 A** dargestellt, ist eine adäquate O_2 Versorgung der Zellen ab einem Abstand von ca. 100 μm zu den O_2 -versorgenden Gefäßen nicht mehr gewährleistet [48]. Dabei kann es wie in **Abb. 4 B** dargestellt bei einem $pO_2 < 10$ mmHg zu proteomischen und ab einem $pO_2 < 1$ mmHg sogar zu genomischen Veränderungen kommen, was auch die Malignität während der Tumorprogression fördert [49, 50]. Die intratumorale Oxygenierung ist zudem meist nicht gleichmäßig verteilt, sondern räumlich und zeitlich heterogen, was mit der irregulären Gefäßstruktur und Mikrozirkulation in Tumoren einhergeht [24], ausgeprägt. Ebenso findet keine metabolische Regulation der Oxygenierung wie in Normalgeweben statt [50]. Obwohl manche Tumorregionen nicht mehr mit O_2 versorgt werden, können die Zellen dort auch weiterhin proliferieren, da ein Wechsel

zum glykolytischen Stoffwechsel (bei ausreichender Glukoseversorgung) die Energiebereitstellung sicherstellen kann [52].

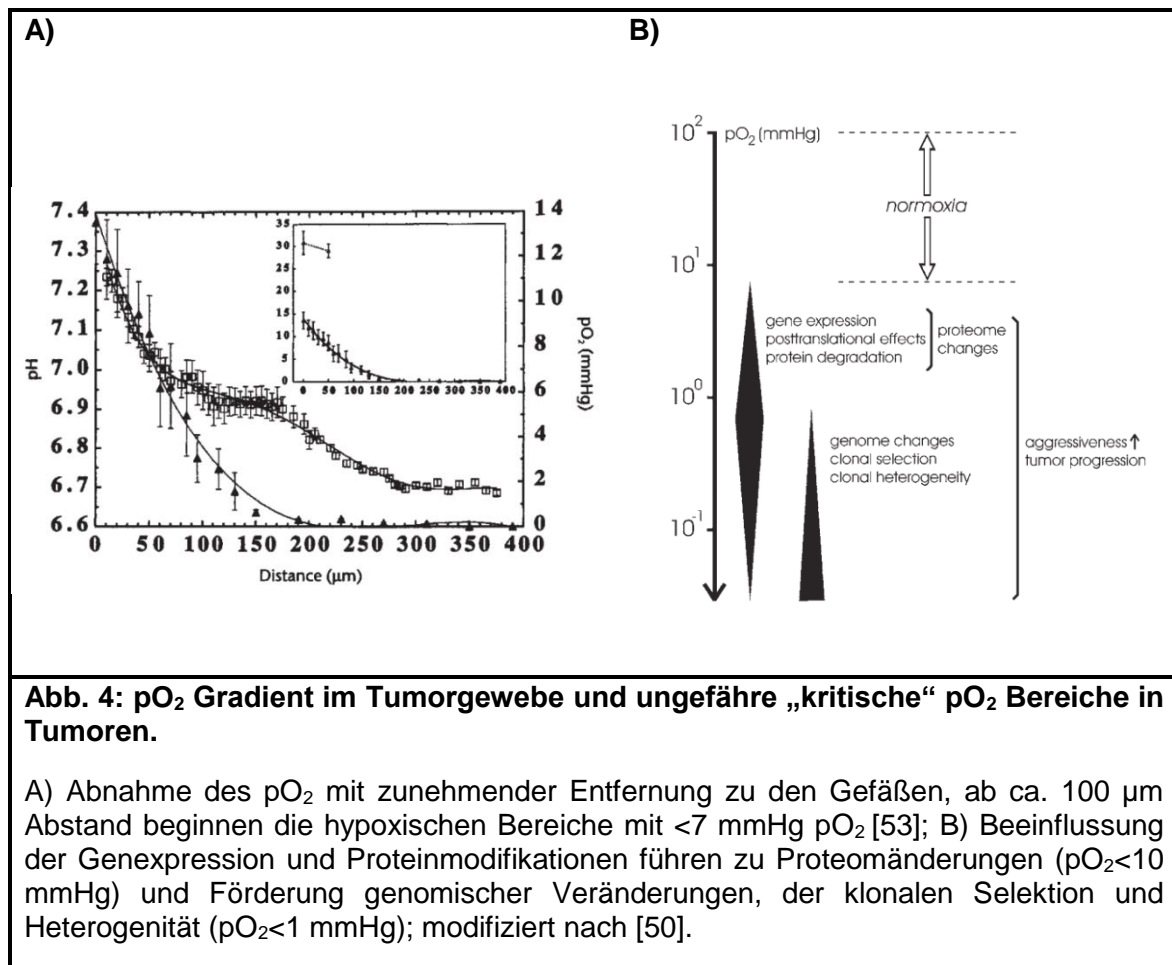


Abb. 4: pO₂ Gradient im Tumorgewebe und ungefähre „kritische“ pO₂ Bereiche in Tumoren.

A) Abnahme des pO₂ mit zunehmender Entfernung zu den Gefäßen, ab ca. 100 μm Abstand beginnen die hypoxischen Bereiche mit <7 mmHg pO₂ [53]; B) Beeinflussung der Genexpression und Proteinmodifikationen führen zu Proteomänderungen (pO₂<10 mmHg) und Förderung genomischer Veränderungen, der klonalen Selektion und Heterogenität (pO₂<1 mmHg); modifiziert nach [50].

2.4.2. Azidose in Tumorgeweben

Ein besonderes Merkmal von schnell teilenden Tumorzellen stellt die aerobe Glykolyse dar, welche als „Warburg Effekt“ bezeichnet wird. Dieser Effekt beschreibt, dass auch unter nicht-hypoxischen bzw. aeroben Tumormilieubedingungen vermehrt Glukose zu Laktat abgebaut wird und neben der Glutaminolyse wesentlich zur Energiebereitstellung der Tumorzellen beiträgt [52, 54, 55]. Durch die erhöhte Proliferationsrate der Tumorzellen werden neben anderen Stoffwechselendprodukten eine große Menge an H⁺ generiert. Um einer intrazellulären Übersäuerung entgegenzuwirken werden neben Laktat überschüssige Protonen aus den Tumorzellen geschleust. Die Regulation des pH_i setzt eine aktive Protonen-Export aus der Zelle voraus, welche unter anderem durch Na⁺/H⁺-Antiporter (z. B. NHE-1), Na⁺-unabhängige Anionenaustauscher, Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher und H⁺/Laktat-Symporter gewährleistet wird [56, 57]. Auch trägt eine extrazelluläre CO₂-Umwandlung zu Kohlensäure z.B. durch die Carboanhydrase IX (CAIX) zur Ansäuerung des Extrazellularraums in Tumoren bei [58]. Der mit dem insuffizienten Gefäßsystem

einhergehende eingeschränkte Blutfluss und die schlechte Lymphdrainage führen somit auch zu einem schlechteren Abtransport von Protonen im Vergleich zu Normalgeweben. Daraus resultierend reichern sich Protonen im Tumorgewebe an und es kommt zur Tumorzidose. Wie in **Abb. 5 B** dargestellt, kann diese intra- und intertumoral sehr heterogen verteilt sein. Es können extrazelluläre pH-Werte (pH_e) von $pH < 6$ bis 7,6 erreicht werden, wobei in Normalgeweben der pH_e zwischen $pH 7,0$ und $7,4$ liegt. Dahingegen sind die intrazellulären pH-Werte (pH_i) von Tumorzellen sehr viel weniger heterogen (**Abb. 5 A**) [24, 56]. Die intrazellulären pH-Werte in Tumoren liegen in etwa in einem zu Normalgeweben vergleichbaren Bereich, was darauf hindeutet, dass Tumorzellen über sehr effektive Transportmechanismen verfügen, um H^+ aus den Zellen auszuschleusen. Mit zunehmenden Gefäßabstand nimmt zudem der pH-Wert in Tumorgeweben diffusionsbedingt ab (**Abb. 4 A**). So konnte gezeigt werden, dass der pH im Mittel um 0,32 bei einem Gefäßabstand zwischen 10 und 100 μm sinkt, welcher dann bis zu einem Gefäßabstand von ca. 100 μm (hypoxischen Tumorbereichen) bei 6,91 lag und erst mit größeren Gefäßabständen (anoxische Tumorbereiche) auf ca. 6,7 absank. Somit konnte eine Korrelation zwischen sinkendem pO_2 und sinkendem pH_e mit zunehmendem Gefäßabstand nachgewiesen werden [53].

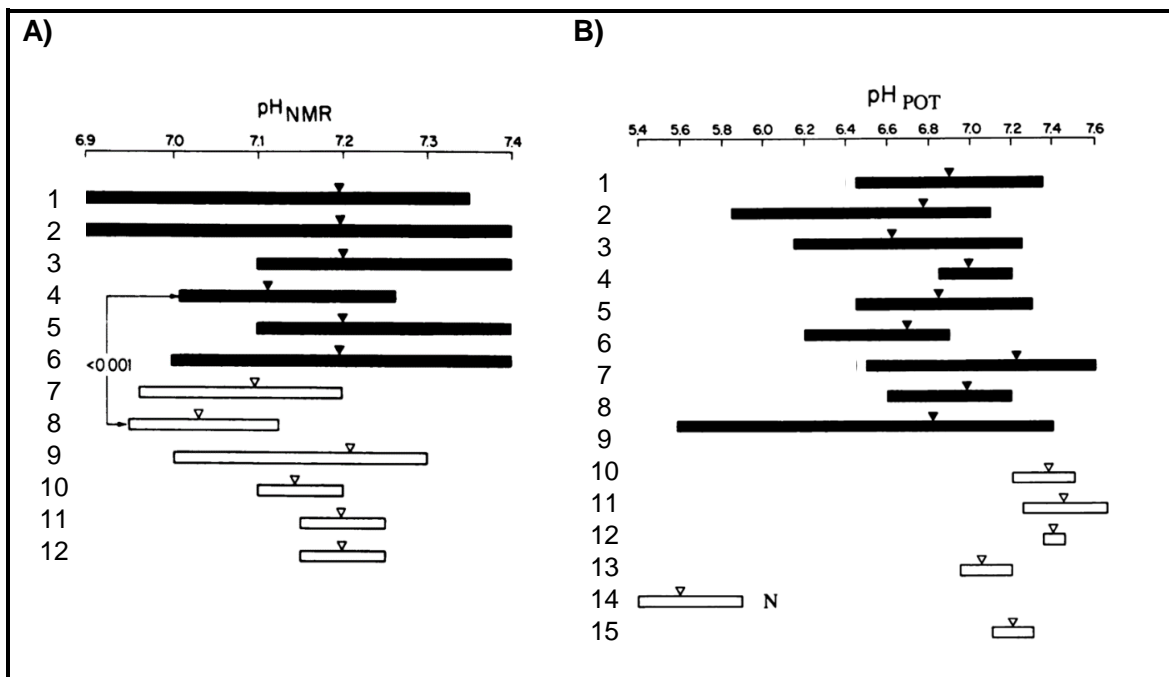


Abb. 5: Gepoolte intrazelluläre und extrazelluläre pH-Werte (pH_i und pH_e) in Geweben.

Tumore (schwarz) und gesunde Gewebe (weiß); A) pH_i mittels ^{31}P NMR (pH_{NMR}) bestimmt: 1) Sarkom, 2) Plattenepithelkarzinom, 3) Mammakarzinom, 4) Hirntumor, 5) Non-Hodgkin-Lymphom, 6) andere Tumore, 7) Skelettmuskel, 8) Gehirn, 9) Leber, 10) Herz, 11) Erythrozyt, 12) Lymphozyt; B) pH_e mit potentiometrischer pH-Elektrode gemessen (pH_{POT}) 1) Glioblastom, 2) Astrozytom, 3) Meningiom, 4) Hirnmetastase, 5) malignes Melanom, 6) Sarkom, 7) Mammakarzinom, 8) Adenokarzinom, 9) Plattenepithelkarzinom, 10) ruhender Skelettmuskel, 11) Haut, 12) arterielles Blut, 13) Gehirn, 14) Hautoberfläche, 15) Erythrozyt. Modifiziert nach [24].

2.5. Säulen der Tumorthherapie

Die klassischen Säulen der Tumorthherapie stellen die operative Resektion, sowie die Radio- bzw. Chemotherapie der Tumorgewebe dar. Ein chirurgischer Eingriff ist hierbei die effektivste Methode, wird aber oft durch die Lage, den Status und die Größe des Tumors begrenzt. Aber auch die Komorbidität und der Allgemeinzustand (Karnofsky-Index) des Patienten lassen schwere chirurgische Eingriffe nicht immer zu [10]. Eine weitere Behandlungsmethode von Tumoren erfolgt mittels Strahlentherapie. Sie kommt häufig bei lokal abgegrenzten inoperablen Tumoren zum Einsatz. Dabei wird versucht die Tumorzellen durch Induktion von letalen DNA-Strangbrüchen abzutöten. In fortgeschrittenen Tumorstadien (Metastasierung), zur Rezidivprävention und in Kombination mit obengenannten Strategien kommen systemisch wirkende Therapien, wie Chemotherapien, zum Einsatz. Diese werden entweder direkt als Bolus oder Infusion in die Blutbahn appliziert oder in fester Form über den Darmtrakt in die Blutbahn resorbiert. Der Vorteil besteht darin, dass diese Wirkstoffe Tumore im ganzem Körper erreichen können. Der Nachteil dieser Therapieformen sind die teilweise beträchtlichen Nebenwirkungen und die Entwicklung von Resistenzmechanismen. Ursächlich für die Nebenwirkungen ist unter anderem die unzureichende Tumorselektivität. Dadurch werden nicht-entartete, insbesondere sich schnell teilende Zellen in Normalgeweben negativ beeinflusst. Durch deren drohenden Funktionsverlust bzw. Zerstörung können teilweise nur eingeschränkte therapeutische Dosen eingesetzt werden. So wirkt z. B. Cisplatin durch die Akkumulation im Nierenparenchym nephrotoxisch, da es nicht nur glomerulär, sondern auch tubulär (transzytotischer Mechanismus) sezerniert wird. Andere weit verwendete Chemotherapeutika wie Anthrazykline (Doxorubicin, usw.) besitzen kardiotoxische oder im Fall von Methotrexat (Folat-Analog) neurotoxische Nebenwirkungen [59–62]. Neben den primären Resistenzmechanismen, welche ein Therapieansprechen von vornherein erschweren oder verhindern, können sich bei Tumorrezidiven nach anfänglich gutem Ansprechen des Primärtumors auf eine Therapie sekundäre Resistenzen herausbilden. So kommt es z. B. zur Positivselektionen wirkstoffresistenten Tumorzellsubpopulationen oder aber auch zur Förderung der DNA Reparatur in zellzyklusarretierten Tumorzellen z. B. durch Cisplatingabe. Ebenso kann eine fehlerhafte Apoptose, Autophagie und die Induktion von Effluxprozessen Grund für eine Therapieadaptation der Tumorzellen sein. [63–65]

Das Repertoire an Behandlungsmöglichkeiten entwickelt sich aktuell rasant weiter und es kommen immer effektivere, nebenwirkungsärmere Therapien im klinischen Alltag zum Einsatz. Neben immunologischen, rücken vor allem die „*Drug Delivery*“ basierende Ansätze für personalisierte Therapien in den Fokus der therapeutischen Krebsforschung. Diese beruhen auf Mehrkomponentensysteme, bei dem bestimmte Wirkstoffkonzentrationen aus Formulierungen bzw. Trägersystemen an einem spezifischen Wirkort kontrolliert freigesetzt werden sollen [66]. Diese reichen von biologischen Vektor-Systemen wie Viren [67] und Bakterien [68, 69] bis hin zu makromolekularen Wirkstoffträgern [20].

Der Behandlungserfolg nicht-operativer Tumortherapien wird u.a. von zwei Faktoren des Tumormikromilieus maßgeblich beeinflusst. Dies wäre zum einem die Tumoroxygenierung (Hypoxie/Anoxie) und der pH-Wert (Azidose), deren Einfluss auf die Tumortherapie im Folgendem eingegangen wird.

2.5.1. Einfluß der Hypoxie auf die Tumortherapien

Die hypoxischen Tumoreareale stellen eine besondere Herausforderung hauptsächlich für nicht-chirurgische Tumortherapien dar. Molekularer Sauerstoff bzw. Sauerstoffradikale, wie Hydroxyl-, Peroxyl- und Hydroperoxyradikale, sind extrem elektronenaffine Moleküle, die nach Adsorption ionisierender Strahlung maßgeblich an den DNA-schädigenden chemischen Reaktionen beteiligt sind [70–72]. So wie in **Abb. 6** dargestellt nimmt die Empfindlichkeit gegenüber locker-ionisierender Strahlung (Radiosensitivität) von Zellen ab einem $pO_2 < 10$ mmHg stark ab, wobei gut oxygenierte Tumoren bzw. Tumorregionen ($pO_2 > 30$ mmHg) ca. um das 3-fache sensibler gegenüber ionisierende Strahlung reagieren, als anoxische Tumore bzw. Tumorregionen.

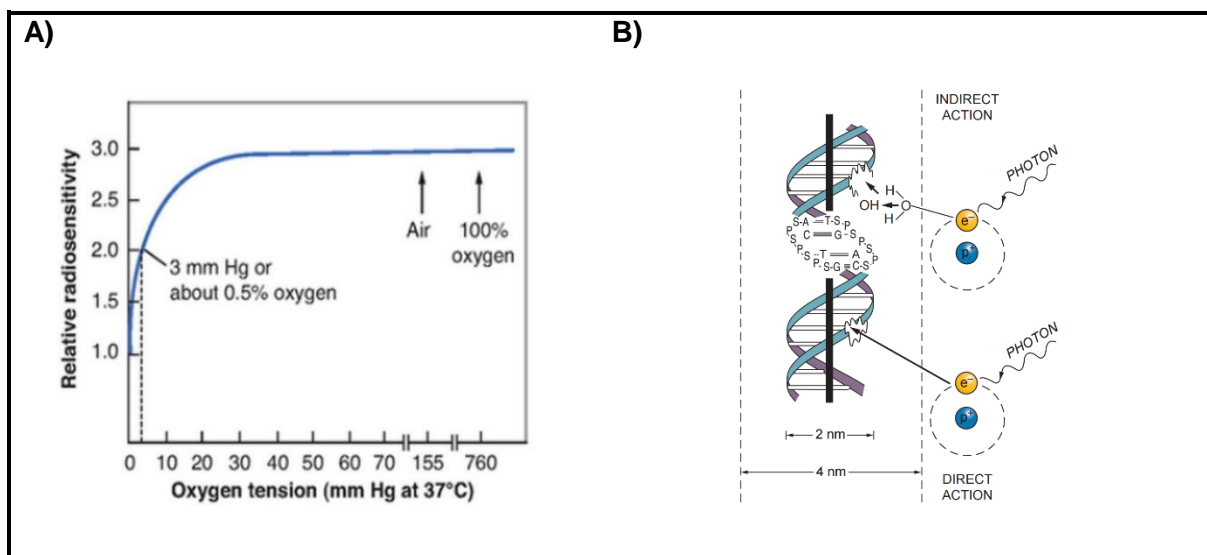


Abb. 6: Idealisierte Darstellung der Radiosensivität von Tumoren in Abhängigkeit der Oxygenierung und Wirkungsweisen der DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung.

A) Die pO_2 -abhängige Radiosensivität ändert sich zwischen 0 und 30 mmHg, wobei ein gut oxygeniertes Tumorgewebe ein ca. 3-fache höhere Sensitivität gegenüber locker-ionisierende Strahlung besitzt, als unter anoxischen Bedingungen. B) Prinzip der indirekten DNA-Schädigung durch Sauerstoffradikalbildung und durch Fixierung strahleninduzierter DNA-Strangbrüchen. Modifiziert nach [73].

Durch fraktionierte Bestrahlungen und Behandlung mit Radiosensitizern kann die Strahlenempfindlichkeit von radiobiologisch hypoxischen Tumorregionen ($pO_2 < 10$ mmHg) über den Behandlungszeitraum verbessert werden. Dabei reichen nicht-zytotoxische oder nur gering zytotoxische Konzentrationen der Radiosensitizer aus. Diese wirken entweder

direkt auf die DNA, wie 5-Fluoroxuracil, Platinderivate und Campothecinderivate (Topoisomeraseinhibitoren) oder Modifikatoren, welche die Tumorzellen nach der Induktion von Strahlenschäden für Zellabbauprozesse zugänglicher machen. Diese Modifikatoren inhibieren z. B. den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR) oder die Cyclooxygenase 2 (COX 2) [73, 74].

Chemotherapeutika, deren zytotoxische Aktivität unter hypoxischen Bedingungen zunimmt, stellen z. B. bioreduktive Verbindungen dar. Diese umfassen unter anderem nitroheterozyklische Verbindungen (z. B. PR-104, usw.), aromatische N-Oxide (z. B. Tirapazamin, usw.), welche Radikale unter hypoxischen Bedingungen bilden, oder aliphatische N-Oxide, die im reduzierten Zustand in die DNA interkalieren [75, 76]. Auf der anderen Seite hängen induzierte DNA-Schäden z. B. von alkylierende Chemotherapeutika unmittelbar von reaktiven O_2 -Spezies und damit von der Menge an vorhandenem molekularem O_2 ab [49, 77].

2.5.1.1. Einfluss der Tumorzidose auf die Tumorthherapie

Durch eine heterogene Tumorperfusion, eine hypoxieinduzierte metabolische Verlagerung und andere metabolische Besonderheiten wie dem Warburg-Effekt (aerobe Glykolyse) wird der Extrazellularraum des Tumors verstärkt azidotisch [35, 58]. Wie in **Abb. 4** dargestellt ist, sinkt der pH-Wert dabei mit zunehmendem Gefäßabstand. Ebenso wie der pO_2 ist auch der pH innerhalb eines Tumorgewebes z. T. räumlich sehr heterogen verteilt [56, 78]. In experimentellen Tumorsystemen konnte gezeigt werden, dass ein azidotisches Tumormikromilieu zu einer Verstärkung des Metastasierungspotenzials [79, 80] und zu einer Zunahme der Resistenz gegenüber Chemotherapien führen kann. Auf der anderen Seite konnte z. B. gezeigt werden, dass durch Inhibierung der Na^+/H^+ -Austauscher durch Amiloridanaloga und der damit verbundenen Senkung des intrazellulären pH, die Sensitivität der Tumorzellen bei einer Hyperthermiebehandlung zunimmt [81]. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Inhibierung des HCO_3^-/Cl^- Austauschers mittels 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonsäure (DIDS) verstärkt werden [82]. Dahingegen kann der pH_e den aktiven Transport und die passive Diffusion von Wirkstoffen in die Tumorzellen beeinflussen. So werden z. B. unter azidotischen Bedingungen die Effluxsysteme wie der Pgp-1/MDR-1 Komplex verstärkt aktiviert, was zu einem zellulären Ausschleusen (Efflux) der Wirkstoffe führt, bevor die zytotoxische Wirkung zum Tragen kommt [83, 84]. Zudem spielen die intra-extrazellulären pH-Gradienten in Tumoren für die intrazelluläre Anreicherung und Zytotoxizität von membrangängigen Wirkstoffen eine Rolle. Schwach basische Wirkstoffe, wie z. B. Doxorubicin ($pK_a=8,2$) reichern sich eher in dem vergleichsweise sauren Kompartiment und schwach saure membrangängige Wirkstoffe, wie z. B. Chlorambucil ($pK_a\leq 6,5$) in dem vergleichsweise basischeren Kompartiment an [85–88].

2.5.1.2. Einfluß der Mikrozirkulation auf die Therapie

Die Mikrozirkulation in Tumoren kann sehr unregelmäßig sein, wobei es zu Durchblutungsreduktion und -stasis bis hin zu einem Blutflußumkehr kommen kann [27, 28]. Anhand von Unterschieden in der Gewebedurchblutung lassen sich 4 Regionen in Tumoren unterscheiden. Eine nekrotische avaskuläre, eine semi-nekrotische, eine Region mit einer stabilen Mikrozirkulation und eine gut vaskulierte Region. Dabei ist aber die Perfusion zeitlich und räumlich sehr variabel und oftmals höher als in dem umgebenden Normalgewebe. Diese Umstände tragen zu einer heterogenen Verteilung von Chemotherapeutika entscheidend bei [47]. Die gestörte Perfusion kann die Tumorazidose fördern, aber ebenso eine inadäquate O₂-Versorgung verursachen und dadurch zu einer akuten Hypoxie beitragen, welche dann wiederum Auswirkung auf strahlen- und chemotherapeutische Ansätze hat [24].

2.6. Der Enhanced Permeation and Retention (EPR)-Effekt und dessen therapeutischer Nutzen

Die anatomischen und physiologischen Besonderheiten der Tumorgewebe können zielgerichtet und spezifisch als therapeutische Ansätze genutzt werden. Bereits seit langem ist bekannt, dass die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwand in Tumoren dazu genutzt werden kann, Makromoleküle verstärkt in Malignomen anzureichern [20, 89–91]. Aufgrund der erhöhten Permeabilität können Makromoleküle die Gefäßbahn im Tumor besser verlassen als im Vergleich zu den meisten Normalgeweben und werden dort auch längere Zeit zurückgehalten. Dieses Phänomen wird als der sog. Enhanced Permeation and Retention (EPR)-Effekt bezeichnet und bietet die Möglichkeit einer gezielteren Chemotherapie von Tumoren unter Schonung des Normalgewebes. *Matsumura et al.* [20] schlugen vor, den EPR-Effekt dazu zu nutzen niedermolekulare Chemotherapeutika (<500 g/mol), die an einen makromolekularen Träger gekoppelt sind, im Tumorgewebe anzureichern, um auf diese Weise eine verbesserte und tumorselektive Wirksamkeit zu erreichen.

Da diese makromolekularen Trägerstrukturen zumeist eine Größe zwischen 1 bis mehreren 100 nm besitzen, spricht man auch von Nanotransportern oder Nanovektoren [92]. Durch die Kopplung von therapeutischen Wirkstoffen an solche Nanotransporter kann einerseits eine hohe Konzentration an Therapeutika selektiv in soliden Tumorgeweben angereichert werden und andererseits das gesunde Gewebe geschont werden. Durch die stark fenestrierten Blutgefäße extravasieren die Makromoleküle leichter in das Tumorgewebe. Im Gegensatz zu den ebenso fenestrierten Endothelen von Normalgeweben, wie sie z.B. in der Niere oder Leber vorkommen [93], führt die dürftige Lymphdrainage in Tumoren zu einem erschwerten Abtransport der Makromoleküle [94]. *Matsumura et al.* konnten diesen Effekt mittels Evans Blue gekoppeltem Albumin in Sarkom-180 tragenden Mausmodellen zeigen (**Abb. 7**).

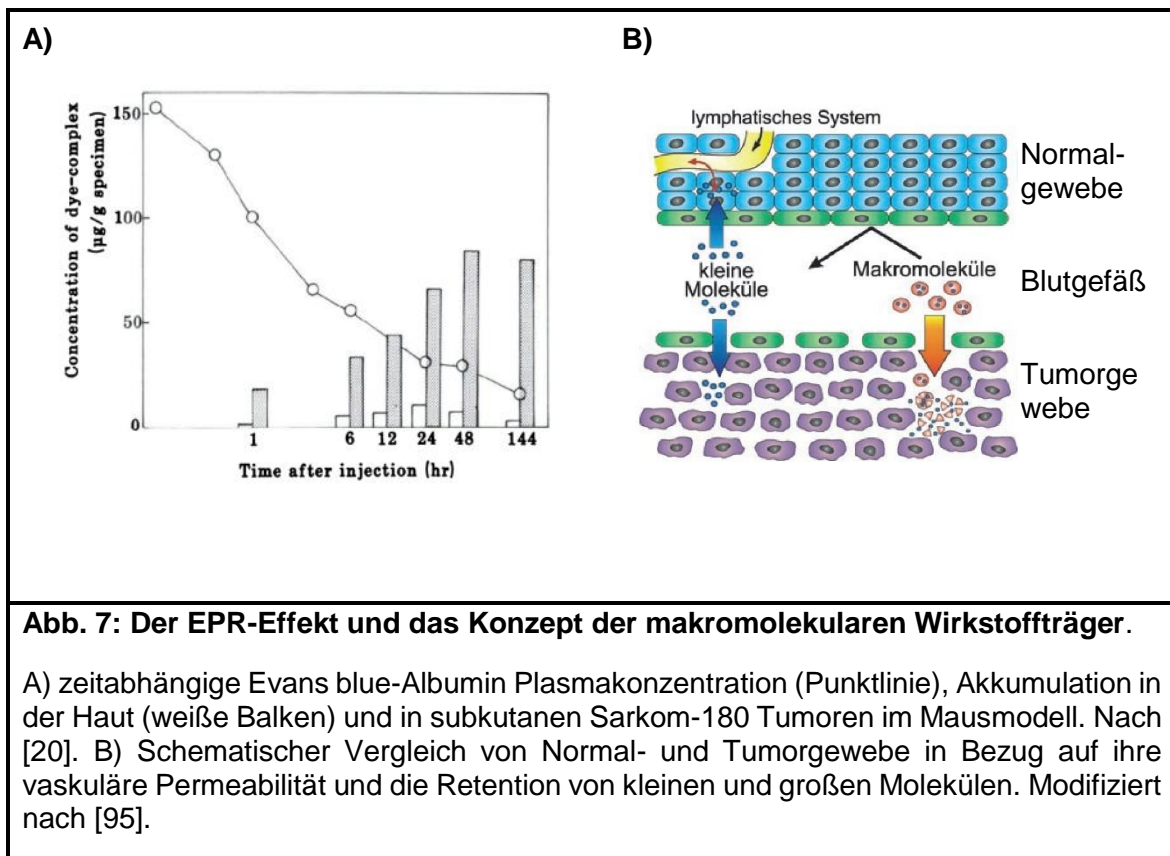


Abb. 7: Der EPR-Effekt und das Konzept der makromolekularen Wirkstoffträger.

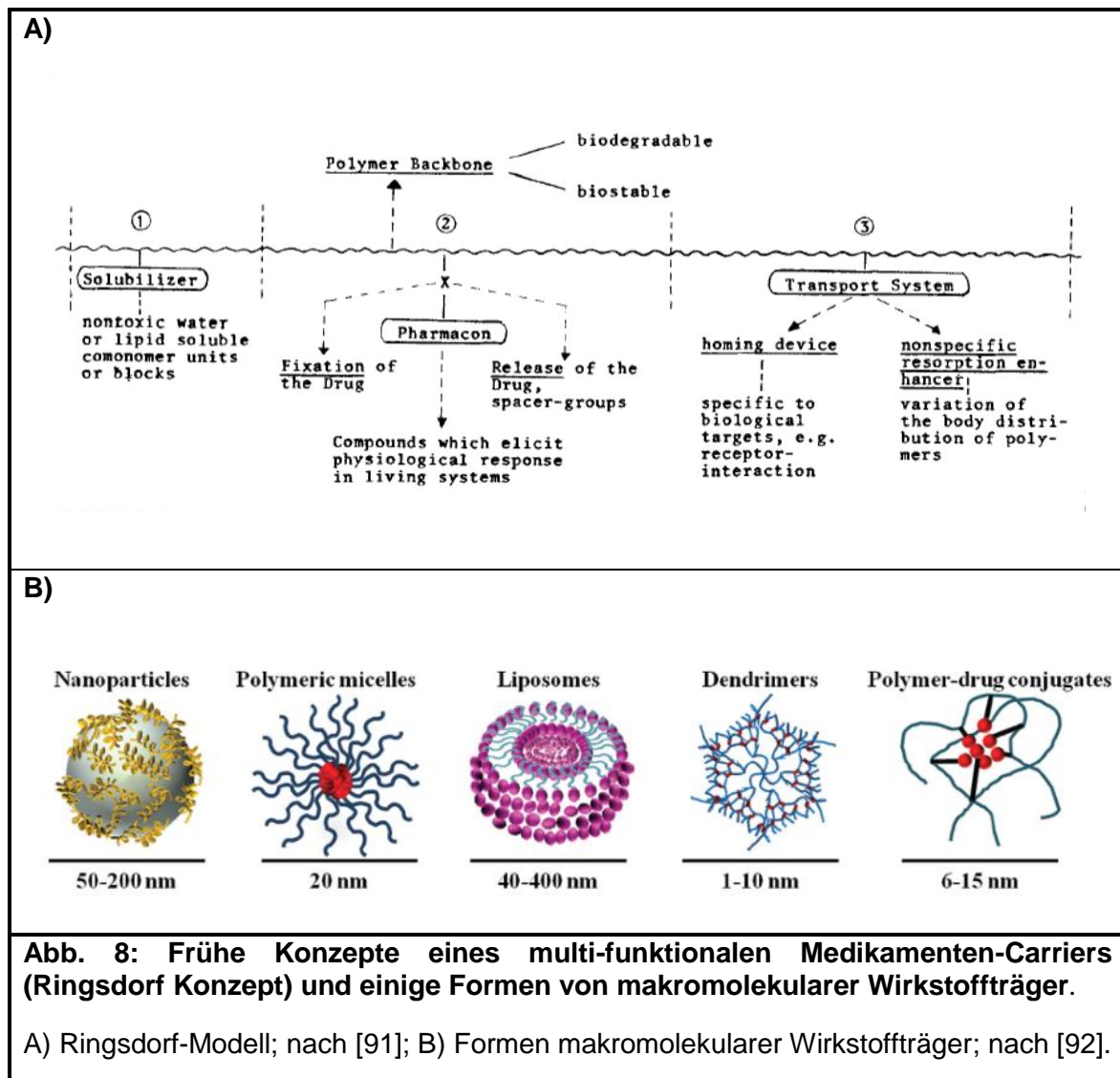
A) zeitabhängige Evans blue-Albumin Plasmakonzentration (Punktlinie), Akkumulation in der Haut (weiße Balken) und in subkutanen Sarkom-180 Tumoren im Mausmodell. Nach [20]. B) Schematischer Vergleich von Normal- und Tumorgewebe in Bezug auf ihre vaskuläre Permeabilität und die Retention von kleinen und großen Molekülen. Modifiziert nach [95].

2.7. Konzepte der makromolekularen Transportsysteme

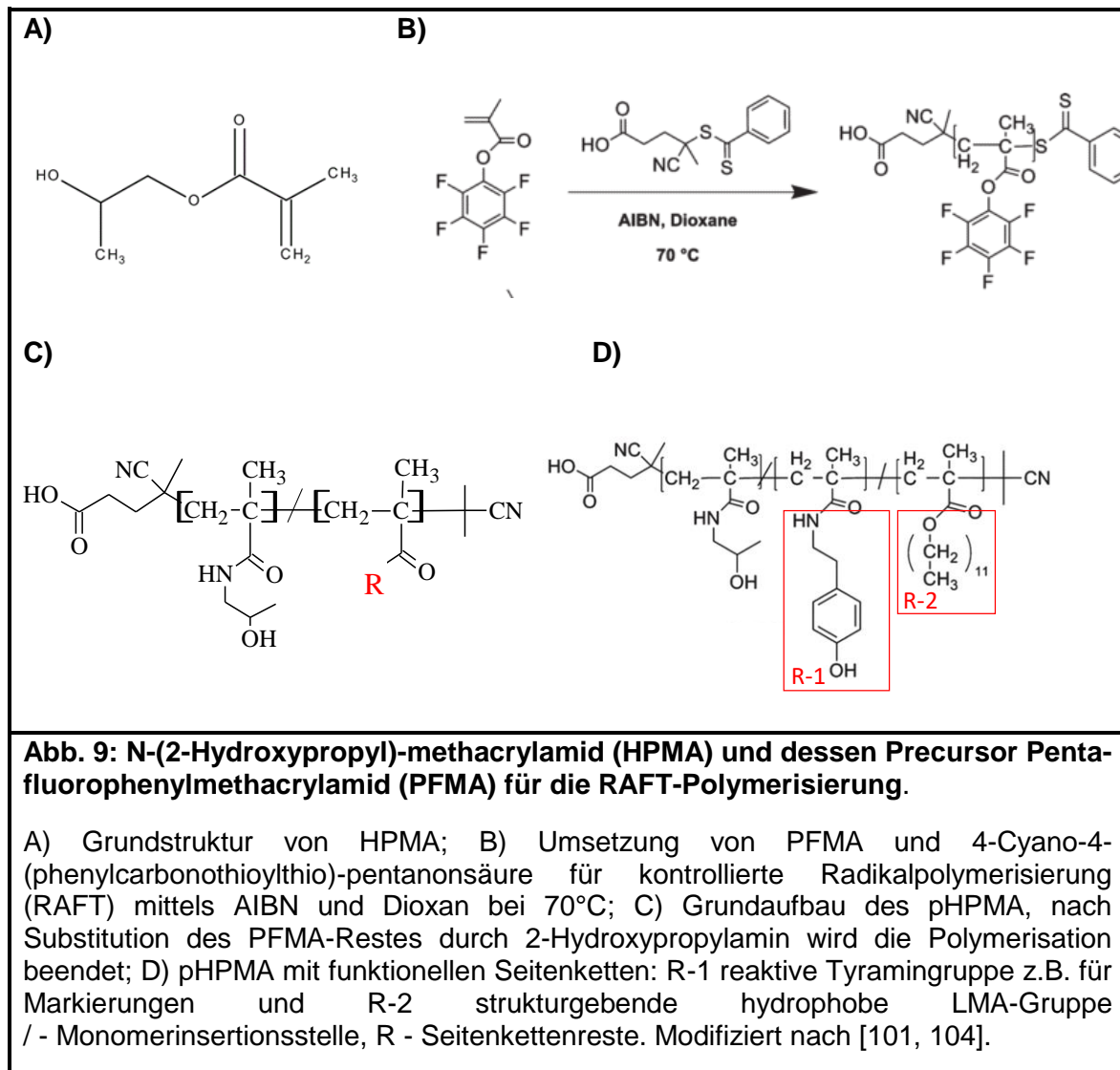
Zahlreiche niedermolekulare Chemotherapeutika weisen erhebliche Probleme auf, wie einen geringen therapeutischen Index, eine kurze Bioverfügbarkeit, Anreicherung auch in gesundem Gewebe sowie eine geringe Verfügbarkeit am Wirkort. Damit einher geht eine Dosislimitierung, welche die Effektivität einer Therapie vermindern kann [95–98]. Um den therapeutischen Index zu erhöhen entstand die Idee der Verwendung makromolekularer Transportsysteme.

Aufbauend auf polymeren Grundstrukturen entwickelte Ringsdorf ein Konzept (**Abb. 8 A**), bei dem mehrere Wirkstoffgruppen an ein Makromolekül bzw. Polymerrückgrat gebunden werden können. Diese Gruppen können dann durch einen spaltbaren Linker spezifisch an einem Wirkort freigesetzt werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit zusätzlich löslichkeitsvermittelnde Gruppen und Liganden für ein spezifisches Targeting und für die Verbesserung von pharmakokinetischen Eigenschaften gekoppelt werden [91]. Ausgehend von diesem Modell lassen sich derzeit zwei Konzepte unterscheiden. Zum einem Wirkstofftransportsystem mit einer physikalischen Wirkstoffbindung, wie Mizellen, Liposomen und nicht-kovalente Polymerträgersysteme und zum anderem kovalent gebundene Wirkstoffträgersystem, wie z. B. Polymer-Wirkstoff-Konjugate oder Dendrimere [92, 95]. In **Abb. 8 B** sind einige Beispiele von Molekülformen für die Trägerkomponente aufgeführt. Nanopartikel sind solide Strukturen, die ca. 50 bis 200 nm groß sind und auch

aus mehreren Hüllen bestehen können. Die kolloidalen Liposomen haben meist eine Größe zwischen 40 bis 400 nm und bestehen aus ein oder mehreren amphiphilen Phospholipidbilayerschichten. Polymere Mizellen bilden ebenso einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Korona aus, sind aber im Gegensatz zu den Liposomen oft kleiner (ca. 20 nm). Dendrimere sind hochverzweigte organische Moleküle, welche von einem Kern ausgehend schrittweise zu einer definierten dreidimensionalen Struktur polymerisiert werden und Größen bis ca. 10 nm aufweisen. Polyvalente-lineare Polymer-Wirkstoff-Konjugate besitzen ein polymeres Rückgrat an den über organische Linker mehrere Wirkstoffgruppen gebunden sind [92]. N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA) [99–102], Polyglutaminsäure und Dextran werden dabei am häufigsten als Polymerrückgrat benutzt, aber auch modifizierte Hydroxyethylstärke (HES) [103]. HPMA soll im Folgendem genauer betrachtet werden.



2.7.1. Wirkstoff-Polymer-Konjugate am Beispiel des Poly-N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (pHPMA)



Die Makromoleküle zur Herstellung von Wirkstoff-Polymer-Konjugaten sollten idealerweise wasserlöslich, nicht toxisch und nicht immunogen sein, außerdem einen EPR-Effekt aufweisen, aber auch vom Organismus abgebaut und/oder eliminiert werden. Darüber hinaus sollte der makromolekulare Träger passende funktionelle Gruppen zur Kopplung der Wirkstoffe und Linker aufweisen [20, 98, 105]. Diese Eigenschaften konnten für HPMA-basierte Polymere (pHPMA) nachgewiesen werden und führten dazu, dass die Verbindung für klinische Studien zugelassen wurde (Tab. 2) [106, 107]. Für die Polymerisation hatte sich dabei die „reversible addition-fragmentation chain transfer“ (RAFT) Methode gegenüber der „atom transfer radical polymerization“ (ATRP) durchgesetzt, da diese mit einer Vielzahl an funktionellen Monomeren kompatibel ist und keine toxischen Metallverbindungen verwendet werden müssen. Beide gehören zu den „living free radical“ Polymerisationsprozessen, welche eine direkte Kontrolle der Polymerkettenlänge




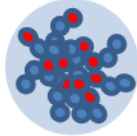

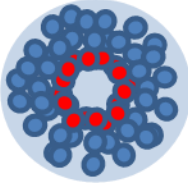
(Dispersität (\bar{D}) < 1,2) zulassen [108, 109]. Ausgehend von Pentafluormethacrylat (PFMA) als Precursor kann z. B. unter Verwendung von Azobisisobutyronitril (AIBN) und Dioxan bei 70°C das polymere HPMA (pHPMA) hergestellt werden [110–112].

Die entstehenden Polymere sind gut wasserlöslich, nicht immunogen und nicht-toxisch [100]. Zudem wird die renale Exkretion ab einer Polymergröße von ca. 45 kDa deutlich erschwert (Nierenschwelle) und verlängert die Bioverfügbarkeit [113]. Die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften können weiterhin durch Einbringen von Monomere mit funktioneller Seitenketten in die RAFT-Polymerisation modifiziert werden. Diese stellen unter anderem löslichkeitsvermittelnde und strukturgebende Seitenketten wie z.B. hydrophobe Laurylmethacryl- (**Abb. 9 D**), Dodekyl-, Oleinsäure- oder Cholesterylreste geben den hydrophilen Grundstrukturen einen amphiphilen Charakter [101, 114]. Dadurch bilden sich in einem wässrigen Medium selbstassemblierende Überstrukturen. So können neben Homopolymeren, die nur aus gleichen monomeren Untereinheiten bestehen verschiedene Copolymer Typen mit unterschiedlichen Eigenschaften synthetisiert werden. Block-Copolymere bestehend aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Block bilden dadurch mizellartige Überstrukturen. In wässrigen Medien weisen diese dann einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Korona auf. In solche Überstrukturen ist es möglich sonst schwerlösliche hydrophobe Wirkstoffe physikalisch zu verkapseln [101, 104, 115]. Random Copolymere bei denen Monomere mit hydrophoben Ketten in die hydrophile Grundstruktur nach dem Zufallsprinzip eingebracht werden, bilden dahingegen weniger formstabile, sondern sich verändernde dynamische Überstrukturen aus. Diese drei Polymertypen sind in **Tab. 1** schematisch dargestellt.

Um den EPR-Effekt in den Tumoren zu optimieren, kann z. B. durch Kopplung der Polymere mit Polyethylenglykol (PEG) Seitenketten die Plasmahalbwertszeit erhöht werden. Ebenso wird durch die Pegylierung die Immunogenität und Antigenität verringert ("stealth effect"), was ebenso die pharmakokinetischen Eigenschaften der Polymere verbessert [116–118].

Die Seitenketten der Polymermonomere können auch als spaltbare Linker für eine ortsselektive Wirkstofffreisetzung verwendet werden. Beispiele dafür wären unter anderen hydrolytisch labile Esterbindungen, enzymatisch degradierbare Peptidketten wie Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin (GFLG, Substrat von Cathepsin) oder pH-sensitive Verbindungen wie Hydrazon oder cis-Azonitsäure [106, 119, 120] sein. Das erste synthetische polymerbasierte anti-Krebskonjugat, welches für klinische Studien zugelassen wurde, war der pHPMA-basierter Wirkstoffträger PK1 [106, 121]. Dieses trägt als Wirkstoff Doxorubicin, welches mit einem enzymatisch spaltbaren GFLG linker an das Polymerrückgrat gekoppelt ist.

Tab. 1: Beispiele von Polymeren mit hydrophilen und hydrophoben Monomeranteilen und deren Überstruktur in wässrigen Medium

Polymertyp	Aufbau Polymerkette	Polymerassemblierung
Homopolymer		
Random-Copolymer		
Block-Copolymer		

blau – hydrophile Monomere, rot – hydrophobe Monomere

Für ein aktives Targeting können Monomere mit assoziierten Liganden in die Polymerketten eingebracht werden. Der erste ligandentragende pHPMA-basierte Wirkstofftransporter stellt PK2 dar, welcher sich in der klinischen Phase 2 befindet [122]. Weitere pHPMA-basierte Polymer-Wirkstoffkonjugate, die sich in klinischen Phasen befinden, sind **Tab. 2** aufgeführt.

Tab. 2: HPMA-basierte Polymer-Wirkstoffkonjugate in klinischen Studien

Name	Ligand (aktives Targeting)	Wirkstoff (Linker)	Indikation	Klinische Phase	Ref.
AP5280		Platin (GFLG)	Solide Tumore	½	[123]
PK1	-	Doxorubicin (GFLG)	Brustkrebs, Lungenkrebs, Kolorektalkrebs	2	[106, 121]
PK2	Galaktosamin	Doxorubicin (GFLG)	Heptozellularkrebs	½	[122]
MAG-CPT	-	Camptothecin (Ester)	Solide Tumore	1	[119]
PNU166945	-	Paclitaxel (GFLG)	Solide Tumore	1	[107]
ProLindac (AP5346)	-	DACH-Oxiplatin (pH-sensitiv)	Ovarialkrebs	2	[124]

2.7.2. Endozytose von Makromolekularen Wirkstoffträgern

Prinzipiell kann je nach verfolgtem Konzept die Wirkstofffreisetzung von den Wirkstofftransportern extra- oder intrazellulär erfolgen. Jedoch ist meist die Aufnahme der Therapeutika (ausgenommen von z. B. Radionukliden) in die Zielzelle notwendig um eine entsprechende Zytotoxizität zu erreichen. Durch den EPR-Effekt wird eine höhere Konzentration der konjugierten Verbindungen und nach Abspaltung im Extrazellularraum auch der unkonjugierten Wirkstoffe erreicht, wobei für die Abspaltung die besonderen physiologischen Besonderheiten, wie z.B. das azidotische Tumormilieu ausgenutzt werden kann [125, 126]. Da Tumorzellen aber über *Multi Drug Resistance* (MDR)-Komplexe verfügen können, welche unter azidotischen Bedingungen sogar hyperaktiviert werden [84], können die freien Wirkstoffe schnell aus den Tumorzellen wieder ausgeschleust werden. Um aber ein Ausschleußen der Wirkstoffe durch den MDR-Komplex aus der Zelle zu umgehen, konnte gezeigt werden, dass eine intrazelluläre vesikuläre Freisetzung von Vorteil sein kann [127–129]. Auch *Minko et al.* zeigten unter anderen, dass im Gegensatz zu freien Doxorubicin pHPMA-Copolymer-GFLG gebundenes Doxorubicin keine MDR in A2780 Zellen induziert [130]. In **Abb. 10** ist eine prinzipielle Klassifikation der Endozytosemechanismen dargestellt, welche sich in die Phagozytose und differenzierte Pinozytosemechanismen unterteilen lässt.

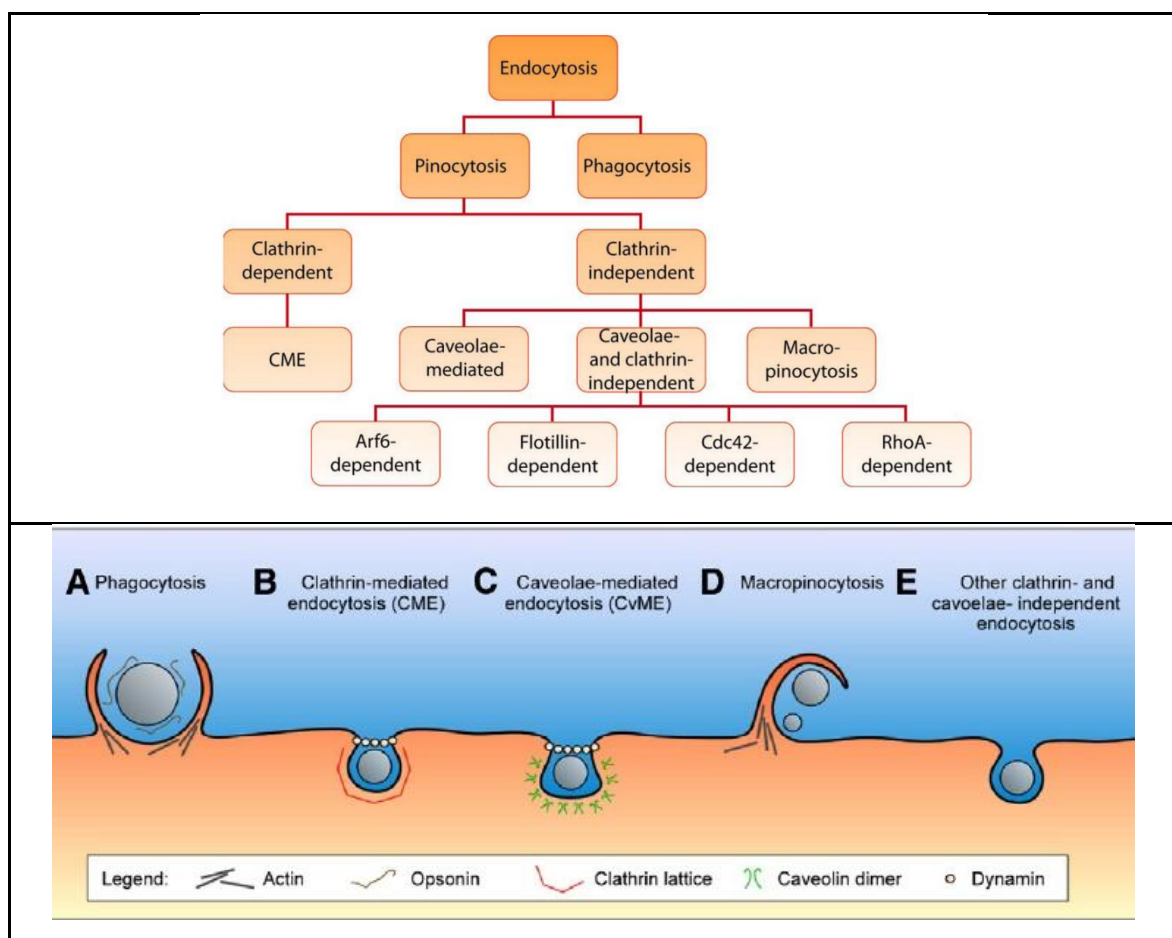


Abb. 10: Klassifikation der Endozytose basierend auf den involvierten endozytosewegtypischen Proteinen.

A) nach [131] und B) nach [132].

2.7.2.1. Phagozytose

Die zelluläre Internalisierung von opsonierten und partikulären Material erfolgt von spezialisierten Zellen des Immunsystems durch Phagozytose (Makrophagen, Monozyten, usw.) [133]. Diese „professionellen“ Phagozyten können auf diese Weise Pathogene, wie Bakterien und sogar einige Viren, aus dem Körper beseitigen. Bei diesem Vorgang werden progressiv Invaginationen (Einstülpungen) um die zu phagozytierenden Partikel von den Zellen ausgebildet und stellt eine Art „Umfließen“ der Partikel dar. Dieser Endozytosemechanismus kann mit oder ohne Membranausstülpungen von statten gehen. Andere „nicht professionelle“ Phagozyten, wie z. B. einige Endothelzellen können ebenfalls größere Partikel aufnehmen, gehören aber nicht zum Immunsystem an sich [133].

2.7.2.2. Pinozytose

Im Gegensatz zur Phagozytose sind bei der Pinozytose wesentlich kleinere Membranflächen involviert [132, 134].

Neben der Phagozytose gibt es eine Vielzahl anderer endozytotischer Aufnahmewege, über die fast alle Zellen des menschlichen Körpers (und somit auch Tumorzellen) freie oder membrangebundene Makromoleküle aufnehmen können. Diese nicht-phagozytotischen Endozytosemechanismen sind für die Aufnahme von an Makromolekülen gebundene Wirkstoffe von besonderer Bedeutung. Für eine kontrollierte zielgerichtete und tumorspezifische Wirkstoffaufnahme und -freisetzung ist die Kenntnis dieser Endozytosewege von maßgeblicher Bedeutung [132]. Bereits in den 1970-ern konnte gezeigt werden, dass prinzipiell liposomale und nanopartikulären Wirkstoffträger in den Zellen angereichert werden können [135, 136]. Wobei Liposomen entweder mit der Membran verschmelzen oder bei endozytotischen Prozessen über lysosomale Vesikel die enthaltenen Wirkstoffkomponenten in das Zytoplasma freisetzen [137]. Die zelluläre Aufnahme von Makromolekülen kann dabei über Clathrin-abhängige pinozytotische Mechanismen (CME) oder Clathrin-unabhängige pinozytotische Mechanismen, wie die Makropinozytose und anderen Cholesterol-abhängigen Endozytoserouten (z. B. CvME) in die Zelle aufgenommen werden [131, 132].

Die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) ist für eine Vielzahl von Säugetierzellen der Hauptmechanismus für die Aufnahme von makromolekularen Nährstoffen und die Endozytose von membrangebundenen Stoffen. Dazu gehört unter anderen die zelluläre Aufnahme von Cholesterol via *low density lipoproteins* (LDL) über den LDL-Rezeptor oder Eisen via Transferrin (Tf) über den Tf-Rezeptor. Diese Transportproteine werden für

gewöhnlich auch als Marker für die CME genutzt [131]. Indem Rezeptoren oder Ionenpumpen internalisiert werden, spielt sie für die Zellkommunikation eine wichtige Rolle und ist ebenso von zellphysiologischer Bedeutung [132, 138]. Die Rezeptoren sitzen dabei in ummantelten Membranvertiefungen (*coated pits*). Diese *coated pits* werden durch die Polymerisation des zytosolischen Proteins Clathrin-1 gebildet und stellen eine für die CME typische Struktur dar, welche unter dem Elektronenmikroskop in einer Triskelform erscheint (**Abb. 11**). Nach der Assemblierung der Vesikel, werden diese durch die GTPase Dynamin von der Membran abgetrennt und die Clathrinhülle kurz vor der Fusion mit den frühen Endosomen von den Vesikeln abgespalten, bevor sie weiter zu den späten Endosomen und Lysosomen, zu dem trans-Golgi-Netzwerk oder Recyclen-Endosomen sortiert werden [139–141]. Die durchschnittliche Größe der CME-Vesikel beträgt ca. 120 nm [138]. Die Überexpression von tumorzellassoziierten Membranrezeptoren wird bei gerichteten Tumortherapien, durch die Funktionalisierung von Nanotransportern mit Liganden ausgenutzt. Auf diese Weise spielt es z. B. durch das aktive Targeting von G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Integrinen, aber auch von Transferrinrezeptoren für die CME eine wichtige Rolle [131, 142].

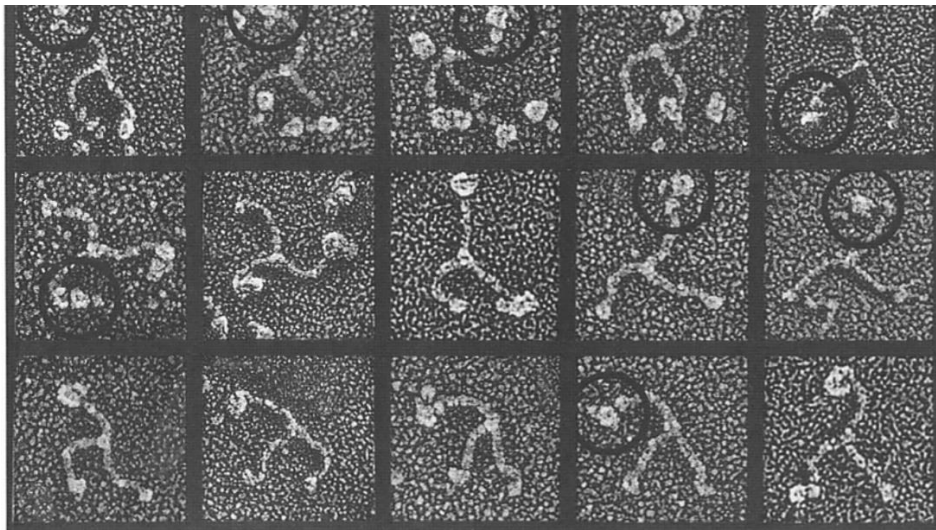


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Clathrin-Triskel assoziierten AP-2 Proteinen.

Ein Aufnahmefeld entspricht 100 x 100 nm. Nach [141].

Die Clathrin-unabhängige Caveolin-vermittelte Endozytose (CvME) ist durch das haarnadelförmige Protein Caveolin gekennzeichnet. Caveolin-1 und -2 sind vor allem in nicht-Muskelzellen verbreitet und essentiell für die Ausbildung von Caveolen. Für die Stabilisierung der Caveolen durch das strukturgebende Protein Caveolin-1 ist unter anderem Cholesterol notwendig, wobei dessen Depletion die Caveosomen auseinanderbrechen lässt. [143] Dieser Endozytosemechanismus ist abundant in Muskel-

und Endothelzellen, ebenso wie in Adipozyten verbreitet, fehlt aber Neuronen und Leukozyten [134]. Die Vesikel sind flaschenförmig, haben einen Durchmesser von ca. 50 bis 100 nm und können bis zu 20 % der Zellmembranoberfläche einnehmen [138]. Diese werden ebenso wie bei der CME durch die GTPase Dynamin von der Zellmembran getrennt. Im Gegensatz zur CME erfolgt keine Ansäuerung der Caveosomen und unterscheidet sich somit auch von den Endosomen und Lysosomen. Dadurch wird die CvME auch von Bakterien (z. B. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) und Viren (z. B. SV40, Polyomaviren) für das zelluläre Eindringen genutzt um der lysosomalen Degradierung zu umgehen. [143] Darauf zurückzuführen ist die Verwendung markierter nicht-toxischer Bindungsdomänen bakterieller Toxine als Marker für die CvME und anderer Cholesterol-abhängiger Endozytosewege. Dazu zählen unter anderem das Shigatoxin und Cholera toxin β Marker, welche selektiv an die Glycosphingolipide Gb3 und GM-1 in den Caveolen binden [134, 144, 145]. Durch Optimierung der physikochemischen Eigenschaften von makromolekularen Transportern oder durch Kopplung von Liganden, welche an Caveolen-assoziierte Rezeptoren (z. B. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin) binden, kann die zelluläre Aufnahme durch die CvME begünstigt werden und dadurch die lysosomale Degradierung von Wirkstoffen umgangen werden [146, 147]. Caveolin-1 kann zudem die Signaltransduktion, z. B: durch die Interaktionen mit dem Epithelialen Wachstumshormonrezeptor (EGFR) oder der epithelialen Stickstoffmonoxidase (eNOS), oder durch die Modulation der Proteinkinase Akt1 Phosphorylierung, beeinflussen [148–150]. Durch die Lokalisation von Ca^{2+} -Kanälen und Ca^{2+} -Modulatoren in Caveolen, stellen diese außerdem Mikrodomänen für Ca^{2+} -abhängige Signalwege dar [151, 152].

Die Makropinozytose dient der zellulären Aufnahme von Flüssigkeiten und der darin befindlichen Nährstoffe. Die dabei gebildeten inhomogenen Vakuolen haben Durchmesser von 0,5 - 10 μm und sind somit größer als alle anderen pinozytotischen Vesikel [153]. Sie ist unabhängig von Clathrin, Caveolin und Dynamin und kann über die Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren initiiert werden. Dadurch wird eine Änderung der Aktinfilamente bewirkt, welches zu einem Membranausstülpen (*membrane-ruffling*) führt [153, 154]. Die Initiation der Makropinozytose geht also nicht vom Cargo aus. Einige Bakterien, Apoptosekörperchen, nekrotische Zellen und Viren können unabhängig von Wachstumsfaktoren den makropinozytotischen Endozytoseweg aktivieren und dadurch mit den Makropinosomen in Zellen aufgenommen werden [155, 156]. Im Gegensatz zur Phagozytose ist die Makropinozytose zelltypenspezifisch und es werden große Mengen an nicht-spezifischen Flüssigkeiten mit den darin gelösten Stoffen aufgenommen. Zudem ist sie ungerichtet, da es zu einer globalen Aktivierung des Aktin-Cytoskelettes und eine damit verbundene Ausbildung von Membranausstülpungen über die gesamte Zellmembran stattfindet [153].

Andere Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytosewege werden unter anderem durch cholesterol- und sphingolipidreiche Mikrodomänen (lipid rafts) mit einer Größe von ca. 90 nm, die frei auf der Zelloberfläche diffundieren vermittelt. Damit ähneln sie der CvME,

sind aber Caveolin-1 und -2 unabhängig [157]. Auf den lipid rafts sind Glykosylphosphatidylinositol zellmembranverankerte Proteine (GPI-APs) wie z. B. der Folatrezeptor α (FR α) oder der Interleukin-2 Rezeptor lokalisiert. Nach der Internalisierung werden die Cargos z. B. in GPI-AP-angereicherte frühe endosomale Kompartimente (GEEC) entlassen. Sie können abhängig von ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (Arf6), von der Rho-GTPase Cdc42 und der Aktivität des kleinen G Proteins RhoA sein [134]. Eine Kompensation der Cdc42 abhängigen Endozytose von GPI-APs durch eine CME konnte durch die Inaktivierung von Cdc-42 gezeigt werden [158]. In **Abb. 10** sind die beschriebenen Endozytosewege schematisch dargestellt.

2.7.3. Einfluß der physikochemischen Eigenschaften von makromolekularen Wirkstofftransportern auf die zelluläre Aufnahme

2.7.3.1. Ladung und Löslichkeit

Die Oberflächenladung der Nanotransporter wird durch das ζ -Potential (Zeta- oder Coloumb-Potential) charakterisiert. Es beschreibt die elektrische Ladung an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in einer Dispersion.

Durch die negativ geladene Zellmembranoberfläche der Zellen erfahren Nanotransporter mit einer positiven ζ -Potential meist eine bessere zelluläre Aufnahme, als Nanotransporter mit einem negativ geladenen ζ -Potential. Der bevorzugte Endozytoseweg für positiv geladene Nanotransporter scheint die CME und für negativ geladene die CvME zu sein [131, 132]. Dies konnte z. B. an PLA-PEG basierten gezeigt werden, welche ein ζ -Potential von ≈ -35 mV aufwiesen und selbiges mit einer Beschichtung von kationischen Lipidstearylamin ein ζ -Potential von $\approx +35$ mV. Durch die kationische Beschichtung wurden die Nanotransporter schneller und in einer höheren Konzentration in HeLa Zellen internalisiert [159]. Kationische Partikel sind aber nach systemischer Applikation of toxisch und werden rasch durch das RES System aufgenommen.

Bei der Endozytose von Makromolekülen mit einer neutralen Oberflächenladung spielen vor allem hydrophobe Interaktionen und Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen eine Rolle [160, 161]. Amphiphile bzw. hydrophobe Wirkstofftransporter besitzen eine höhere Affinität zu der Lipiddoppelschicht der Zellmembranen als hydrophile Transportsysteme. Zudem hat das Gleichgewicht und die Anordnung zwischen hydrophoben und hydrophilen Polymeranteilen auch Einfluss auf die Form und Stabilität der Polymeraggregate, und damit auch auf die zelluläre Aufnahme [112].

2.7.3.2. Größe

Der Einfluß der Nanopartikelgröße auf die zelluläre Aufnahme ist abhängig von der verwendeten Zelllinie. Es konnte gezeigt werden, dass polystyrenbasierte Nanopartikel (20 nm - 1000 nm) von HUVEC-, ECV 304- (Blasenkarzinom) und 14C-Zellen (Plattenepithelkarzinom) gar nicht aufgenommen werden. Dahingegen werden in Hepa 1–6 (Hepatom) und in HepG2 (Hepatozyten) die gleichen Nanotransporter bis zu einer Größe von 20 nm - 100 nm und bis 600 nm in KLN 205 (Plattenepithelkarzinom) endozytiert [162]. Eine zelluläre Aufnahme von bis zu 5 µm großen Partikeln konnte für HUVEC Zellen gezeigt werden. Bei diesen Versuchen wurden Partikelgrößen von 0,5 nm bis 5 µm untersucht, wobei die effektivste Aufnahme für Partikel mit einer Größe von 150 nm, gefolgt von 100 nm und 200 nm großen Partikeln gezeigt wurde [163]. Dies zeigt aber auch, dass die Polymergröße nicht allein für eine effektive zelluläre Aufnahme der Nanotransporter verantwortlich ist. Ein Zusammenhang zwischen Nanotransportergröße und bevorzugten Endozytoseweg kann dabei nicht ganz ausgeschlossen werden und zumindest teilweise die unterschiedliche effektive Aufnahme erklären. Eine geringe Dispersität (\bar{D}) der Nanotransporter ist somit auch für Aussagen zu einer größenabhängigen Nanotransporteraufnahme wichtig [164].

2.8. Voruntersuchungen zur Biodistribution verschiedener pHPMA-Polymer in vivo

Tab. 3: Charakteristika der pHPMA basierten Homo- (HP), p(HPMA)-co-p(LMA) (RCP) und p(HPMA)-b-p(LMA) (BCP)

[101, 104, 117]. Alle Verbindungen wurden mit unterschiedlichem Molekulargewicht als kleines (k) und großes (g) Polymer synthetisiert.

Nomenklatur	Monomer- verhältnis (%)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	\bar{D}	r_h (nm)	PEG2000 (%)
kHP	100	9000	12000	1,29	1,1	0
gHP	100	52000	77000	1,49	3	0
kRCP	82 : 18	11000	14000	1,26	33,4	0
gRCP	75 : 25	39000	55000	1,41	39,9	0
kBCP	79 : 21	9000	12000	1,24	58,7	0
gBCP	75 : 25	17000	21000	1,24	112,8	0
gBCP-1	75 : 25	20000	24000	1,25	55,4	1
gBCP-5	75 : 25	26000	33000	1,25	38,0	5
gBCP-7	75 : 25	30000	38000	1,25	38,1	7
gBCP-11	75 : 25	39000	47000	1,25	53,0	11

k – klein, g – groß. LMA – Laurylmethacrylat, HP – Homopolymer, RCP – Random-LMA-Co-Polymer, BCP – Block-LMA-Co-Polymer, PEG2000 – 2000 Da Polyethylenglykolketten

Es wurden verschiedene HPMA-basierte Polymere hergestellt, wobei der hydrophobe Anteil durch Laurylmethacrylat (LMA) Seitenketten realisiert wurde. Die drei HPMA Typen

umfassten Homopolymere, p(HPMA)-co-p(LMA) und p(HPMA)-b-p(LMA) jeweils in einer kleinen und einer großen Polymervariante (**Tab. 1** und **Tab. 3**).

Die kleinen Varianten hatten dabei ein Molekulargewicht unter der Nierenschwelle von 40000 g/mol und die großen darüber [101, 104]. In einem weiteren Ansatz wurden Triblock-Polymere mit zusätzlichen 2000 Da Polyethylenglykol (PEG 2000) in der großen Block-LMA-Co-Polymervariante untersucht [117].

Die verwendeten **Homopolymere** waren dabei reine HPMA-Polymere, ohne zusätzliche Seitenketten und somit sehr hydrophil, wodurch die Ausbildung von zusammengelagerten Überstrukturen unwahrscheinlich ist.

Die **p(HPMA)-co-p(LMA)** stellten ein zufällig zusammengesetztes Gemisch aus reinen HPMA-Monomeren und HPMA-Monomeren mit hydrophoben Seitenketten (18 % Anteil in den kRCPs und 25 % Anteil in den gRCPs). Auf diese Weise bilden sich dynamische und sehr unregelmäßige Überstrukturen aus.

Die **p(HPMA)-b-p(LMA)** dahingegen bestanden aus einer definierten Reihenfolge an reinen HPMA-Oligomeren und HPMA-LMA-Oligomeren. Daraus resultierten in wässriger Umgebung zusammengelagerte Überstrukturen mit einer hydrophilen Korona und einem hydrophoben Kern. Die kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) hatten einen HPMA-LMA-Anteil von 21 % und die großen p(HPMA)-b-p(LMA) von 25 %.

Weiterhin wurden große p(HPMA)-b-p(LMA) mit zusätzlichen pegylierte HPMA-Oligomere verwendet. Der pegylierte Anteil betrug dabei entweder 1 %, 5 %, 7 % oder 11 % der Polymerkette. Dadurch nahm zum einem der hydrodynamische Radius ab und das Molekulargewicht zu.

Die Biodistribution von HPMA-basierten Polymeren wurde in *in vivo* Studien mit den syngen Tumormodellsystemen AT-1 Dunning 3327 (Prostatakarzinomzelllinie) und Walker-256 (Mammakarzinomzelllinie) in der Ratte untersucht [101, 104, 111, 117]. Die pharmakokinetischen Untersuchungen in den Tumormodellsystemen zeigten: 1) Die Tumorakkumulation war abhängig von der Tumorzelllinie, aber ebenso vom pHPMA-Typ und dessen Größe, wobei das große Random-LMA-Co-Polymer die höchste Tumorakkumulation aufwies [101, 104]. 2) Die Homopolymervarianten wurden in einer relativ kurzen Zeit vom Körper ausgeschieden, wobei dies für die kleine Variante hauptsächlich über den renalen und die große Variante über den hepatobiliären Weg erfolgte. Zudem konnte eine Akkumulation der großen Homopolymervariante auch in der Milz nachgewiesen werden. 3) Die Kopplung von 2000 Da Polyethylenglykol (PEG 2000) an die Seitenketten des Block-LMA-Co-Polymers steigerte die Akkumulation in Walker-256 Tumoren und ebenso die Bioverfügbarkeit, da eine verringerte Exkretion zu einer langsameren Konzentrationsabnahme im Blut führte, wobei ein Zusammenhang zwischen dem Gewichtsanteil des PEG am Polymer und der Akkumulation im Tumor bestand [117].

3. Fragestellungen

Da wie in den Vorarbeiten gezeigt, sich die Akkumulation der HPMA-Polymere in den beiden untersuchten Tumormodellen *in vivo* unterschied, sollten verschiedene physiologische Parameter, die einen Einfluss auf den konvektiven und diffusiven Transport der Polymere haben könnten, in den beiden Tumormodellen näher untersucht werden. Dies umfasste zum einem Parameter der Gefäße (z.B. die Dichte des Gefäßnetzes sowie die Permeabilität der Gefäße) sowie Parametern des interstitiellen Raums der Tumoren, wie der IFP, der extrazelluläre pH und die Oxygenierung (pO_2 -Verteilung) in den Tumormodellen.

Da bekannt ist, dass der pH, aber auch der pO_2 Einfluss auf Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber Therapeutika haben kann, sollte geklärt werden, welchen Einfluß diese tumorpathophysiologischen Parameter auf die aktive zelluläre Aufnahme der verschiedenen makromolekularen pHMPA basierten Wirkstofftransporter haben. Diese stellt eine essentielle Voraussetzung für die intrazelluläre Freisetzung von transportierten Wirkstoffen dar. Hierzu sollte mittels Fluoreszenzmarkierten Polymeren, die Aufnahme in Zellen der beiden Tumormodelle in Zellkulturansätzen unter verschiedenen pH und pO_2 -Bedingungen ermittelt werden.

Die zelluläre Aufnahme kann dabei über verschiedene Endozytosewege erfolgen. In weiteren Analysen sollte daher untersucht werden, über welchen Endozytoseweg die unterschiedlichen Polymere in die Zelle aufgenommen werden. Hierbei kamen wiederum die Fluoreszenzmarkierten Polymere in den beiden Tumorzelllinien zur Anwendung. Da sich das extrazelluläre Milieu in Tumoren bezüglich des pH-Werts und des pO_2 von Normalgeweben erheblich unterscheidet, sollte schließlich noch untersucht werden, welchen Einfluss eine extrazelluläre Azidose bzw. Hypoxie auf die verschiedenen Endozytosewege haben.

4. Materialien und Methoden

4.1. Abkürzungsverzeichnis der Hersteller

A	Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen, Österreich
ABB	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Abc	Abcam, Cambridge, UK
ADI	ADI Instruments Pty Ltd, Bella Vista, Australia
APL	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
BC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
BD	Becton, Dickinson, San Jose, USA
BI	Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA
BM	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
BMol	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
BR	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kidlington UK
CLS	Cell lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland
CP	CellPath Ltd., Newtown, UK
CST	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
D	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
DK	Dako North America, Inc., Carpinteria, USA
Ept	Epitomics, Burlingame, USA
GBO	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
GE	General Electrics Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
H	A. Hartenstein Laborversand GmbH, Würzburg, Deutschland
Her	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
hpi	Hypoxyprobe, Inc, Burlington, USA
K	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Knt	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Bielefeld, Deutschland
M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mer	Merial GmbH, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Mid	Midmark Corporation, Orchard Park, USA

MG	Magnettech GmbH, Berlin, Deutschland
MIL	Millar, Inc., Houston, USA
MP	Molecular Probes
MPS	Magicplot Systems, LLC, St. Petersburg, Russland
NEB	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
NIH	National Institute of Mental Health, Bethesda, USA
Ox	Oxford Optronics Ltd., Oxford, UK
Q	Qiagen, Hilden, Deutschland
R	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roc	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
RP	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
RT	Ruskin Technology, Ltd., Bridgend, UK
S	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
SA	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
SLEE	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Sm	Siemens Aktiengesellschaft, München, Deutschland
Tec	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Tc	Tocris Bioscience, Bristol, UK
TF	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
VWR	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
WM	Whatman, Dassel, Deutschland

4.2. Materialien

Die Abkürzung des Herstellers steht in Klammern.

Tab. 4: Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium/Puffer	Supplement
AT-1 (Dunning 3327)	RPMI 1640	10 % Fötale Kälber-serum (M)
Walker-256	RPMI 1640	10 % Fötale Kälber-serum (M) 10 mM L-Glutamin (S) 7,5 % NaHCO ₃ (M) 20 mM HEPES (SA)

Tab. 5: Verwendete Tiermodelle

Art	Linie	Geschlecht
Ratte	Wistar	männlich
Ratte	Copenhagen	männlich

Tab. 6: Verwendete selektive, fluoreszenzmarkierte Endozytosewegmarker

Endozytosewege	Endozytosemarker	C _{Ansatz}	Literatur
Makropinozytose	Dex-70 Dextran, Oregon Green® 488; 70,000 MW, Anionic, Lysine Fixable (TF)	1 g/ml	[165]
Dynamamin-abhängige, clathrinvermittelte Endozytose (CME)	Tf-488 Transferrin from human serum, Alexa Fluor® 488 conjugate (TF)	25 µg/ml	[166, 167]
Cholester-abhängige Endozytose	Ctb-488 Cholera Toxin Subunit B (Recombinant), Alexa Fluor® 488 Conjugate (TF)	2 µg/ml	[168]

Tab. 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffername	pH-Wert	Zusammensetzung
HEPES-Ringer (HR)	6,8 – 7,6	24 mM NaHCO ₃ (M) 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (M) 0,2 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O (M) 86,5 mM NaCl (5,06 g/l) 5,4 mM KCl (M) 1,2 mM CaCl ₂ (M) 0,8 mM MgCl ₂ (M) 20 mM HEPES (SA) 11 mM Glucose (SA)
MES-Ringer (MES)	5,8 – 6,6	4,5 mM NaHCO ₃ (M) 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (M) 0,2 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O (M) 106 mM NaCl (5,06 g/l) 5,4 mM KCl (M) 1,2 mM CaCl ₂ (M) 0,8 mM MgCl ₂ (M) 20 mM MES (SA) 11 mM Glucose (SA)
Laktat-Ringer	7,4	24 mM NaHCO ₃ (M) 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (M) 0,2 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O (M) 46,5 mM NaCl (5,06 g/l) 40 mM Na-Laktat (S) 5,4 mM KCl (M) 1,2 mM CaCl ₂ (M) 0,8 mM MgCl ₂ (M) 20 mM HEPES (SA) 11 mM Glucose (SA)
PBS	7,4	13,7 mM NaCl (R) 0,27 mM KCl (M) 0,81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (M) 0,15 mM KH ₂ PO ₄ (M)
Zellablösepuffer	7,3	0,54 mM EDTA, Titriplex III (M) 136,9 mM NaCl (R) 2,7 mM KCl (M) 6,46 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (M) 1,47 mM KH ₂ PO ₄ (M) 42 mM Trypsin (SA)
Zellysepuffer	7,4	20 mM MOPS (SA) 0,1 % Triton X 100 (SA)

Tab. 8: Selektive Inhibierung der Endozytosewege

Selektive Inhibitoren der Endozytosewege	Mechanismus	C _{Ansatz} (µM)
Rottlerin (A)	Makropinozytoseinhibitor durch Inhibierung der PKC δ	10
Dynasor (Tc)	Inhibierung der Dynamin-abhängigen Endozytosewege über Dynamin 1 und Dynamin 2 GTPase Aktivität	100
Chlorpromazin (SA)	Inhibierung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Inhibierung der Clathrindisassemblierung	50
Nystatin (SA)	Cholesteroldepletion	30

Tab. 9: Eichlösungen für die pH_i und [Ca²⁺]_i Einzelzellanalysen

Eichlösung	Zusammensetzung
pH7,6 und pH6,8	132 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES 10 µM Nigericin
Puffer mit 1 mM Kalzium (pH7,4)	141 mM NaCl 0,8 mM NaH ₂ PO ₄ 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ 4 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 1 µM Ionomycin
Kalzium-depletierte Puffer (pH7,4)	siehe 1 mM Kalziumlösung; nur 1mM CaCl ₂ mit 1 mM EGTA substituiert

Tab. 10: Ratiometrische Sonden für die pH_i und [Ca²⁺]_i Einzelzellanalysen

Nachweis	Sonde	c(µM)	Literatur
[Ca ²⁺] _i	Fura-2-AM (M)	5	[169]
pH _i	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein (TF) BCECF-AM	5	[170]

Tab. 11: Filter und deren Wellenlängen für die Fluoreszenzmikroskopie

Filter	Anregung (nm)	Emission (nm)
GFP	470 (± 40)	535 (± 50)
DAPI	360 (± 40)	460 (± 50)

Tab. 12: Für die IHC verwendete Antikörper in einer IHC-AKV

Antigen (Zielstruktur)	Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper
Pimonidazol-Thiol-Verbindung	2627 Rabbit antisera aus dem Hypoxyprobe Omni Kit (<i>hpi</i>), 1 : 500	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Oregon Green® 488 conjugate (LT)
PECAM, CD31 (Endothelzellen)	Anti-PECAM-1 Antibody, clone TLD-3A12 (<i>M</i>), 1 : 1000	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Oregon Green® 488 conjugate (LT)

Tab. 13: ESR-Einstellungen

Messparameter	Parametereinstellungen
Mikrowellenstärke	< 1 mW
Modulationsfrequenz	100 kHz
Reichweite	0,5 mT
Scanzeit	30 – 300 s
Scangeschwindigkeit	1,5 – 1,7 μ T/s

4.3. Methoden

4.3.1. Zelllinien und Zellkultur

Es wurden für diese Arbeit 2 syngene Tumorzelllinien der Ratte (**Tab. 4**) bis maximal Passage 50 verwendet. Die Mammakarzinomzelllinie Walker-256 (W-256, *CLS*) wächst in Suspension. Die Zellpassagierung erfolgte bei einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml 2- bis 3-mal pro Woche in supplementiertes Medium (**Tab. 3**) nach Angaben von *CLS*. Die Dunning R-3327 Prostatakarzinomsubzelllinie AT-1 (*CLS*), wächst adhärent und wurde bis zu einer Konfluenz von $\approx 90\%$ vor der Passagierung ($3 \pm 0,5 \times 10^7$ Zellen/Zellkulturschale) in supplementierten Medium (Tab. 3) kultiviert. Das Ablösen dieser Zellen erfolgte mit Zellablösepuffer (**Tab. 7**). Der Zellrasen wurde mit diesen Lösungen für 20-30 s bei Raumtemperatur inkubiert, diese danach wieder abgesaugt und die Zellablösung mit supplementierten Medium abgestoppt. Der Mediumwechsel und die Passagierung erfolgte 2-mal pro Woche. Beide Zelllinien wurden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 in Zellkulturschalen („tissue culture treated“) mit 10 cm Durchmesser von BD in einem BB16 CU Brutschrank (*HER*) kultiviert. Alle Behandlungsschritte und Kulturbedingungen wurden unter den nötigen Aspekten des sterilen Arbeitens durchgeführt. Dabei kamen ausschließlich sterile Lösungen bzw. Zellkulturmedien, eine Herasafe H12 Sterilwerkbank (*HER*), sterilisierte Pipetten und Reaktionsgefäße zum Einsatz. Das Pelletieren der Zellen erfolgte in sterilen Reaktionsgefäßen bei 500 g für jeweils 3 min. Zellzahl, Vitalität und Zelldurchmesser wurden regelmäßig mit einem CASY TT Cell Counter (*Roc*) überprüft.

4.3.2. Tierversuche

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Copenhagen- und Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht (KG) von 150 bis 250 g. Diese stammten aus der Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät in Halle/Saale. Die versuchsnahe Tierhaltung erfolgte im Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, der Medizinischen Fakultät, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Dabei wurden die artgerechte Haltung und die Tierversuche nach den bestehenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt und waren durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt (Genehmigungsnummer 42502-2-1098 MLU).

4.3.3. Allgemeine *in vivo* Methoden

4.3.3.1. Angewendete Narkosearten

Für minimalinvasive Eingriffe wurde für die Inhalationsnarkose ein Isofluran-Sauerstoff-Gemisch verwendet. In Versuchen bei denen eine tiefere Narkose notwendig war, kamen Pentobarbital-Injektionsnarkosen zum Einsatz. Um einer Unterkühlung der Versuchstiere

vorzubeugen, lagen diese auf einer Wärmeplatte (37°C). Das Erwachen der Tiere erfolgte in einer abgedunkelten mit Zellstoff gepolsterten Kammer.

Inhalationsnarkose: Die Tiere wurden für die initiale Narkose in eine mit 5 % Isofluran (ABB) und 95 % O₂ geflutete Begasungskammer gesetzt. Diese war über eine Gasmischvorrichtung an einen Matrix™ VIP 3000 Calibrated Vaporizer (Mid) angeschlossen. Für die Aufrechterhaltung der Narkose wurde ein Gasgemisch aus 3 % Isofluran und 97 % O₂ verwendet. Dieses wurde über einen gasdichten Schlauch an eine Atemmaske weitergeleitet.

Injektionsnarkose: Für die Narkose wurde Pentobarbital (Narcoren Mer) in einer Dosierung von 40 mg/kg KG i.p. injiziert. Die Tiere wurden für die Einschlafphase bis zum Erreichen der notwendigen Narkosetiefe in einer abgedunkelten Kammer untergebracht. Um die Narkose über einen längeren Zeitraum (max. 3 h) aufrechtzuerhalten, wurde bei Bedarf ca. 1 mg Pentobarbital-Lösung (8 mg/ml) i.p. oder i.v. verabreicht.

4.3.3.2. Tumormodelle und Tumorzellimplantation

Für die *in vivo* Versuche wurden syngene Tumormodelle verwendet. Die Implantation der Prostatakarzinomzellen AT-1 (**Tab. 4**) erfolgte in männliche Copenhagen-Ratten und die Mammakarzinomzellen Walker-256 in männliche Wistar-Ratten. Die AT-1 Zellen wurden mittels Zellablösepuffer (**Tab. 7**) von den Zellkulturschalen gelöst und in supplementierten Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellzahlen wurden mittels einem CASY TT Cell Counter (Roc) ermittelt. Es erfolgte anschließend die Pelletierung der Zellsuspensionen bei 500 g für 3 min. 4×10^7 Zellen wurden in 0,4 ml 0,9 %-iger NaCl resuspendiert und subkutan in die dorsale Seite der Hinterpfoten unter Isoflurannarkose inokuliert. Die Einstichstelle für die Kanüle befand sich zwischen dem ersten und zweiten Phalangen. Die Applikation erfolgte dann subkutan im zentralen Bereich der Hinterpfoten.

4.3.3.3. Wachstumskurven der Tumore

Für die Kontrolle des Tumorstwachstums wurden die Tumorummolumina täglich mit einer Schieblehre in Höhe, Länge und Breite auf 0,5 mm genau vermessen. Unter Annahme einer ellipsoiden Tumormform kam folgende Formel für die Bestimmung der Tumorummolumina zum Einsatz:

$$V(ml) == \frac{\frac{\pi}{6} * l(mm) * b(mm) * (h(mm) - 3 mm)}{1000}$$

V steht dabei für das Volumen in ml, l für die Tumorumlänge in mm, b für die Tumorumbreite und h für die Tumorumhöhe in mm abzüglich der Fußhöhe ohne Tumor von 3 mm. Die Tumorummolumenverdopplungszeit D_t wurde wie folgt berechnet [171]:

$$D_t = \Delta t * \frac{\log 2}{\log \left(\frac{V_2}{V_1} \right)}$$

Δt stellt dabei den Zeitraum zwischen der ersten und zweiten Volumenbestimmung (V) dar. D_t gibt somit den Zeitraum wieder, der benötigt wird, um das Volumen zu verdoppeln. Wenn sich $D_t < 0$ ergibt, ist das Tumorwachstum rückläufig und der Tumor nimmt an Volumen ab.

4.3.3.4. Katheterisierung der Vena jugularis und Aorta carotis

Um während der *in vivo*-Messungen von pO_2 , pH und IFP den Blutdruck der Tiere kontinuierlich überwachen und arterielle Blutproben für Blutgasanalysen gewinnen zu können, sowie Narkosemittel schnell zu applizieren, musste ein direkter arterieller und venöser Zugang geschaffen werden. Für den venösen Zugang wurde als erstes die Vena jugularis stumpf frei präpariert. Ein 15 cm langer, mit 5 U/ml Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® (*RP*) gefüllter Tubing Portex fine bore PE-Schlauch (Außendurchmesser: 1 mm, Innendurchmesser: 0,5 mm; *TF*) wurde intravasal eingeführt und dieser mittels 2 Zwirnfäden mit Doppelknoten fixiert. Der venöse Zugang diente der Applikation von Pentobarbital zur Aufrechterhaltung der Narkose. Danach erfolgte die Präparation der A. carotis, welche mit einem zweiten PE-Schlauch der gleichen Abmessungen kanüliert wurde. Dieser wurde mit 3 Zwirnfäden fixiert. Für die Blutdrucküberwachung wurde der arterielle Katheter über einen flüssigkeitsgefüllten Druckdom an einen Brückenverstärker gekoppelt. Die Druckkalibrierung erfolgte im Vorfeld.

4.3.3.5. Inspiratorische Hypoxie und Hyperoxie

Um in den Tumorgeweben eine artifizielle Hypoxie und Hyperoxie zu erreichen, atmeten die Tiere spontan ein inspiratorisches Gasgemisch mit unterschiedlichen O_2 -Anteil. Dies erfolgte zum Einem über Atemmasken und zum anderen durch Aspirationskammern. Über eine Schlauchverbindung wurde entweder Gasgemische mit 8 % O_2 / 92 % N_2 (Hypoxiegas), 100 % O_2 oder Druckluft (Raumluft) zugeführt.

4.3.3.6. Tumorgewebebegewinnung

Vor der Tumorgewebebegewinnung fand die Euthanasie der Tiere im narkotisierten relaxierten Zustand mittels einer Überdosierung des Narkotikums und anschließender zervikaler Dislokation statt. Die Tumore wurden chirurgisch entfernt und sofort in stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren. Die Zwischenlagerung erfolgte bei - 80°C.

4.3.3.7. Herstellung der Gewebedünnschnitte

Die Gewebedünnschnitte wurden mit einem Cryostat (*SLEE*) hergestellt. Dieses und alle benötigten Werkzeuge wurden auf -20 °C vorgekühlt. Die Tumore wurden auf Kühlstempel (*SLEE*) mittels OCT Embedding Matrix (*CP*) aufgefroren. Nach Erhärtung des Gefrierklebemittels wurden die Stempel in die Schnittvorrichtung eingespannt. Darauf folgte das Trimmen in 20 µm Schritten bis die gewünschte Schnittebene erreicht war. Anschließend wurden Schnitte je nach Fragestellung mit einer Dicke von 8 bis 12 µm gewonnen. Die Gewebedünnschnitte wurden mit einem Pinsel glattgezogen und auf KNITTEL StarFrost® Objektträger (*Knt*) aufgebracht. Es folgte die sofortige Hitzefixierung bei 54 °C für 5 min auf einer Heizplatte. Die Objektträger wurden dann bis zur Weiterbehandlung bei -20 °C zwischengelagert. Daran schloss sich entweder die direkte Eindeckelung, wie bei den Extravasationsversuchen, mittels Fluorescent Mounting-Eindeckmedium (*DK*) an oder es fanden vorher noch die immunhistochemischen Färbungen statt. Das Eindeckeln erfolgte mit für die Mikroskopie geeigneten Deckgläschen und der Randversiegelung mit Nagellack.

4.3.3.8. Bestimmung des Gewebedruckes (Interstitieller Flüssigkeitsdruck, IFP)

Der IFP der Tumore wurde invasiv mittels eines 1,4 French Druckkatheters (*MIL*) bestimmt. Dafür kam eine an die wickel-in needle angelehnte Methode [172] zum Einsatz. Als Katheterführung diente eine auf 3 cm gekürzte 19 G Venenverweilkanülenummantelung. Diese wurde vorsichtig in dem Tumorzentrum platziert, die Kanüle herausgezogen und der Millarkatheter eingeführt. Für den direkten Kontakt der Drucksonde mit dem Tumorgewebe wurde die Katheterführung aus dem Tumor zurückgezogen. Es wurde gewartet bis die Druckkurve für 2 min konstant war und diese Werte für die Berechnung verwendet. Anschließend erfolgte eine Rekalibrierung. Der Millarkatheter war mit einem BridgeAmp (*ADI*) über ein PowerLab 26T (*ADI*) mit einem PC für die Druckkurvenaufnahme verbunden. Die Labchart 7 Software diente der Druckkurvenregistrierung und die daraus resultierenden Werte als Grundlage für die Auswertung. Der Millarkatheter wurde im Vorfeld in einer Kalibrierlösung (1 % BSA + 0,5 U/ml Heparin in Laktat-Ringer) in einer 1 ml Spritze inkubiert. Dieser Messwert wurde als Hintergrundwert von allen Messwerten abgezogen.

4.3.3.9. Bestimmung der Extravasation

Für die Bestimmung der Extravasationsraten in Walker-256- und AT-1-Tumoren kamen fluoreszenzmarkierte Dextrane (*TF*) zum Einsatz: Dextran Cascade Blue 10.000 MW (10-kDa-Dex), Dextran Texas Red 70.000 MW (70-kDa-Dex) und Dextran fluorescein 2.000.000 MW (2-MDa-Dex). Die Applikation der Dextrane erfolgte in einer Konzentration von 25 mg/ml zu je 200 µl i.v. unter Isoflurannarkose. Das 2-MDa-Dex wurde 2 h, das 70-kDa-Dex 1 h und das 10-kDa-Dex 15 min vor Versuchsende appliziert. Zum Versuchsende wurden die Tiere getötet und die Tumoren entnommen. Nach der Tumorgewebegewinnung

und Herstellung der Gewebedünnschnitte erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse und Bildauswertung mittels ImageJ (*NIH*)

4.3.3.10. Analysen der Tumoroxygenierung

Zur Bestimmung der Oxygenierung des Tumorgewebes kamen neben *ex vivo* Analysen mittels Immunhistochemie, verschiedene *in vivo* Methoden zum Einsatz.

Ex vivo

Die *ex vivo* Analysen erfolgten durch den Nachweis von der Bindung von Pimonidazol (*hpi*) im Gewebe. Pimonidazol ist eine heterozyklische Nitroverbindung, die durch intrazelluläre Reduktasen zu Nitroradikal-Anionen reduziert werden. In Abwesenheit von O_2 ($pO_2 < 10$ mmHg) binden diese Radikale irreversibel an Makromoleküle. Mittels Antikörpern lässt sich die Bindung nachweisen und als Maß für die Hypoxie quantifizieren. Dafür wurde ein Hypoxyprobe Omni Kit (*hpi*) nach Angaben des Herstellers verwendet. 15 min nach einer initialen Eingewöhnungsphase wurde 60 mg/kg KG Pimonidazol i.v. appliziert und die Tiere für weitere 90 min unterschiedlichen inspiratorischen Gasen ausgesetzt. Nach 90 min wurden die Tumoren der getöteten Tiere chirurgisch entfernt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Der Nachweis der Pimonidazoladdukte erfolgte mittels IHC (s.u.).

In vivo (invasiv)

Alle verwendeten Messgeräte waren an ein PowerLab 26T (*ADI*) gekoppelt. Die Aufzeichnung des arteriellen Blutdrucks und des intratumoralen pO_2 fanden mittels der LabChart 7 Software (*ADI*) statt.

Die invasiven pO_2 Bestimmungen wurde mit O_2 -sensitiven Katheteroptoden an katheterisierten Versuchstieren (A. carotis und V. jugularis) vorgenommen. Der intratumorale pO_2 konnte mittels NP/O/E pO_2 - E-Series Sensoren (*Ox*), welche zentral im Tumorgewebe eingebracht wurden, bestimmt werden. Mittels 22 G Venenverweilkanülen wurde dafür ein Kanal bis zum Tumorzentrum gestochen. Die Venenverweilkanülemantelung diente hierbei als Führungskanal zur Platzierung der Optoden. An der Silikonspitze des vorkalibrierten fluoroptischen Katheters ist ein Rutheniumchlorid basiertes Fluorophor eingebettet. Dieses wird über einen Lichtleiter durch die Oxylite 2000 Steuereinheit (*Ox*) mittels einer im blauen Lichtwellenlängenbereich emittierenden LED Diode angeregt. Durch die Lichtpulse wird eine pulsatile Fluoreszenz der Rutheniummoleküle erzeugt. Diese Fluoreszenz klingt nach der Anregung schnell ab, wobei der Abfall der Fluoreszenz abhängig vom O_2 -Partialdruck an der Spitze der Optode ist. Somit ist die Signaldauer der Rutheniumfluoreszenz indirekt proportional zum pO_2 und ermöglicht eine Quantifizierung des pO_2 .

In vivo (nicht-invasiv) - Elektronenspinresonanztomographie (ESR bzw. EPR)

Die Datenaquisition und Auswertung erfolgte in Kooperation mit Fr. Juliane Frank (AG Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie am Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg).

Bei der ESR werden paramagnetische Eigenschaften von ungepaarten Elektronen ausgenutzt. Dabei werden die Elektronenspins in einem statischen Magnetfeld gleichgerichtet und mit einem senkrecht dazu stehenden dynamischen Magnetfeld angeregt. Für diese Experimente wurde ein 1,3 GHz L-Band ESR-Spektrometer (MG) verwendet. Die Geräteinstellungen sind in **Tab. 13** ersichtlich.

Als O₂-sensitive μ -Spinsonden wurden biokompatible in Polyvinylacetat verkapselte Lithiumokta-n-butoxynaphthalozyanin (LiNc-BuO) verwendet. Da die ESR Linienweite von Scheitelpunkt zu Scheitelpunkt proportional zum pO₂ ist, konnte somit unter Verwendung einer linearen Regression auf den intratumoralen pO₂ geschlossen werden. Die vorangegangenen *in vitro* Bestimmungen der Linienweite bei definierten pO₂ dienten dabei als Referenzwerte. Bei dieser Methode wurden die Spinsonden zusammen mit den Tumorzellen in die Versuchstiere implantiert. Somit war eine gleichmäßige Verteilung der Sonden im Tumorgewebe möglich und es konnten die Messungen nicht-invasiv durchgeführt werden. Die Versuchstiere wurden mittels Narcoren narkotisiert und auf einer höhenverstellbaren Rampe fixiert, welche in das statische Magnetfeld eingebracht und der Resonator direkt auf den ektopischen Tumoren platziert wurde.

4.3.3.11. Messung der relativen Gewebedurchblutung

Für die Messung der Tumordurchblutung wurde die Laser-Doppler-Flowzytometrie eingesetzt. Hierbei wird über einen Lichtleiter monochromatisches Laserlicht in das Gewebe eingestrahlt. Wird das Licht von bewegten Teilchen (fließenden Erythrozyten) reflektiert, kommt es zu einer Frequenzverschiebung des Lichts (Doppler-Effekt), die über denselben Lichtleiter gemessen werden kann. Die Auswertung der Frequenzverschiebung liefert Informationen über die Anzahl, die Richtung und die Geschwindigkeit der Erythrozyten und entspricht somit dem Erythrozytenfluss im beleuchteten Tumorabschnitt. Mit dieser relativen Messmethode lassen sich Änderungen der Durchblutung während einer experimentellen Intervention (z.B. Änderung des inspiratorischen Gases) beurteilen.

Verwendet wurde ein Mehrkanal-Laser-Doppler-Flußmeter (OxyFlow 2000; Oxford Optronics, Oxford, England). Zur Messung wurden Lichtleiter vom Typ MNP100NX in das Zentrum des Tumors einige Millimeter tief eingeführt und fixiert. Die Erfassung der Laserlicht-Reflexion erfolgte kontinuierlich während der gesamten Versuchsdauer über die OxyFlow-Kontrolleinheit. Die Messung erfolgte auch über den Versuch hinaus, nachdem die Tiere eine Überdosis des Anästhetikums erhielten. Das Signal, das unter diesen Bedingungen gemessen wurde, diente als "biologisch Null" und wurde von allen gewonnenen Messwerten subtrahiert. Die so gewonnenen Flusswerte wurden auf das

Ausgangssignal zu Beginn des Versuches normiert und stellen somit die relative Durchblutungsänderung dar.

Zur Beurteilung des "Strömungswiderstands" (resistance-to-flow) im Gewebe wurde für jeden Messzeitpunkt der Quotient aus mittlerem arteriellem Blutdruck (MABP) und relativem Erythrozytenfluss gebildet.

4.3.3.12. Bestimmung des intratumoralen pH-Wertes

Die Ermittlung der intratumoralen pH-Werte wurden invasiv mittels einer potentiometrischen 21 G MI – 407B Nadel - pH-Elektrode und einer MI – 402 flexiblen Referenzelektrode bestimmt. Diese Methode erfasst den extrazellulären pH in Geweben. Die Verwendung der Elektroden erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Referenzelektrode subkutan im Hinterlauf des zu messenden Tumors fixiert und die Messelektrode mittels Mikromanipulator in 1 mm Schritten durch den Tumor bewegt. Nach jedem Schritt erfolgte eine einzelne pH-Messung. Insgesamt wurde in 3 Einstichkanälen pro Tumor gemessen, sodass pro Tumor etwa 26 bis 31 Einzel-pH-Werte erfasst wurden. Die Messwerte wurden pro Messelektrodenposition für maximal 20 s, aber mindestens bis zur pH-Stabilisierung für eine Mindestzeitspanne von 5 s aufgenommen. Die elektrischen Spannungswerte wurden mittels eines PowerLab Verstärker aufgezeichnet und an die Erfassungssoftware Labchart 7 übermittelt. Vor und nach der Messung eines Tumors erfolgte eine 2-Punkt-Kalibrierung der pH-Elektrode in Standard pH-Lösungen (*BI*) mit pH 4,0 und pH 7,0. Die Elektrodendrift zwischen den beiden Kalibrierungen wurde durch lineare Interpolation ausgeglichen.

4.3.3.13. Immunhistochemische Nachweise (IHC)

Die Dichte der CD31-positiven Zellen (Gefäßendothelzellen), ebenso wie die Pimonidazol-Thiol-Bindungen (Ausmaß der Gewebehypoxie) in W-256 und AT-1 Tumoren wurden *ex vivo* durch einen immunhistochemischen Nachweis bestimmt. Nach der Zwischenlagerung bei -20°C der hitzefixierten Gewebedünnschnitte folgte ein weiterer Fixierungsschritt für 10 min in eiskaltem Aceton, ein Waschschrift mit 3-mal PBS und die anschließende Inkubation über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Primärantikörper in einem Waschschrift (s.o.) entfernt und die selektiv gebundenen Primärantikörper in einem Inkubationsschritt von 2 h bei Raumtemperatur mit einem Oregon Green 488 gekoppelten Sekundärantikörper für die Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar gemacht. Die ungebundenen Sekundärantikörper wurden ebenso in einem Waschschrift entfernt. Alle Antikörper wurden wie in einer IHC-Antikörperverdünnungslösung (IHC-AKV) verdünnt. Diese bestand aus einer PBS-Lösung mit 1 % BSA und 0,1 % Tween20.

4.3.3.14. Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Tumorgewebedünnschnitten

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Biozero 8000-Mikroskop (*K*) und die Bildauswertung wurde mit der Software ImageJ analysiert. Nach Abzug der Hintergrundwerte wurden die Bilder auf eine 8-Bit Farbtiefe reduziert und danach die Bildberechnungen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Normalisierung der signalpositiven Flächen auf die Gesamtumorfläche. Bei den Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass gleiche Einstellungen des Mikroskops und Objektive verwendet wurden. Bei zusammengesetzten Einzelbildern, wurde eine Größenskala auf den Einzelbildern eingefügt. Diese war nur in den äußeren Randbereichen des Gesamtbildes sichtbar und gab nach der automatischen Bildkompression die tatsächliche Referenzgröße wieder.

4.3.3.15. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die BCA (Bicinchoninsäure)-Methode genutzt. Diese Methode beruht auf einer Biuret-Reaktion. Dabei wird Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine im alkalischen Milieu reduziert und zwei Cu^+ mittels BCA chelatiert. Bei 562 nm hat der wasserlösliche Komplex sein Absorptionsmaximum. Der Messbereich verläuft bei Proteinkonzentrationen von 20 bis 20000 $\mu\text{g/ml}$ linear. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (*TF*) und wurde in transparenten 96-well Polystyrolmikrotestplatten (*H*) durchgeführt. Definierte BSA-Lösungen dienten dabei als Standardkurvenwerte und reichten von 0,1 mg/ml bis 0,7 mg/ml. Es kamen jeweils 15 μl Standard bzw. Zelloösungen zum Einsatz und wurden unter Zuhilfenahme einer Multipipette zügig mit 200 μl BCA-Reaktionsansatz versetzt. Die Platte wurde im Dunkeln in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Adsorptionsmessung erfolgte bei 562 nm mit einer Bandbreite von 9 nm in einem Infinite M200 (*Tec*) Plate-Reader bei Raumtemperatur.

4.3.3.16. Pufferkalibrierung für Zellkulturversuche

Die Replizierbarkeit der Ergebnisse und Einhaltung von Versuchsstandards konnte durch definierte Milieubedingungen gewährleistet werden. Dazu wurden ausschließlich Puffersysteme verwendet, die für bestimmte pH-Bereiche optimiert sind und mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf den entsprechenden pH bei 4 °C bzw. 37 °C titriert wurden.

Da unter Versuchsbedingungen bei 37°C nicht zwischen passiver und aktiver Zellaufnahme der Makromoleküle unterschieden werden kann, wurden parallel gleiche Versuchsansätze bei 4 °C durchgeführt. Bei 4 °C findet keine aktive Aufnahme statt und die erhaltenen Werte entsprechen der passiven Zelloassoziation. Dieser Wert wurde von dem Messergebnis bei 37 °C als Hintergrund abgezogen. Die in dieser Arbeit dargestellten Werte beschreiben somit die tatsächlich aktive zelluläre Aufnahme der markierten Substanzen [173].

4.3.3.17. HPMA-Polymere (pHPMAs)

Die verwendeten HPMA basierten Polymere wurden vom AK Zentel (Mareli Allmeroth, Nicole Mohr), Institut für Organische Chemie, der Johannes-Gutenberg Universität Mainz synthetisiert und charakterisiert [101, 117]. Sie sind in **Tab. 3** zusammengefasst dargestellt. Sie besitzen für die Nachweisbarkeit in den Versuchen eine fluoreszierende Oregon Green 488 Markierung (Anregung: 494 nm, Emission: 523 nm). Um die Polymere für die nötigen Zellkulturversuche verwenden zu können, wurden diese erst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend mit den entsprechenden Puffern auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die DMSO Konzentration im Ansatz betrug maximal 0,4 %. Die Polymerlösungen wurden für jede Versuchsreihe neu angesetzt und die zu verwendenden Polymermengen mit einer Feinwaage bestimmt.

Für die physikochemische Charakterisierung der verschiedenen Polymere sind einige wichtige Größen von Bedeutung, die im Folgenden erläutert werden sollen:

Das **Monomerverhältnis** gibt das Verhältnis zwischen dem Vorläufermonomeren Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA) und den hydrophoben Laurylmethacrylat (LMA)-monomeren an.

M_n ist das statistisch durchschnittliche anzahlgewichtete Molekulargewicht, dabei stellt M_i das Molekulargewicht einer Kette und N_i die Anzahl dieser Ketten dar.

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

Im Gegensatz dazu beschreibt M_w den massegewichteten Mittelwert. M_w ist gleich oder größer als M_n , da große Ketten mehr zur Gesamtmasse beitragen als kleine.

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

Die Dispersität (\mathfrak{D}) ist der Quotient aus M_w und M_n . Sie ist ein Maß für die Streuung des Molekulargewichtes einer Probe. Ist \mathfrak{D} gleich 1 ist nur eine Kettenlänge in der Probe vorhanden.

r_H stellt den hydrodynamischen bzw. den Stokes-Radius dar. Dieser beschreibt den Radius einer hypothetischen festen Kugel, die in einem Lösungsmittel dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Teilchen.

4.3.3.18. pHPMA-Aufnahmestudien in 2D-Zellkulturansätzen

Diese Versuchsreihen wurden in für die Zellkultur beschichteten 24-well Platten (Tissue Culture-treated, *BD*) mit einem Gesamtvolumen von jeweils 250 μl durchgeführt. Wobei die Zellen der Prostatakarzinomzelllinie AT-1 (10^6 Zellen/Well) einen Tag vor Versuchsbeginn mit 500 μl supplementierten Medium (s.o.) ausgesät wurden. Diese inkubierten über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 in einem Zellkulturschrank. Dadurch konnten die Zellen an dem Boden der 24-well Platten adhären und ihre für die Zellkultur typische längliche Form ausbilden. Die Walker-256-Zellen wurden am Versuchstag bei 500 g für 3 min bei Raumtemperatur pelletiert. Die Resuspendierung erfolgte in den für die Versuchsreihen notwendigen Puffern zu 5×10^6 Zellen/ml, wovon 1×10^6 Zellen (200 μl) pro Ansatz verwendet wurden und mit 50 μl der Polymerlösung (0,1 mg/ml) auf das Endvolumen mit einer Polymerendkonzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt wurde. Die verwendeten Puffer besaßen für die Umgebungsbedingungen (Temperatur und CO_2 -Gehalt) kalibrierte pH-Werte. Die Versuche unter hypoxischen (0,2 % $\text{O}_2 = p\text{O}_2$ 1,4 mmHg) Bedingungen fanden in einer InvivO₂ 400 Hypoxiekammer (*RT*) statt. Dafür wurden die verwendeten Puffer über Nacht in der Kammer equilibriert. Für die Ansätze zur Bestimmung der passiven Zellossoziation wurden die Zellen in der Hypoxiekammer auf Eis in einer wärmeisolierten Styroporbox inkubiert. Der Reaktionsstop nach Ablauf der Inkubationszeiten mit den zu untersuchenden Substanzen wurde durch Überführen der Zellkulturplatten auf Eis eingeleitet. Es erfolgte ein sofortiger Waschschriff mit PBS und der Zellaufschluß mittels 200 μl 0,1 %-igen TritonX-100 (in 20 mM MOPS, pH7,4). Das Pelletieren der Walker-256 Versuchsansätze erfolgte nach dem Überführen auf Eis bei 4°C und Zentrifugieren mit 500 g für 3 min. Nach einem Waschschriff mit 500 μl PBS und wiederholtem Pelletieren erfolgte auch hier die sofortige Aufnahme in Lysepuffer. Die Versuche wurden in Form von Duplikaten mit mindestens 3 verschiedenen Zellpassagen wiederholt.

4.3.3.19. Quantifizierung der aktiven Zellaufnahme der HPMA-Polymere

Für die Quantifizierung der zellossoziierten Polymermengen wurden Standardkurven aus den eingesetzten Polymerlösungen hergestellt. Die 5-stufigen Verdünnungsreihen der Polymere erfolgten im Lysepuffer und reichten von 0,01 mg/ml bis 0,000625 mg/ml. Den Hintergrundwert bildete der reine Lysepuffer. Die Analyse erfolgte von je 100 μl Zelllysat in F16 Black Maxisorp Fluoronunc Platten, 96-well (*TF*). Die Messungen fanden in einem Infinite M200 (*Tec*) Plate-Reader statt. Die Anregungswellenlänge für OregonGreen480 gekoppelten Polymere lag bei 485 nm mit einer Bandbreite von 9 nm und die Emissionswellenlänge bei 532 nm mit einer Bandbreite von 20 nm. Anschließend wurden 15 μl von den gemessenen Proben für die Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe von BSA-Standardkurven quantifiziert. Die fluorometrischen Messwerte wurden auf die Proteinkonzentration normiert. Im Vorfeld wurde die Proteinmenge von 10^6 Zellen bestimmt. Dadurch konnte die Zellzahl/mg Protein berechnet und die Polymeraufnahme pro Zelle berechnet werden.

4.3.3.20. Analyse der Endozytosewege

Zur getrennten Untersuchung der verschiedenen Endozytosewege wurden drei mit OregonGreen-488 markierten Endozytosemarker (**Tab. 6**) verwendet. Das 70 kDa Dextran (Dex-70) als Marker für die Makropinozytose, Transferrin (Tf-488) als Marker für die Dynamin-abhängige clathrinvermittelte Endozytose (CME) und Cholera toxin β (Ctb-488) kamen als Marker für die CME und Cholesterol-abhängige Endozytose zum Einsatz. Die Markersubstanzen wurden im Vorfeld mittels Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Millipore) von ungebundenen Fluoreszenz-Sonden aufgereinigt. Die in ddH₂O gelösten Endozytosemarker wurden als erstes durch Zentrifugieren bei 10.000 g aufkonzentriert. Die somit reinen Sonden wurden mit ddH₂O als konzentrierte Stammlösungen angelegt und bis zum Einsatz bei -20°C gelagert. Die Stammlösungskonzentrationen betragen für 70-Dex-70 50 mg/ml, für Tf-488 1,25 mg/ml und für Ctb-488 100 μ g/ml. Für den Einsatz wurden die Endozytosemarkerstammlösungen (EM) 1:10 in den jeweiligen Versuchspuffern verdünnt. 200 μ l der Versuchspuffer wurden in einem Well einer 24-well Platte vorgelegt und 50 μ l der jeweiligen 5-fach EM auf 250 μ l Endvolumen aufgefüllt. Das Stoppen der aktiven Endozytose nach den Inkubationszeitpunkten erfolgte durch den Transfer der Probenträger auf Eis. Alle weiteren Aufbereitungsschritte bis zur Probenmessung erfolgten ebenfalls auf Eis bzw. 4°C. Die Proben wurden in Durchflusszytometerröhrchen (*BD*) überführt, bei 500 g für 3 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte ein Waschschritt mit 1 ml eiskaltem PBS und anschließender Zellpelletierung durch Zentrifugation (s.o.). Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und die Zellen in 0,5 ml eiskaltem PBS durch vortexen vereinzelt. Durch anschließende Zugabe von 0,5 ml Roti[®]-Histofix 4,5 % (*R*) erfolgte die Fixierung des zellassozierten Endozytosemarker für 20 min bei 4°C. Die Zellen wurden nochmals pelletiert (s.o.) und in 0,5 ml eiskaltem PBS für die durchflusszytometrische Analyse resuspendiert.

4.3.3.21. Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung der Menge der aufgenommenen fluoreszenzgekoppelten Endozytosemarker kam ein Laser Flow Cytometer Model EPICS XL-MCL (*BC*) und LSR Fortessa[™] Cell Analyzer (*BD*) zum Einsatz. Die Anregung der Fluorophore erfolgte mittels eines Argon-Lasers bei 476 nm. Die Emission wurde bei 525 nm detektiert. Die Hintergrundwerte der zelleigenen Fluoreszenz wurden anhand von unbehandelten Zellen bestimmt und von der zellassozierten Fluoreszenz der Proben abgezogen. Die Normalisierung der Fluoreszenzintensität pro Zelle erfolgte über Latexpartikel mit definierter Fluoreszenzstärke, Immunobrites Level 2 (*BC*). Eine Messung war abgeschlossen, wenn mindestens 10.000 Zellen gezählt waren.

4.3.3.22. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes pH_i und der intrazellulären Kalziumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$

Die Messung des intrazellulären pH-Werts und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte durch ratiometrische mikroskopische Einzelzelluntersuchungen unter Verwendung pH- bzw. Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe. Hierfür wurden die Zellen auf beschichtete Deckgläschen mit einem Durchmesser von 30 mm ausgesät, die 30 min zuvor mit einer 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin Lösung bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend 2-mal mit Zellkulturmedium gewaschen wurden. Die AT-1 Zellen wurden mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen für 24 h im Brutschrank und die Walker-256 Zellen mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen 2 h vor Messbeginn ausgesät. Für die Walker-256 Zellen war nur ein engbegrenzter Versuchszeitraum möglich, da sich die Zellen nach ca. 4 bis 5 h wieder von den beschichteten Deckgläschen ablösten. Die Quantifizierung der $[Ca^{2+}]_i$ und des pH_i erfolgte mittels ratiometrischer Sonden (**Tab. 10**) und durch die finale Superfusion der Zellen mit Eichlösungen (**Tab. 9**). Während der Versuche wurden die Zellen mit 37 °C warmen und CO_2 konditionierten Puffern (**Tab. 7**) überströmt. Ein Axiovert100-TV-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) diente unter Verwendung eines Fluor Ölimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung den Signaldetektionen. Die Fluoreszenzanregung wurde durch eine Xenon-Lampe über einen elektronisch gesteuerten Shutter geregelt und über Filter die entsprechenden Wellenlängen eingegrenzt. Die Steuerung von Anregung und Messung sowie die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale erfolgte unter Zuhilfenahme einer AquaCosmos Software (Hamamatsu).

Intrazellulärer pH (pH_i)

Um den intrazellulären pH-Wert zu bestimmen, wurde der zellmembrangängige pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein - Acetomethylester (BCECF-AM) verwendet. Die Abspaltung der AM-Gruppe durch intrazelluläre Esterasen verhindert die Exozytose des fluoreszierenden BCECF. Das Fluoreszenzanregungsspektrum ist mit einem pH-abhängigen Maximum bei 500 nm und einem isosbestischen Punkt bei 450 nm sehr gut für pH-Messungen geeignet und der Messbereich von pH 6,4 bis pH 7,5 linear [174]. Für die Messung wurden die Zellen für 15 min mit 5 μM BCECF-AM inkubiert und danach zweimal gewaschen. Die Anregungen wurden in 10 s Intervallen bei den Wellenlängen 450 und 490 nm ausgelöst und die Emission bei 535 nm aufgezeichnet. Aus dem Verhältnis der Emissionswerte bei beiden Anregungswellenlängen lässt sich durch eine finale 2-Punkt-Kalibrierung der intrazelluläre pH ermitteln. Dafür kamen ein Hochkaliumpuffer mit pH 7,6 und ein Hochkaliumpuffer mit pH 6,8 (Tab. 9) zum Einsatz. Diese enthielten zudem 10 μM des K^+/H^+ -Ionophor Nigericin [174, 175].

Intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$

Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde durch Komplexierung der Kalziumionen mit dem fluoreszierenden Chelator Fura-2-AM nachgewiesen. Auch hier werden die AM-Gruppen nach zellulärer Aufnahme der Verbindung durch Esterasen abgespalten und somit ein Ausschleusen des Fura-2 aus der Zelle verhindert. Fura-2 besitzt ebenfalls eine isosbestische Wellenlänge für die Anregung bei 380 nm sowie eine Calcium-abhängige Absorption bei 340 nm. Die Emission wird bei 510 nm gemessen. Das Signalverhältnis, welches aus beiden Anregungswelllängen hervorgeht, lässt über eine lineare Regression auf die $[Ca^{2+}]_i$ schließen. Dafür wurde eine finale Zweipunktkalibrierung mit einer 1 mM Kalziumlösung und einer Kalzium-freien Lösung (Tab. 9) durchgeführt. Die Eichlösungen enthielten 1 μ M Ionomycin als Ionophor.

4.3.3.23. Statistik

Soweit nicht anders angegeben erfolgten die statistischen Berechnungen mit der Office Software Excel und der GraphPad Prism 7 Software. Die Darstellungen werden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Durch die Gegenüberstellung von Vorarbeiten aus anderen Arbeiten wird teilweise der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Vergleich von Messgrößen zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests für unverbundene Stichproben. Alle Tests wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=5\%$ durchgeführt.

5. Ergebnisse

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung der Tumormodelle AT-1 (Prostatakarzinomzelllinie der Ratte) und Walker-256 (Mammakarzinomzelllinie der Ratte) hinsichtlich des Wachstums, Vaskularisierung, der intratumoralen Oxygenierung und des interstitiellen pH-Wertes. Im zweiten Teil wurde die Aufnahme von HPMA-Polymeren und anderen Makromolekülen in verschiedene Tumorzellen untersucht.

5.1. Pathophysiologischen Charakterisierung der *in vivo* Tumormodelle AT-1 und Walker-256

5.1.1. Tumorwachstumskurven

Nach subkutaner Implantation von 4×10^7 Zellen in die dorsale Seite der Hinterpfoten der Ratten, benötigten die Zellen 2 Tage, um einen soliden Tumor zu entwickeln. In der frühen Phase des Tumorwachstums (etwa bis Tag 5 nach Implantation) zeigten beide Zelllinien ein exponentielles Wachstum mit einer Volumenverdopplungszeit D_t von $2,4 \pm 0,4$ d (AT-1, **Abb. 12 A**) und $2,6 \pm 0,5$ d (Walker-256, **Abb. 12 B**). In Walker-256 Tumoren nahm ab dem 6. Tag nach Implantation die Verdopplungszeit auf $1,5 \pm 0,8$ d ab.

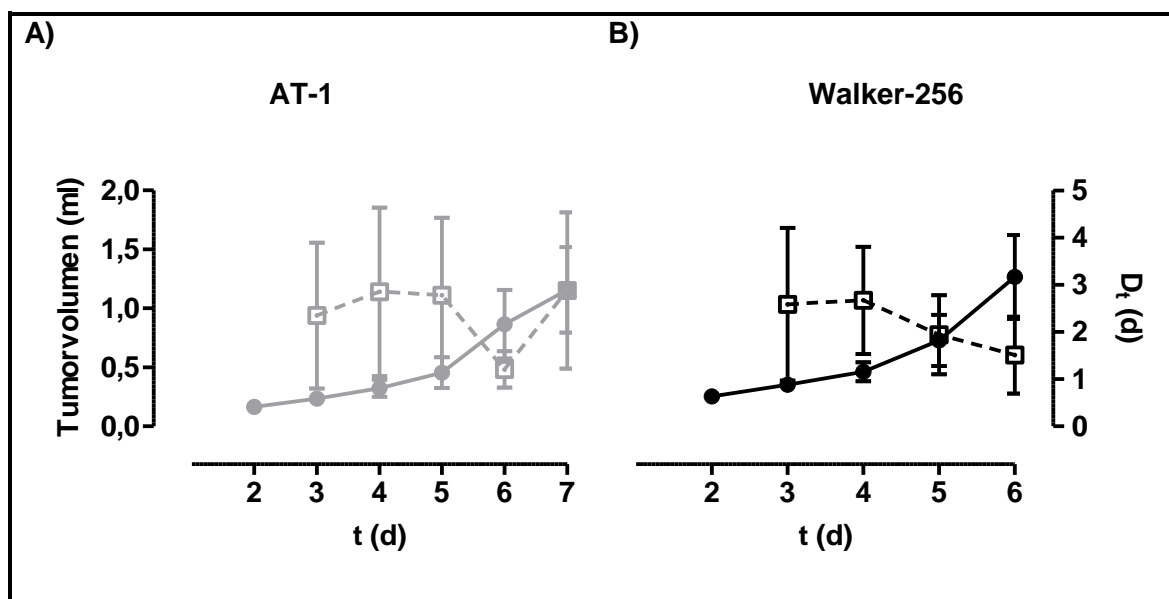


Abb. 12: Charakterisierung des Wachstums der syngen Prostatakarzinomzelllinie AT-1 und der Mammakarzinomzelllinie Walker-256 als subkutane heterotope Tumormodelle.

Tumolvolumen (durchgängige Linien) und Volumenverdopplungszeit (D_t) (gestrichelte Linien) von Tumoren in Abhängigkeit der Zeit nach Tumorzellimplantation; A) AT-1 (n = 16); B) Walker-256 (n = 10); Mittelwert \pm SD.

5.1.2. Tumorvaskularisierung und Permeabilität der intratumoralen Blutgefäße

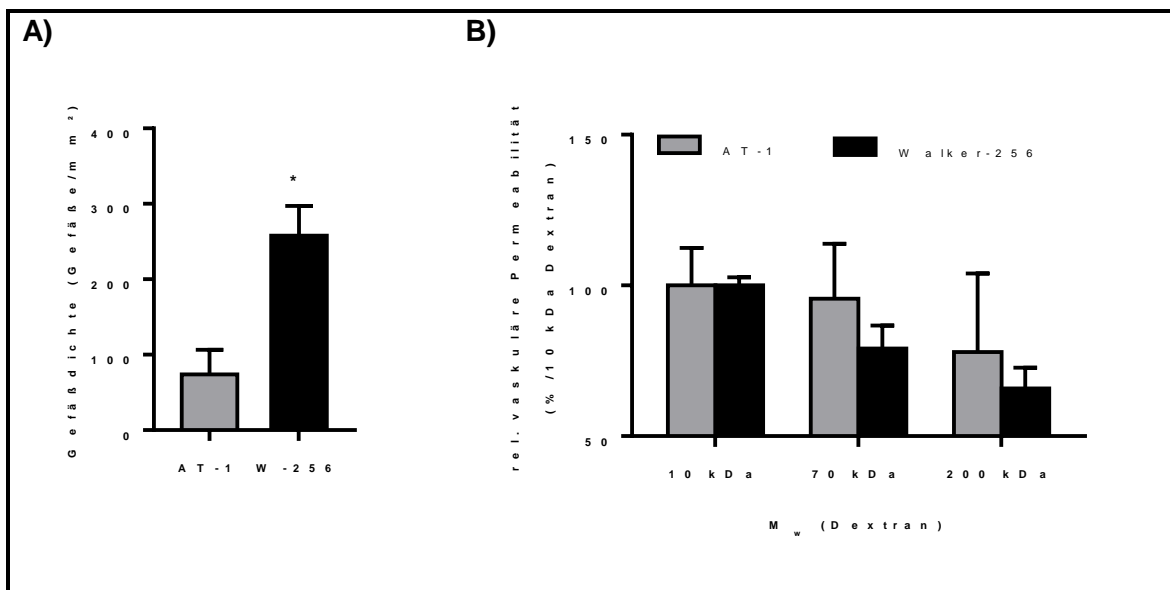


Abb. 13: Gefäßdichte und vaskuläre Permeabilität in AT-1 und Walker-256 Tumoren.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von 10 µm Dünnschnittschnitten; A) Bestimmung der Gefäßdichte mittels anti-CD31 Antikörper (n = 5); B) Bestimmung der relativen vaskulären Permeabilität anhand der zeitabhängigen Extravasation fluoreszenzmarkierter Dextrane mit unterschiedlichen M_w. Werte wurden normiert auf das 10 kDa Dextran (n=2-6); Mittelwert±SD, (*) p<0,05.

Die mikroskopische Analyse der Anzahl von Blutgefäßen ergab, dass Walker-256 Tumoren mit 258±40 Gefäßen/mm² im Vergleich zu den AT-1 Tumoren mit 74±32 Gefäßen/mm² eine signifikant höhere vaskuläre Dichte (3,5-fach erhöht) aufwiesen (**Abb. 13 A**).

Die relative vaskuläre Permeabilität wurde mit fluoreszenzmarkierten Dextranen unterschiedlichen Molekulargewichts überprüft. Hierbei wurde die Extravasation dieser Makromoleküle fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Mit zunehmenden M_w der Dextrane nimmt auch der hydrodynamische Radius (r_H) der Moleküle zu. Es waren keine signifikanten intertumoralen Unterschiede hinsichtlich der Permeation der Dextranen unterschiedlichen M_w nachweisbar, obwohl tendenziell die Gefäße in Walker-256-Tumoren eine geringere Permeabilität für große Dextrane aufwiesen als AT1-Tumoren.

5.1.3. Der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP)

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Extravasation und Verteilung der Makromoleküle im Tumorgewebe stellt der IFP dar. Dieser wirkt dem hydrostatischen Druck der Gefäße entgegen und somit auch der Extravasation der Makromoleküle. Der IFP wurde mit der *wick-in-needle* Technik bestimmt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Tumormodellen (**Abb. 14**). Die Walker-256 Tumore wiesen im Mittel einen IFP von

11,3±4,5 mmHg und die AT-1 Tumoren von 18,9±5,6 mmHg auf. Betrachtete man die Druckwerte in Tumoren unterschiedlicher Größe, so ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tumormodellen in der Gruppe der kleineren Tumoren mit einem Volumen von 0,5–1,1 ml. Beim Vergleich der großen Tumore (1,4–2,0 ml) zeigte sich zwar ein deutlicher IFP Unterschied, der aber nicht statistisch signifikant war. Eine Korrelation zwischen der Tumorgöße und dem IFP war eher bei den Walker-256 Tumoren gegeben. Die Regressionsanalyse ergab ein r^2 von 0,17 für die Walker-256 Tumoren und ein r^2 von 0,02 für die AT-1 Tumoren (**Abb. 14**).

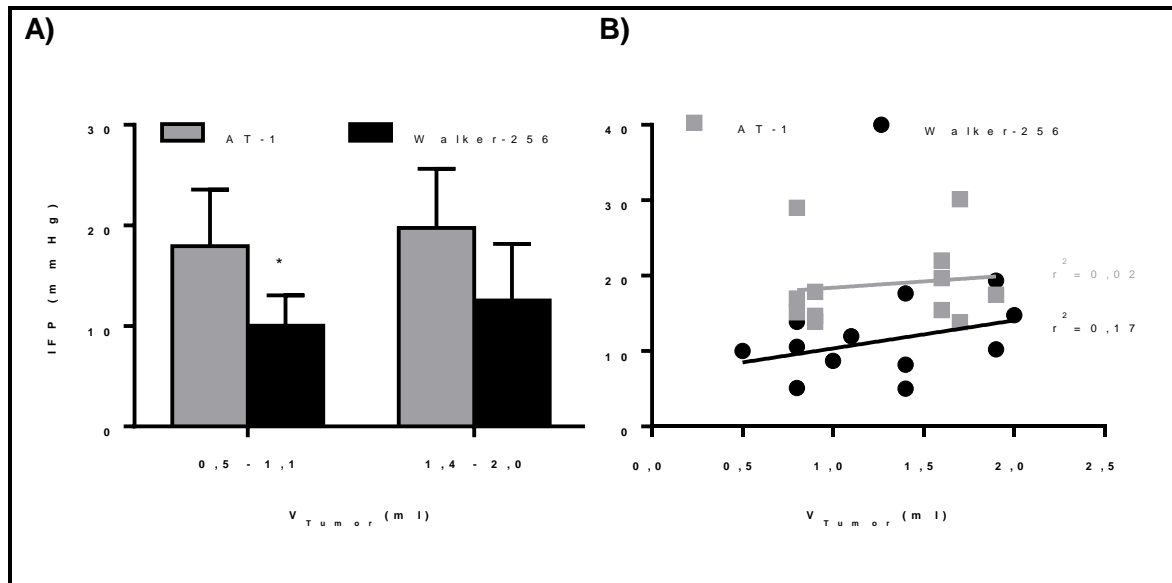


Abb. 14: Interstitieller Flüssigkeitsdruck in AT-1 und Walker-256 Tumoren.

Die Bestimmung erfolgte invasiv mittels Druckkatheter; A) Differenzierung in Abhängigkeit vom Tumolvolumen; B) Korrelation des IFP mit dem Tumolvolumen für die beiden untersuchten Tumormodelle; Mittelwert±SD, (*) $p < 0,05$.

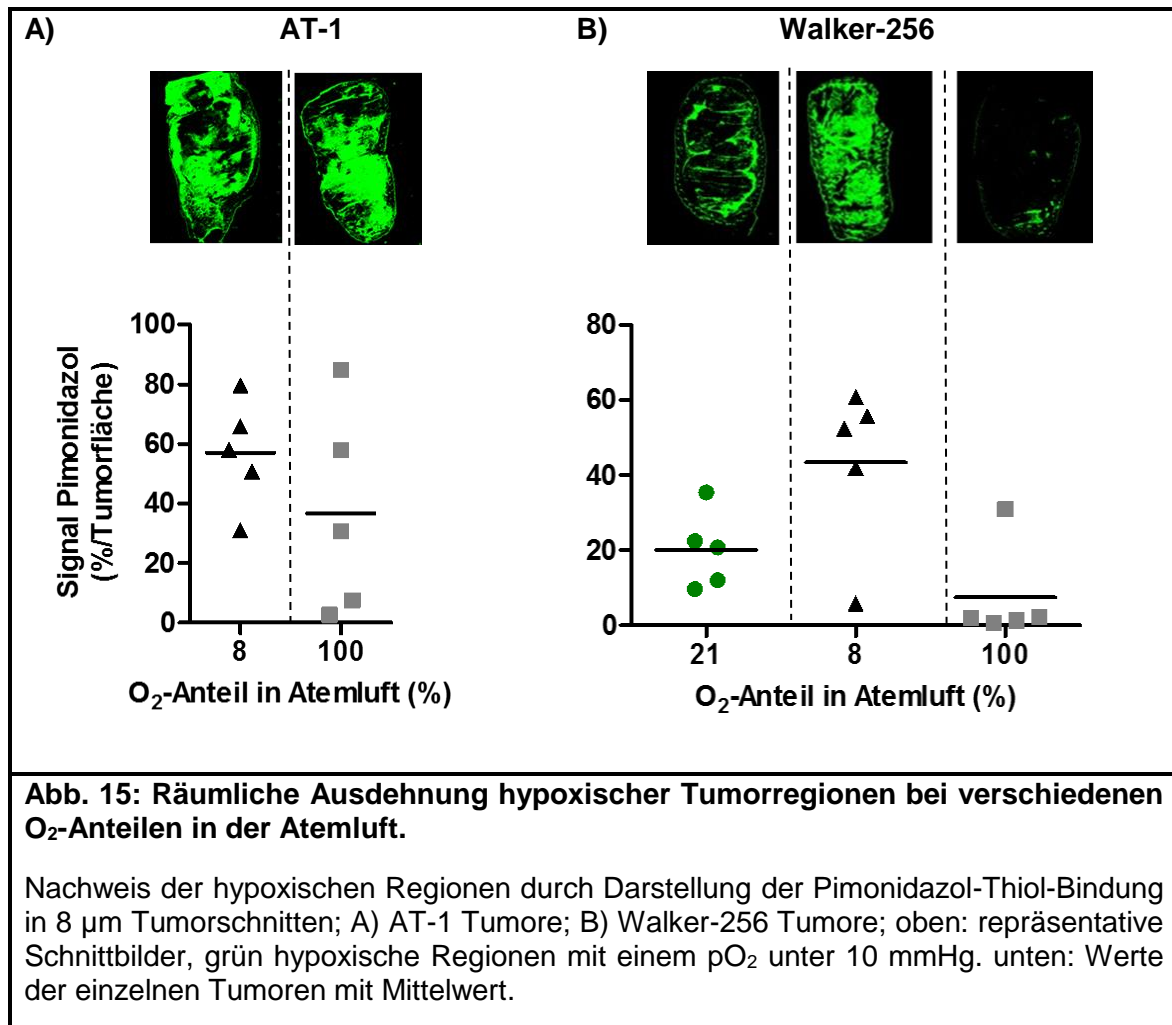
5.1.4. Bestimmung der intratumoralen Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) und der Einflüsse von inspiratorischer Hypoxie und Hyperoxie

Die nicht-invasiven Bestimmungen der intratumoralen pO_2 -Werte mittels ESR wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Pharmazie (AG Pharmazeutische Technologie) durchgeführt.

5.1.4.1. Oxygenierungsmessung ex vivo mittels Pimonidazol

Die Bindung von Pimonidazol an thiolhaltige Peptide und Proteine bei pO_2 -Werten ≤ 10 mmHg (hier als hypoxisch definiert) führt zu einer irreversiblen Adduktbildung, welche mittels Immunhistochemie spezifisch nachgewiesen werden kann. In **Abb. 15** sind

Tumordünnschnittschnitte von resezierten Tumoren 2 h nach i.v. Applikation von 60 mg Pimonidazol/kg KG dargestellt. Während dieser 2 h atmeten die Versuchstiere unter Pentobarbitalnarkose spontan Gasgemische mit unterschiedlichen O₂-Anteilen (Normoxie: 21% O₂, Hypoxie: 8% O₂, Hyperoxie: 100% O₂).



Wie in **Abb. 15** dargestellt, waren unter normoxischen Atemgasbedingungen $20,1 \pm 10,2$ % der Schnittfläche von Walker-256 Tumoren hypoxisch (=positiver Nachweis der Pimonidazolbindung). Nach 90 min Atmung des Hypoxiegases (8 % O₂ / 92 % N₂) waren $43,4 \pm 22,1$ % und durch 90 min Atmung von reinem O₂ $7,5 \pm 13,2$ % des Tumors hypoxisch. Die AT-1 Tumoren zeigten im Vergleich eine deutlich schlechtere Oxygenierung. Der hypoxische Anteil dieser Tumoren, mit einem pO₂ ≤ 10 mmHg, lag bei Atmung des Hypoxiegases bei 57 ± 18 %. Selbst bei Atmung des reinen Sauerstoffs betrug dieser Wert noch 37 ± 5 %.

5.1.4.2. Invasive fluoro-optische pO₂-Messung *in vivo*

Über Katheteroptoden besteht die Möglichkeit den pO₂ in Geweben lokal zu quantifizieren. Die hier verwendeten fluoro-optischen Sonden besitzen an ihrer Spitze ein Fluorochrom

dessen lichtpulsinduzierte Fluoreszenz nach Anregung O₂-abhängig abnimmt. Die Optoden sind vorkalibriert, sodass während der Messung direkt der Gewebe-pO₂ angegeben wird.

Die mit dieser Methode bestimmten pO₂-Werte (**Abb. 16 A**) lagen in den AT-1 Tumoren unter normoxischen (Raumluft-Atmung) Bedingungen bei 1,1±2,1 mmHg. Eine Reduzierung des O₂-Gehalts der Atemluft auf 8 % führte im Tumorgewebe zu einem pO₂ von 0,1±0,28 mmHg und bei der Atmung von reinem O₂ zu einem Anstieg des pO₂ auf 3,2±3,2 mmHg. Somit sind die AT-1 Tumore als deutlich hypoxisch einzustufen, welche sich auch durch eine Beatmung mit reinem O₂ nur schwer verbessern lassen.

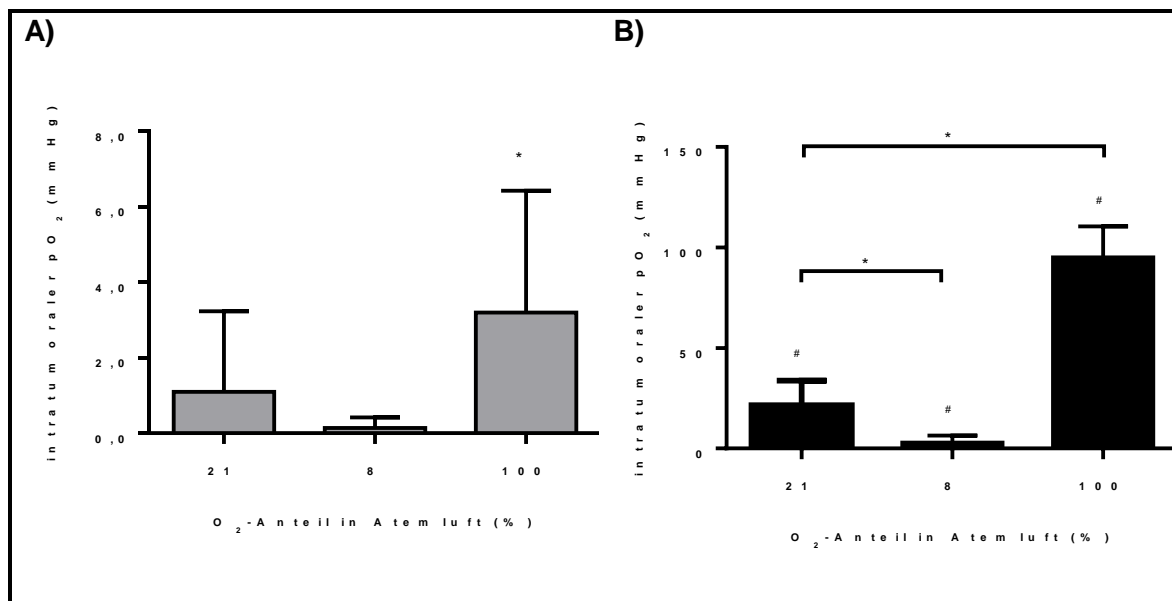


Abb. 16: Invasive Bestimmung des pO₂ unter *steady state* Bedingungen bei Inhalation von Atemgasen mit unterschiedlichen O₂ Anteilen.

A) AT-1 Tumore und B) Walker-256 Tumore; Mittelwert±SD (*) p≤0,05 vs. Raumluftatmung im gleichen Tumormodell und (#) p≤0,05 AT-1 vs. Walker-256.

Dahingegen lagen die beobachteten pO₂-Werte in den Walker-256 Tumoren bereits unter normoxischen Bedingungen mit 21,5±12,3 mmHg signifikant höher und reichten von 2,9±3,5 mmHg unter hypoxischen Bedingungen bis zu 95,1±15,5 mmHg bei der Atmung von reinem O₂ (**Abb. 16 B**).

Betrachtet man die Dynamik der O₂ Anreicherung im Tumorgewebe bei einem schnellen Wechsel von normoxischen zu hypoxischen und dann zu hyperoxischen Atemgasbedingungen, zeigten die Tumore eine schnelle Anpassung des intratumoralen pO₂ (**Abb. 17**). Die intratumoralen pO₂ Werte erreichten innerhalb von 8 min ein *steady state* Niveau mit den in **Abb. 16** bereits dargestellten Werten.

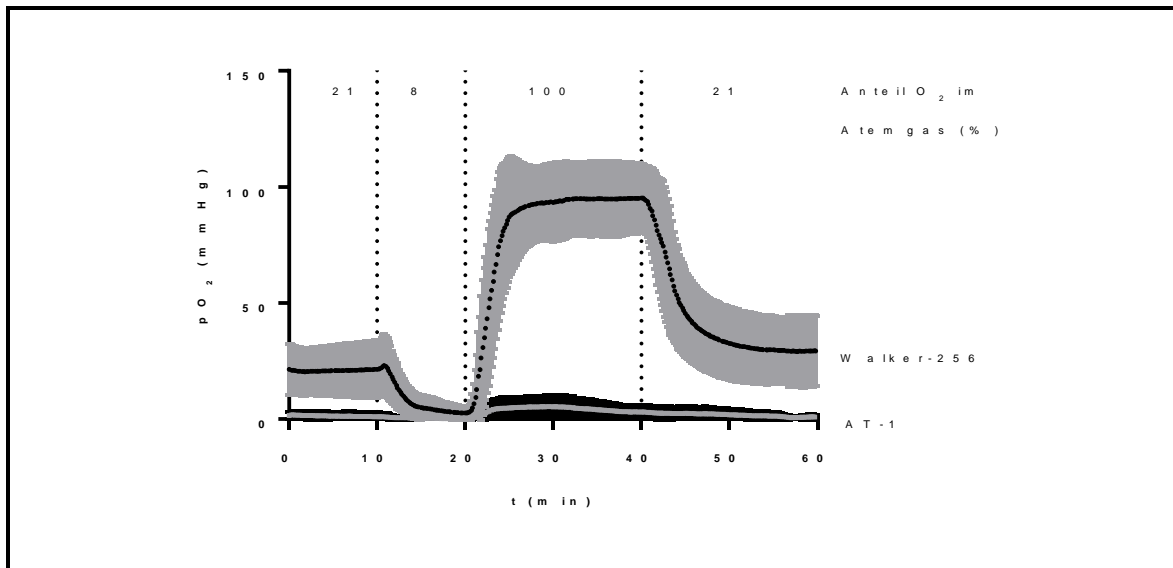


Abb. 17: Dynamische Verläufe der intratumoralen pO_2 mittels fluoro-optischen Sonden.

AT-1 Tumore: graue Linie (SD – schwarz) und Walker-256 Tumore: schwarze Linie (SD – grau), Werte über 100 mmHg sind methodisch bedingt nur eingeschränkt beurteilbar; $n=10$, Mittelwert \pm SD.

5.1.4.3. Nicht-invasive Oxygenierungsmessungen *in vivo* mittels ESR

Durch die Co-Implantation von mikroverkapselten ESR-Sonden (Lithium octa-n-butoxynaphthalocyanin-Kristalle) zusammen mit den Tumorzellen, wurde eine Verteilung der Sonden während der Tumorzellwachstumsphase im Tumorgewebe erreicht (**Abb. 18 A2+B2**). Die Stabilität und Sensitivität (*in vitro*: $7,2\pm 0,2$ μ T Linienweite bei $pO_2=0$ mmHg und $96,1\pm 0,91$ μ T bei $pO_2=150$ mmHg, *ex vivo*: $8,2\pm 0,6$ μ T Linienweite bei $pO_2=0$ mmHg und $95,1\pm 11,9$ μ T bei $pO_2=150$ mmHg) der Sonden blieben im Tumorgewebe erhalten [176]. Am Messtag konnten somit in unverletztem Tumorgewebe die Oxygenierung mittels ESR bestimmt werden. Hierbei wurde wiederum der Tumor- pO_2 während Spontanatmung unterschiedlicher inspiratorischer Gasgemische bestimmt.

Die grundsätzlichen Oxygenierungsunterschiede zwischen den beiden Tumormodellen waren auch mit dieser Methode nachweisbar (**Abb. 18 A1+B1**). Unter normoxischen Bedingungen lagen die mittels ESR gemessenen pO_2 -Werte in den AT-1 Tumoren bei $1,7\pm 0,7$ mmHg und in den Walker-256 Tumoren bei $39,6\pm 20,9$ mmHg. Wurde der O_2 -Anteil des Atemgases auf 8 % reduziert, fiel auch der intratumorale pO_2 deutlich ab. Dieser betrug in den AT-1 Tumoren dann nur noch $1,2\pm 0,6$ mmHg und in den Walker-256 Tumoren $3,8\pm 3,4$ mmHg. Die Begasung mit reinem O_2 zeigte auch hier eine deutliche Verbesserung der Tumoroxygenierung. Der pO_2 stieg auf 17 ± 17 mmHg in den AT-1 Tumoren und auf 109 ± 40 mmHg in den Walker-256 Tumoren.

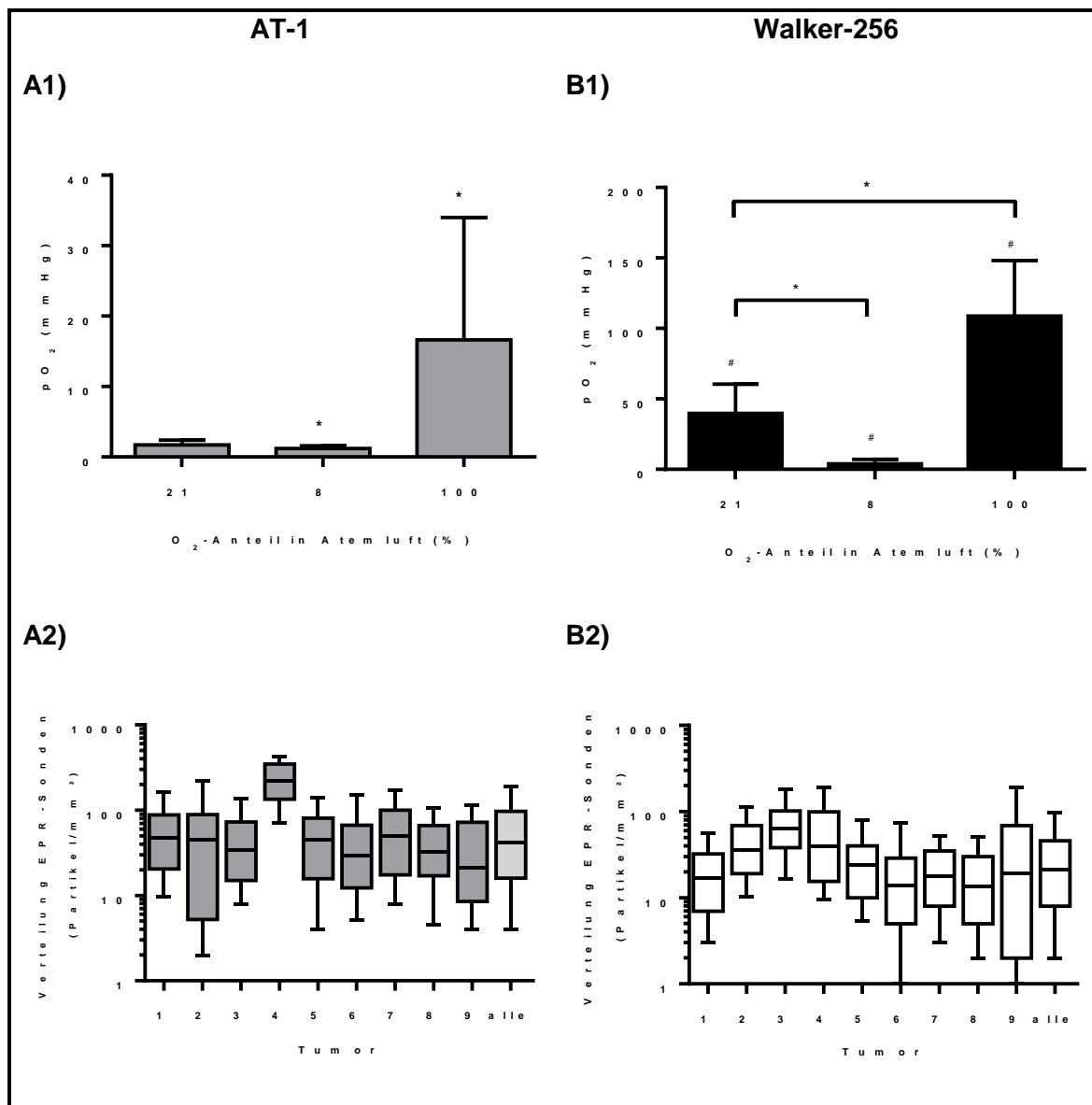
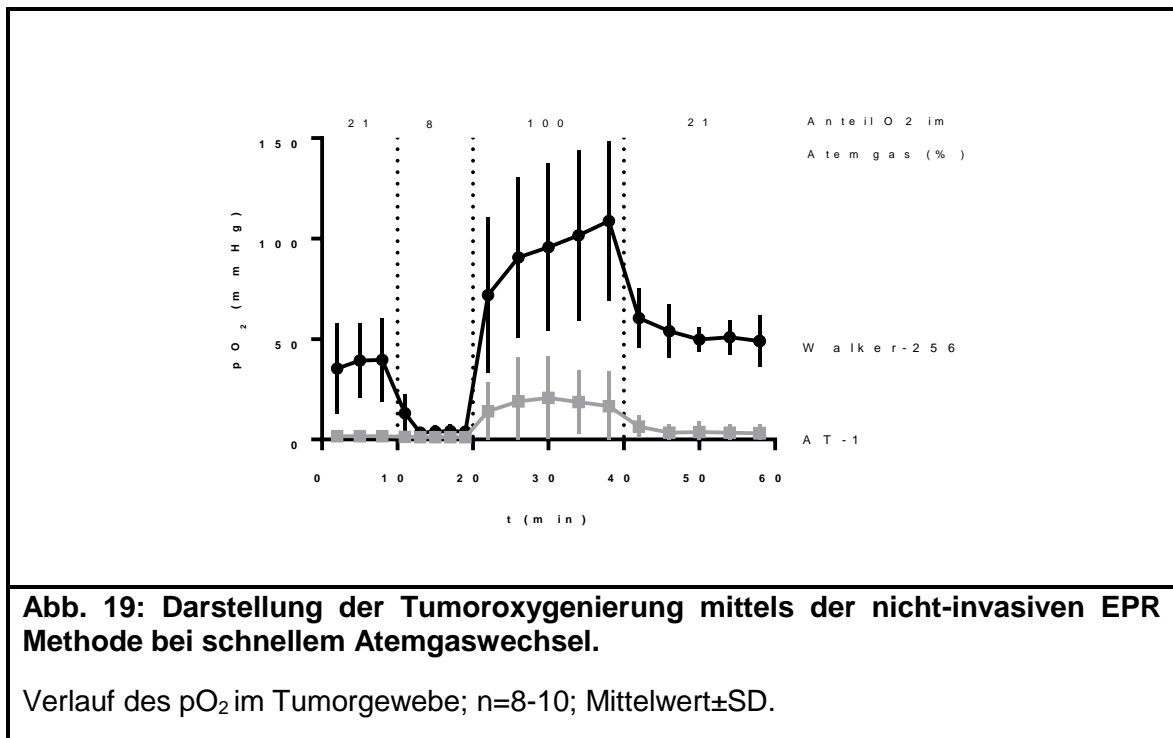


Abb. 18: Intratumoraler pO₂ gemessen mittels ESR bei inspiratorischen Gasen mit unterschiedlichem O₂-Anteilen und die Verteilung der ESR-Sonden im Tumorgewebe.

A) AT-1 Tumore und B) Walker-256 Tumore; pO₂ (A1/B1), Verteilung der mit den Tumorzellen co-implantierten ESR-Sonden (A2/B2). Für die Oxygenierungsmessungen atmeten die narkotisierten Tiere zunächst Raumluft bevor das Atemgas für 90 min auf 8% O₂ oder 100% O₂ gewechselt wurde. n=8–10; Mittelwert±SD; (*) p<0,05, (#) p<0,05 vs. AT-1; Whiskers als 10 % und 90 % Perzentile; Box mit 25 %, 50 % und 75 % Perzentile).

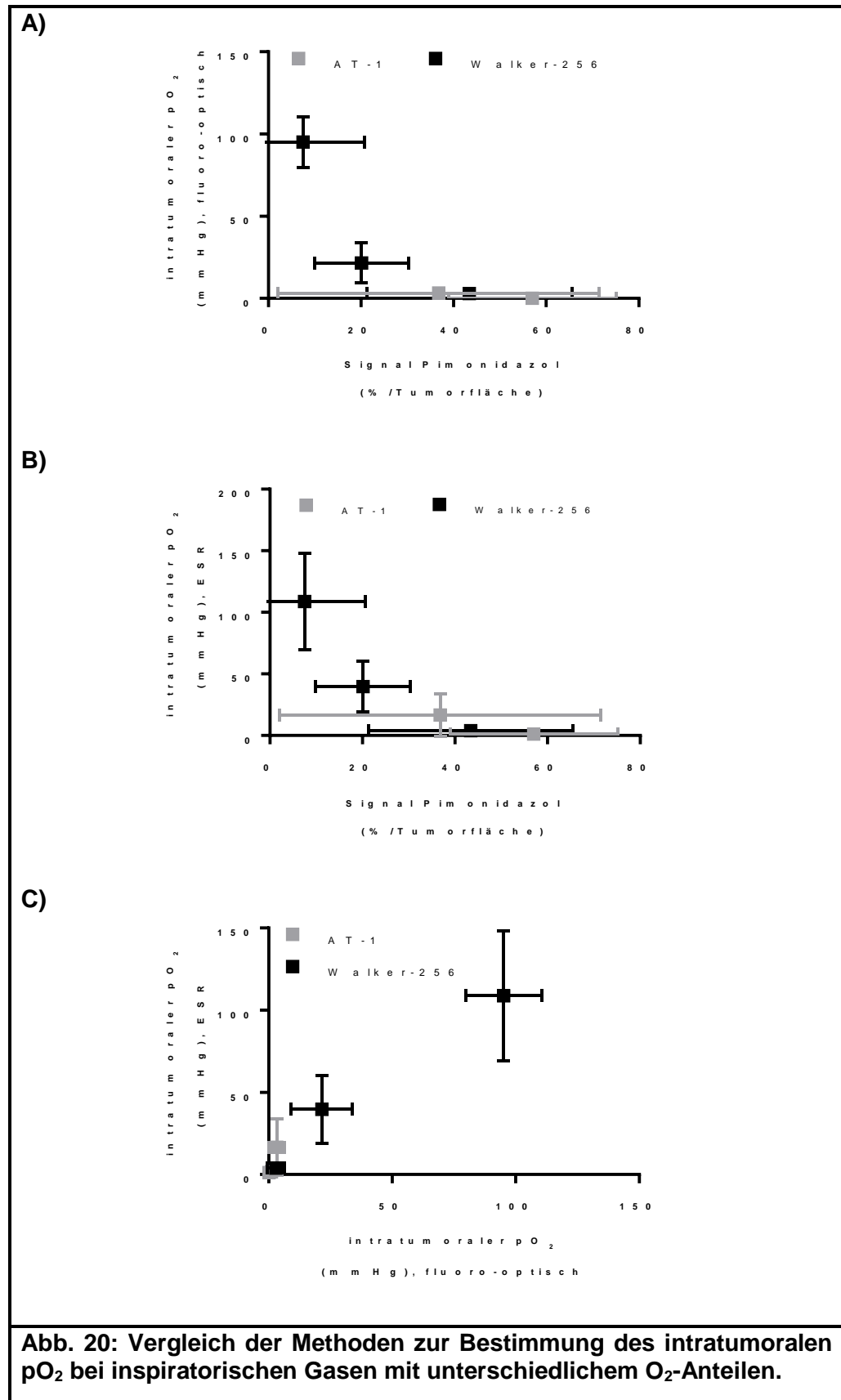
Die zeitabhängige Veränderung des intratumoralen pO₂ bei einem schnellen Atemgaswechsel kann mittels ESR ebenso wie mit der fluoroptischen Methode quantitativ bestimmt werden (**Abb. 19**). Unterschiede ergeben sich unter anderem bei den Messpunktabständen, welche methodisch bedingt bei den ESR-Messungen zeitlich weiter auseinanderliegen.

Die ESR-Methode hat gegenüber der fluoroptischen Methode den entscheidenden Vorteil, dass mehrfache Messungen durchgeführt werden können (nicht invasiv) auch über einen längeren Zeitraum verteilt. Außerdem ist von Vorteil, dass mit der ESR-Methode ein größerer Messbereich untersucht werden kann. Ein Nachweis von pO_2 -Werten über 100 mmHg wie sie in den Walker-256 Tumoren erreicht wurden, sind mit dieser Methode darstellbar. Somit war im Vergleich zur fluoro-optischen Messung auch ein weiterer Anstieg des mittleren intratumoralen pO_2 in den Walker-256 Tumoren bei der Atmung mit reinem O_2 nachweisbar.



5.1.4.4. Zusammenfassung der Methoden zur Bestimmung der pO_2 in AT-1 und Walker-256 Tumormodellen

Der Vergleich der verwendeten Methoden zur intratumoralen O_2 -Bestimmung untereinander zeigt ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der *ex vivo* bestimmten Anreicherung von Pimonidazoladdukten und fluoroptischen Messmethode, sowie der ESR-Methode (**Abb. 20**). Zudem korrelieren die pO_2 -Bestimmungen zwischen der fluoroptischen und ESR Messmethode positiv.



5.1.5. Einfluß der O₂ Konzentration im Atemgas auf den arteriellen Blutdruck, die Tumorperfusion und den relativen Gefäßwiderstand

Parallel zur invasiven Bestimmung des intratumoralen pO₂ wurde der Blutdruck über eine intravasale Druckmessung sowie die Tumorgewebeperfusion mittels Laser-Doppler-Flussmessung überwacht. Die Beeinflussung beider Parameter durch die unterschiedlichen O₂-Gehalte im Atemgas wird im folgendem Abschnitt beschrieben. Da die Tumorperfusion entscheidend für den konvektiven Transport mit dem Blutstrom ist, kann dieser Parameter Einfluss auf die Akkumulation makromolekularer Wirkstoffträger im Tumor haben.

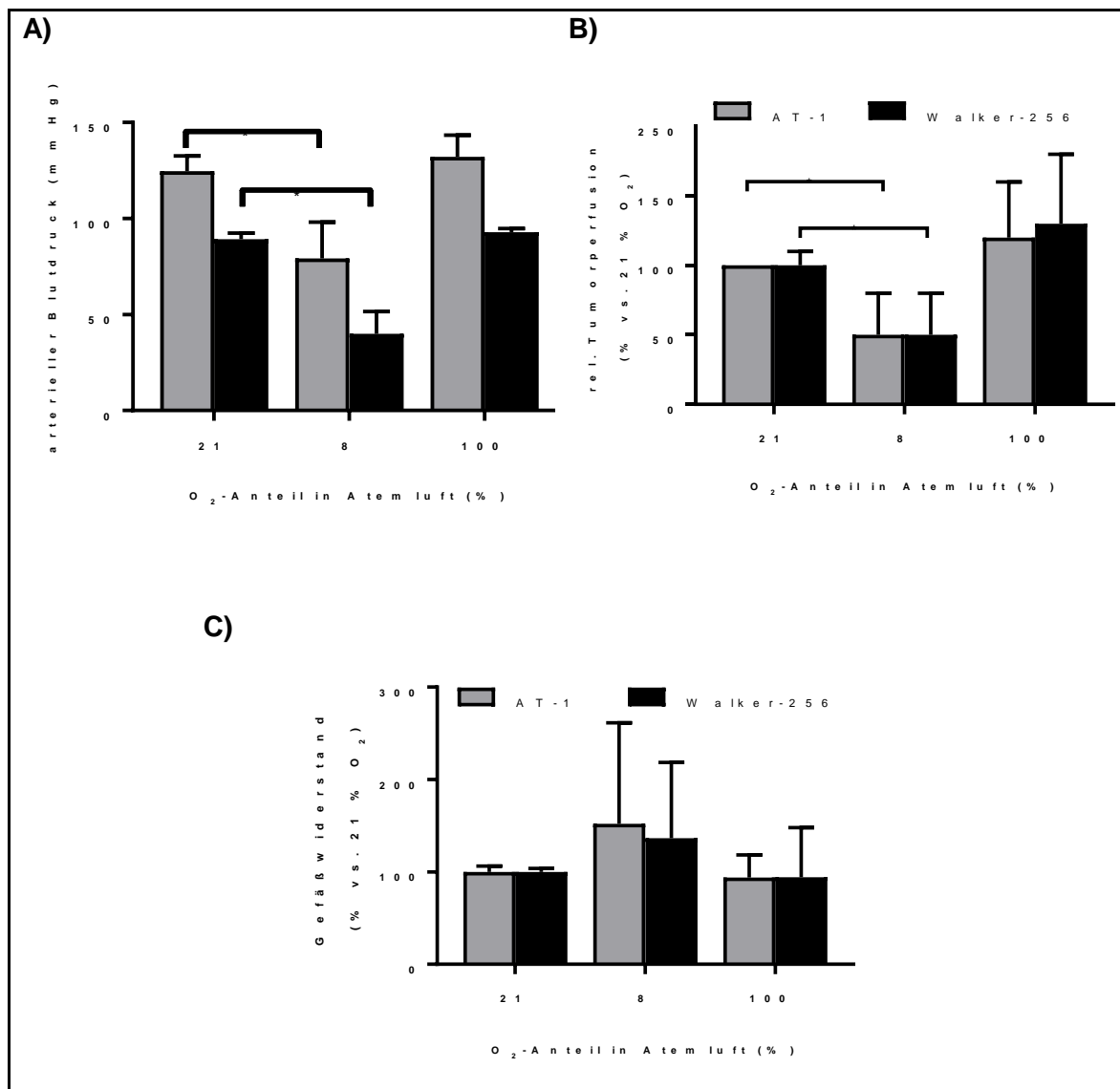


Abb. 21: Einfluss der Atemgasinhalation mit unterschiedlichem O₂-Anteilen auf das Blutkreislaufsystem.

A): Intraarterielle Bestimmung des Blutdruckes (n=5), B): Bestimmung der relativen Tumorperfusion mittels Doppler-Sonden (n=19-20) und C) der relative Gefäßwiderstand (n=19-20) in AT-1 und Walker-256 Tumoren; Mittelwert±SD; (*) p<0,05.

Der arterielle Blutdruck (Abb. 21 A) betrug unter Normoxie in Copenhagen-Ratten 124 ± 8 mmHg und in Wistar-Ratten 89 ± 3 mmHg und zeigte somit signifikante Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen.

Unter hypoxischen (8 % O₂) Atemgasbedingungen nahm der arterielle Blutdruck signifikant gegenüber normoxischen Bedingungen um 46 ± 19 mmHg in den Copenhagen- und um 49 ± 12 mmHg in Wistar-Ratten ab. Hingegen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen hyperoxischen (100 % O₂) und normoxischen Atemgasbedingungen (21 % O₂) nachweisbar. Eine Beeinträchtigung des Blutdrucks ist somit in beiden Tierstämmen nur bei Beatmung mit der Hypoxiegasmischung festzustellen.

Der relative Erythrozytenfluss als Maß der Tumorgewebeperfusion (Abb. 21 B) nahm unter hypoxischen Atemgasbedingungen signifikant in beiden Tumormodellen um ca. 50 % ab. Bei Atmung von reinem O₂ kam es zu keiner signifikanten Änderung des relativen Erythrozytenflusses. Die Änderungen waren in beiden Tumormodellen vergleichbar. Die Beatmung der Ratten mit dem Hypoxiegasgemisch führte in beiden Tierstämmen zu einer Abnahme der Tumorperfusion.

Der relative Gefäßwiderstand (Abb. 21 C), welcher sich aus dem Quotienten der relativen Tumorgewebeperfusion und dem Blutdruck ergibt, erwies sich als unabhängig von den einzelnen O₂ Konzentrationen der Atemgase.

5.1.6. Bestimmung des intratumoralen pH_e

Da der pH_e in Tumorgeweben sehr heterogen verteilt sein kann sind Mehrpunktmessungen in verschiedenen Regionen des Tumors notwendig. Aus diesem Grund wurden mehrere punktuelle extrazelluläre pH-Werte (pH_e) in jedem Tumor beider Tumormodelle mittels pH-Mikroelektroden bestimmt. Bei Betrachtung der punktuellen pH-Werte (n=115-222) fiel eine breite Streuung der pH-Werte auf. So lagen 10,3 % der gemessenen pH_e-Werte in AT-1 Tumoren und 8,5 % der gemessenen pH_e-Werte in Walker-256 Tumoren unter einem pH von 6,8 (Abb. 22 A). Der gemittelte pH_e (Abb. 22 B) in AT-1 Tumoren lag bei einem pH von $7,05 \pm 0,19$ (N=8) und in Walker-256 Tumoren bei einem pH_e von $7,2 \pm 0,3$ (N=4). Dies zeigte, dass die AT-1 Tumoren im Gegensatz zu den Walker-256 Tumoren im Mittel einen niedrigeren pH_e aufwiesen. Dieser Unterschied war allerdings durch die geringe Stichprobenzahl statistisch nicht signifikant.

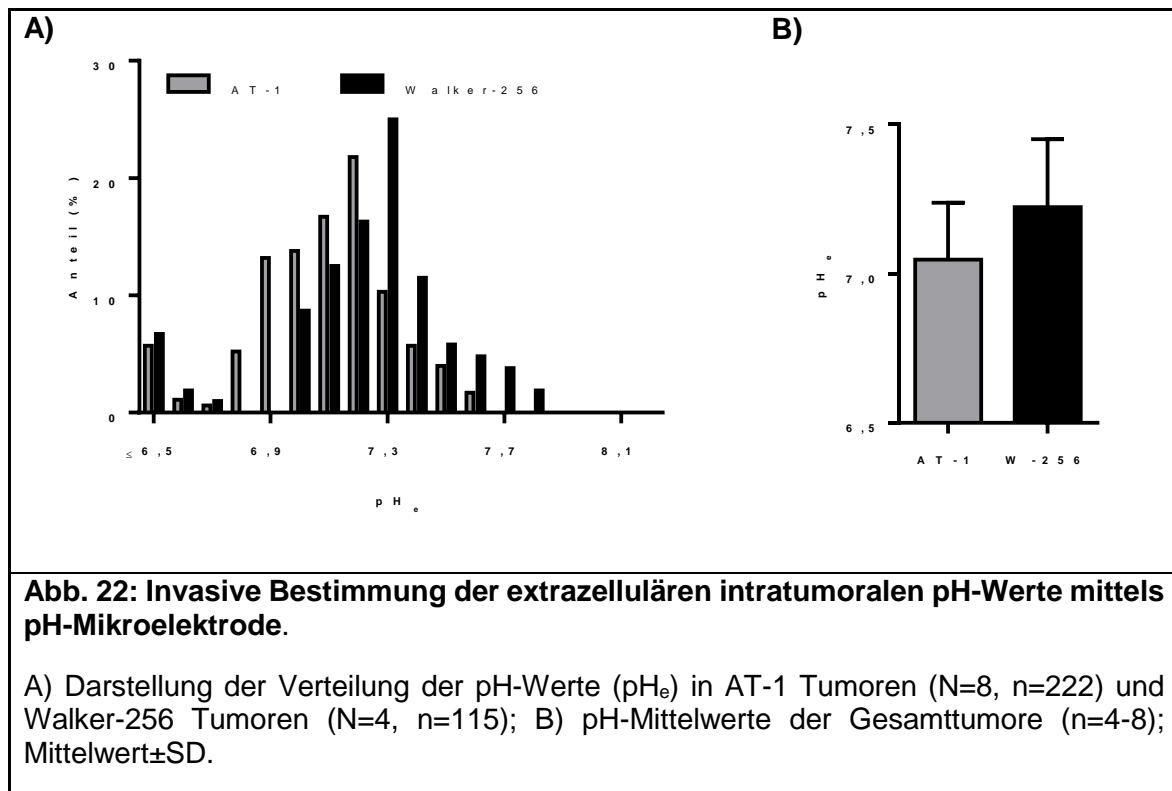


Abb. 22: Invasive Bestimmung der extrazellulären intratumoralen pH-Werte mittels pH-Mikroelektrode.

A) Darstellung der Verteilung der pH-Werte (pH_e) in AT-1 Tumoren (N=8, n=222) und Walker-256 Tumoren (N=4, n=115); B) pH-Mittelwerte der Gesamttumore (n=4-8); Mittelwert \pm SD.

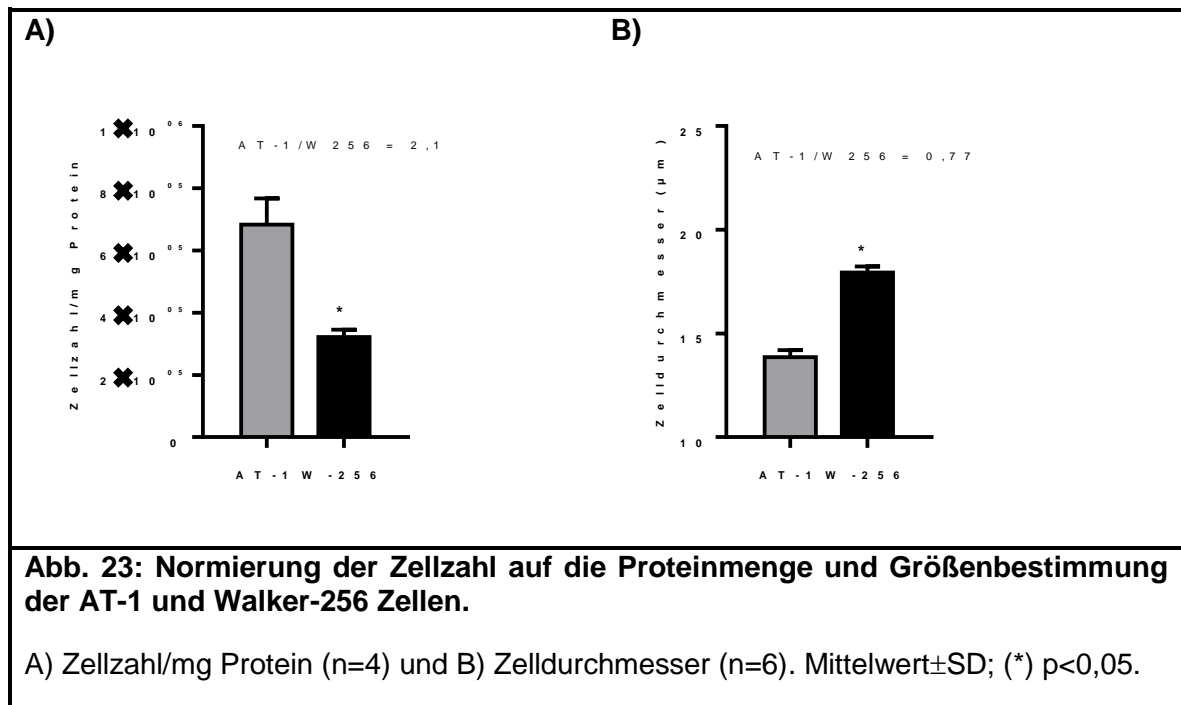
5.2. Charakterisierung der Aufnahme von pHMPA basierten Medikamententrägern in AT-1 und Walker-256 in der Zellkultur

Nach der Extravasation und der Verteilung der makromolekularen Substanzen im interstitiellen Raum der Tumore folgt die Bindung und Aufnahme in die Tumorzellen. Um die aktive zelluläre Aufnahme isoliert untersuchen zu können, wurde die beiden Tumormodelle in einem 2D-Zellkultursystem analysiert. Die Charakterisierung erfolgte unter physiologischen (pH 7,4 und 21 % O_2), sowie unter azidotischen (pH 6,6) und hypoxischen ($pO_2 \approx 1$ mmHg) Bedingungen, wie sie auch in den hier verwendeten Tumormodellen nachweisbar waren.

5.2.1. Bestimmung der Zellzahl/mg Protein von AT-1 Zellen und Walker-256 Zellen

Um die Aufnahme der Polymere auf die Zellzahl beziehen zu können, wurde zunächst die Proteinmenge von 10^6 Zellen der jeweiligen Tumorzelllinie bestimmt. Wie in **Abb. 23** dargestellt ist, entspricht 1 mg Zellprotein $3,22 \pm 0,24 \cdot 10^5$ Walker-256 Zellen. Dagegen entspricht 1 mg Zellprotein $6,83 \pm 0,85 \cdot 10^5$ AT-1 Zellen. Offensichtlich enthalten AT-1-Zellen nur etwa halb so viel Protein wie Walker-256 Zellen. Dieses Verhältnis spiegelt sich ebenso in den Volumen und der Zelloberfläche der beiden Zelllinien wieder. Die AT-1 Zellen besitzen einen Durchmesser von $13,9 \pm 0,3 \mu m$ und die Walker-256 Zellen von $18,0 \pm 0,3 \mu m$.

Somit haben die AT-1 Zellen ein durchschnittliches Volumen von $1406 \mu\text{m}^3$ (Zelloberfläche = $607 \mu\text{m}^2$) und die Walker-256 Zellen ein durchschnittliches Volumen von $3053 \mu\text{m}^3$ (Zelloberfläche = $1018 \mu\text{m}^2$).



5.2.2. Zeitabhängige Aufnahme der Polymere in AT-1 und Walker-256 Zellen

In **Abb. 24** ist die aktive Aufnahme der verschiedenen Polymervarianten über einen Zeitraum von bis zu 24 h dargestellt. Die Zellen wurden hierfür mit einer Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ des jeweiligen fluoreszenzmarkierten Polymers inkubiert.

Anhand des zeitlichen Verlaufes konnte nachgewiesen werden, dass die AT-1 Tumorzellen auch über einen längeren Zeitraum hinweg sehr viel weniger Polymer aufnahmen als Walker-256 Zellen. Somit ist die quantitative Polymeraufnahme spezifisch für die untersuchten Tumorzelllinien. Die intrazelluläre Sättigung der meisten Polymere wurde in einem Zeitraum von 4 bis 16 h erreicht. Nur die Aufnahme der Homo- und p(HPMA)-co-p(LMA) in die Walker-256 Zelllinie erhöhte sich bei den längeren Inkubationszeiten bis 24 h noch einmal. Signifikante Unterschiede zwischen den großen und kleinen Polymeren eines Typs hinsichtlich der zellulären Aufnahme waren bei den p(HPMA)-co-p(LMA) und p(HPMA)-b-p(LMA) in die AT-1 und nach 24 h bei den p(HPMA)-b-p(LMA) in die Walker-256 nachweisbar.

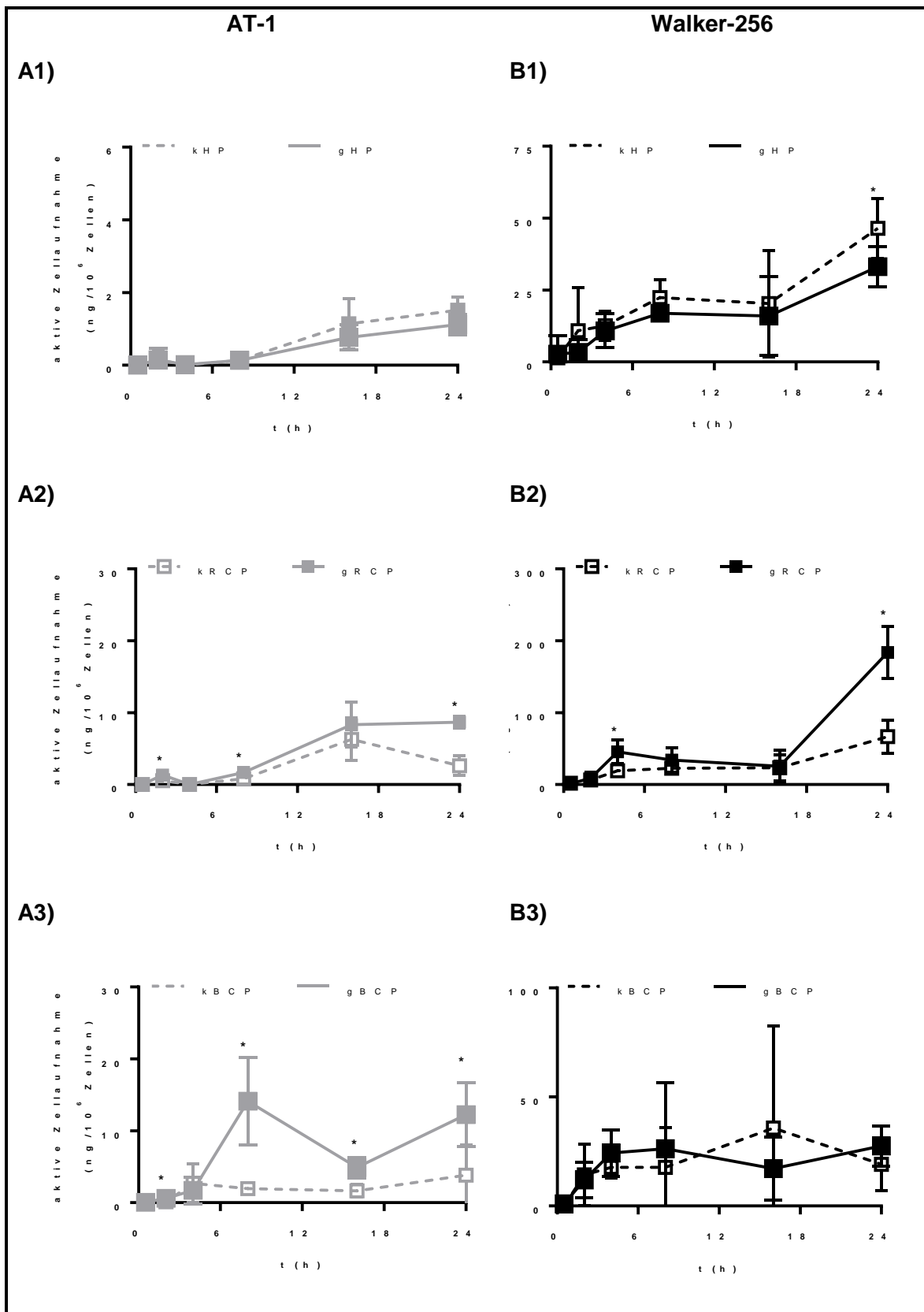


Abb. 24: Zeitabhängige aktive Zellaufnahme der verschiedenen HPMA-basierten Polymervarianten.

A) AT-1 und B) Walker-256; Polymere: k-klein, g-groß, A1/B1: Homopolymere, A2/B2: Random-LMA-Co-Polymere und A3/B3: p(HPMA)-b-p(LMA); n =6-9; Mittelwert±SD; (*) p<0,05 kleines vs. großes Polymer bei t(x).

Die maximal bestimmte intrazelluläre Konzentration in den AT-1 Zellen von $1,5 \pm 0,4 \text{ ng}/10^6$ erreichten die Homopolymervarianten nach einer Inkubationsdauer von 24 h. In den Walker-256 erreichten die Homopolymere zwischen 8 bis 16 h ein Aufnahmeplateau. Die kleinere Variante erreichte eine intrazelluläre Konzentration von $22,3 \pm 6,2 \text{ ng}/10^6$ Zellen und die größere von $17,0 \pm 1,3 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Anschließend verdoppelte sich bis 24 h die Aufnahme der kleinen Homopolymere auf $46 \pm 10 \text{ ng}/10^6$ Zellen und der großen Homopolymere auf $33 \pm 7 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Die Homopolymere wurden also in einer mehr als 10-fach höheren Konzentration in den Walker-256 Zellen im Vergleich zu den AT-1 Zellen nachgewiesen.

In AT-1 Zellen zeigte sich nach 16 h die maximale Aufnahme des kleinen p(HPMA)-co-p(LMA) mit einer intrazellulären Konzentration von $6,3 \pm 3,0 \text{ ng}/10^6$ Zellen und des großen p(HPMA)-co-p(LMA) mit $8,3 \pm 3,1 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Im Vergleich dazu zeigten die Walker-256 Zellen auch bei diesem Polymertyp bereits nach 4 h den Übergang in eine Sättigungsphase für das kleine p(HPMA)-co-p(LMA) mit $22,5 \pm 6,0 \text{ ng}/10^6$ Zellen und für das große p(HPMA)-co-p(LMA) mit $45,4 \pm 16,9 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Eine weitere Zunahme der p(HPMA)-co-p(LMA) Aufnahme erfolgte zwischen 16 h und 24 h auf $67 \pm 23 \text{ ng}/10^6$ Zellen für die kleine Variante und auf $184 \pm 37 \text{ ng}/10^6$ Zellen für die große Variante. Auch hier wurde die unterschiedliche Aufnahmekapazität zwischen den beiden Zelllinien deutlich, welche in den Walker-256 Zellen 4- bis 5-mal und nach 24 h sogar bis zu dem 20-fachen im Falle des großen p(HPMA)-co-p(LMA) höher war als in AT-1 Zellen.

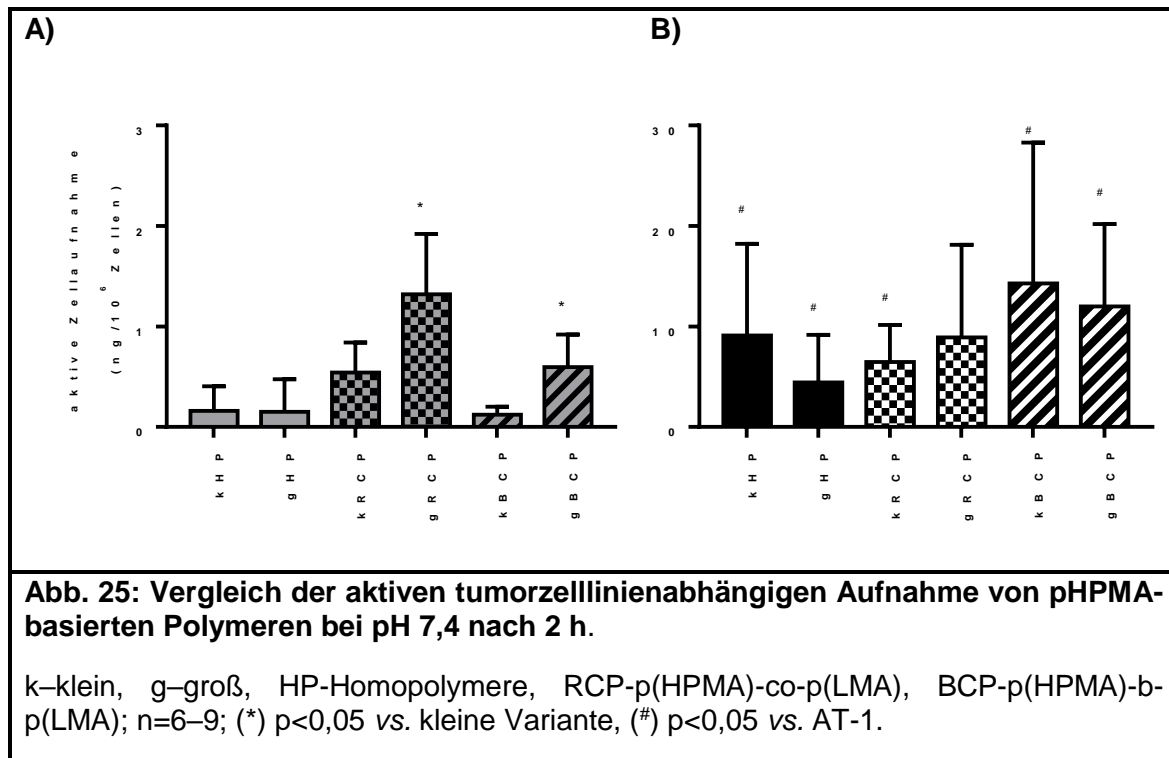
Die AT-1 Zellen nahmen das große p(HPMA)-b-p(LMA) am besten auf, welches nach 8 h eine intrazelluläre Sättigung von $14,1 \pm 6,1 \text{ ng}/10^6$ Zellen erreichte. Nach 4 h erreichte die kleine p(HPMA)-b-p(LMA) Variante mit $2,7 \pm 2,7 \text{ ng}/10^6$ Zellen das Sättigungsniveau und wurde somit im Vergleich zur großen p(HPMA)-b-p(LMA)variante in einer 5-fach niedrigeren Konzentration aufgenommen. Aber auch dieser HPMA-Polymertyp wurde in beiden Varianten signifikant stärker in die Walker-256 Zellen aufgenommen. So erreichte die kleine p(HPMA)-b-p(LMA)form in den Walker-256 Zellen die maximale intrazelluläre Konzentration nach 4 h mit $18 \pm 5 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Das große p(HPMA)-b-p(LMA) erreichte ebenso die maximale Zellkonzentration nach 4 h mit $24 \pm 11 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Auch wenn die mittlere Konzentration im Vergleich zur kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) Form doppelt so hoch war, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der intrazellulären Konzentration beider p(HPMA)-b-p(LMA)formen festgestellt werden.

5.2.3. Aufgenommene Polymermengen in AT-1 und Walker-256 Zellen nach 2 h unter physiologischen Milieubedingungen

Um den Einfluss von relevanten tumorpathophysiologischen Milieubedingungen auf die aktive zelluläre Aufnahme der Polymere zu untersuchen wurde eine Inkubationszeit von 2 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die zellulären Aufnahmen noch in keine Plateauphase

übergegangen waren. Zunächst wurde die Aufnahme der Polymere unter physiologischen Milieubedingungen zwischen AT-1 und Walker-256 verglichen (**Abb. 25**).

Die Homopolymere wurden in AT-1 Zellen nur sehr schwach aufgenommen, wobei fast kein Unterschied zwischen den zwei Größen des Polymers zu beobachten war (kleines Homopolymer: $0,16 \pm 0,25$ ng/ 10^6 Zellen, großes Homopolymer: $0,15 \pm 0,32$ ng/ 10^6 Zellen).



Die zelluläre Aufnahme der kleinen p(HPMA)-co-p(LMA) in die AT-1 Zellen war mit $0,54 \pm 0,30$ ng/ 10^6 Zellen ebenfalls gering. Dahingegen wurde das große p(HPMA)-co-p(LMA) mit $1,32 \pm 0,60$ ng/ 10^6 Zellen in einer signifikant höheren Konzentration in diese Tumorzelllinie aufgenommen.

Ähnlich wie bei den p(HPMA)-co-p(LMA)n, wurde die große Variante der p(HPMA)-b-p(LMA) signifikant besser von den AT-1 Zellen aufgenommen als die kleine Variante. Die intrazelluläre Konzentration der kleineren Variante lag in AT-1 Zellen nach 2 h bei $0,12 \pm 0,08$ ng/ 10^6 Zellen und die große p(HPMA)-b-p(LMA) Variante bei $0,59 \pm 0,33$ ng/ 10^6 Zellen.

Von den sechs untersuchten Polymeren erwies sich somit das große p(HPMA)-co-p(LMA), als das Polymer mit der höchsten intrazellulären Konzentration in den AT-1 Zellen nach 2 h Inkubation unter Kontrollbedingungen. Die Walker-256 Zelllinie zeigte nicht nur hinsichtlich der Aufnahmekapazität, also nach Erreichen der Plateauphase, signifikante Unterschiede, sondern auch hinsichtlich einer höheren aktiven Polymeraufnahme nach 2 h.

Das kleine Homopolymer erreichte in diesem Inkubationszeitraum eine intrazelluläre Konzentration von $9,1 \pm 9,1$ ng/ 10^6 Zellen. Es wurde somit im Mittel in einer 2-fach höheren

Konzentration aktiv aufgenommen als das große Homopolymer. Dieses erreichte nach 2 h eine intrazelluläre Konzentration von $4,4 \pm 4,7 \text{ ng}/10^6$ Zellen.

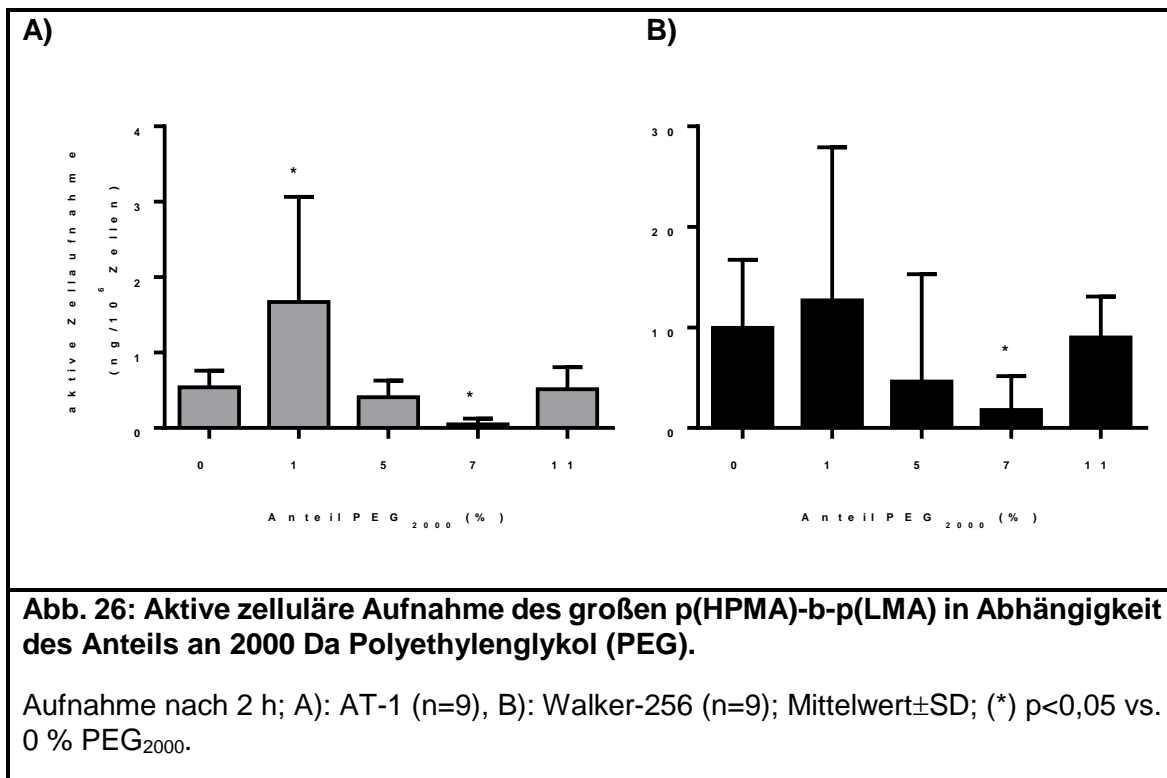
Die aktive Aufnahme der Random-Co-Polymer Varianten in die Walker-256-Zellen nach 2 h, war zumindest bei der kleineren Variante signifikant höher, als die aktive Aufnahme in die AT-1 Zellen. Diese ließ sich in einer Konzentration von $6,5 \pm 3,7 \text{ ng}/10^6$ Zellen und die große Variante in einer Konzentration von $8,9 \pm 9,2 \text{ ng}/10^6$ Zellen in den Walker-256 Zellen nachweisen. Durch die sehr hohe Standardabweichung der aktiv aufgenommenen großen Polymervariante in die Walker-256 Zellen, war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den AT-1 Zellen nachweisbar.

Die intrazelluläre Anreicherung der kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) Variante von $14,3 \pm 14,01 \text{ ng}/10^6$ Zellen war nach 2 h in Walker-256 Zellen fast 100-mal höher, als die Konzentration in den AT-1 Zellen. Die große p(HPMA)-b-p(LMA) Variante dessen intrazelluläre Konzentration in den Walker-256 Zellen nach 2 h $12,0 \pm 8,2 \text{ ng}/10^6$ Zellen erreichte, war ebenfalls signifikant um das 20-fache höher, als in den AT-1 Zellen.

Im Vergleich zu den AT-1 Zellen waren die intrazellulären Polymerkonzentrationen in Walker-256-Zellen mit Ausnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) alle signifikant höher. In Walker-256 Zellen konnte jedoch nach 2 h Inkubation kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der aktiven Aufnahme der unterschiedlichen Polymere festgestellt werden.

5.2.3.1. Einfluss der PEGylierung des großen p(HPMA)-b-p(LMA) auf die Polymerendozytose

Um die Verweildauer von Medikamententransportern im Blut zu verbessern, wurde vorgeschlagen, Block-bildende Polymere mit hochmolekularem PEG (2000 Da) zu koppeln. In *in vivo* Versuchen in Walker-256 Tumoren konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender PEGylierung des großen p(HPMA)-b-p(LMA) eine Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften hinsichtlich der Tumorakkumulation erreicht werden konnte [117]. Im Gegensatz hierzu zeigten die Zellkulturversuche (**Abb. 26**), dass eine verbesserte Aufnahme lediglich mit einem geringen Anteil (1 %) an PEG-Seitenketten in AT-1 Zellen erreicht werden konnte. Zusätzliche PEGylierte Seitenketten bis zu einem Masseanteil von 7 % führten zu einer deutlichen Verschlechterung der zellulären Aufnahme. Ein ähnliches Bild war auch für die Walker-256 Tumorzellen zu beobachten. Die Polymere mit 11 % Masseanteil an PEGylierten Seitenketten zeigten in beiden Tumorzelllinien keine signifikante Änderung der Polymeraufnahme im Vergleich zu der nicht-PEGylierten Variante.



5.2.3.2. Einfluss der mittleren Molmasse (M_w) und des hydrodynamischen Radius (r_h) von pHPMAs auf deren aktive Aufnahme

Die verschiedenen Polymere mit den unterschiedlichen Kettenlängen, aber auch mit variierenden Anteilen an Laurylmethacrylat (LMA) führt dazu, dass diese Verbindungen z.T. eine komplexe 3-dimensionale Struktur einnehmen und außerdem von einer Hydrathülle umgeben sind. Diese Parameter können ebenfalls die zelluläre Aufnahme beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Korrelation zwischen der mittleren Molmasse (M_w) bzw. dem hydrodynamischen Molekülradius (r_h) und der zellulären Aufnahme analysiert (Vergleich **Tab. 3**).

In **Abb. 27** sind der Bezug zwischen zellulärer Polymeraufnahme und r_h bzw. M_w dargestellt. Zwischen dem r_h und dem M_w gegenüber der aktiven zellulären Aufnahme in AT-1 (r_h /aktive Zellaufnahme: $r^2=0,08$, M_w /aktive Zellaufnahme: $r^2<0,01$) war kein linearer Zusammenhang gegeben. Somit spielen beide der Polymereigenschaften, wenn dann nur eine untergeordnete Rolle für die Aufnahme in die AT-1 Zellen. Eine geringe positive Korrelation zwischen dem r_h und der aktiven Zellaufnahme ($r^2=0,27$), ebenso wie eine geringe negative Korrelation zwischen dem M_w und der aktiven Zellaufnahme ($r^2=0,23$) bestand dahingegen bei den Walker-256.

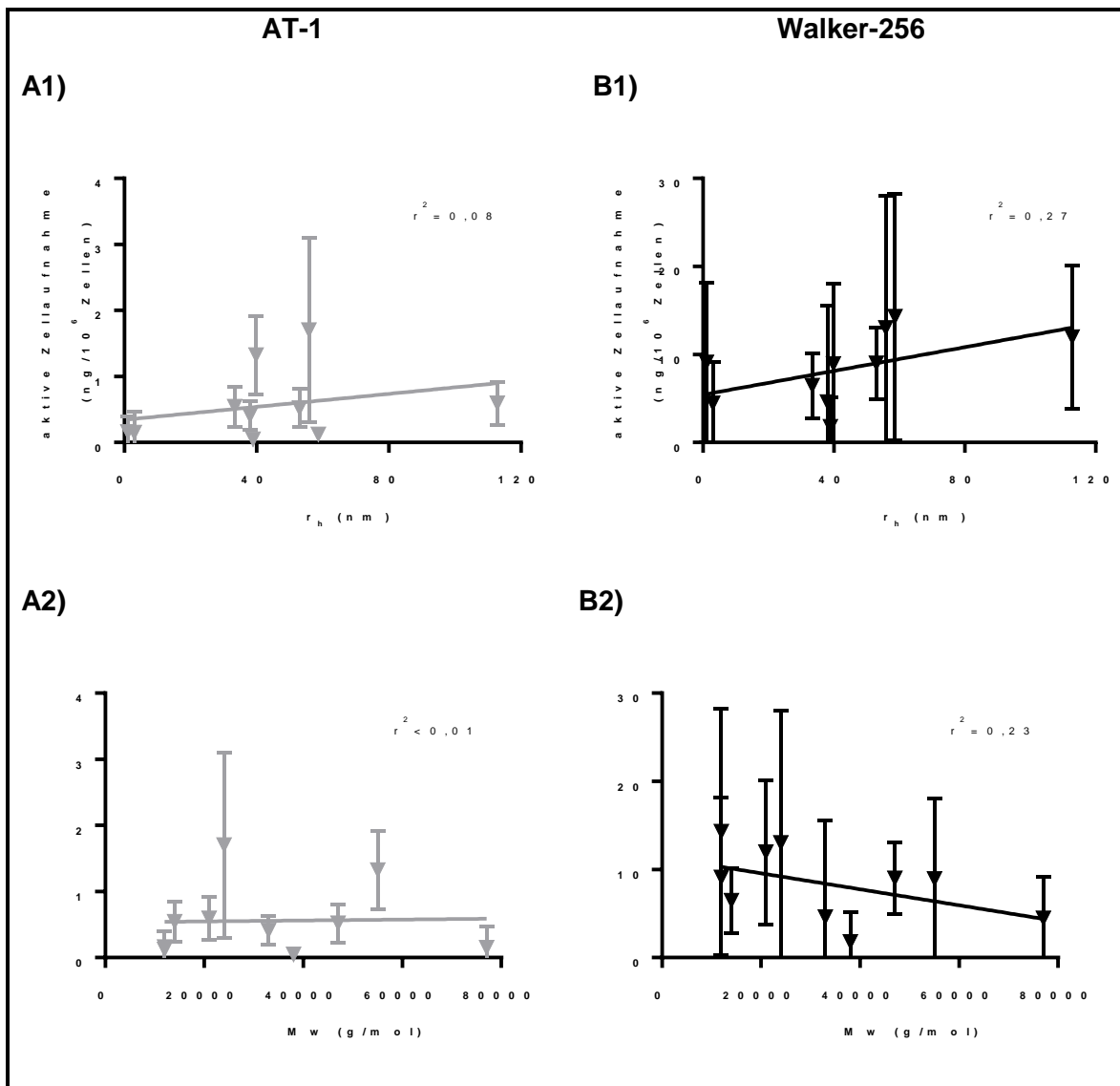


Abb. 27: Einfluss des hydrodynamischen Radius (r_H) und der mittleren Molmasse (M_w) der Polymere auf deren zelluläre Aufnahme.

A): in AT-1 und B): Walker-256; Mittelwert \pm SD; n=6–9.

5.2.3.3. Einfluss des extrazellulären pH auf die Polymeraufnahme

Um den Einfluss eines azidotischen pH-Werts, wie er in vielen Tumoren nachweisbar ist, auf die Polymeraufnahme zu untersuchen, wurden die Zellen für 2 Stunden entweder einer extrazellulären Azidose (pH 6,6) oder Kontrollbedingungen (pH 7,4) ausgesetzt. Die Vergleiche sind in **Abb. 28** dargestellt.

Die Inkubation der Zellen unter azidotischen Mikromilieubedingungen führte zu einer signifikant geringeren aktiven zellulären Aufnahme des großen Homopolymers, welches nicht mehr in den AT-1 Zellen nachweisbar war. Im Gegensatz dazu war die Aufnahme der kleinen Homopolymere unter azidotischen Bedingungen und bei pH 7,4 in AT-1 Zellen vergleichbar.

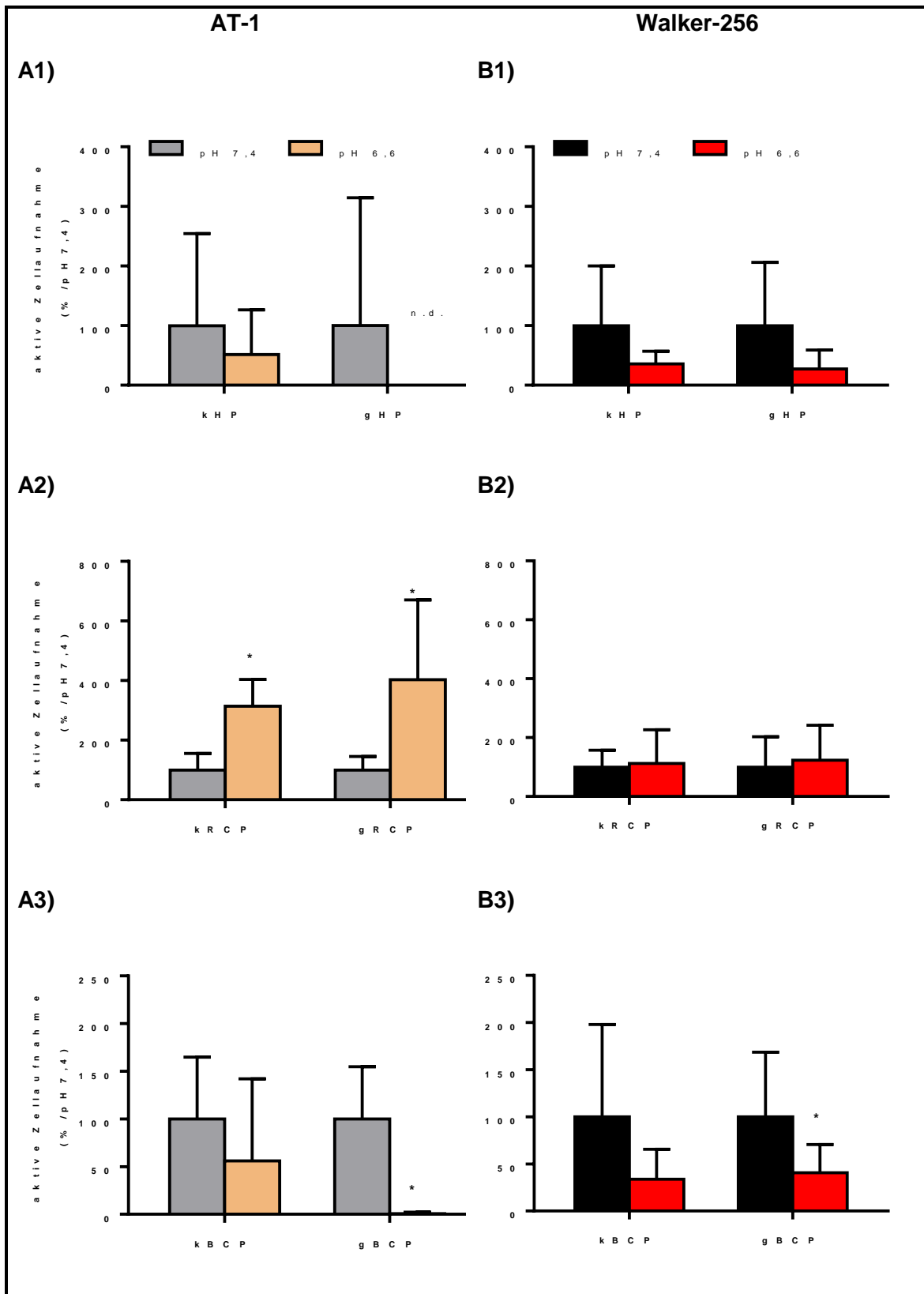


Abb. 28: Einfluss der Azidose auf die aktive Polymeraufnahme.

A: AT-1 und B: Walker-256 Zellen; k-klein und g-groß, HP-Homopolymer (A1/B1), RCP-p(HPMA)-co-p(LMA) (A2/B2) und BCP-p(HPMA)-b-p(LMA) (A3/B3); Mittelwert \pm SD; n=6-10; (*) p<0,05 vs. pH 7,4; n.d. nicht nachweisbar.

Interessanterweise führte ein azidotisches Mikromilieu zu einer signifikant höheren Aufnahme der p(HPMA)-co-p(LMA)varianten in die AT-1 Zellen. Dabei nahm die aufgenommene Menge der kleinen Variante um 214 ± 32 % von $0,54 \pm 0,30$ ng/ 10^6 Zellen auf $1,70$ ng/ 10^6 Zellen und die Menge der großen Variante um 303 ± 95 % von $1,32 \pm 0,60$ ng/ 10^6 Zellen auf $5,32 \pm 3,54$ ng/ 10^6 Zellen zu.

Die pH-abhängige Aufnahme des p(HPMA)-b-p(LMA) in die AT-1 Zellen war vergleichbar zu der pH-abhängigen Aufnahme der Homopolymere. Im Gegensatz zu einer unveränderten Aufnahmemenge der kleinen Polymervariante, verringerte sich die aufgenommene Menge der großen Variante unter azidotischen Bedingungen signifikant um 94 ± 30 %.

Bei den Walker-256 Zellen führte das azidotische Milieu zu keiner signifikanten Änderung der aktiven Polymeraufnahmen der p(HPMA)-co-p(LMA). Die Homo- und p(HPMA)-b-p(LMA) wurden unter den azidotischen Bedingungen tendenziell weniger aufgenommen und nur das große p(HPMA)-b-p(LMA) zeigte eine signifikant verringerte Aufnahme von 59 ± 30 % von $12,0 \pm 8,2$ ng/ 10^6 Zellen auf $4,9 \pm 3,6$ ng/ 10^6 .

5.2.3.4. Einfluss von Hypoxie auf die zelluläre Aufnahme der Polymere

Die zweite tumorpathophysiologische Milieubedingung, welche in dieser Arbeit näher betrachtet wurde, stellt die Hypoxie dar. Deren Auswirkung auf die aktive Polymeraufnahme in die Tumorzelllinien AT-1 und Walker-256 werden im Folgenden dargestellt (**Abb. 29**) und den Untersuchungen zur Tumorzidose gegenübergestellt. Das für den Untersuchungszeitraum konstante hypoxische Milieu von $0,2$ % O_2 ($pO_2 \approx 1,0$ mmHg) wurde mit Hilfe einer temperierten Hypoxiekammer gewährleistet.

Ebenso wie unter den azidotischen Bedingungen (**Abb. 28**) war die Aufnahme des kleinen Homopolymers in die AT-1 Zellen unter hypoxischen Bedingungen (**Abb. 29**) nicht signifikant beeinflusst, wobei aber eine tendenzielle Abnahme zu beobachten war. Wurde das große Homopolymer unter azidotischen Bedingungen nicht mehr aktiv aufgenommen, so war unter hypoxischen Bedingungen dahingegen keine signifikante Änderung nachweisbar.

Führte die Azidose zu einer 3- bis 4-fach verbesserten Aufnahme der p(HPMA)-co-p(LMA)varianten in die AT-1 (**Abb. 28**), so blieb ein Einfluss der Hypoxie (**Abb. 29**) aus. Zwar war im Mittel die aktive Aufnahme des großen Polymers unter hypoxischen Bedingungen um 500 % höher als unter normoxischen Bedingungen, diese Zunahme war jedoch aufgrund der hohen Variabilität der Ergebnisse nicht signifikant.

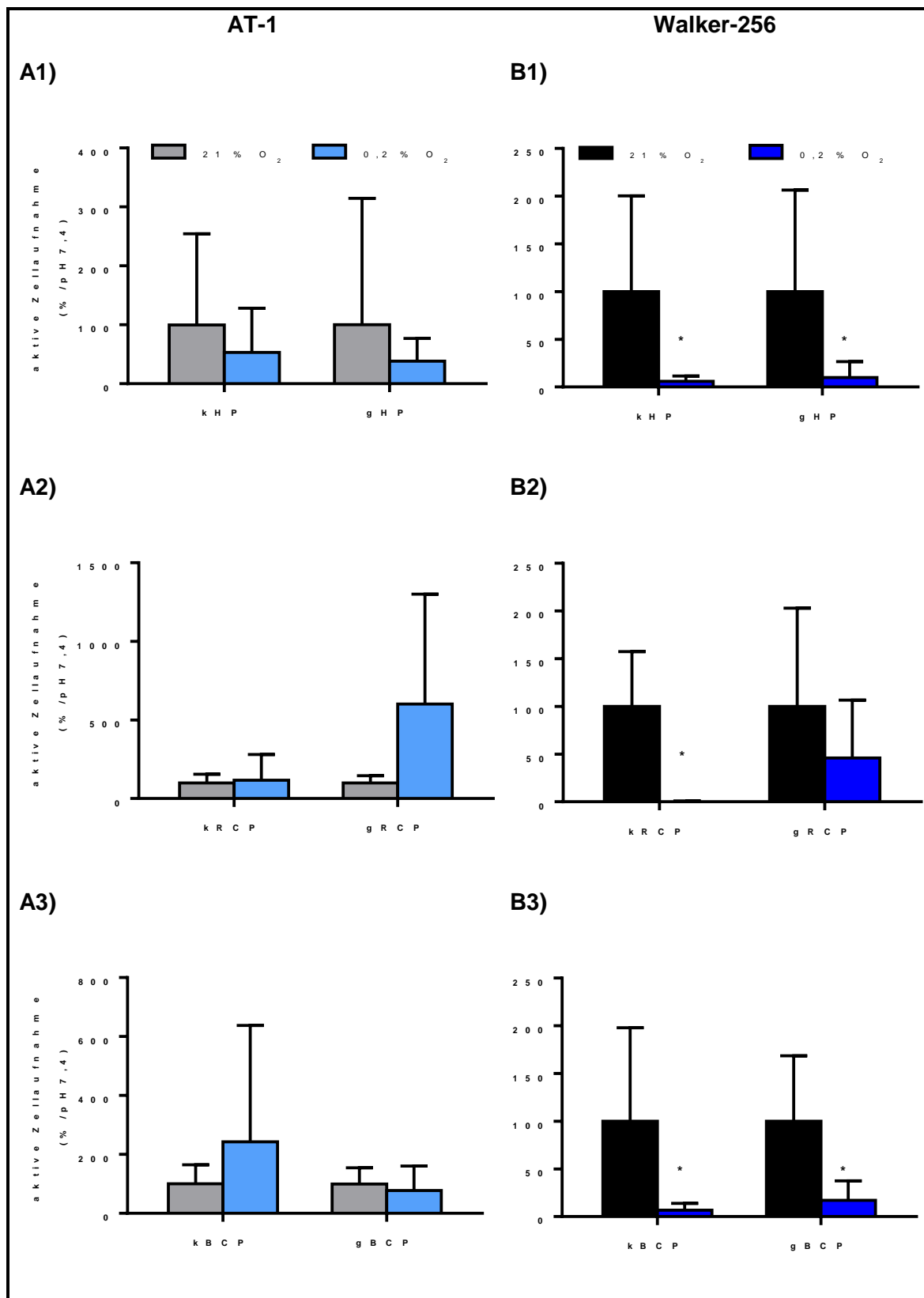


Abb. 29: Einfluss der Hypoxie auf die aktive Polymeraufnahme.

A: AT-1 und B: Walker-256 Zellen; k-klein und g-groß, HP-Homopolymer (A1/B1), RCP-p(HPMA)-co-p(LMA) (A2/B2) und BCP-p(HPMA)-b-p(LMA) (A3/B3); Mittelwert \pm SD; n=6–10; (*) p<0,05 vs. 21 % O₂.

Die aktive Aufnahme des kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) in die AT-1 Zellen veränderte sich unter Hypoxie (**Abb. 29**), ebenso wie unter azidotischen Bedingungen (**Abb. 28**) nicht signifikant, stieg aber im Mittel auf über das Doppelte im Vergleich zu der Aufnahme unter normoxischen Bedingungen. Eine signifikant verringerte aktive Aufnahme des großen Polymers wie unter azidotischen Bedingungen konnte somit nicht beobachtet werden. Hatte bei den Walker-256 Zellen die Azidose außer auf die aktive Aufnahme des großen p(HPMA)-b-p(LMA) (**Abb. 28**) keine weiteren signifikanten Auswirkungen, so war dahingegen die Aufnahme aller untersuchten Polymere unter hypoxischen Bedingungen, mit Ausnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA), signifikant geringer. Die Aufnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) in die Walker-256 Zellen war zumindest tendenziell ebenfalls niedriger (**Abb. 29**).

5.2.3.5. Zusammenfassender Vergleich der Polymer-Aufnahme unter verschiedenen Milieubedingungen

Tab. 14: Signifikante Änderung der aktiven Zellaufnahme von pHPMAs bezogen auf physiologische Kontrollbedingungen (pH 7,4, pO ₂ =150 mmHg)				
Polymer	Azidose (pH 6,6)		Hypoxie (pO ₂ ≈1 mmHg)	
	AT-1	Walker-256	AT-1	Walker-256
kHP	-	-	-	↓↓
gHP	↓↓↓	-	-	↓↓
kRCP	↑↑	-	-	↓↓↓
gRCP	↑↑↑	-	-	-
kBCP	-	-	-	↓↓↓
gBCP	↓↓↓	↓↓	-	↓↓
(-) keine, (↓) >-50 %, (↓↓) -50 % bis <-90 %, (↓↓↓) -90 % bis <-100 %, (↑) <+200 %, (↑↑) +200 % bis <+400 %, (↑↑↑) >+400 %				

Diese Untersuchungen zeigen, dass das tumorpathophysiologische Mikromilieu signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von HPMA-basierten Polymervarianten haben kann. In die AT-1 Zellen war diese azidose- und polymerabhängig. Das große Homopolymer wurde bei einem pH_e von 6,6 gar nicht mehr aktiv aufgenommen und das große p(HPMA)-b-p(LMA) nur noch zu einem sehr geringen Anteil. Im Fall der p(HPMA)-co-p(LMA)-Varianten führten die azidotischen Milieubedingungen in AT-1 Zellen zu einer gesteigerten aktiven Aufnahme bis zu 400 %. Die Hypoxie hatte dahingegen keinen Einfluss auf die aktiven Aufnahmeprozesse. Ein durch Azidose bedingter Einfluss auf die aktive Polymeraufnahme in die Walker-256 Zellen konnte nur für das großen p(HPMA)-b-p(LMA) in Form einer geringeren Aufnahme nachgewiesen werden. Dahingegen führte ein hypoxisches Milieu generell zu einer Reduktion der aktiven Polymeraufnahme. Nur die

Aufnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) blieb nur wenig beeinflusst. In **Tab. 14** sind die untersuchten tumorpathophysiologischen Einflüsse auf die aktive Zellaufnahme der Polymervarianten zusammengefasst dargestellt.

5.2.4. Charakterisierung der Endozytosewege von AT-1 und Walker-256 unter verschiedenen Milieubedingungen

Wie oben beschrieben, kann es sowohl durch azidotische, als auch durch hypoxische Milieubedingungen zu einer veränderten Aufnahme der Polymere kommen. Da unterschiedliche Endozytosewege eine mögliche Erklärung für die polymerabhängige aktive Zellaufnahme darstellen, sollten zunächst diese hinsichtlich der Beeinflussung durch Azidose und Hypoxie untersucht werden.

Um die verschiedenen Endozytosewege getrennt untersuchen zu können, wurden die Substrate Dextran mit einem M_w von 70 kDa (Makropinozytose, Dex-70), Transferrin (CME, Tf-488) und die nicht-toxische β -Untereinheit des Cholera-toxins (Cholesterin-abhängiger Endozytose, Ctb-488) verwendet. Da von diesen Substraten der genaue Aufnahmemechanismus bekannt ist, dienten sie hier als fluoreszenzmarkierte Marker der jeweiligen Endozytosewege. Neben dem Einfluss azidotischer und hypoxischer Milieubedingungen, wurden außerdem auch die Bedeutung des intrazellulären pH (pH_i) sowie der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) untersucht. Beide Parameter können von dem extrazellulären pH (pH_e) beeinflusst werden und somit indirekt Einfluss auf die zellulären Aufnahmeprozesse nehmen.

5.2.4.1. Bedeutung der Azidose und Hypoxie für die Aufnahme von 70 kDa Dextran als Marker der Makropinozytose

Im Gegensatz zu den Polymeraufnahmen wurde das Dextran unter physiologischen Bedingungen signifikant besser von den AT-1 Zellen, als von den Walker-256 Zellen endozytiert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse waren in AT-1 Zellen etwa 3-fach höhere intrazelluläre Dextrankonzentrationen nachweisbar (**Abb. 30 A**).

Die Untersuchungen der zellulären Dextranaufnahme bei zunehmender Azidose zeigten ein gegensätzliches Verhalten beider Zelllinien. Die aufgenommene Menge durch AT-1 Zellen nahm um 42 ± 36 %, nach 3 h Inkubation bei pH 6,6, signifikant ab. Bei einem stark azidotisch geprägten Mikromilieu (pH 6,2), wie es auch *in vivo* teilweise nachweisbar ist (**Abb. 22**), wurde sogar 70 ± 15 % weniger Dextran in diese Zellen aufgenommen.

Die Walker-256 Zellen nahmen dahingegen unter azidotischen Mikromilieubedingungen mehr Dextran auf. Bei pH 6,6 war durchschnittlich 90 % und bei pH 6,2 im Mittel 140 % mehr zellulär aufgenommenes Dextran nachweisbar. Die Änderungen der Dextranaufnahme in Walker-256 Zellen waren unter beiden azidotischen Bedingungen statistisch signifikant (**Abb. 30 B**).

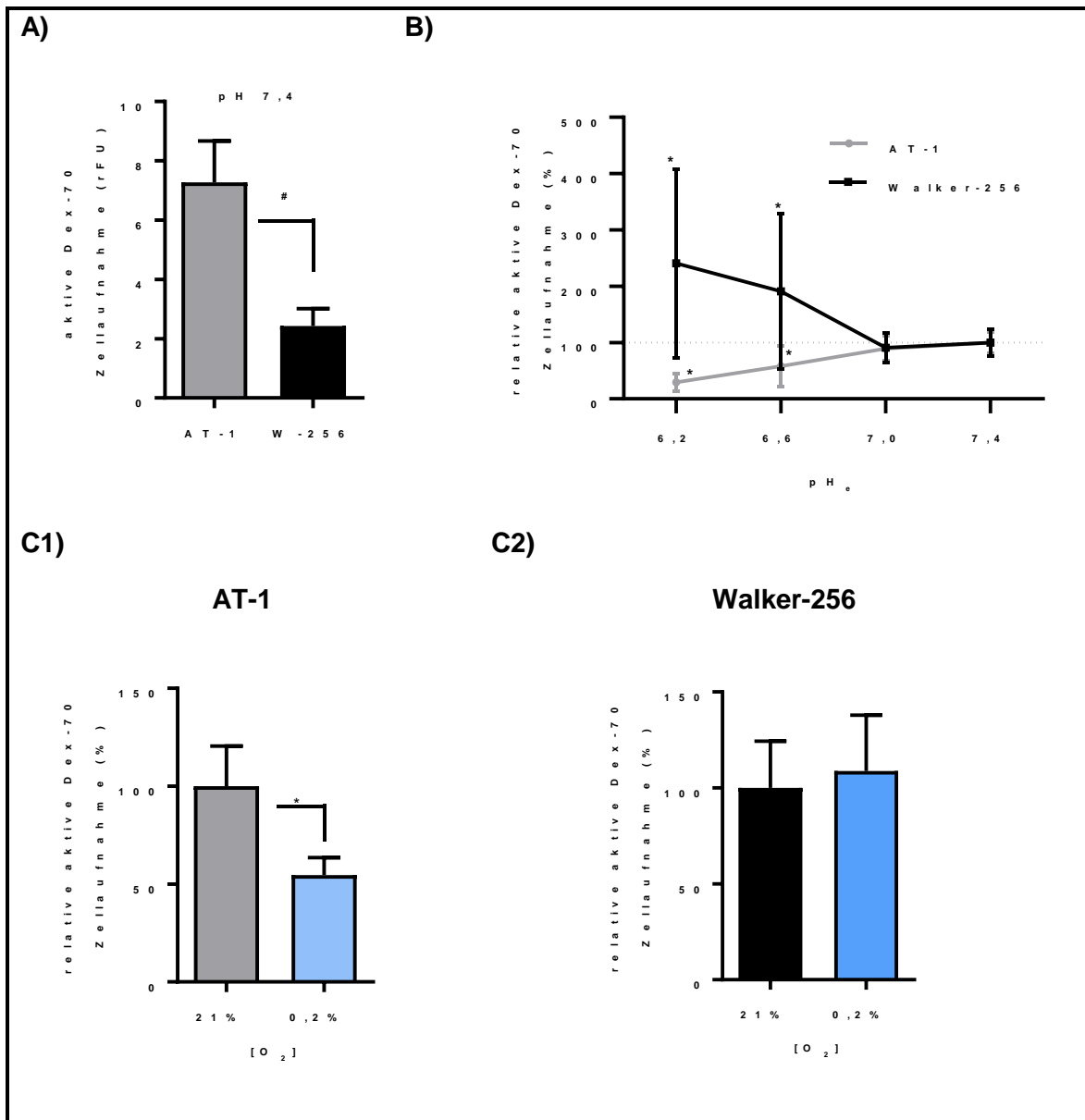


Abb. 30: Einfluss eines azidotischen oder hypoxischen Milieus auf die Makropinozytose.

Relative Aufnahme des 70 kDa Dextrans (Dex-70) in AT-1 und Walker-256-Zellen; A) Vergleich der aktiven Zellaufnahme beider Zelllinien bei einem pH 7,4; B) pH_e abhängige relative Änderung der Dextranaufnahme im Vergleich zu pH 7,4; C) Vergleich der Dextranaufnahme unter hypoxischen vs. normoxischen Bedingungen; Mittelwert±SD; n=6–13; (#) p<0,05 vs. AT-1, (*) p<0,05 vs. Kontrollbedingungen.

Wie die vorangegangenen *in vivo* Messungen zeigten, sind hypoxische Regionen im Vergleich zu Walker-256 Tumoren vor allem in AT-1 Tumoren besonders stark ausgeprägt (**Abb. 15 bis Abb. 19**). Bei den Untersuchungen der zellulären Dextranaufnahme unter hypoxischen Bedingungen ($pO_2 \approx 1$ mmHg) in Zellkulturansätzen, zeigten die AT-1 Zellen eine signifikante Verminderung im Vergleich zur Normoxie. Die relative aktive Zellaufnahme von Dextran sank dabei um $55 \pm 9\%$. Dahingegen waren Hypoxie bedingt keine

signifikanten Veränderungen hinsichtlich der aktiv aufgenommenen Menge an Dextran in die Walker-256 Zellen nachweisbar.

Diese Beobachtungen zeigen, dass das 70 kDa Dextran und die HPMA-basierten Polymere wahrscheinlich über unterschiedliche Endozytosewege in die AT-1 und Walker-256 Zellen unter hypoxischen Bedingungen aufgenommen werden (Vergleich mit **Abb. 29**).

5.2.4.2. Einfluss des extrazellulären pH-Wertes (pH_e) auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und den intrazellulären pH (pH_i)

Aus anderen Zelllinien ist bekannt, dass es durch eine Änderung des pH_e parallel zu Veränderungen des pH_i und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommen kann und diese Parameter wiederum zahlreiche intrazelluläre Signalvorgänge und Zellfunktionen beeinflussen. Darum wurde für die beiden Tumorzelllinien der Einfluss des pH_e auf diese Parameter in einem Superfusionsmodell untersucht.

Durch vorangegangene Studien [84] konnte gezeigt werden, dass in AT-1 Zellen nach einem pH-Wechsel von 7,4 auf 6,6 innerhalb weniger Minuten die intrazelluläre Calcium-Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 129 ± 1 (SEM) nmol/l auf 68 ± 3 (SEM) nmol/l sank. Dieser azidoseinduzierte Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verringerte sich jedoch innerhalb von 10 Minuten wieder um ca. 30 nmol/l, sodass nach 10 min extrazelluläre Azidose ein Wert von 94 ± 5 nmol/l erreicht wurde (**Abb. 31**). Der anschließende pH-Wechsel zurück auf 7,4 führte zu einer Normalisierung auf die anfängliche $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

In den Walker-256 Zellen war die initiale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 43 nmol/l niedriger als in den AT-1. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sank ebenso nach dem Wechsel des pH_e von 7,4 auf 6,6 innerhalb weniger Minuten von 86 ± 1 nmol/l auf 65 ± 3 nmol/l. Es konnte aber im Gegensatz zu den AT-1-Zellen keine kurzfristige Anpassung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der gesamten 10 minütigen Azidose beobachtet werden (**Abb. 31, Abb. 32**). Erst durch den anschließenden Wechsel zurück zum Kontroll-pH (7,4) wurde wie in den AT-1 Zellen der Ausgangswert der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erreicht. Bei diesem schnellen pH_e -Wechsel konnte außerdem in beiden Zelllinien ein initialer überschießender Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration (Rebound) um ca. 20 nmol/l beobachtet werden, bevor die anfängliche $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder erreicht wurde.

Beide pH_e abhängige Konzentrationsänderungen des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waren somit reversible Effekte. Im Gegensatz zu den Walker-256 Zellen konnten die AT-1 Zellen zumindest temporär auch unter azidotischen Milieubedingungen die niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ teilweise kompensieren. **Abb. 31** zeigt, dass in beiden Zelllinien durch eine extrazelluläre Azidose nicht nur die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sondern auch der pH_i in den Tumorzellen sehr schnell sinkt.

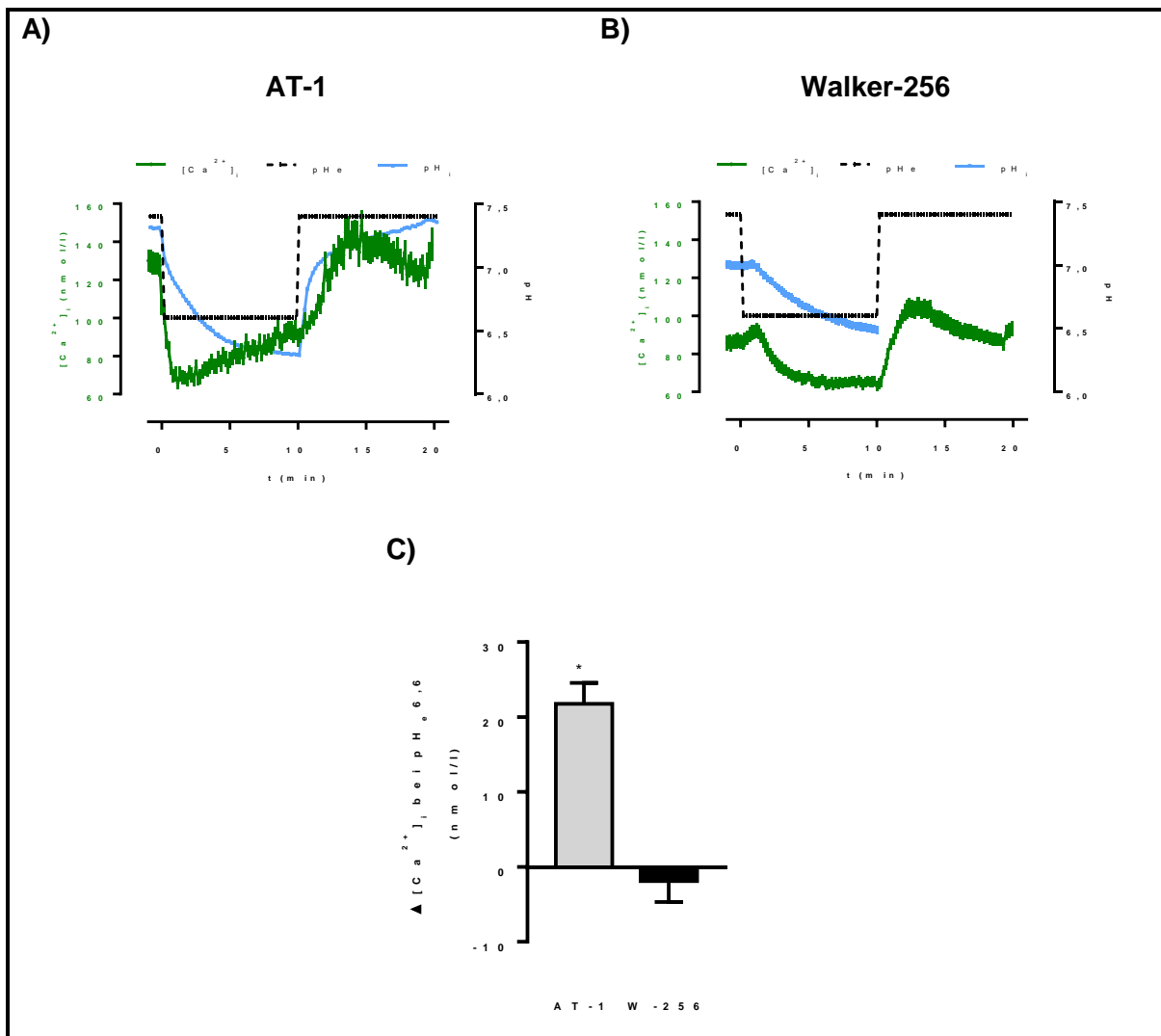
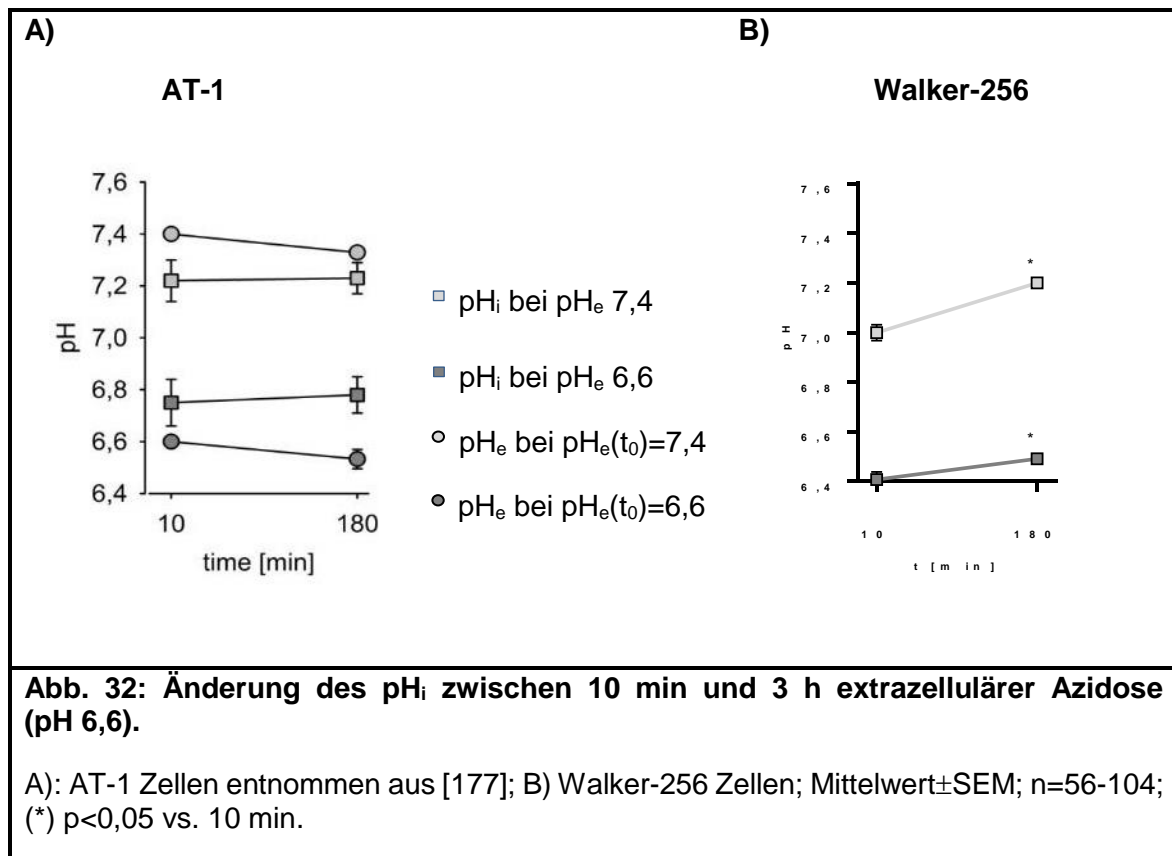


Abb. 31: pH_e abhängige Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ und des pH_i .

Zeitlicher Verlauf in A) AT-1-Zellen (modifiziert nach [84]; $n=104-135$) und B): Walker-256-Zellen, $n=33-56$; $MW \pm SEM$; (*) $p < 0,05$; C): Spontane Kompensation der $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung nach 10 min bei pH_e 6,6; (*) $p < 0,05$ vs. initialer azidoseinduzierter $[Ca^{2+}]_i$.

In vorangegangenen Arbeiten (**Abb. 32 A**) konnte eine stabiler pH_i von pH 6.75 ± 0.09 in AT-1 Zellen nach 3 h bei einem extrazellulären pH von 6,6 nachgewiesen werden (pH_i $7,22 \pm 0,08$ bei pH_e 7,4). Dies hatte folglich auch die Umkehr des pH Gradienten zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum zur Folge [177].

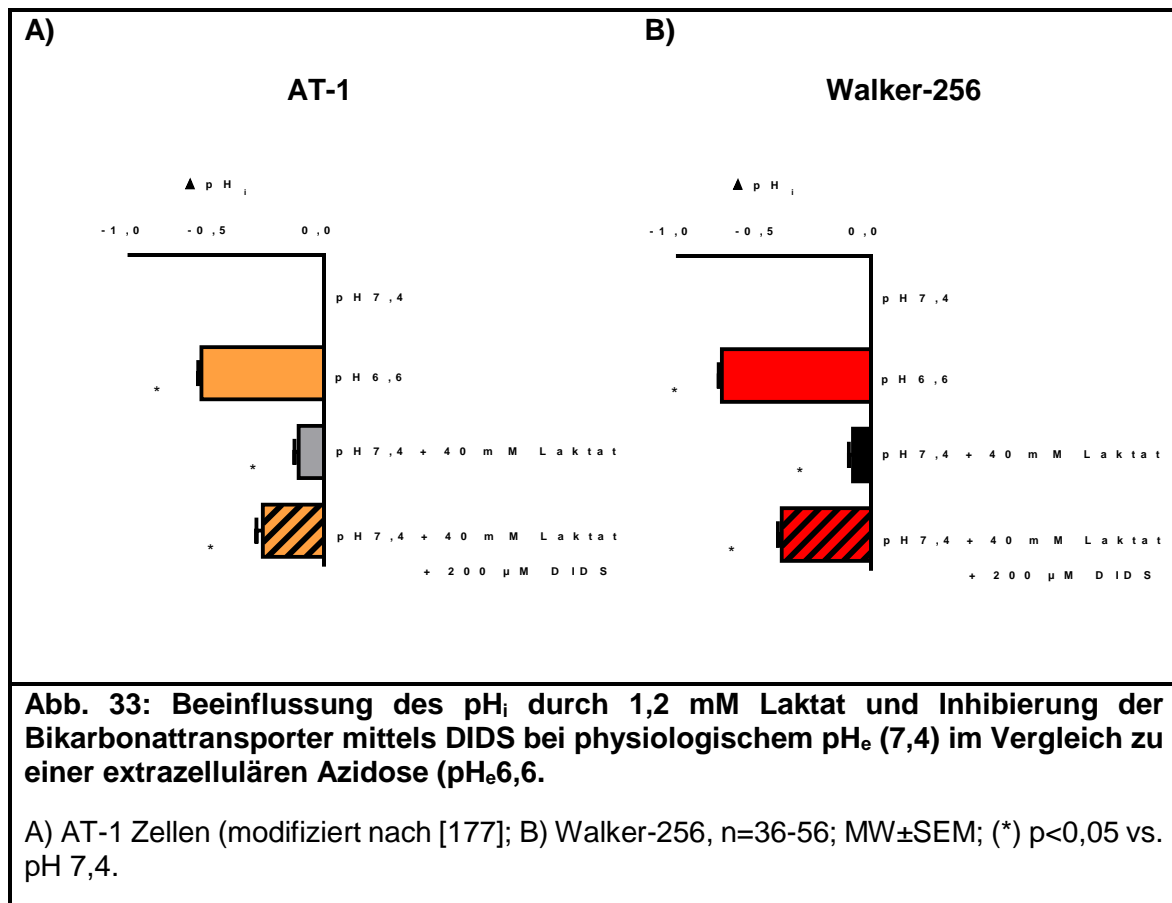
In den Walker-256 Zellen (**Abb. 32 B**) stieg der pH_i über einen Zeitraum von 3 h sowohl unter physiologischen als auch azidotischen Bedingungen signifikant leicht an. Bei einem pH_e von 7,4 stieg der pH_i innerhalb von 3 h um 0,2 auf einen pH_i von 7,2 und bei einem pH_e von 6,6 um 0,09 pH -Einheiten auf einen pH_i von 6,5 an.



5.2.4.3. Einfluss des pH_i auf die Makropinozytose

Da es durch die extrazelluläre Azidose zu einer Abnahme des intrazellulären pH kam (**Abb. 31**), sollte untersucht werden, ob der pH_i den Vorgang der Makropinozytose beeinflusst oder ob andere Signalwege hierfür verantwortlich sind. Hierfür wurde der Intrazellularraum selektiv angesäuert (bei normalem extrazellulären pH) und die Dextranaufnahme gemessen. In Untersuchungen von Riemann et al. an AT-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit 40 mM Laktat sowie mit dem Inhibitor des Bikarbonat-Chlorid-Austauschers mittels DIDS (200 μ M) zu einer Verminderung des intrazellulären pH, vergleichbar den Werten bei einem extrazellulären pH von 6,6, führte [177].

Durch die Inkubation der Walker-256 Zellen mit 40 mM Laktat bei pH 7,4 sank der pH_i signifikant auf 7,1. Somit wurde eine ähnliche pH_i Reduktion wie in AT-1 Zellen erreicht. Ein Zusatz von 200 μ M DIDS und 40 mM Laktat senkte den pH_i um weitere 0,4 pH-Einheiten auf 6,7. Somit konnten in beiden Zelllinien pH-Werte erreicht werden, die in etwa denen bei extrazellulären Azidose entsprachen (**Abb. 33**). In folgenden Versuchen wurde dieses Modell verwendet, um den Einfluss des intrazellulären pH auf die Dextran-Aufnahme selektiv zu untersuchen.



Die Auswirkungen des erniedrigten pH_i auf die Makropinozytose des 70 kDa Dextrans waren im Gegensatz zu den Auswirkungen des erniedrigten pH_e zwischen beiden Zelllinien vergleichbar und führten zu einer signifikant geringeren Aufnahme des Dextrans. In AT-1-Zellen war die intrazelluläre Dextran-Konzentration um 74 ± 22 % und die Walker-256 Zellen um 62 ± 30 % vermindert (**Abb. 34**). Hieraus kann gefolgert werden, dass die Makropinozytose einerseits zelllinienunabhängig vom pH_i , auf der anderen Seite aber gleichzeitig zelllinienspezifisch durch eine extrazelluläre Azidose beeinflusst werden.

Wie oben (**Abb. 31**) beschrieben wird auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch den pH_e beeinflusst. Um zu untersuchen, ob eine reduzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Makropinozytose beeinflusst, wurde gezielt der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt pH-unabhängig reduziert. Dies geschah durch die Inkubation der Zellen in einer annähernd Ca^{2+} -freien Lösung ($[\text{Ca}^{2+}] \approx 0,005$ mM) [84].

Aus **Abb. 35** wird ersichtlich, dass unter physiologischem pH_e die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur einen untergeordneten Einfluss auf die Makropinozytose der beiden Zelllinien hat. Unter azidotischen Bedingungen (pH 6,6) war die Dextranaufnahme hingegen in den AT-1 Zellen niedriger und in den Walker-Zellen höher. Diese Effekte werden aufgehoben, wenn man die extrazelluläre (und damit auch die intrazelluläre) Ca^{2+} -Konzentration vermindert. Dies deutet darauf hin, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_e$ auf die Makropinozytose unter azidotischen Milieubedingungen hat (unabhängig, ob sie gesteigert oder vermindert wird).

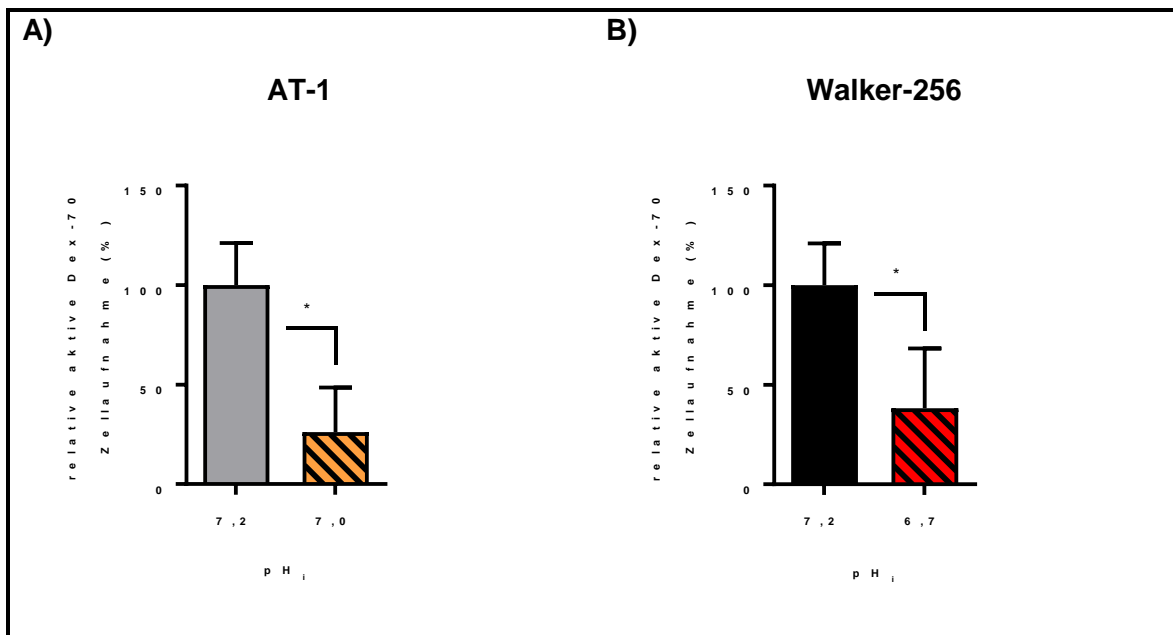


Abb. 34: pH_i-abhängige Aufnahme von 70 kDa Dextran (Dex-70) in (A) AT-1- und (B) Walker-256-Zellen.

Mittelwert±SD; n=6; (*) p<0,05 vs. pH_i 7,2.

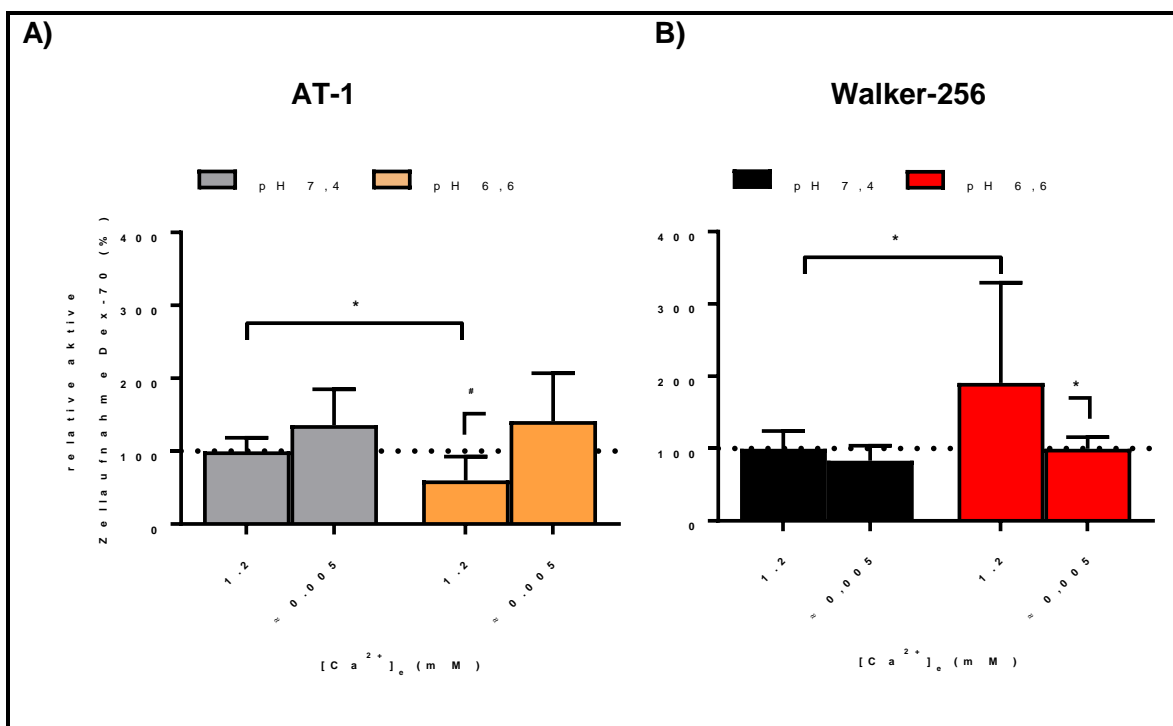
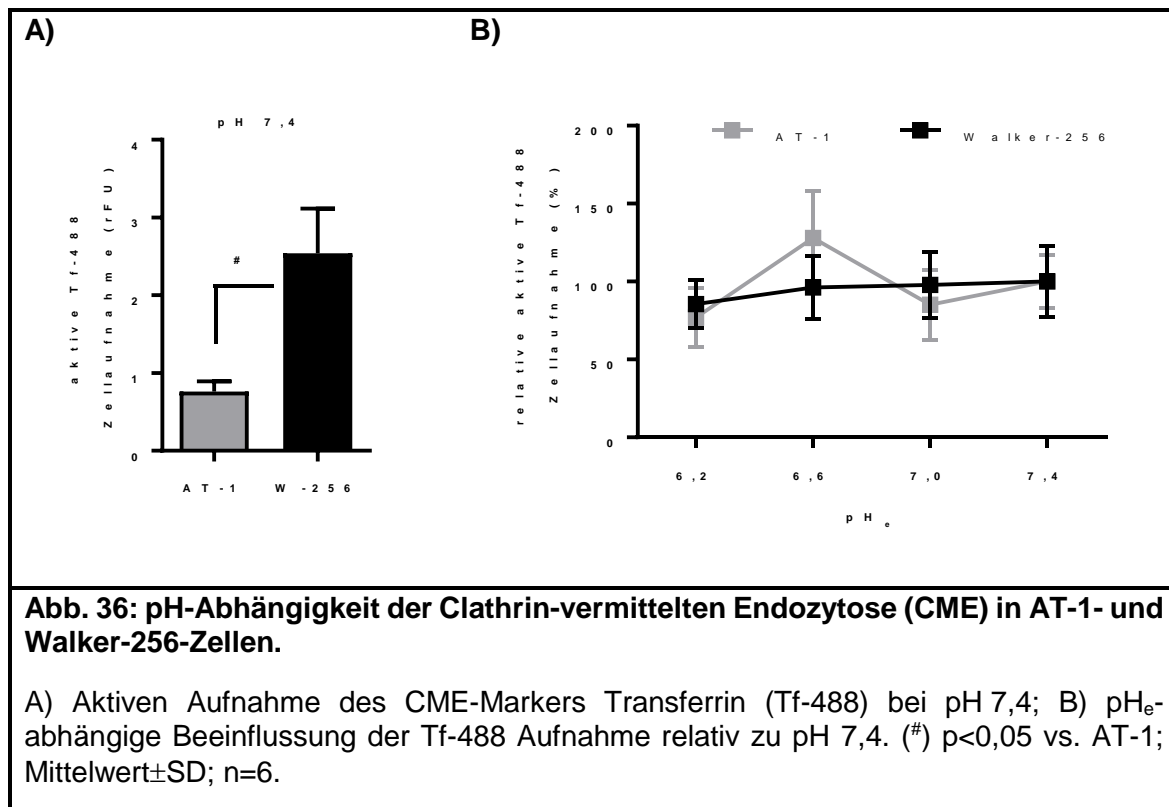


Abb. 35: Einfluss einer [Ca²⁺]_i Senkung induziert durch eine stark reduzierte [Ca²⁺]_e auf die aktive Aufnahme des 70 kDa Dextrans (Dex-70).

Graue und schwarze Säulen: Kontrollbedingungen (pH 7,4), orange und rote Säulen: extrazelluläre Azidose (pH 6,6); Mittelwert±SD; n=6-12; (*) p<0,05 vs. pH 7,4 + 1,2 mM Ca²⁺.

5.2.4.4. Einfluss des pH_e auf die Clathrin-vermittelten und Cholesterol-abhängigen Endozytose

Die Dynamin-abhängige, Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) wurde über die zelluläre Aufnahme von Alexa Fluor 488 konjugiertem humanem Transferrin (Tf-488) nachgewiesen. Als Marker für die Cholesterol-abhängige Endozytose diente die mit Alexa Fluor 488 konjugierte, nicht toxische β -Untereinheit des Cholera-toxins (Ctb-488). Die Aufnahmen wurden ebenso wie die Dex-70 Aufnahme mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.



In **Abb. 36** ist die Clathrin-vermittelte Endozytose in beiden Zelllinien dargestellt. Zunächst zeigte sich, dass Walker-256 Zellen unter Kontrollbedingungen eine etwa 3-fach stärkere Aufnahme über diesen Endozytoseweg aufwiesen als AT-1 Zellen. Dieser Aufnahmemechanismus war jedoch in beiden Zelllinien unabhängig vom pH_e . Die Cholesterol-abhängige Endozytose (gemessen über die zelluläre Ctb-488-Aufnahme) war nach 3 h Inkubation in AT-1 Zellen im Mittel 17-fach höher als in Walker-256 Zellen (**Abb. 37**). In AT-1 Zellen war diese Aufnahme unabhängig vom extrazellulären pH-Wert. In Walker-256 Zellen hingegen zeigte sich bei ausgeprägter Azidose (pH 6,2) eine signifikante Steigerung dieses Endozytoseweges um 139 ± 11 %.

Somit ist die Makropinozytose, zumindest unter mäßig azidotischen Bedingung (bis etwa pH 6,6), der einzige der drei untersuchten Aufnahmewege, der eine pH-Abhängigkeit aufweist.

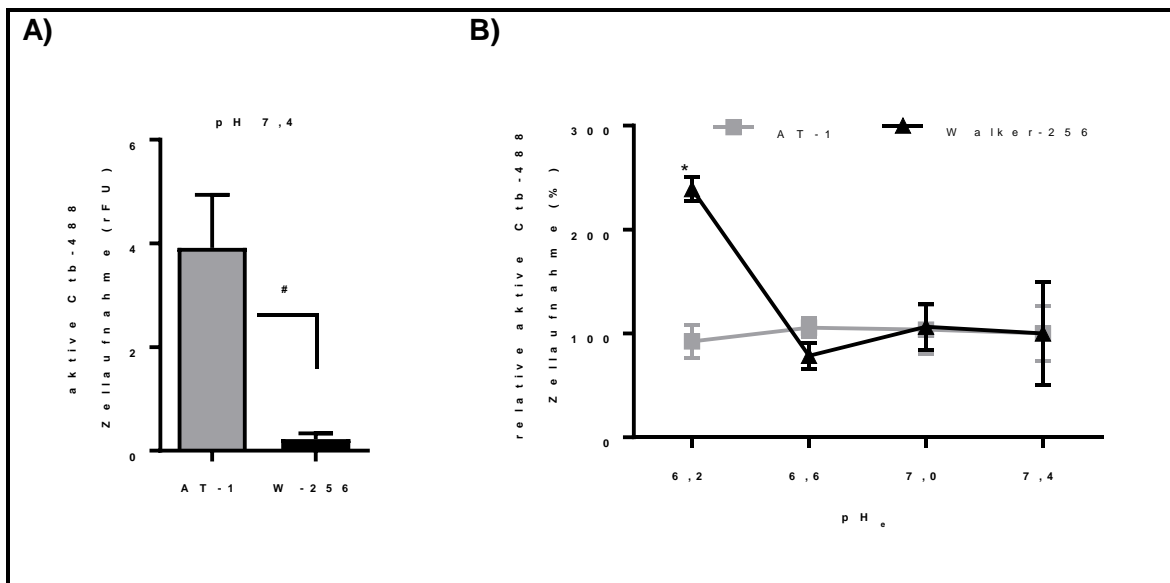


Abb. 37: pH-Abhängigkeit der Cholesterol-abhängigen Endozytose AT-1- und Walker-256-Zellen.

A) Aktive Aufnahme des Markers der Cholesterol-abhängigen Endozytose Choleratoxin- β (Ctb-488) bei pH 7,4; B) pH_e -abhängige Ctb-488 Aufnahme relativ zu pH 7,4, (#) $p < 0,05$ vs. AT-1; Mittelwert \pm SD; $n=6$.

5.2.4.5. Einfluss der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Clathrin-vermittelte bzw. Cholesterol-abhängige Endozytose

Auch für die Clathrin-vermittelte bzw. Cholesterol-abhängige Endozytose sollte untersucht werden, ob die $[Ca^{2+}]_i$ einen Einfluss hat. Die Messung der CME mittels Tf-488 ergab, dass in beiden Zelllinien die $[Ca^{2+}]_i$ sowohl unter Kontrollbedingungen (pH 7,4) als auch unter azidotischen Bedingungen (pH 6,6) nur eine untergeordnete Rolle spielt (**Abb. 38**).

Sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 6,6 (**Abb. 39**) war der Cholesterol-abhängige Endozytoseweg in den AT-1 Zellen unabhängig von einer intrazellulären Ca^{2+} -Depletion. In den Walker-256 Zellen hingegen wurde unter azidotischen Bedingungen und zusätzlicher Absenkung des $[Ca^{2+}]_i$ signifikant weniger Ctb-488 ($-65 \pm 38\%$) aufgenommen (**Abb. 39**). Offensichtlich spielt in Walker-256 Zellen die $[Ca^{2+}]_i$ in einem azidotischen Milieu eine gewisse Rolle für diesen Endozytoseweg.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die $[Ca^{2+}]_i$ endozytosewegabhängig die zelluläre Aufnahme unterschiedlich beeinflussen kann.

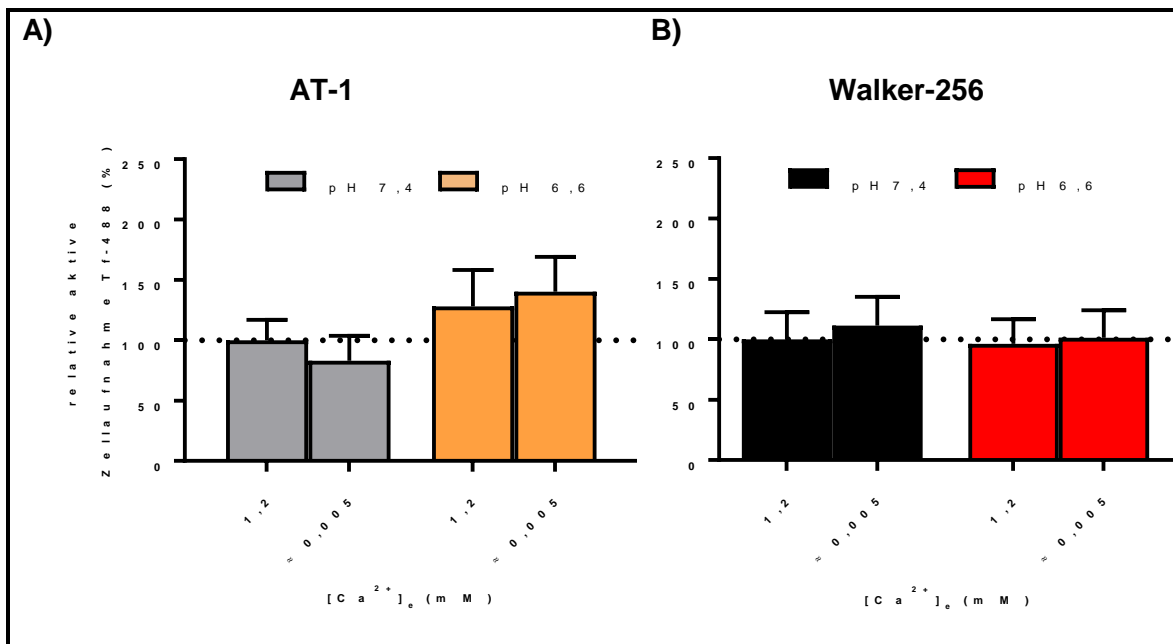


Abb. 38: Einfluss der Senkung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME).

Graue und schwarze Säulen: Kontrollbedingungen (pH 7,4), orange und rote Säulen: extrazelluläre Azidose (pH 6,6); A) AT-1 Zellen und B) Walker-256 Zellen; Mittelwert±SD; n=6-12; (*) p<0,05 vs. pH 7,4 + 1,2 mM Ca²⁺.

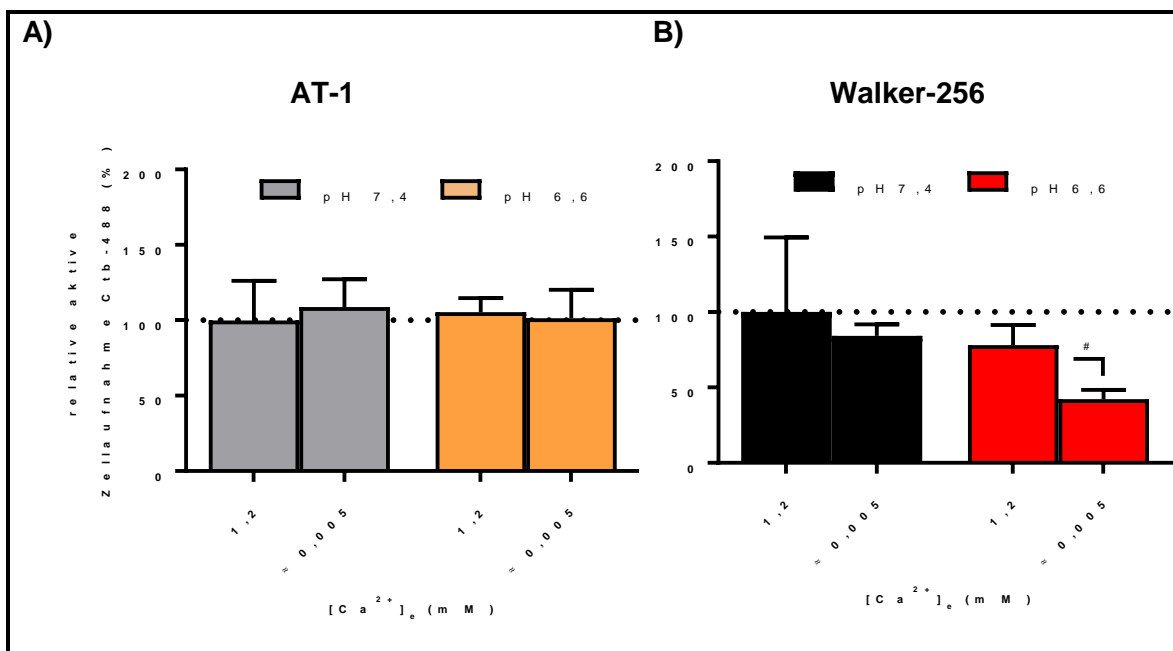


Abb. 39: Einfluss der [Ca²⁺]_i auf die Cholesterin-abhängige Endozytose.

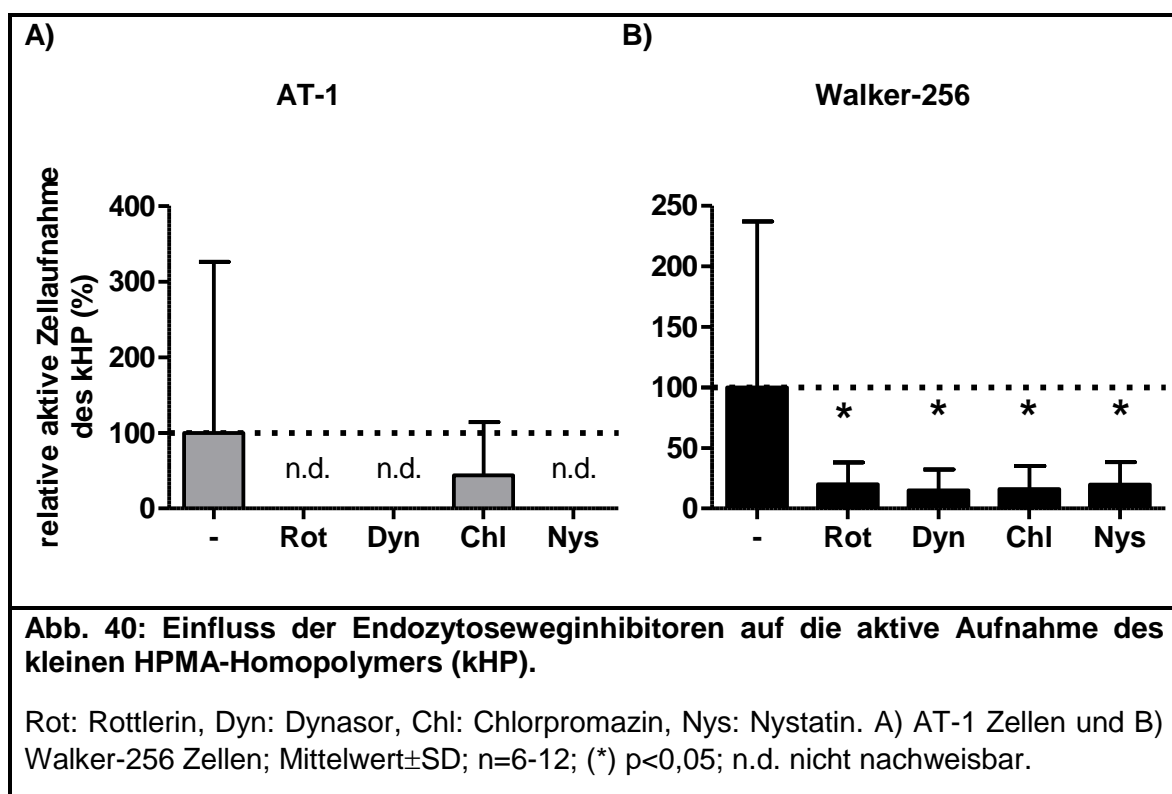
Graue und schwarze Säulen: Kontrollbedingungen (pH 7,4), rote Säulen: extrazelluläre Azidose (pH 6,6); A) AT-1 Zellen und B) Walker-256 Zellen; Mittelwert±SD; n=6-12; (*) p<0,05 vs. pH 7,4 + 1,2 mM Ca²⁺; (#) p<0,05 vs. pH 6,6 + 1,2 mM Ca²⁺.

5.2.5. Bedeutung der verschiedenen Endozytosemechanismen für die Zellaufnahme der HPMA-basierten Polymervarianten

Da es nicht eindeutig bestimmbar war, über welchen der drei Endozytosewege (Makropinozytose, Dynamin-abhängige Clathrin-vermittelte Endozytose, Cholester-abhängige Endozytose) die verschiedenen HPMA-Polymere vermutlich aufgenommen werden, wurde die intrazellulären Polymerkonzentrationen nach Inhibition der verschiedenen Endozytosewege bestimmt. Dafür wurde zur Hemmung der Makropinozytose Rottlerin (Rot), der Dynamin-abhängigen Wege Dynasor (Dyn), der CME Chlorpromazin (Chl) und der Cholester-abhängigen Wege Nystatin (Nys) eingesetzt.

5.2.5.1. Homopolymere

Wie in **Abb. 25** gezeigt, wurden die Homopolymere besser von den Walker-256 Zellen aufgenommen. In die AT-1 Zellen war die aktive Aufnahme der Homopolymere deutlich niedriger.



Für die Aufnahme der kleinen Homopolymeren (kHP) scheinen in beiden Zelllinien alle Endozytosewege von großer Bedeutung zu sein. Die Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren führte, außer unter der Verwendung von Chlorpromazin, zu einer signifikanten geringeren Aufnahme des kleinen Homo-Polymers (**Abb. 40**), wobei in AT-1 Zellen in vielen Fällen überhaupt keine Aufnahme mehr zu verzeichnen war. In den Walker-

256-Zellen führten alle vier Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme der kleinen Homopolymere um 80 bis 85 % (**Abb. 40**).

Für die großen Homopolymere (gHP) ergab sich zum Teil ein anderes Bild. In Walker-256 Zellen bewirkten alle Inhibitoren wiederum eine deutliche (z.T. signifikante) Reduktion der Polymeraufnahme und lässt somit auf eine Aufnahme über verschiedene Wege schließen. In AT-1 Zellen ergab sich jedoch für die großen Homopolymere ein gegensätzliches Bild.

Die Inkubation mit den Inhibitoren führte in AT-1-Zellen, im Gegensatz zum kleinen Homopolymer, zu einer generell sehr viel stärkeren Aufnahme des großen Homo-Polymers. Den größten Effekt zeigte die Inkubation mit Chlorpromazin, welches die Endozytose um 13190 ± 939 % verstärkte. Rottlerin erhöhte die zelluläre Aufnahme immerhin noch um 2421 ± 652 %, Dynasor um 858 ± 403 % und Nystatin um 1098 ± 147 % (**Abb. 41**). Eine derartige Steigerung ließ sich für kein anderes Polymer in keiner der Zelllinien nachweisen. Die Zunahme war aber durch Messwiederholungen reproduzierbar. Derzeit muss offenbleiben, worauf diese immense Zunahme ausschließlich des großen Homopolymers und nur in AT-1-Zellen durch die Inhibition aller Endozytosewege zurückzuführen ist.

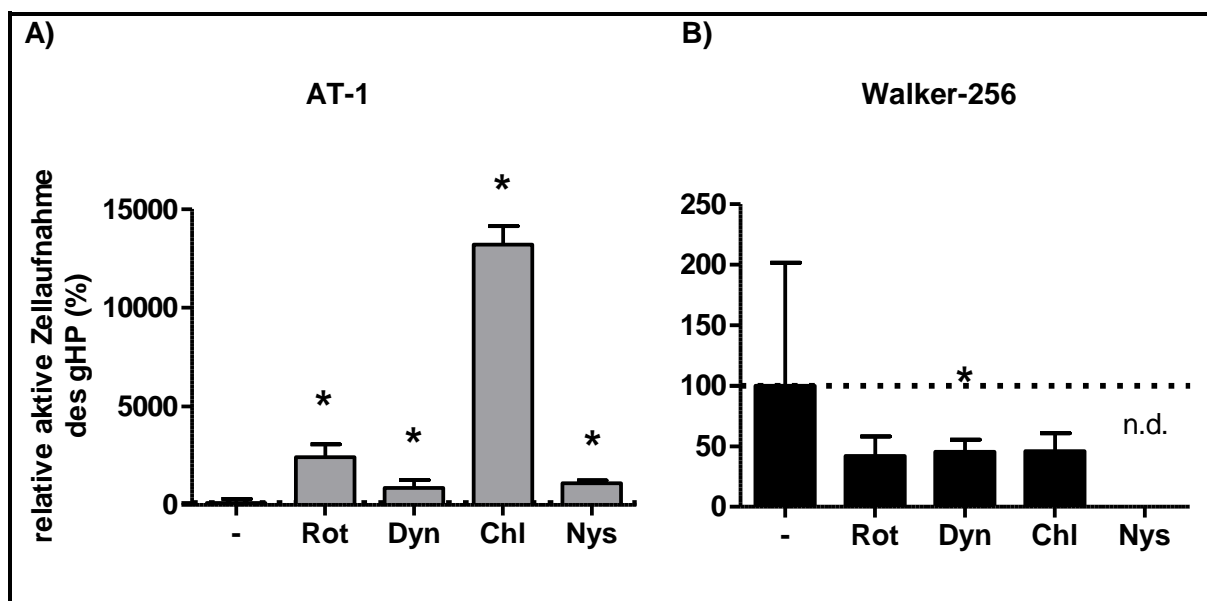
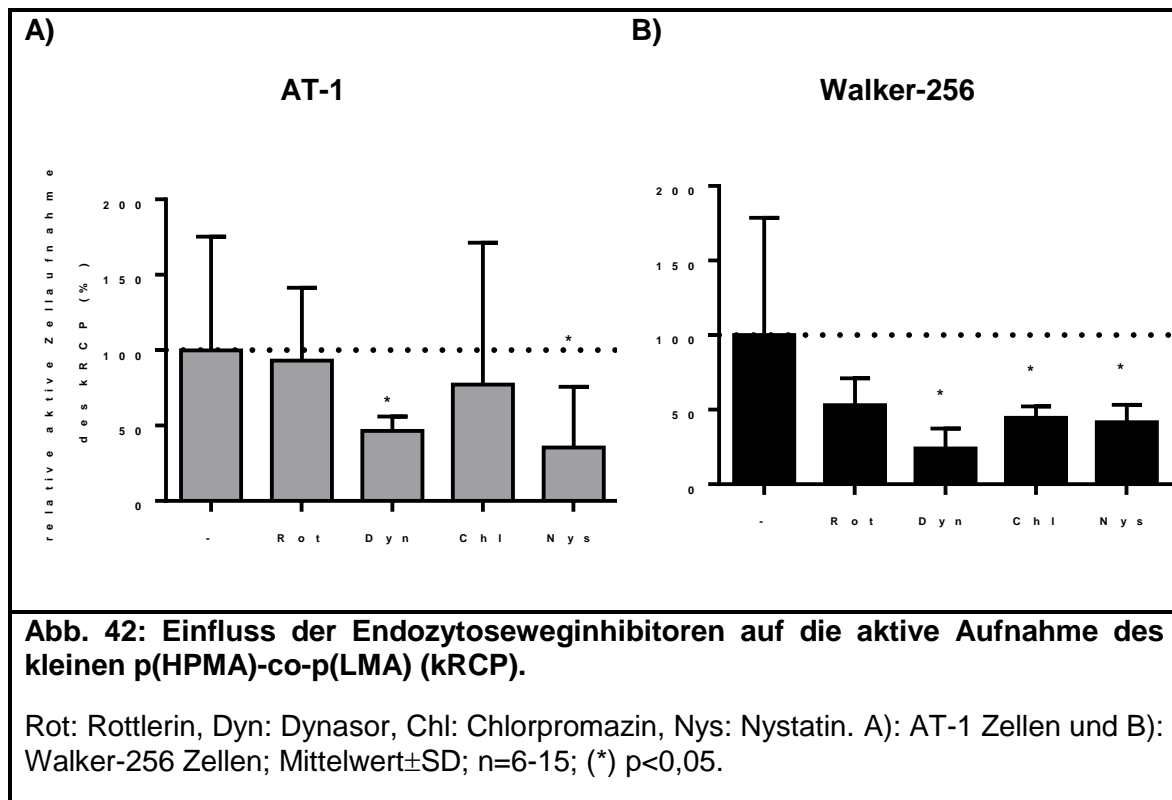


Abb. 41: Einfluss der Endozytoseweginhibitoren auf die aktive Aufnahme des großen HPMA-Homopolymere (gHP).

Rot: Rottlerin, Dyn: Dynasor, Chl: Chlorpromazin, Nys: Nystatin. A) AT-1 Zellen und B) Walker-256 Zellen; Mittelwert \pm SD; n=6-15; (*) p<0,05; n.d. nicht nachweisbar.

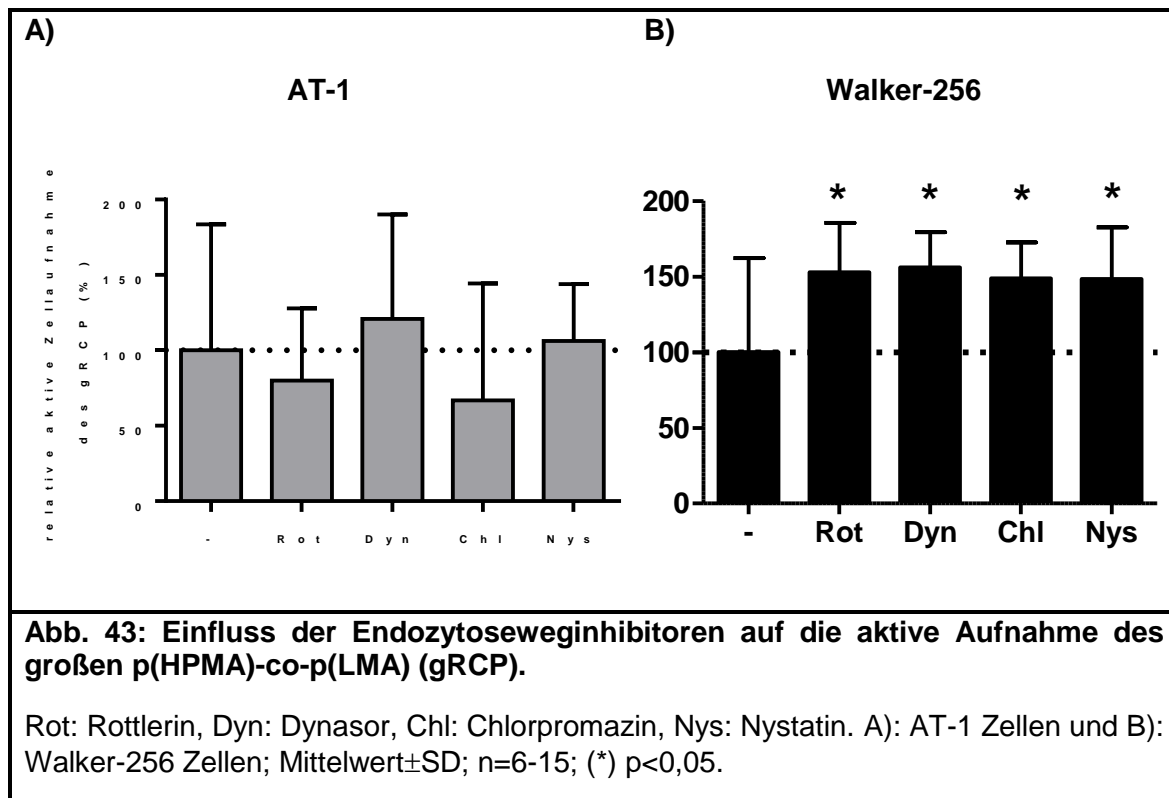
5.2.5.2. p(HPMA)-co-p(LMA)



In AT-1 Zellen war die Aufnahme des kleinen p(HPMA)-co-p(LMA) (kRCP) lediglich durch die Inhibierung des Dynamin- und des Cholesterol-abhängigen Endozytoseweges beeinflussbar. Eine Hemmung dieser beiden Mechanismen führte zu einer signifikant geringeren Aufnahme der kleinen Homo-Polymervariante in die Zellen (um 54 ± 10 % bei Hemmung des Dynamins und um 65 ± 40 % bei Cholesteroldepletion). Jedoch zeigte sich keine Abhängigkeit bei Hemmung der Makropinozytose und der CME (**Abb. 42**).

In Walker-256 Zellen (**Abb. 42**) führten wiederum drei der vier Inhibitoren zu einer signifikant geringeren Aufnahme um 50 bis 70 % des kleinen p(HPMA)-co-p(LMA). Die geringere Aufnahme über Makropinozytose war tendenziell gegeben. Dies könnte auf eine geringe Beteiligung der Makropinozytose bei der Aufnahme dieser Polymervariante nicht nur in die AT-1, sondern auch in die Walker-256, hindeuten, sollte aber durch eine höhere Stichprobenzahl bestätigt werden.

Wie in **Abb. 43** dargestellt, war das zelluläre Aufnahmeverhalten bei dem großen p(HPMA)-co-p(LMA) (gRCP) ganz anders. In AT-1 Zellen wurde dessen durch keinen der verwendeten Inhibitoren relevant beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von allen Inhibitoren zu einer mäßigen Zunahme der Aufnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) in die Walker-256 Zellen. Alle eingesetzten Inhibitoren steigerten dessen Aufnahme um ca. 50 %.



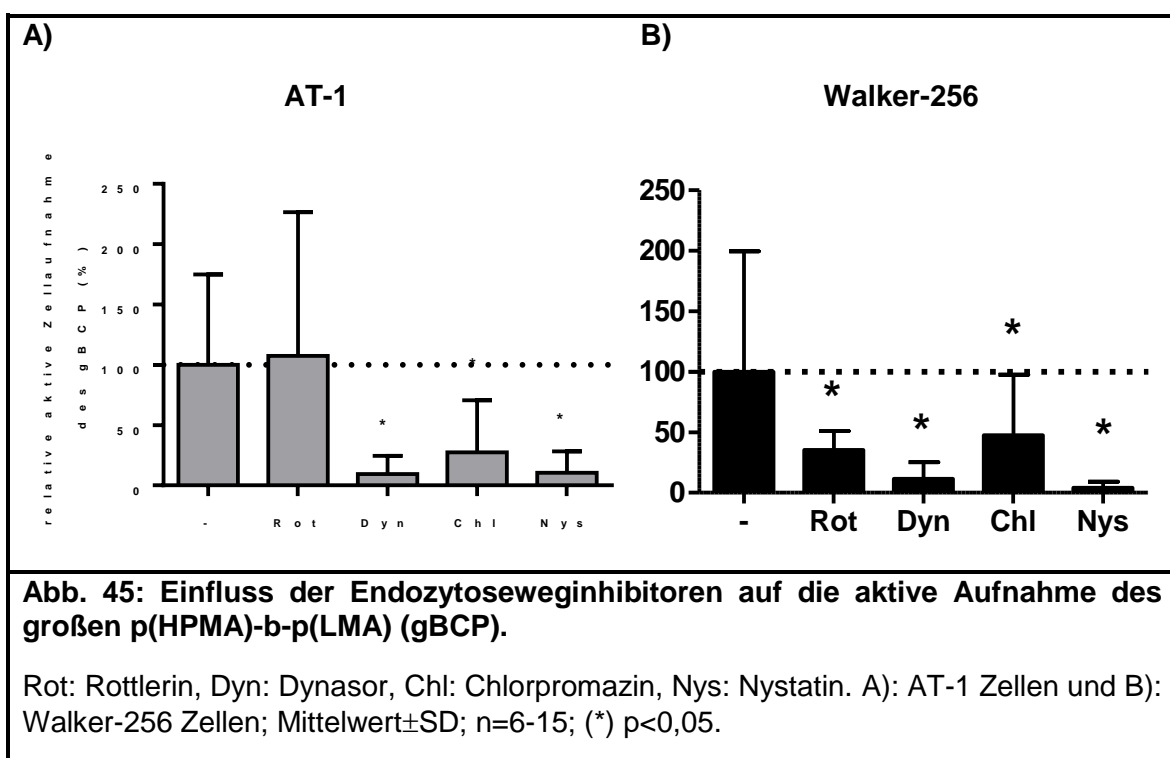
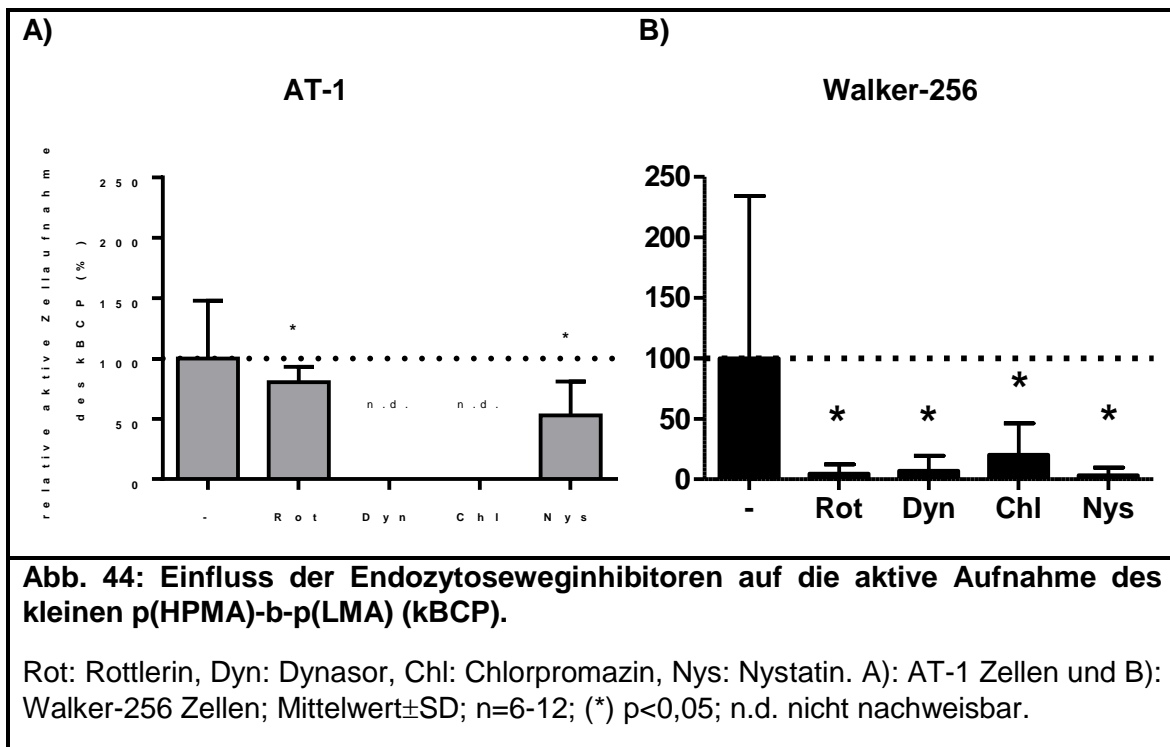
5.2.5.3. p(HPMA)-b-p(LMA)

Die p(HPMA)-b-p(LMA) sind aufgrund der Ausbildung einer geordneten Überstruktur mit hydrophilen Elementen auf der Außenseite von einer Hydrathülle umgeben. Sie besitzen jedoch einen deutlich größeren hydrodynamischen Radius als die ebenfalls hydrophilen Homopolymere.

Die Hemmung der verschiedenen Endozytosewege zeigten eindeutig, dass alle Inhibitoren die Aufnahme der kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) (kBKP) mehr oder weniger (jedoch stets statistisch signifikant) verminderten. In AT-1 Zellen führte die Hemmung der mittels Rottlerin zu einer Reduktion der Aufnahme der kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) um $20\pm 12\%$ und bei Cholesterin-Depletion um $47\pm 28\%$. Bei Dynamin-Inhibierung und bei Hemmung der Clathrin-Disassemblierung wurde die aktive Aufnahme sogar vollständig verhindert (**Abb. 44**).

Walker-256 Zellen nahmen durch den Einsatz aller 4 Inhibitoren signifikant weniger kleines Block-Copolymer auf, wobei die Aufnahme um 80% (Chlorpromazin) bis 97% (Nystatin) reduziert wurde (**Abb. 44**).

Vergleichbar zum kleinen p(HPMA)-b-p(LMA) verhielt sich die Aufnahme des großen p(HPMA)-b-p(LMA). In Walker-256 Zellen vermindert sich die Aufnahme durch alle vier Inhibitoren signifikant um 52% bis 96% (**Abb. 45**).



Bezüglich der Aufnahme des großen p(HPMA)-b-p(LMA) in AT-1 Zellen zeigte sich eine vermindert Endozytose nur bei Inhibition mit Dynasor, Chlorpromazin und Nystatin um 63 bis 91 % (**Abb. 45**). Eine Hemmung der PKC δ mittels Rottlerin hatten keinen Effekt auf die gBCP-Aufnahme. Somit scheint ebenso wie bei der aktiven Aufnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) eine Beteiligung der Makropinozytose eher unwahrscheinlich zu sein.

6. Diskussion

Polymere können als potentielle makromolekulare Wirkstofftransporter unter Ausnutzung des EPR-Effektes für eine effiziente, nebenwirkungsarme und personalisierte Tumorthherapie eine wichtige Rolle spielen. Wie in den vorangegangenen Studien gezeigt wurde hängt die effiziente tumorgewebeselektive Akkumulation neben den Wirkstofftransportereigenschaften, auch vom Tumortyp ab. So zeigte sich das z. B. die molekulare Struktur einen größeren Einfluß auf die Tumorakkumulation hatte als die Polymergröße. Auch zeigte sich, dass die großen p(HPMA)-co-p(LMA) eine bessere Akkumulation in Walker-256 Tumoren im Vergleich zu den AT-1 Tumoren aufwiesen. [101]

In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise für diese tumorspezifische Akkumulation verschiedener HPMA basierter Polymere (pHPMAs) untersucht. Diese umfasste im ersten Teil die Charakterisierung der *in vivo* Tumormodelle hinsichtlich des Tumorwachstums, der Gefäße, des IFPs, der Oxygenierung und des extrazellulären pH-Wertes. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die beiden Tumormodelle in der Zellkultur hinsichtlich der aktiven Aufnahme der pHPMA-Varianten untersucht. Der dritte Teil befasste sich mit dem Einfluss eines hypoxischen und eines azidotischen Mikromilieus auf die Aufnahme der pHPMA-Varianten in beide Zellkulturmodelle. Im vierten Teil wurden die Endozytosewege durch Inhibitorstudien und der Einfluss des hypoxischen und azidotischen Mikromilieus auf diese näher betrachtet und mit der zellulären Aufnahme der pHPMAs verglichen.

6.1. Vergleich der *in vivo* Tumormodelle

6.1.1. Wachstum

Die gewählten Tumormodelle AT-1 Dunning 3327 (Prostatakarzinom der Ratte) und Walker-256 (Mammakarzinom der Ratte) sind schnell wachsende syngene Tumormodelle (**Abb. 12**). Die Vorteile sind neben der Verwendung von immunkompetenten Tieren, auch die Robustheit solcher Tumormodelle. Diese umfasst eine sehr gute Anwachsrate und konsistente Wachstumskurven, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit von Ergebnissen bei einem geringen Tiereinsatz erreicht wird. Nachteile sind unter anderem, dass keine Langzeitversuche (z. B. über mehrere Wochen oder Monate) möglich sind und die Tumore durch die heterotope Implantation der Tumorzellen einem nicht-ursprünglichen Milieu ausgesetzt sind. Beide erwähnten Nachteile spielen für die Fragestellungen eine eher untergeordnete Rolle. In dieser Arbeit sollten Hinweise für die beobachteten Unterschiede in der pHPMA-Akkumulation [101] in beiden Tumormodellen gesammelt werden.

6.1.2. Gefäße

Die anormale intratumorale Gefäßstruktur führt zu einem EPR-Effekt, welcher für eine erhöhte Akkumulation von Makromolekülen im Tumorgewebe verantwortlich ist [20, 33].

Neben einer schlechten Drainage spielt auch die Gefäßdichte eine Rolle. Diese war in den Walker-256 Tumoren 3,5-fach höher als in den AT-1 Tumoren (**Abb. 13**). Dies könnte einen ersten Hinweis auf die tumorabhängigen Akkumulationsunterschiede der HPMA Polymere geben. Ähnliche Gefäßdichten für die AT-1 Tumoren wurden z. B. von *Zhao et al.* und für die Walker-256 Tumoren von *Guerin et al.* nachgewiesen [178, 179]. Jedoch spielen neben der Gefäßdichte für die effektive Tumorakkumulation von makromolekularen Wirkstofftransportern weitere Faktoren eine wichtige Rolle. So hängt der Übergang von makromolekularen Wirkstofftransporter in den interstitiellen Raum auch von der Gefäßpermeabilität, der Perfusion und des interstitiellen Flüssigkeitsdruck ab [48, 180].

Unter Verwendung von ^{51}Cr markierten Erythrozyten und ^{125}I markiertem humanen Serumalbumin ermittelten *Song et al.* ein intravaskuläres Volumen von 0,0079 ml/g Tumorgewebe und eine Plasmaextravasation von $0,59 \pm 0,05$ ml/g Tumorgewebe/h in Walker-256 Tumoren und beschrieben die tumorassoziierten Blutgefäße als sehr permeabel [181]. Die vergleichenden Untersuchungen zwischen den AT-1 und Walker-256 Tumoren zu der Extravasation unterschiedlich großer Dextrane zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tumormodellen (**Abb. 13**). Die *in vivo* beobachteten Unterschiede der Polymeranreicherung in AT-1 und Walker-256 Tumoren können somit nicht auf unterschiedlich permeable Gefäße zurückgeführt werden.

Die konvektive Extravasation von Makromolekülen wird aber auch durch den IFP beeinflusst. Es zeigte sich jedoch, dass der IFP (**Abb. 14**) nur bei kleineren Tumoren zwischen 0,5 ml und 1,1 ml Volumen signifikante Unterschiede zwischen beiden Tumormodellen aufwies, bei größeren nicht. Der IFP von $11,3 \pm 4,5$ mmHg in Walker-256 Tumoren war vergleichbar mit den von *Boucher et al.* (1990) gefundenen Werten [43], mit dem Unterschied dass in der vorliegenden Arbeit zwar ein Trend aber kein signifikanter tumorgrößenabhängiger IFP in diesem Tumormodell zu verzeichnen war.

Das heißt, die tumortypabhängige Polymeranreicherung könnte durch die höhere Gefäßdichte, aber nicht durch eine bessere Extravasation und Unterschiede im IFP begünstigt werden.

6.1.3. Tumoroxxygenierung und extrazellulärer pH

Des Weiteren wurden die physiologischen Parameter Oxygenierung und pH_e der beiden Tumormodelle verglichen. In Tumoren weichen diese physiologischen Parameter meist von den Normwerten ab und können Einfluß auf den chemotherapeutischen Erfolg, z. B. durch die Hyperaktivierung von Effluxmechanismen in Tumorzellen, nehmen [84, 182, 183]. Ebenso kann eine metabolische Hypoxie zu gravierenden Veränderung im Proteom und Energiehaushalt führen [184]. In **Abb. 46** sind kritische pO_2 -Werte, die mit solchen Veränderungen einhergehen aufgeführt.

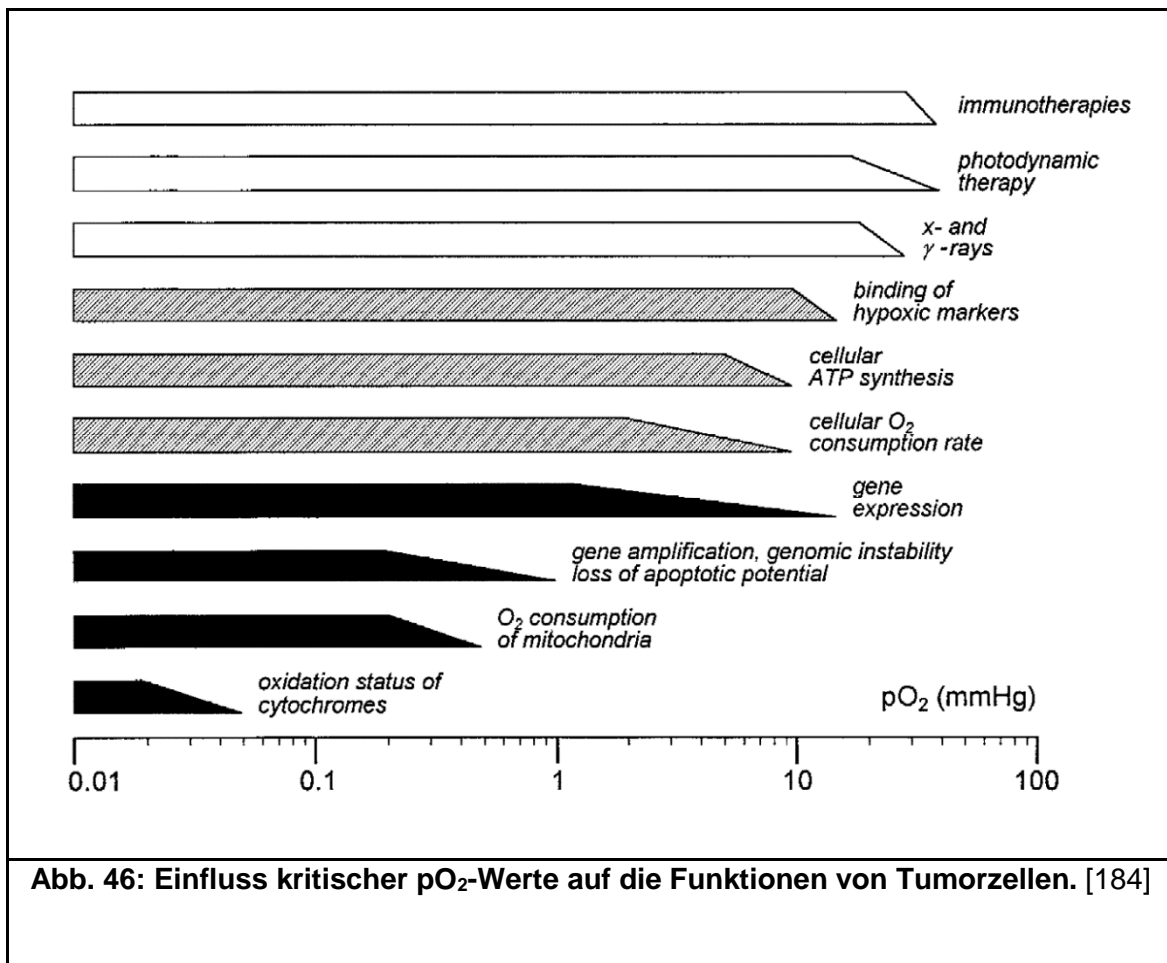


Abb. 46: Einfluss kritischer pO_2 -Werte auf die Funktionen von Tumorzellen. [184]

6.1.3.1. Einfluß des O_2 -Anteils im Atemgas auf die Oxygenierung der Tumoren

Die Verwendung von Hypoxiemarkern, die von der Verbindung 2-Nitroimidazol abgeleitet werden, beruhen auf der irreversiblen intrazellulären Bindung dieser Derivate an Peptidthiole unter hypoxischen Bedingungen, die nur unter hypoxischen Bedingungen ausreichend lange stabil sind, um binden zu können [73, 185, 186]. Um die Bindung dieser Hypoxie-Marker quantifizieren zu können, kommen unter anderem dafür bildgebende Verfahren wie der Positronen-Emissionstomographie zur nicht-invasiven Darstellung des Oxygenierungsstatus von Tumoren (z. B. ^{18}F -Misonidazol, usw.) zum Einsatz [187, 188]. Eine andere Methode, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, beruht auf einem immunhistochemischen Nachweisverfahren. Dabei wurde das 2-Nitroimidazol-Derivat Pimonidazol 90 min vor Versuchsende appliziert und anschließend Gewebedünnschnittschnitte angefertigt, welche im Nachhinein mittels eines fluoreszenzgekoppelten anti-Pimonidazoladduktantikörpers sichtbar gemacht wurden. Der Vorteil der immunhistochemischen Nachweismethoden hypoxischer Regionen liegt in einem detaillierten Vergleich mit der Gewebehistologie auf mikroskopischer Ebene, gibt auf der anderen Seite aber nur relative Informationen über den Gewebe pO_2 wieder. Pimonidazol wird auch in der klinischen Anwendung als exogener Hypoxie-Standardmarker verwendet [189].

Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass die intratumorale Oxygenierung sehr heterogen ausgeprägt ist und Tumorbereiche mit klinisch relevanten pO_2 Werten unter 10 mmHg nachweisbar waren (**Abb. 15**). Der Anteil an hypoxischen Regionen änderte sich zudem bei der Inspiration von 8 % O_2 (Hypoxiegas) und 100 % (Hyperoxiegas) Zelllinien-abhängig in unterschiedlichem Ausmaß. Die höchste Pimonidazolbindung zeigten die AT-1 Tumoren (mit ca. 54 % des Tumors) unter hypoxischen Atemgasbedingungen und die niedrigste die Walker-256 Tumoren unter hyperoxischen Atemgasbedingungen (ca. 7,5 % des Tumors). Im Vergleich zu den AT-1 Tumoren, bei denen sogar unter Atmung von reinem O_2 noch durchschnittlich 37 % des Tumorgewebes als hypoxisch anzusehen waren, kann man die Walker-256 Tumoren mit 20 % hypoxischen Tumoranteil unter normoxischen Atemgasbedingungen als relativ gut oxygeniert betrachten. *Zhao et al.* konnten in AT-1 Tumoren mit der gleichen Methode zeigen, dass der hypoxische Anteil in AT-1 Tumoren ca. 18 % beträgt [178]. Die unterschiedlichen Werte im Vergleich zur vorliegenden Arbeit könnten auf eine Abhängigkeit der Probenaufbereitung hinweisen, da sich diese unter anderem von der hier verwendeten in der Gewebeschnittdicke (8 μm vs. 6 μm), der Verwendung anderer sekundärer Antikörper (Fluoreszenz vs. HRP) und in der Konservierung (Kryokonservierung vs. Paraformaldehyd) unterschieden. Auch könnte die Wahl der Narkose (Pentobarbital vs. Ketamin/Isofluran + Raumluft oder 100% O_2) eine Rolle spielen [190]. Somit sind die direkten Ergebnisse der Pimonidazol-basierten Nachweise nur beschränkt miteinander vergleichbar. Auf der anderen Seite ähneln die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte der hypoxischen Fraktion (37 %) unter Atmung von 100% O_2 sehr denen von *Zhao et al.* ermittelten Werten der HF_{10} Fraktionen (< 10 mmHg pO_2) mittels der FREDOM (Fluorocarbon Relaxometry Using Echo Planar Imaging for Dynamic Oxygen Mapping) – Methode (24-59 mmHg pO_2). Der Vergleich mit der intertumoralen Oxygenierung von humanen Tumoren zeigt, dass auch diese sehr heterogen ausgeprägt ist [191]. Es konnte zudem eine gute Korrelation zwischen der ermittelten hypoxischen Tumorregionen mittels des immunhistochemischen Pimonidazoladduktnachweises und der genau ermittelten pO_2 -Werte mittels ESR und fluoroptischen Methode nachgewiesen werden (**Abb. 20**). Somit kann das Walker-256 Tumormodell stellvertretend für gut oxygenierte und das AT-1 Modell stellvertretend für hypoxische Tumore angesehen werden.

Die zeitlichen Verläufe der Tumoroxygenierung zwischen schnellwechselnden inspiratorischen Gasen von 21 % O_2 (Raumluft) zu 8 % O_2 Anteil und dann zu 100 % O_2 Anteil ließen sich mit der ESR-Oxymetrie und der invasiven fluoreszenzbasierten Oxymetrie mit einer guten zeitlichen Auflösung verfolgen (**Abb. 17** und **Abb. 19**). Beide Methoden zeigten dabei eine sehr schnelle Anpassung der intratumoralen pO_2 Werte innerhalb von 5 min an die verschiedenen Inspirationsgase. Der Vorteil von den verwendeten Optoden liegt in der zeitlichen Auflösung von bis zu einer Sekunde und einer Genauigkeit von $\pm 0,7$ mmHg. Nachteile liegen in der ungenauen Ermittlung von pO_2 -Werten über 100 mmHg und einer punktuellen Darstellung (1 mm^2 Aufnahmefläche) des Tumorgewebe pO_2 . Die ESR-Oxymetrie ermöglichte hier zeitliche Auflösungen im Bereich von 30 bis 300 s und einen

gemittelten pO_2 aus einem größeren Tumolvolumen von einigen mm^3 . Zudem sind repetitive Messungen über mehrere Tage hinweg mittels nicht-invasiven Methoden wie der ESR-Oxymetrie unproblematisch. Die ermittelten pO_2 -Werte (**Abb. 16** und **Abb. 18**) der AT-1 Tumoren unter Inspiration von normoxischen Atemgasen und 100 %-igen O_2 waren nicht vergleichbar mit den von *Zhao et al.* ermittelten. Sie konnten mittels Magnetresonanz Bildgebung durch Verwendung der FREDOM – Methode pO_2 -Werte zwischen 3 bis 8 mmHg wie sie in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden unter normoxischen Atemgasbedingungen nur in großen Tumoren zwischen 1,5 und 3 cm^3 feststellen. In Tumoren mit einem vergleichbaren Volumen von $<1,5 cm^3$, wie sie hier verwendet wurden konnten sie mit FREDOM Methode intratumorale pO_2 Werte von ca. 10 mmHg nachweisen. Auch war die Tumoroxygenierung in den Tumoren $<1,5 cm^3$ Volumen mit ca. 62,4 mmHg bei der Atmung von 100 % O_2 um das 3-fache höher als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte [178]. Dies könnte nicht nur eine Folge der verwendeten Narkosemittel wie es weiter oben schon erwähnt wurde sein, sondern auch eine Folge bei der von *Zhao et al.* verwendeten FREDOM-Methode. die Folge von Partialvolumeneffekte (Signalkombination von Blutgefäßen und Tumorgewebe in einem Voxel) bei der durch die grobe räumliche Auflösung (1,25 mm/Voxel) gerade in kleinen Tumoren zurückzuführen sein. Polarografisch ermittelte intratumorale pO_2 Werte in 1,5 - 2 ml großen AT1-Tumoren, waren dahingegen vergleichbar mit den hier ermittelten $<3 mmHg$, 1 mmHg und 12 mmHg unter inspiratorischer Normoxie, Hypoxie und Hyperoxie [192]. Die Oxygenierung der Walker-256 Tumore unter normoxischen Atemgasbedingungen waren vergleichbar mit den Literaturdaten ($32.9 \pm 6.7 mmHg$) [193].

Der Vergleich der beiden Tumorlinien in der vorliegenden Untersuchung zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten sowohl bezüglich der Oxygenierung als auch bei der Vaskularisierung. Ein Zusammenhang der Oxygenierung mit der Gefäßdichte liegt daher nahe, da sich mit zunehmenden Gefäßabstand auch die Gewebeoxygenierung verschlechtert [53, 194]. Dies spiegelt sich auch in der besseren Oxygenierbarkeit der Walker-256 Tumore im Vergleich zu den AT-1 Tumoren wieder. Dies deutet auch auf eine bessere Tumorperfusion der Walker-256 Tumore hin. In **Tab. 15** sind die Ergebnisse hinsichtlich der Tumoroxygenierung in AT-1 und Walker-256 Modellen unter den verschiedenen inspiratorischen Atemgasbedingungen zusammengefasst.

Die Aussagekraft der unterschiedlichen Methoden zur Charakterisierung der Oxygenierung der Tumorgewebe hängt von den jeweiligen Fragestellungen ab. Prinzipiell zeigen alle verwendeten Methoden, dass die AT-1 Tumoren schlechter oxygeniert sind und sich auch schlechter als die Walker-256 Tumoren durch die Inspiration von reinem O_2 oxygenieren lassen.

Der *ex vivo* Nachweis von Pimonidazoladdukten lässt Aussagen über eine momentane Oxygenierungsverteilung im Tumorgewebe bzw. in Tumorgewebebiopsien zu. Diese sind für einige klinische Anwendungen, wie der Strahlentherapie und auch einige

Chemotherapien von Bedeutung [195], da kritische pO_2 -Werte, welche die Effektivität dieser Therapieform negativ beeinflussen unter 10 mmHg liegen [185, 196].

Die Implantation von ESR-Sonden im Tumorgewebe ist für die klinische Anwendung begrenzt geeignet. Für *in vivo* Modelle in präklinischen Untersuchungen sind die hier verwendeten verkapselten ESR-Sonden durch die gute Verträglichkeit und die Möglichkeit der nicht-invasiven repetitiven Tumoroxymetrie in oberflächennahen Tumoren bis zu einer Tiefe von ca. 10 mm unter der Haut sehr nützlich. Ein großer Vorteil ist die hohe Sensitivität, der ESR-Sonden welche ebenso wie die der Optoden gerade bei niedrigen pO_2 -Werten noch zunimmt und dabei eine Genauigkeit wie bei diesen unter 1 mmHg aufweist. Damit wird eine genaue quantitative Bestimmung des pO_2 im Gewebe ermöglicht. Eine zeitliche Auflösung im Minutenbereich lässt auch die Darstellung von pO_2 Verläufen der Tumoroxygenierungsstudien sowohl in Kurzzeitversuchen, als auch Langzeitversuchen zu. Durch die homogene Verteilung der Sonden in der vorliegenden Untersuchung durch Implantation zusammen mit den implantierten Tumorzellen, wäre auch eine Darstellung der heterogenen Tumoroxygenierung (O_2 -Mapping) möglich. [176, 197]

Die fluoroptische Bestimmung des pO_2 in den Tumormodellen mittels des Oxylite-Systems beschränkt sich im Gegensatz zu der ESR-Methode auf ein sehr kleines Volumen ($\approx 1 \text{ mm}^2$ vs. $\approx 125 \text{ mm}^3$) in den Tumoren und ist somit nur bedingt für die Bestimmung des mittleren pO_2 des gesamten Tumors aussagekräftig. Der Vergleich mit der ESR-Methode zeigt jedoch, mit Ausnahme der AT-1 Tumoren bei Inspiration von reinem O_2 , sehr ähnliche Ergebnisse. Die Unterschiede könnten durch die inter- und intratumorale Heterogenität der Tumoroxygenierung erklärt werden, welche durch die Pimonidazolversuche deutlich wurde. Diese Heterogenitäten werden durch die größeren Messvolumina bei der ESR-Oxymetrie stärker herausgemittelt. Auch ist ein O_2 -Mapping mit dieser Methode nicht möglich. Ein Vorteil der fluoroptischen Bestimmung ist die sehr hohe zeitliche Auflösung und eine hohe Sensitivität bei niedrigen pO_2 Werten.

Weitere Möglichkeiten der Tumoroxymetrie sind z. B. durch polarografische Sauerstoffelektroden (invasiv), bildgebende Verfahren mit ^{18}F markierte Misonidazolderivate wie ^{18}F -MISO und Fluoroazomycinarabinside wie ^{18}F -FAZA mittels Positronenemissionstomografie (PET) oder diverse Methoden mittels Magnetresonanzbildgebung, wie „Blood Oxygen Level-Dependent“ (BOLD) oder die schon erwähnte ^{19}F -Hexafluorbenzen-basierte Bildgebung durch Magnetresonanztomographie, usw. [197].

Tab. 15: Zusammenfassung der Methoden zur Bestimmung der intratumoralen pO₂;
(schwarz) gemessene Werte in mmHg und (blau, kursiv)

	Methode zur Analyse der Gewebeoxygenierung	[O ₂] in Atemluft		
		21 %	8 %	100 %
Walker-256	Pimonidazol (% Tumor)	20±10	43±22	7,5±13
	(%)	100±50	23±22	- 13±13
	Fluoro-optische Nadelsonden (mmHg)	21±12	3±4	95±15
	(%)	100±57	- 86±16	226±72
AT-1	ESR (mmHg)	38±20	4±2	104±38
	(%)	100±53	- 90±6	275±100
	Pimonidazol* (%)	-	-	-
AT-1	Fluoro-optische Nadelsonden (mmHg)	1,1±2,1	0,1±0,3	3±3
	(%)	100±194	- 91±25	291±291
	ESR (mmHg)	1,6±0,7	1,0±0,7	16±17
	(%)	100±39	- 38±25	994±1043

*- Berechnung der prozentualen Werte nicht möglich da kein Normoxiewert bestimmt wurde

6.1.3.2. Einfluß des inspiratorischen O₂ Gehaltes auf den Blutdruck, die Tumorperfusion und den Gefäßwiderstand

Eine Zunahme der Tumorperfusion um 25% bei der Inspiration von reinem O₂, mit gesteigertem MABP und gleichbleibenden Gefäßwiderstand wurde unter anderem von *Thews et al.* beschrieben [22]. Ähnliches zeigten die Mittelwerte der Tumorperfusion auch in dieser Arbeit für beide Tumortypen (**Abb. 21**), nur waren die Standardabweichungen zu groß um signifikante Effekte nachzuweisen. Dahingegen konnte bei der Atmung des Hypoxiegases (8 % O₂-Anteil) ein signifikantes Absinken des mittleren arteriellen Blutdruckes (MABP) und der relativen Tumorgewebeperfusion (**Abb. 21**) beobachtet werden, der relative Gefäßwiderstand hingegen blieb konstant. Eine über 50 % verringerte Tumorgewebeperfusion bei einer akuten Hypoxie (Atmung von 8 % O₂ für 20 min) wurde schon vorher beschrieben [51]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tumorgewebeperfusion, ebenso wie die Tumoroxygenierung, innerhalb von 5 min nach dem Atemgaswechsel auf Hypoxiegas signifikant abfällt. Im Gegensatz zur Tumoroxygenierung erfolgt nach dem direkten Wechsel zu reinem inspiratorischen O₂ ein Anstieg der Gewebeperfusion auf das gleiche Niveau wie unter normoxischen Atemgasbedingungen.

6.1.3.3. Der extrazelluläre pH in Walker-256 und AT-1 Tumoren

Um an möglichst vielen Punkten den extrazellulären pH intratumoral zu bestimmen, wurde eine potentiometrische Sonde stufenweise in mehreren Kanälen in die Tumore eingebracht. Dadurch konnte die räumliche Heterogenität besser erfasst werden. Bei diesen Experimenten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den AT-1 (pH_e $7,05 \pm 0,19$) und Walker-256 Tumoren (pH_e $7,2 \pm 0,3$) nachgewiesen werden, wobei die AT-1 Tumoren im Mittel einen etwas niedrigeren extrazellulären pH aufwiesen. Die niedrigsten gemessenen pH-Werte lagen dabei unter 6,0. Die ermittelten extrazellulären pH-Werte waren vergleichbar mit den Literaturdaten [185, 200].

Weitere Methoden zur *in vivo* Darstellung des extrazellulären pH-Wertes stellen z.B. „Chemical Exchange Saturation Transfer“ (CEST) MRI basierten Methoden [199, 200] oder die PET basierte „pH Low Insertion Peptide“ (pHLIP) [201] dar. Wobei *Chen et al.* [201] mit dem ursprünglichen CT-Kontrastmittel Iopromid zeigte das ein mittlerer extrazellulärer Tumor pH-Wert mittels CEST zwischen 6,2 und 7,2 ermitteln lässt. Dahingegen konnte *Sheth et al.* [202] mit der PARACEST MRI Substanz Yb-DO3A-oAA unter Verwendung eines CEST-FISP Protokolls pH-Gradienten im Tumorgewebe gut darstellen. Vorteil von PARACEST Substanzen sind die selektiv detektierbaren CEST-Effekte durch die Kopplung von unterschiedlichen chemischen Gruppen, wodurch ratiometrische Messungen ermöglicht und konzentrationsabhängige Effekte umgangen werden. Die von *Sheth et al.* verwendete Substanz enthielt dabei einen Aminrest mit einem chemischen Shift von +10 ppm und einen Amidrest mit einem chemischen Shift von – 10 ppm. Nachteile ergaben sich bei *Sheth et al.* im Gegensatz zu *Chen et al.* dadurch, dass wegen der geringen Bioverfügbarkeit nach i.v. Gabe, das Kontrastmittel direkt in den Tumor appliziert werden musste. Die pHLIP Methode basiert auf ca. 38 Aminosäuren lange Peptidkette, welche bei einem $\text{pH}_e < 7,0$ fest in die Doppellipidschicht von Zellen integrieren. *V vere et al.* [203] zeigte erstmalig pH-Wert abhängige Tumorakkumulationsunterschiede eines ^{64}Cu -markiertes pHLIP Peptids. Nachteile zeigten sich vor allem in der unspezifischen Organverteilung und der geringen Tumoraufnahme, welche noch weiterer Optimierung bedürfen.

Thews et al. zeigten, dass eine verstärkte Azidose in AT-1 Tumoren mit extrazellulären pH-Werten $< 6,7$ eine geringere zytotoxische Wirkung des Chemotherapeutikums Daunorubicin bewirkte [183], welche in Zellkulturversuchen auf eine erhöhte Aktivität des p-Glykoproteins zurückgeführt werden konnte [183, 202]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Tumor-Anteil mit einem pH-Wert $< 6,7$ in den AT-1 Tumoren 9,0 % und in den Walker-256 Tumoren 8,5 % unter normoxischen Atemgasbedingungen betrug. Solche Tumorregionen könnten sich als resistent gerade gegen schwach basische Chemotherapeutika erweisen, da in diesen Regionen die Aufnahme/Diffusion des Chemotherapeutikums durch den pH-Gradienten zwischen extrazellulärem (pH niedrig) und intrazellulärem Raum (pH höher) erschwert wird [88]. Ebenso kann eine klonale Selektion von resistenten Tumorzellen durch transkriptionelle Veränderungen und die

Hyperaktivierung von Effluxmechanismen durch den azidotischen pH gefördert werden [177, 202, 203]. Auf der anderen Seite kann man die Tumorazidose nutzen um selektiv Wirkstoffe durch Spaltung pH sensitive Linker wie z. B. Hydrazone, von Nanotransportern freizusetzen und somit die Tumorselektivität von Wirkstoffen zu verbessern [102, 120, 204, 205].

6.2. Zelluläre Aufnahme von pHPMA

In der vorliegenden Arbeit wurde als erstes die Aufnahme von unterschiedlich modifizierten HPMA-basierten Polymeren unter physiologischen und anschließend der Einfluß von Hypoxie und Azidose auf die zelluläre Aufnahme dieser Polymere untersucht. Die Polymere waren aus rein hydrophilen Polymeruntereinheiten (Homo-Polymere), aus definierten hydrophilen und hydrophoben Blöcken (p(HPMA)-b-p(LMA)) oder aus zufällig zusammengesetzten hydrophilen und hydrophoben Polymeruntereinheiten (p(HPMA)-co-p(LMA)) zusammengesetzt.

6.2.1. Aufnahme der HPMA-basierten Polymere unter physiologischen Bedingungen

In den *in vivo* Versuchen zeigte sich eine bessere Akkumulation der großen Random- und p(HPMA)-b-p(LMA) in die Walker-256 Tumoren, im Gegensatz zu deren kleineren Polymervarianten. In den AT-1 Tumoren war, mit Ausnahme des großen p(HPMA)-b-p(LMA), die Polymeranreicherung dahingegen unabhängig von der Polymergröße [101, 104]. Der Vergleich mit den Zellaufnahmestudien unter physiologischen Bedingungen zeigte prinzipiell eine höhere Aufnahme in die Walker-256 Zellen. Die in den *in vivo* Versuchen signifikant bessere Aufnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) in die Walker-256 Tumore [101], konnte mit den Zellkulturansätzen unter physiologischen Bedingungen nicht erklärt werden. Die Ergebnisse der zellulären Aufnahme der HPMA-basierten Polymere korrelieren nur bedingt mit den *in vivo* Daten. In MCF-7 Zellen zeigten *Barz et al.*, dass die Aufnahme dieser Polymervarianten zum einem aktiv erfolgt, die großen Polymervarianten der p(HPMA)-b-p(LMA) und p(HPMA)-co-p(LMA) in höheren Konzentrationen innerhalb einer Stunde, im Vergleich zu den korrelierenden kleinen Polymervarianten, aufgenommen werden und dafür verschiedene Endozytosemechanismen in Betracht zogen [112]. Dies konnte in dieser Arbeit (**Abb. 25**) für die AT-1 Zellaufnahme bestätigt werden. Dahingegen waren keine signifikanten Unterschiede für die Aufnahme in die Walker-256 Zellen nachweisbar. Eine aktive zelluläre Aufnahme der Polymere konnte ebenso bestätigt werden. Im Unterschied zu *Barz et al.* wurde in dieser Arbeit die unspezifische Zellosoziation (Inkubation bei 4°C) der Polymere subtrahiert. Auf diese Weise konnte auf die aktive Polymeraufnahme durch den Bezug auf die Proteinmengen und somit auf Zellzahl quantifiziert (**Abb. 23**).

Liu et al. konnten anhand der LnCaP Sublinie C4-2 zeigen, dass vor allem das ζ -Potential von HPMA-basierten Polymeren für eine effektive zelluläre Aufnahme von Bedeutung ist. Dabei wurden Polymere mit einem positiven ζ -Potential besser von den Tumorzellen aufgenommen, als Polymere mit negativen ζ -Potential [206]. Die hier verwendeten pHPMA Typen besaßen ein negatives ζ -Potential, wie es bei *Mohr et al.* beschrieben wurde [207]. Des Weiteren können weitere Faktoren, wie der hydrodynamische Radius der Polymersuperstruktur, das Molekulargewicht bzw. die Größe der Polymerketten Einfluss auf die Biodistribution, biologische Halbwertszeit und den Exkretionsweg nehmen [104, 113, 208]. Somit war die Biodistribution und Anreicherung der Polymere im Tumorgewebe bei den *in vivo Versuchen* abhängig von der Polymerstruktur und den damit verbundenen physikochemischen Eigenschaften. In dieser Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme in Abhängigkeit des r_H und des M_W untersucht (**Abb. 27**). Dabei konnte aber nur eine gering positive Korrelation des r_H und gering negative Korrelation des M_W mit der aktiven Zellaufnahme in die Walker-256 Zellen, aber nicht in die AT-1 Zellen, gezeigt werden. Andere Arbeiten zeigten, dass die Partikelgröße Einfluss auf den Endozytoseweg und das subzelluläre Verteilung eine Rolle spielen können [131, 209], eine generelle Zellaufnahme aber nicht unbedingt von der Partikelgröße abhängig ist. So konnten *Gratton et al.*, eine makropinozytische Aufnahme von bis zu 5 μm großen PRINT Partikeln in HeLa Zellen nachweisen [163].

Die Voruntersuchungen zeigten, dass durch eine Pegylierung der p(HPMA)-b-p(LMA) die Tumorakkumulation positiv beeinflusst wurde. Dahingegen zeigten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass in Abhängigkeit des Pegylierungsgrades die Tumorzellaufnahme der Polymere durchaus behindert werden kann (**Abb. 26**). Dabei zeigte sich *in vivo* eine fast proportionale Zunahme der akkumulierten Menge von diesen Polymeren mit zunehmenden Pegylierungsgrad (0%, 1%, 5%, 7%, 11% an 2000 Da PEG) [117]. Somit konnte durch die Pegylierung von Nanopartikeloberflächen eine verlängerte biologische Halbwertszeit (Verfügbarkeit im Blutpool) und eine geringe Überführung über das retikuläre endotheliale System in das Knochenmark, die Milz und die Leber erreicht werden [210]. Die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme zeigten dahingegen nur eine signifikant bessere Aufnahme des großen p(HPMA)-b-p(LMA) mit 1% PEG Anteil in die AT-1 Zellen und eine signifikant geringere Aufnahme des großen p(HPMA)-b-p(LMA) mit 7 % PEG Anteil in beide untersuchten Tumorzelllinien.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den *in vivo* Untersuchungen mit den hier erlangten Ergebnissen aus der Zellkultur zeigte sich, dass Polymereigenschaften, welche eine Akkumulation im Tumorgewebe z. B. wie eine Pegylierung begünstigen, auf der anderen Seite die Polymeraufnahme in die Tumorzellen erschweren können. Des Weiteren können andere Faktoren wie die Gefäßdichte und physiologische Parameter eine wichtige Rolle für die Anreicherung der Polymere spielen.

6.2.1.1. Zeitabhängige Polymeraufnahme

Die höchsten intrazellulären Polymerakkumulationen durch eine aktive Aufnahme wurden für die verschiedenen Polymerformen zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten festgestellt und erwiesen sich in erster Linie als zelllinienabhängig (**Abb. 24**). So wurden die Homopolymer über 24 h am schlechtesten in die AT-1 Zellen aufgenommen, zeigten aber in die Walker-256 Zellen ähnlich hohe aktiv aufgenommene Mengen wie die beiden anderen Polymertypen. Dennoch konnten Unterschiede hinsichtlich der zeitabhängigen Aufnahme der Polymertypen und deren M_w festgestellt werden. Dies zeigte sich vor allem bei den p(HPMA)-co-p(LMA), wobei die großen Polymervarianten von beiden untersuchten Zelllinien über 24 h besser endozytiert wurden. Den deutlichsten M_w abhängigen Unterschied hinsichtlich der aktiven Aufnahme zeigte das große p(HPMA)-b-p(LMA) in die AT-1 Zellen. *Liu et al.* zeigten, dass nach 12 h vor allem leicht negativ geladene HPMA-basierte Polymere (ähnlich wie die hier verwendeten) mit zunehmenden Molekulargewicht besser in C4-2 Zellen aufgenommen wurden [206]. Zudem konnte vorher von *Duncan et al.* eine bessere pinozytische Aufnahme von HPMA-basierten Polymeren mit einem Anteil an > 10 mol % hydrophoben Tyrosinamid in Experimenten mit isolierte Dottersäcken feststellen [211]. Auch konnten *Hemmelmann et al.* in Transzytoseexperimenten mit p(HPMA)-co-p(LMA) an einem Blut-Hirn-Schrankenmodell die besten Ergebnisse mit einem LMA-Anteil ab 10 % nachweisen, wobei höhere Anteile keinen weiteren Effekte zeigten [212]. Die p(HPMA)-co-p(LMA) und p(HPMA)-b-p(LMA) in dieser Arbeit hatten einen hydrophoben Monomeranteil von > 18 % (**Tab. 3**). Somit wäre in beiden hier verwendeten Zelllinien ein Unterschied zwischen den Homopolymeren und den beiden andern verwendeten HPMA-Typen zu erwarten gewesen. Diese hydrophoben Anteile hatten aber scheinbar keinen Einfluss auf die aktive Zellaufnahme.

6.2.2. Einfluß einer extrazellulären Azidose und Hypoxie auf die Polymeraufnahme

Um nun den Einfluß eines azidotischen und eines hypoxischen Milieus auf die zelluläre Aufnahme von HPMA-basierten Co-Polymeren mit ungeladenen hydrophoben LMA-Gruppen und deren Anordnung zu untersuchen wurden Inkubationszeiten von 2 h gewählt, da in diesem Zeitraum noch keine Plateauphase der Polymeraufnahme erreicht wurde und der Zeitraum mit den Untersuchungen der *in vivo* Versuche korreliert.

Wie in **Abb. 15** und **Abb. 22** gezeigt gibt es in den AT-1 und im geringeren Maße auch in den Walker-256 Tumoren hypoxische und azidotische Bereiche. Die Zellkulturversuche unter solchen Bedingungen wurden durch Inkubation der Zellen in Puffern mit einem pH von 6,6 oder in einem Milieu mit einem $pO_2 < 2$ mmHg nachgestellt.

In beiden Zelllinien wurde die zelluläre Aufnahme der Homo- und p(HPMA)-b-p(LMA) um ca. 50 % durch die Azidose reduziert, war aber durch die hohen Standardabweichungen nicht bei jedem Polymer signifikant (**Abb. 28**). Ein signifikanter Einfluss auf die

Polymeraufnahme durch azidotischen Bedingungen konnte nur bei den großen Polymervarianten in die AT-1 Zellen nachgewiesen werden. Eine signifikant geringere Zellaufnahme in die Walker-256 Zellen war dahingegen nur bei dem großen p(HPMA)-b-p(LMA) durch die Azidose nachweisbar. Überraschenderweise wurde die zelluläre Aufnahme der p(HPMA)-co-p(LMA), im Gegensatz zu den anderen Polymeren, in die AT-1 Zellen sogar verbessert. Ebenso zeigen die Hypoxieversuche auf die Polymeraufnahme in die AT-1 Zellen zumindest keine signifikanten Auswirkungen, dahingegen wird die Polymeraufnahme in die Walker-256 Zellen mit Ausnahme des großen p(HPMA)-co-p(LMA) signifikant reduziert.

Friberg et al. schlossen bei einer beobachteten verbesserten Zellaufnahme von hydrophilen Hämatorporphyrin IX (HpIX) mit sinkendem extrazellulärem pH, auf eine durch Protonierung erhöhte Hydrophobizität von HpIX und somit auf eine bessere passive Diffusion durch die Zellmembran [213]. Allerdings handelt es sich bei HpIX um ein relativ kleines Molekül ($M_w=599$ g/mol) und unterliegt keiner aktiven zellulären Aufnahme. Dahingegen zeigten *Liu et al.* [206], dass gerade in einem azidotischen Milieu das ζ -Potential für die Interaktion mit der Zellmembran und der darauffolgenden aktiven zellulären Aufnahme von Makromolekülen von Bedeutung ist. Durch Postmodifikation von Co-Polymeren mit positiv geladenen Polylysin- und Polyethylenimingruppen mit Citraconanhydrid konnten Nanopartikel mit einer negativ geladenen Oberfläche erzeugt werden. In einem azidotischen Milieu erfolgte dann durch die Abspaltung des Anhydrids eine Oberflächenladungskonvertierung wieder zu Co-Polymeren mit positiver Oberflächenladung, welche dann besser von den Zellen aufgenommen wurden [214, 215].

Auf der anderen Seite können ebenso Veränderungen der Zellmembran oder aber auch intrazellulär veränderte Prozessabläufe nicht ausgeschlossen werden. Dies konnte von *Ben-Dov et al.* anhand eines FITC-gekoppelten 70 kDa Dextrans in Kurzzeitversuchen (10 min) mit HaCat Zellen gezeigt werden, wobei unter azidotischen extrazellulären pH veränderte endozytoseassoziierte Membraneinstülpungen beobachtet wurden und das FITC-Dextran besser in die Zellen aufgenommen wurde [216].

Ebenso wie das azidotische Mikromilieu hat auch die Hypoxie in tumorzellspezifisch Einfluss auf die Polymeraufnahme (**Abb. 29**). Wirkte sich das azidotische Milieu vor allem auf die Polymeraufnahme in die AT-1 Zellen aus, so hatte ein hypoxisches Milieu größere Auswirkungen auf die Polymeraufnahme in die Walker-256 Zellen, welche sich Hypoxie bedingt um 80 – 90 % verringerte. Diese veränderte Aufnahme an HPMA-basierten Polymeren könnte aber auch hier auf eine zelluläre Veränderung und nicht nur auf einen Einfluss des extrazellulären Milieus auf die Polymere zurückgeführt werden. *Neshatian et al.* zeigte in Langzeitversuchen (18 h) eine verbesserte Aufnahme von Goldnanopartikeln ($r_H=50$ nm) in MCF-7 Zellen unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen, wobei bei kürzeren Inkubationszeiten (4 h) das Verhältnis umgekehrt war [217]. Dahingegen konnten *Jain et al.* nach 24 h eine verringerte Aufnahme an Goldnanopartikeln ($r_H=1,9$ nm) unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu

normoxischen Bedingungen in DU145, MDA-MB-231 und LN132 nachweisen [218]. Bei längeren Inkubationszeiten kann unter anderem ein adaptiertes Expressionsprofil von Genen [184] und die veränderte Proteinexpression auf der Zellmembran eine große Rolle spielen [219]. So konnten *Guilmain et al.* in Langzeitversuchen (20 h) zeigen, dass Caveolin-1 abhängig vom pO_2 die dynamin-abhängige Endozytose beeinflussen kann. Da es sich in dieser Arbeit, sowohl bei den Azidoseversuchen, als auch bei den Hypoxieversuchen um Kurzzeitansätze handelte, sind zellenergetische Veränderungen (z. B. Hypoxie bedingte Hemmung ATP-abhängiger Prozesse z. B. durch eine verstärkte hypoxieinduzierte AMPK Aktivität [220], aber auch eine pO_2 - und pH-Wert abhängige Regulation von Enzymaktivitäten, wie z.B. die Rho-GTPase cdc42 [221–223] und folglich auch Abläufe in Endozytosemechanismen ein möglicher Grund für die milieuhängige zelluläre Aufnahme wahrscheinlicher [184]. Von *Riemann et al.* wurde gezeigt, dass in diesen Inkubationszeiträumen (3 h) weder azidotisch, noch hypoxisch bedingte apoptotische und nekrotische Prozesse eine Rolle für AT-1 und Walker-256 Zelllinien spielen [177]. Somit können diese auch als Einflussfaktoren auf eine veränderte zelluläre Aufnahme der HPMA-Polymer ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das extrazelluläre Mikromilieu (pH, pO_2) zelllinienabhängig sowohl positiv, als auch negativ die Aufnahme von pHMPA-basierten Medikamententrägern in die Tumorzellen beeinflussen kann.

6.3. Endozytotische Routen der Polymeraufnahme

Die zelluläre Aufnahme der verschiedenen HPMA-basierten Polymere war unterschiedlich stark ausgeprägt und deuten auf eine Aufnahme über unterschiedliche endozytotische Wege hin. Auch zeigte sich im Gegensatz zu den Polymeraufnahmen, dass die AT-1 Zellen unter physiologischen Bedingungen das 70 kDa Dextran und das Cholera toxin β besser als die Walker-256 Zellen aufnahmen (**Abb. 30** und **Abb. 37**). Da dieses Verhältnis für die HPMA basierten Polymere umgekehrt ist, spricht dies gegen eine generelle makropinozytotische oder Cholesterol-abhängige Aufnahme der HPMA-basierten Polymere. Das heißt, dass weitere Endozytosewege in die Polymeraufnahme involviert sein müssen, was durch die bessere Transferrinaufnahme in die Walker-256 Zellen im Vergleich zu den AT-1 Zellen deutlich wird (**Abb. 36**).

Liu et al. untersuchten die Aufnahme von HPMA-Polymeren mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften in die humane Prostatakarzinomzelllinie LnCaP (Sublinie C4-2) und konnten direkte Zusammenhänge zwischen der endozytotischen Route und den physikochemischen Eigenschaften von HPMA-basierten Polymeren feststellen. Sie zeigten, dass vor allem positiv geladene HPMA-Polymere sehr gut endozytiert werden, aber leicht negativ geladene HPMA-Polymere, wie sie auch hier verwendet wurden, eher schwach aufgenommen wurden. Stark negativ geladene HPMA-Polymere zeigten vor allem eine bevorzugte Aufnahme über den makropinozytotischen Endozytoseweg. [206]

6.3.1. Homo-Polymere

Für die Homo-Polymere konnte *Mohammadpur et al.* zeigen, dass ebenso wie in der vorliegenden Arbeit (**Abb. 40** und **Abb. 41**), über keinen spezifischen Endozytoseweg die Aufnahme exklusiv erfolgt und ebenso zelllinienabhängig variierte [224]. Eine Erklärung für die beobachteten Aufnahmeverhalten der Homopolymere könnte die Milieubedingung sein, welche die Aktivität der verschiedenen Endozytosewege insgesamt beeinflussen kann. Das heißt, der extrazelluläre pH und der pO_2 beeinflussen zellenergetische Prozesse, aber auch Enzymaktivitäten (z. B. Rho-GTPasen, usw.) und somit indirekt die Aktivität der Endozytoseereignisse.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete dramatische Zunahme der Aufnahme des großen Homopolymers in AT1 Zellen bei Hemmung verschiedener Endozytosewege kann derzeit nicht erklärt werden (**Abb. 41**). Gesteigerte Aufnahmen nach Inhibierung einzelner Endozytosewege konnte unter anderem von *Hussain et al.* für HEV nach Inhibierung der Makropinozytose gezeigt werden [225]. Ob ähnliche Mechanismen für die Aufnahme des großen Homo-Polymers in die AT-1 Zellen verantwortlich sein können, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

6.3.2. p(HPMA)-co-p(LMA)

Eindeutigere Hinweise auf bevorzugte Aufnahmewege ergaben sich für die amphiphilen p(HPMA)-co-p(LMA) (**Abb. 42** und **Abb. 43**). Bei diesen HPMA-Varianten sind die hydrophoben LMA-Gruppen nicht nur im Kern, wie bei den p(HPMA)-b-p(LMA)_n lokalisiert, sondern auch an der Außenseite der Überstrukturen [112, 212]. Gerade die kleine Variante scheint bevorzugt über cholesterol- und Dynamin-abhängige Endozytosewege in beide Zelllinien aufgenommen zu werden, was auch für anderen amphiphilen Verbindungen schon gezeigt werden konnte [131] und auf eine caveolinabhängige Aufnahme hindeutet [226]. In den Walker-256 Zellen spielte zusätzlich noch der Clathrin-abhängige Endozytoseweg eine Rolle. *Liu et al.*, zeigte ähnliches für negativ geladene HPMA-Co-Polymere in C4-2 Zellen [206], wobei der Fokus auf der Oberflächenladung der Polymere lag und nicht wie hier auf den löslichkeitsvermittelnden Gruppen, verbunden mit den sich daraus ergebenden Überstrukturen. Auch kann hypoxieinduziert die Clathrin-vermittelte Endozytose verlangsamt werden wie es *Wang et al.* anhand des EGFR zeigen konnten [227]. Da die Walker-256 eine relativ hohe Clathrin-vermittelte Endozytose gegenüber den AT-1 Zellen zeigten, könnte auch hier ein Grund für die verringerte Polymeraufnahme unter hypoxischen Bedingungen liegen. Der Vergleich mit den milieuhängigen Versuchen (**Abb. 28** und **Abb. 29**), bei denen das kleine p(HPMA)-co-p(LMA) unter azidotischen Bedingungen besser in den AT-1 Zellen und unter hypoxischen zu einer verringerten Aufnahme in die Walker-256 Zellen führte, bestätigte eine unterschiedliche zelllinienspezifische Regulation der Endozytose.

Das große p(HPMA)-co-p(LMA) scheint über keinen der untersuchten Endozytosewege spezifisch in die AT-1 Zellen aufgenommen zu werden, wohingegen eine Aufnahme in die Walker-256 Zellen, ähnlich zu dem großen Homo-Polymer in die AT-1 Zellen, verstärkt wurde. So könnte eine unspezifische Zellmembranintegration der großen p(HPMA)-co-p(LMA) ohne eine anschließende Endozytose ein Grund für diese Effekte darstellen. Die unterschiedlichen Anteile an hydrophoben LMA-Resten (klein: 18 % und groß: 25 %) einen Einfluss auf die Interaktion mit der lipidreichen Zellmembran haben. *Hemmelmann et al.* konnten eine Abhängigkeit der Transzytose von p(HPMA)-co-p(LMA) Polymeren über die Bluthirnschranke in Abhängigkeit des Anteils an LMA in den Polymere nachweisen und führten dies auf eine erhöhten Zellmembranbindung zurück [212]. Die bevorzugte Aufnahme von Polymeren mit hydrophoben Gruppen an der Außenseite ihrer Überstrukturen über Lipid Rafts kann auf eine nicht-lysosomale Endozytoseroute hindeuten [228]. Die Aufnahme von Polymer-Wirkstoffkonjugaten, bei denen die Wirkstofffreisetzung auf die subzelluläre Lokalisierung in Lysosomen basiert, könnte somit negativ beeinflusst werden.

6.3.3. p(HPMA)-b-p(LMA)

Die p(HPMA)-b-p(LMA) weisen nach außen hin eine hydrophile Corona auf und unterscheiden sich durch die Ausbildung der Überstruktur in den hydrodynamischen Radii zu den Homopolymeren [101, 229]. Somit sind auch die Aufnahmeverhalten (**Abb. 44** und **Abb. 45**) unter Hypoxie und Azidose, aber auch bei dem Einsatz der Endozytoseinhibitoren ähnlich wie bei den Homo-Polymeren. Allerdings scheint der größere hydrodynamische Radius der p(HPMA)-b-p(LMA), die Aufnahme über die Makropinozytose in die AT-1 Zellen zu erschweren. Für die Walker-256 Zellen spielte der hydrodynamische Radius der p(HPMA)-b-p(LMA) eine eher untergeordnete Rolle. Die geringe Korrelation von dem r_H der Polymere mit der aufgenommenen Menge in die Zellen, wie sie auch hier in dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint daher eine untergeordnete Rolle zu spielen. So konnte eine größenunabhängige Aufnahme auch für andere Nanotransporter beschrieben werden [131]. *Sahay et al.* zeigten ähnlich wie hier, dass Strukturen mit einem hydrophoben Kern und einer hydrophilen Corona eher unspezifisch über verschiedene Endozytosewege aufgenommen werden [230].

6.4. Einfluss der extrazellulären Azidose und Hypoxie auf die Endozytosewege

Da wie gezeigt wurde verschiedene Endozytosewege für die Polymeraufnahme in Frage kommen können, soll im Folgenden der Einfluss des pathophysiologischen Tumormilieus auf drei wichtige Endozytosewege, ebenso wie die Rolle der intrazellulären und extrazellulären Ca^{2+} Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_e$) diskutiert werden.

Thews et al. zeigte, dass ein schneller Wechsel von einem physiologischen zu einem azidotischen extrazellulären pH bei AT-1 (pH7,4 → pH6,6) auch zu einer spontanen Änderung des pHi und der $[Ca^{2+}]_i$ führt [84]. Ähnliches konnte hier für die Walker-256 Zellen gezeigt werden (**Abb. 31**). Die Walker-256 zeigten im Gegensatz zu den AT-1 Zellen in dem Beobachtungszeitraum nach dem schnellen Sinken der $[Ca^{2+}]_i$ keine Kompensation dessen unter azidotischen Bedingungen. Ebenso führt eine extrazelluläre Azidose (pH 6,6) in den Walker-256 Zellen, im Gegensatz zu den AT-1 Zellen [178], nicht zu einer Umkehr des pH-Gradienten (**Abb. 32**). Diese unterschiedliche Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes, aber auch des pH_e/pH_i Gradienten könnte somit ebenso ein Grund für das beobachtete gegensätzliche Endozytoseverhalten beider Zelllinien sein. Auch andere Gruppen konnten ein Zusammenhang zwischen Endo- und Exozytoseprozessen mit der Aktivität von Na^+/H^+ -Austauscher in A431 Zellen [224], sowie der $[Ca^{2+}]_i$ in Dendritischen Zellen [225] nachweisen. Die in dieser Arbeit beobachteten Einflüsse des pH-Wertes und der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Endozytosewege werden im Folgendem diskutiert.

6.4.1. Makropinozytose

Die gesteigerte Aufnahme in die Walker-256 Zellen und die dahingegen verringerte Aufnahme des Dextrans bei sinkenden pH_e ist nicht vollkommen klar (**Abb. 30**). In der Literatur wurde eine azidoseinduzierte verbesserte Makropinozytose ähnlich wie bei den Walker-Zellen für verschiedene Tumor- und Normalzelllinien von *Ben-Dov et al.* [216] beschrieben. Sie zeigten auch, dass eine Inhibierung der Kalzium-abhängigen ATPase Aktivität durch Verapamil zu einer noch höheren azidoseinduzierten (pH 5,25) intrazellulären Anreicherung eines 70 kDa Dextrans führte. Auch konnte ein Zusammenhang von Azidose und einer daraus folgenden temporären $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung von *Koivusalu et al.* für Dendritische Zellen beschrieben werden [231]. In der vorliegenden Arbeit und in der Publikation von *Thews et al.* [84] konnte in diesem Zusammenhang nur ein sehr kurzes Überschießen der $[Ca^{2+}]_i$ (Rebound Effekt) während des Wechsels von pH 7,4 zu pH 6,6 in beiden Zelllinien beobachtet werden (**Abb. 31**). Im Gegensatz zu den Walker-256 Zellen, konnte in den AT-1 Zellen innerhalb des zehnmütigen Beobachtungszeitraums unter azidotischen Bedingungen nach dem schnellen Absinken der $[Ca^{2+}]_i$ ein anschließendes Ansteigen dieser beobachtet werden [84]. In weiterführenden Studien sollte deshalb der Einfluss einer mehrstündigen extrazellulären Azidose auf die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Da die Ca^{2+} -abhängigen Annexine für die Vesikelbildung bei endozytotischen Prozessen eine wichtige Rolle [232] spielen können, könnte auch durch eine extrazelluläre Azidose induzierte Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ die endozytotischen Prozesse beeinflusst werden. *Canton et al.* zeigten, dass die Makropinozytose in Makrophagen nur von extrazellulären Ca^{2+} abhängig ist [233]. Dies könnte unter anderem die $[Ca^{2+}]_e$ Abhängigkeit der gesteigerten Makropinozytose unter azidotischen Bedingungen in die Walker-256 Zellen erklären (**Abb. 35**).

Die Inhibierung der Bikarbonattransporter durch DIDS und Laktat (**Abb. 33**) führten zu einer intrazellulären Ansäuerung, während der extrazelluläre pH bei 7,4 blieb, wodurch in beiden Zelllinien die Makropinozytose signifikant reduziert werden konnte (**Abb. 34**). Eine extrazelluläre Ansäuerung, führte bei den AT-1 Zellen ebenso zu einer signifikant verringerten Aufnahme des Makropinozytosemarkers aber zu einer höheren Aufnahme in die Walker-256 (**Abb. 30**). Dieses gegensätzliche pH_e abhängige Aufnahmeverhalten der beiden Zelllinien kann abschließend nicht erklärt werden.

Wie *Koivusalu et al.* zeigten, kann der submembrane pH-Wert Einfluss auf die GTPase Aktivität für die Aktinremodellierung und somit auf die Makropinozytose haben [234]. Dieser Effekt war abhängig von der Aktivität der Na^+/H^+ -Austauscher, welche die akkumulierten metabolisch erzeugten Protonen an den Orten der Makropinozytose aus den Dendritischen Zellen transportieren. Die hier beobachtete gegensätzliche zelltypabhängige Makropinozytose unter azidotischen Bedingungen, könnte somit durch einen unterschiedlich regulierten aktiven Transport von Protonen in das extrazelluläre Kompartiment erklärt werden und sollte in weiteren Versuchen untersucht werden.

Des Weiteren zeigte sich aber auch, dass die beobachteten Azidoseeffekte auf die Makropinozytose abhängig vom $[Ca^{2+}]_i$ waren (**Abb. 35**). Über einen direkten Einfluss der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Makropinozytose von Krebszellen ist nur wenig bekannt. So könnten z. B. die Calcium-sensing Rezeptoren (Sensoren für extrazelluläres Ca^{2+}) eine wichtige Rolle spielen. Diese sind unter anderem für die Ca^{2+} Homöostase von Bedeutung und ihr Einfluss auf die Makropinozytose konnte zumindest in Makrophagen gezeigt werden [233]. Diese Rezeptoren spielen auch eine zentrale Rolle bei regulatorischen Prozessen von Mamma- und Prostatakarzinomen und sind zudem auch pH-abhängig [235, 236]. Eine weitere Möglichkeit wäre eine indirekte Regulation über intrazelluläre Ca^{2+} Sensoren wie Calmodulin, welches z. B. indirekt über RAC1 Einfluss auf das Membranausstülpfen während der Makropinozytose nehmen könnte [237] oder aber auch über die Cdc42 welche in makropinozytische Prozesse involviert ist [221]. So könnte die Rho-GTPase Aktivität der Cdc42 durch eine extrazelluläre Azidose beeinträchtigt werden [238, 239].

6.4.2. Clathrin-vermittelte und Cholesterol-abhängige Endozytose

Die höhere Transferrinaufnahme (**Abb. 36**) und die niedrigere Dextranaufnahme (**Abb. 30**) der Walker-256 Zellen gegenüber den AT-1 Zellen zeigte die unterschiedliche Bedeutung der Endozytosewege für die beiden Zelllinien. Dies könnte auch ein Grund für die unterschiedliche zelluläre Polymeraufnahme darstellen. Im Gegensatz zu der Makropinozytose war die Clathrin vermittelte Endozytose in beiden Zelllinien unabhängig vom pH-Wert, ebenso wie vom $[Ca^{2+}]_i$ (**Abb. 36** und **Abb. 38**). Erst bei einem pH von 6,2 wurde die Cholesterol-abhängige Endozytose in den Walker-256 Zellen signifikant höher (**Abb. 37**), in den AT-1 Zellen nicht. *Sandvig et al.*, konnten zeigen, dass ein pH_i unter 6,0 die Transferrinaufnahme inhibieren kann [240]. Ein Einfluss des extrazellulären pH-Wertes

auf die Clathrin vermittelte Endozytose und die Cholesterol vermittelte Endozytose in Tumorzellen scheint, wenn dann eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Obwohl Cholesterol in zahlreiche Endozytosewege, außer z. B. bei der Clathrin-vermittelten Endozytose, involviert ist [226], können hier vor allem unter azidotischen Bedingungen Ca^{2+} abhängige Prozesse für die Aufnahme des Cholera-toxin β in die Walker-256 Zellen nicht ausgeschlossen werden (**Abb. 39**). Hierbei muss aber angemerkt werden, dass die 17-fach höhere Aufnahme des Cholera-toxin β unter physiologischen Bedingungen in die AT-1 Zellen (**Abb. 37**) auch ein Hinweis darauf geben können, dass die Cholesterol-abhängige Endozytose bei den Walker-256 Zellen eine untergeordnete Rolle spielen könnte und die Beobachtungen überinterpretiert werden. Somit lässt sich sagen, dass in den untersuchten Endozytosewege bei beiden Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt sind, wobei die Makropinozytose und Cholesterol-abhängige Endozytose vor allem in den AT-1 Zellen zum Tragen kommt und in den Walker-256 Zellen die Clathrin-vermittelte Endozytose.

6.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gute Anreicherung von Nanocarriern im Tumorgewebe nicht unbedingt auch mit einer effektiven Tumorzellaufnahme einhergeht. Charakteristika der makromolekularen Wirkstofftransporter, welche sich positiv auf die Tumorakkumulation und die Verteilung im interstitiellen Raum des Tumors auswirken, können auf der anderen Seite die Tumorzellaufnahme erschweren.

Die beiden Tumormodelle AT-1 und Walker-256 unterschieden sich signifikant hinsichtlich der Gefäßdichte und der Oxygenierung. Gegenüber Walker-256 Tumoren waren die AT-1 Tumoren stärker hypoxisch. Die mittleren pH-Werte waren in beiden Tumormodellen vergleichbar (AT-1 Tumore: pH 7,05 und Walker-256 Tumore: pH 7,2), über 8,0 % beider Tumormodelle wiesen trotz dessen azidotische pH-Werte unter 6,8 auf. Die Gefäßdichte als wichtiger Parameter der Blutversorgung des Gewebes war in Walker-256 Tumoren signifikant höher. Hinsichtlich des interstitiellen Gewebedrucks und der Extravasation von Makromolekülen zwischen beiden Tumormodellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In Zellkulturversuchen zeigte sich, dass die Endozytose der 6 verschiedenen Polymere sowohl von der chemischen Struktur der Verbindungen, von der Molekülgröße, dem hydrodynamischen Radius aber auch von der untersuchten Tumorzelllinie abhängig war. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Polymermodifikationen, wie eine Pegylierung des HPMA-Gerüsts, die Tumoranreicherung verbessern, aber die Aufnahme in die Tumorzellen auch behindern kann. Des Weiteren konnten hypoxische und azidotische Milieubedingungen die Tumorzellaufnahme der HPMA-basierten Polymere abhängig von der Zelllinie und der Polymerstruktur unterschiedlich beeinflussen. Unter azidotischen Bedingungen wurde z. B. die Aufnahme der p(HPMA)-co-p(LMA) in die AT-1 Zellen begünstigt, auf der anderen Seite die Aufnahme der p(HPMA)-b-p(LMA) in die Walker-256 Zellen signifikant reduziert.

Über welche Endozytosewege die Polymeraufnahme hauptsächlich erfolgt, war in erster Linie von der Polymerstruktur abhängig. Das hydrophile Homo-Polymere und das die p(HPMA)-b-p(LMA) Block-Co-Polymere zeigten eine unspezifische Aufnahme über alle untersuchten Endozytosewege (Makropinozytose, CME, Dynamin-abhängige Prozesse und Cholesterol-abhängige Endozytose). Es konnte gezeigt werden, dass unter azidotischen Bedingungen die Makropinozytose tumorzellabhängig signifikant behindert (AT-1 Zellen) oder aber signifikant gefördert (Walker-256) werden kann und hypoxische Bedingungen die Makropinozytose in die AT-1 Zellen negativ beeinflusst. Die nach außen

hin eher amphiphilen p(HPMA)-co-p(LMA) Random-Co-Polymere wurden dahingegen präferenziell über Cholesterol- und Dynamin-abhängige Wege aufgenommen. Diese Endozytosewege waren in beiden Zelllinien weitestgehend unabhängig vom pH-Wert. Der Einfluss eines hypoxischen Milieus sollte in weiteren Studien untersucht werden. Bei den p(HPMA)-co-p(LMA) schien vor allem der Anteil an lipophilen und hydrophilen Gruppen die Endozytoseroute zu bestimmen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anforderungen an HPMA-basierte makromolekulare Wirkstofftransporter für eine effektive Anreicherung im Tumorgewebe *in vivo* über den EPR-Effekt an sich, nicht zwangsläufig mit einer effektiven Aufnahme in die Tumorzellen einhergehen müssen, sondern auch im Gegensatz stehen können. Mit der Aufnahme über die verschiedenen Endozytosewege wird auch die intrazelluläre vesikuläre Lokalisation, welche für die Wirkstofffreisetzung entscheidend ist, bestimmt. Der Einfluss eines hypoxischen und azidotischen Milieus auf das intrazelluläre Schicksal dieser Wirkstoff-Wirkstoffträger-Komplexe sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass es schwer vorherzusagen ist, welcher Wirkstoffträger den bestmöglichen Effekt erzielt. Somit spielen für die Therapie letztendlich individuelle, an den Patienten angepasste Formulierungen solcher Wirkstoff-Wirkstoffträger-Komplexe eine große Rolle.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentuale Verteilung der Krebsinzidenzen 2012 in Deutschland.	5
Abb. 2: Lebenserwartung, krankheitsbedingte Todesursachen und Krebsinzidenzraten in Deutschland.	6
Abb. 3: Tumorprogression und Tumolvaskularisation.	9
Abb. 4: pO_2 Gradient im Tumorgewebe und ungefähre „kritische“ pO_2 Bereiche in Tumoren.	12
Abb. 5: Gepoolte intrazelluläre und extrazelluläre pH-Werte (pH_i und pH_e) in Geweben.	13
Abb. 6: Idealisierte Darstellung der Radiosensivität von Tumoren in Abhängigkeit der Oxygenierung und Wirkungsweisen der DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung.	15
Abb. 7: Der EPR-Effekt und das Konzept der makromolekularen Wirkstoffträger.	18
Abb. 8: Frühe Konzepte eines multi-funktionalen Medikamenten-Carriers (Ringsdorf Konzept) und einige Formen von makromolekularer Wirkstoffträger.	19
Abb. 9: N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA) und dessen Precursor Penta-fluorphenylmethacrylamid (PFMA) für die RAFT-Polymerisierung.	20
Abb. 10: Klassifikation der Endozytose basierend auf den involvierten endozytosewegtypischen Proteinen.	24
Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Clathrin-Triskel assoziierten AP-2 Proteinen.	25
Abb. 12: Charakterisierung des Wachstums der syngenem Prostatakarzinomzelllinie AT-1 und der Mammakarzinomzelllinie Walker-256 als subkutane heterotope Tumormodelle.	50
Abb. 13: Gefäßdichte und vaskuläre Permeabilität in AT-1 und Walker-256 Tumoren.	51
Abb. 14: Interstitieller Flüssigkeitsdruck in AT-1 und Walker-256 Tumoren.	52
Abb. 15: Räumliche Ausdehnung hypoxischer Tumorregionen bei verschiedenen O_2 -Anteilen in der Atemluft.	53
Abb. 16: Invasive Bestimmung des pO_2 unter steady state Bedingungen bei Inhalation von Atemgasen mit unterschiedlichen O_2 Anteilen.	54

Abb. 17: Dynamische Verläufe der intratumoralen pO_2 mittels fluoro-optischen Sonden. _____	55
Abb. 18: Intratumoraler pO_2 gemessen mittels EPR bei inspiratorischen Gasen mit unterschiedlichem O_2 -Anteilen und die Verteilung der EPR-Sonden im Tumorgewebe. _____	56
Abb. 19: Darstellung der Tumoroxygenierung mittels der nicht-invasiven EPR Methode bei schnellem Atemgaswechsel. _____	57
Abb. 20: Vergleich der Methoden zur Bestimmung des intratumoralen pO_2 bei inspiratorischen Gasen mit unterschiedlichem O_2 -Anteilen. _____	58
Abb. 21: Einfluss der Atemgasinhalation mit unterschiedlichem O_2 -Anteilen auf das Blutkreislaufsystem. _____	59
Abb. 22: Invasive Bestimmung der extrazellulären intratumoralen pH-Werte mittels pH-Mikroelektrode. _____	61
Abb. 23: Normierung der Zellzahl auf die Proteinmenge und Größenbestimmung der AT-1 und Walker-256 Zellen. _____	62
Abb. 24: Zeitabhängige aktive Zellaufnahme der verschiedenen HPMA-basierten Polymervarianten. _____	63
Abb. 25: Vergleich der aktiven tumorzelllinienabhängigen Aufnahme von pHPMA-basierten Polymeren bei pH 7,4 nach 2 h. _____	65
Abb. 26: Aktive zelluläre Aufnahme des großen P(HPMA)-b-p(LMA) in Abhängigkeit des Anteils an 2000 Da Polyethylenglykol (PEG). _____	67
Abb. 27: Einfluss des hydrodynamischen Radius (r_H) und der mittleren Molmasse (M_w) der Polymere auf deren zelluläre Aufnahme. _____	68
Abb. 28: Einfluss der Azidose auf die aktive Polymeraufnahme. _____	69
Abb. 29: Einfluss der Hypoxie auf die aktive Polymeraufnahme. _____	71
Abb. 30: Einfluss eines azidotischen oder hypoxischen Milieus auf die Makropinozytose. _____	74
Abb. 31: pH_e abhängige Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ und des pH_i . _____	76
Abb. 32: Änderung des pH_i zwischen 10 min und 3 h extrazellulärer Azidose (pH 6,6). _____	77
Abb. 33: Beeinflussung des pH_i durch 1,2 mM Laktat und Inhibierung der Bikarbonatrasporter mittels DIDS bei physiologischem pH_e (7,4). _____	78
Abb. 34: pH_i -abhängige Aufnahme von 70 kDa Dextran in (A) AT-1- und (B) Walker-256-Zellen. _____	79

Abb. 35: Einfluss der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsenkung auf die aktive Aufnahme des 70 kDa Dextrans. _____	79
Abb. 36: Durchflusszytometrische Analyse der Clathrin-vermittelten Endozytose von Transferrin in AT-1- und Walker-256-Zellen bei extrazellulärer Azidose. _____	80
Abb. 37: Durchflusszytometrische Analyse der Cholesterol-abhängigen Endozytose mittels Choleratoxin- β in AT-1- und Walker-256-Zellen bei extrazellulärer Azidose. _____	81
Abb. 38: Einfluss der Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME). _____	82
Abb. 39: Einfluss der Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Cholesterol-abhängige Endozytose. _____	82
Abb. 40: Einfluss von Rottlerin (Rot), Dynasor (Dyn), Chlorpromazin (Chl) und Nystatin auf die aktive Aufnahme des kleinen HPMA-Homopolymers (kHP). _____	83
Abb. 41: Einfluss von Rottlerin (Rot), Dynasor (Dyn), Chlorpromazin (Chl) und Nystatin auf die aktive Aufnahme des großen HPMA-Homopolymere (gHP). _____	84
Abb. 42: Einfluss von Rottlerin (Rot), Dynasor (Dyn), Chlorpromazin (Chl) und Nystatin auf die aktive Aufnahme des kleinen P(HPMA)-co-p(LMA) (kRCP). _____	85
Abb. 43: Einfluss von Rottlerin (Rot), Dynasor (Dyn), Chlorpromazin (Chl) und Nystatin auf die aktive Aufnahme des großen P(HPMA)-co-p(LMA) (gRCP). _____	86
Abb. 44: Einfluss von Rottlerin (Rot), Dynasor (Dyn), Chlorpromazin (Chl) und Nystatin auf die aktive Aufnahme des kleinen P(HPMA)-b-p(LMA) (kBCP). _____	87
Abb. 45: Einfluss von Rottlerin (Rot), Dynasor (Dyn), Chlorpromazin (Chl) und Nystatin auf die aktive Aufnahme des großen P(HPMA)-b-p(LMA) (gBCP). _____	87
Abb. 46: Einfluss kritischer pO_2 -Werte auf die Funktionen von Tumorzellen. [186] ____	90

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beispiele von Polymeren mit hydrophilen und hydrophoben Monomeranteilen und deren Überstruktur in wässrigen Medium _____	22
Tab. 2: HPMA-basierte Polymer-Wirkstoffkonjugate in klinischen Studien _____	22
Tab. 3: Charakteristika der pHPMA basierten Homo- (HP), p(HPMA)-co-p(LMA) (RCP) und p(HPMA)-b-p(LMA) (BCP) _____	28
Tab. 4: Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien _____	33
Tab. 5: Verwendete Tiermodelle _____	33
Tab. 6: Verwendete selektive, fluoreszenzmarkierte Endozytosewegmarker _____	33
Tab. 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer _____	34
Tab. 8: Selektive Inhibierung der Endozytosewege _____	35
Tab. 9: Eichlösungen für die pH_i und $[Ca^{2+}]_i$ Einzelzellanalysen _____	35
Tab. 10: Ratiometrische Sonden für die pH_i und $[Ca^{2+}]_i$ Einzelzellanalysen _____	35
Tab. 11: Filter und deren Wellenlängen für die Fluoreszenzmikroskopie _____	35
Tab. 12: Für die IHC verwendete Antikörper in einer IHC-AKV _____	36
Tab. 13: ESR-Einstellungen _____	36
Tab. 14: Signifikante Änderung der aktiven Zellaufnahme von pHPMAs bezogen auf physiologische Kontrollbedingungen (pH 7,4, $pO_2=150$ mmHg) _____	72
Tab. 15: Zusammenfassung der Methoden zur Bestimmung der intratumoralen pO_2 ; (schwarz) gemessene Werte in mmHg und (blau, kursiv) _____	94

7.3. Abkürzungsverzeichnis

[Ca²⁺]_i	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
10-kDa-Dex	Dextran Cascade Blue 10.000 MW
¹⁸F-FAZA	¹⁸ F-Fluorazomycinarabinosid
¹⁸F-MISO	¹⁸ F-Misonidazol
¹⁹F-MRI	¹⁹ F-Magnetresonanzbildgebung
2-MDa-Dex	Dextran fluorescein 2.000.000 MW
70-kDa-Dex	Dextran Texas Red 70.000 MW
Abb.	Abbildung
AIBN	Azobisisobutyronitril
Arf6	ADP-Ribosylierungsfaktor 6
ATP	Adenosintriphosphat
ATRP	Atom transfer radical polymerization
BCA	Bicinchoninsäure
BCECF-AM	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein Acetomethylester
BSA	bovines Serumalbumin
CAIX	Carboanhydrase IX
Cdc42	Zellzykluskontrollprotein 42 homolog
CME	Clathrin vermittelte Endozytose
COX-2	Cyclooxygenase 2
Ctb	Choleratoxin beta
Ctb-488	Cholera Toxin Subunit B (Recombinant), Alexa Fluor® 488 Conjugate
ddH₂O	bidestilliertes Wasser
Dex	Dextran
Dex-70	Dextran, Oregon Green® 488; 70,000 MW, Anionic, Lysine Fixable
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid

EGFR	Epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
EM	Endozytosemarkerstammlösung
EPR	Enhanced Permeation and Retention
ESR	Elektronenspinresonanz
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
gBCP	großes P(HPMA)-b-p(LMA)
GEEC	GPI-anchored protein-enriched early endosomal compartment
gHP	Großes Homo-Polymer
gRCP	großes P(HPMA)-co-p(LMA)
GTPase	Guanintriophosphatase
HES	Hydroxyethylstärke
HEV	Hepatitis-E Virus
HPIX	Hämatoporphyrin IX
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid
ICD	Internationale Klassifikation von Krankheiten
IFP	Interstitieller Flüssigkeitsdruck
IHC	Immunhistochemie
kBCP	kleines P(HPMA)-b-p(LMA)
KG	Körpergewicht
kHP	kleines Homo-Polymer
kRCP	kleines P(HPMA)-co-p(LMA)
LDL	Low Density Lipoprotein
LMA	Laurylmethacrylat
MABP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MDR	Multi Drug Resistance
Mw	Molekulargewicht
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronenemissionstomografie
PFMA	Pentafluormethacrylat
PGA	Polyglycolsäure

<i>pH_e</i>	extrazellulärer pH
<i>pH_i</i>	intrazellulärer pH
<i>pHPMA</i>	HPMA-basiertes Polymer
<i>PKC δ</i>	Proteinkinase C delta
<i>PLA</i>	Polymilchsäure
<i>pO₂</i>	Sauerstoffpartialdruck
<i>RAC1</i>	Ras-verwandtes C3 Botulinumtoxinsubstrat 1
<i>RAFT</i>	Reversible addition-fragmentation chain transfer
<i>Rho-GTPase</i>	Ras homologe GTPase
<i>SD</i>	Standardfehler
<i>SEM</i>	Standardfehler des Mittelwertes
<i>SV-40</i>	Simian-Virus 40
<i>Tab.</i>	Tabelle
<i>Tf</i>	Transferrin
<i>Tf-488</i>	Transferrin from human serum, Alexa Fluor ® 488 conjugate
<i>TP53</i>	Tumorprotein 53
<i>usw.</i>	und so weiter
<i>VEGF</i>	Vaskulärer Eptihelialer Wachstumsfaktor
<i>WHO</i>	Weltgesundheitsorganisation
<i>z. B.</i>	zum Beispiel

7.4. Literaturverzeichnis

1. (2015) IARC Factsheet No297. World Heal Organ Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/#> 1–6.
2. Kaatsch P., Spix C., Katalinic A., et al. (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012. doi: 10.17886/rkipubl-2015-004
3. Stewart BW., Wild C. (2014) World cancer report 2014. Lyon
4. Baade P., Youlden D., Valery P., et al. (2010) Population-based survival estimates for childhood cancer in Australia during the period 1997-2006. *Br J Cancer* 103:1663–1670.
5. Knudson AG., Hethcote HW., Brown BW. (1975) Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:5116–5120.
6. (2015) Basisstatistiken C62: Hodentumor. Tumoregister München [Internet: http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base_C62__G.pdf]. 1–29.
7. (2015) Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland. Statistisches Bundesamt [Internet: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Sterbefaelle/Sterbefaelle.html;jsessionid=07DFDB9B5769A7A3261071C3FBA27AE1.cae3>].
8. (2015) Todesursachen nach Krankheitsarten 2014. Wiesbaden
9. Robert-Koch-Institut. (2015) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. doi: 10.1016/0168-8510(91)90076-A
10. Gavhane Y., Shete A., Bhagat A., et al. (2011) Solid Tumors : Facts, Challenges and Solutions. *Int J Pharma Sci Res* 2:1–12.
11. Weinberg RA. (2014) *The Biology of Cancer*, 2nd ed. Garland Science
12. Olivier M., Petitjean A., Marcel V., et al. (2009) Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 16:1–12.
13. Tsuchida N., Kannan Murugan A., Grieco M. (2015) Kirsten Ras* oncogene: Significance of its discovery in human cancer research. *Oncotarget* 7:46717–46733.
14. Hanahan D., Weinberg RA. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell Press* 100:57–70.
15. Hanahan D., Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674.
16. Bergers G., Benjamin LE. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401–410.
17. Kerbel RS. (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21:505–515.
18. Nishida N., Yano H., Nishida T., et al. (2006) Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2:213–219.
19. Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27–31.
20. Matsumura Y., Maeda H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs1. *Cancer Res* 46:6387–6392.

21. Vakoc BJ., Lanning RM., Tyrrell J a., et al. (2010) Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging. *Nat Med* 15:1219–1223.
22. Jain RK. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685–693.
23. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., et al. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156:1363–1380.
24. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49:6449–65.
25. Thews O., Kelleher DK., Vaupel P. (2002) Dynamics of tumor oxygenation and red blood cell flux in response to inspiratory hyperoxia combined with different levels of inspiratory hypercapnia. *Radiother Oncol* 62:77–85.
26. Jain RK. (1988) Determinants of tumor blood flow: A review. *Cancer Res* 48:2641–2658.
27. Sevick EM., Jain RK. (1989) Geometric resistance to blood flow in solid tumors perfused ex vivo: effects of tumor size and perfusion pressure. *Cancer Res* 49:3506–3512.
28. Sevick EM., Jain RK. (1989) Viscous Resistance to Blood Flow in Solid Tumors : Effect of Hematocrit on. *Cancer Res* 49:3513–3519.
29. Brurberg KG., Gaustad J-V., Mollatt CS., Rofstad EK. (2008) Temporal heterogeneity in blood supply in human tumor xenografts. *Neoplasia* 10:727–735.
30. King E., Bowser AD. (2009) Expanding the Targets in Adjuvant Therapy. Pittsburgh
31. Chaplin DJ., Hill SA. (1995) Temporal heterogeneity in microregional erythrocyte flux in experimental solid tumours. *Br J Cancer* 71:1210–1213.
32. Hiroyuki K., Braun RD., Ong ET., et al. (1996) Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *cancer Res* 56:5522–5528.
33. Maeda H., Wu J., Sawa T., et al. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65:271–284.
34. Dvorak HF. (2015) Tumors: Wounds that do not heal. *Cancer Immunol Res* 3:1–11.
35. Gillies RJ., Schornack P a., Secomb TW., Raghunand N. (1999) Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia* 1:197–207.
36. Marusyk A., Polyak K. (2011) Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805:1–28.
37. Swabb E., Wei J., Gullino P. (1974) Diffusion and convection in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53:2814–2822.
38. Heldin C-H., Rubin K., Pietras K., Ostman A. (2004) High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:806–13.
39. Marcucci F., Corti A. (2012) How to improve exposure of tumor cells to drugs: promoter drugs increase tumor uptake and penetration of effector drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 64:53–68.
40. Jain RK. (1987) Transport of molecules in the tumor interstitium: A review. *Cancer Res* 47:3039–3051.

41. Young JS., Lumsden CE., Stalker AL. (1950) The significance of the “tissue pressure” of normal testicular and of neoplastic (Brown-Pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *J Pathol Bacteriol* 62:313–333.
42. Gullino PM., Clark SH., Grantham FH. (1964) The interstitial fluid of solid tumors. *Cancer Res* 24:780–794.
43. Boucher Y., Baxter LT., Jain RK. (1990) Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumours: implications for therapy. *Cancer Res* 50:4478–4484.
44. Paskins-Hurlburt AJ., Hollenberg NK., Abrams HL. (1982) Tumor perfusion in relation to the rapid growth phase and necrosis: Studies on the walker carcinoma in the rat testicle. *Microvasc Res* 24:15–24.
45. Butler TP., Grantham FH., Gullino PM. (1975) Bulk transfer of fluid in the interstitial compartment of mammary tumors. *Cancer Res* 35:3084–3088.
46. Menezes GC., Miron-mendoza M., Ho C., et al. (2009) Oncogenic Ras-Transformed Human Fibroblasts Exhibit Differential Changes in Contraction and Migration in 3D Collagen Matrices. *October* 314:3081–3091.
47. Jain RK., Cook AW., Steele EL. (1991) Haemodynamic and transport barriers to the treatment of solid tumours. *Int J Radiat Biol* 60:85–100.
48. Jain RK., Stylianopoulos T. (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* 7:653–664.
49. Bertout JA., Patel SA., Simon MC. (2008) The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8:967–975.
50. Vaupel P., Thews O., Hoekel M. (2001) Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18:243–259.
51. Thews O., Wolloscheck T., Dillenburg W., et al. (2004) Microenvironmental adaptation of experimental tumours to chronic vs acute hypoxia. *Br J Cancer* 91:1181–1189.
52. Warburg O., Wind F., Negelein E. (1927) The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8:519–530.
53. Helmlinger G., Yuan F., Dellian M., Jain RK. (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177–182.
54. Newsholme E a., Crabtree B., Ardawi MS. (1985) The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep* 5:393–400.
55. Pelicano H., Martin DS., Xu R-H., Huang P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633–4466.
56. Tannock IF., Rotin D. (1989) Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 49:4373–4384.
57. Spugnini EP., Sonveaux P., Stock C., et al. (2015) Proton channels and exchangers in cancer. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1848:2715–2726.
58. Chiche J., Brahimi-Horn MC., Pouysségur J. (2010) Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 14:771–94.
59. Chlebowski RT. (1979) Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review. *West J Med*

- 131:364–368.
60. Vezmar S., Becker A., Bode U., Jaehde U. (2003) Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 49:92–104.
 61. Mistry P., Kelland LR., Loh SY., et al. (1992) Comparison of cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin with that of tetraplatin and amminedibutyratodichloro (cyclohexylamine) platinum (IV) (JM221) in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52:6188–6193.
 62. Miller RP., Tadagavadi RK., Ramesh G., Reeves WB. (2010) Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2:2490–2518.
 63. Sakai W., Swisher EM., Karlan BY., et al. (2008) Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 451:1116–1120.
 64. Leto SM., Trusolino L. (2014) Primary and acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer: Impact on future treatment strategies. *J Mol Med* 92:709–722.
 65. Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley DB., Johnston PG. (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13:714–726.
 66. Paolino D., Sinha P., Fresta M., Ferrari M. (2006) Drug delivery systems. *Encycl Med Devices Instrum*. doi: 10.1002/0471732877.emd274
 67. Serpe M., Umulis D., Ralston A., et al. (2008) Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clin Proc* 14:612–626.
 68. Roberts NJ., Zhang L., Janku F., et al. (2015) Intratumoral injection of clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses. *Sci Transl Med* 6:1–27.
 69. Patyar S., Joshi R., Byrav DSP., et al. (2010) Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci* 17:1–9.
 70. Roots R., Smith KC. (1974) On the nature of the oxygen effect on x-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. *Int J Radiat Biol* 26:467–480.
 71. Rockwell S., Dobrucki IT., Kim EY., et al. (2009) Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 9:442–458.
 72. Quintiliani M. (1986) The Oxygen Effect in Radiation Inactivation of DNA and Enzymes. *Int J Radiat Biol* 50:573–594.
 73. Hall EJ., Willson S. (2012) *Radiobiology for the radiologist*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
 74. Kvols LK. (2005) Radiation sensitizers: A selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets. *J Nucl Med* 46:187–191.
 75. Brown JM. (1993) SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br J Cancer* 67:1163–1170.
 76. Guise CP., Mowday AM., Ashoorzadeh A., et al. (2014) Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: Targeting tumor hypoxia. *Chin J Cancer* 33:80–86.
 77. Grimes DR., Partridge M. (2015) A mechanistic investigation of the oxygen fixation hypothesis and oxygen enhancement ratio. *Biomed Phys Eng Express* 1:1–9.
 78. Glitsch M. (2011) Protons and Ca²⁺: ionic allies in tumor progression? *Physiology (Bethesda)* 26:252–65.

79. Riemann A., Schneider B., Gündel D., et al. (2014) Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. *Pflugers Arch* 466:2127–38.
80. Robey IF., Baggett BK., Kirkpatrick ND., et al. (2009) Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res* 69:2260–2268.
81. Song CW., Lyons JC., Griffin RJ., et al. (1993) Increase in thermosensitivity of tumor cells by lowering intracellular pH. *Cancer Res* 53:1599–1601.
82. Song CW., Ph D., Kim GWIE., et al. (1994) Thermosensitization by increasing intracellular acidity with amiloride and its analogs. *Int J Radiat Oncol* 30:1161–1169.
83. Thews O., Riemann A., Nowak M., Gekle M. (2014) Impact of hypoxia-related tumor acidosis on cytotoxicity of different chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol* 812:51–58.
84. Thews O., Gassner B., Kelleher DK., et al. (2006) Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Neoplasia* 8:143–152.
85. Swietach P., Hulikova A., Patiar S., et al. (2012) Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin. *PLoS One* 7:e35949.
86. Kozin S V., Shkarin P., Gerweck LE. (2001) The cell transmembrane pH gradient in tumors enhances cytotoxicity of specific weak acid chemotherapeutics. *Cancer Res* 61:4740–4743.
87. Gerweck LE. (2006) Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 5:1275–1279.
88. Chaplin DJ., Horsman MR., Trotter MJ., Siemann DW. (1998) Therapeutic significance of microenvironmental factors. In: Mollis M, Vaupel P (eds) *Blood Perfus. Microenviron. Hum. Tumors*. Springer, Heidelberg, pp 131–143
89. Seymour LW., Miyamoto Y., Maeda H., et al. (1995) Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier. *Eur J Cancer* 31:766–770.
90. Winchell HS. (1976) Mechanisms for localization of radiopharmaceuticals in neoplasms. *Semin Nucl Med* 6:371–378.
91. Ringsdorf H. (1975) Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J Polym Sci Polym Symp* 51:135–153.
92. Kozlova D., Epple M. (2013) Biological targeting with nanoparticles: state of the art. *BioNanoMaterials* 14:161–170.
93. Thiriet M. (2011) *Cell and Tissue Organization in the Circulatory and Ventilatory Systems*. Springer, Heidelberg, pp 11–67
94. Peer D., Karp JM., Hong S., et al. (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2:751–760.
95. Haag R., Kratz F. (2006) *Polymere Therapeutika: Konzepte und Anwendungen*. *Angew Chem* 118:1218–1237.
96. Gianasi E., Wasil M., Evagorou EG., et al. (1999) HPMA copolymer platinates as novel antitumour agents: In vitro properties, pharmacokinetics and antitumour activity in vivo. *Eur J Cancer* 35:994–1002.
97. Lin X., Zhang Q., Rice JR., et al. (2004) Improved targeting of platinum

- chemotherapeutics: The antitumour activity of the HPMA copolymer platinum agent AP5280 in murine tumour models. *Eur J Cancer* 40:291–297.
98. Seymour LW., Ulbrich K., Strohalm J., et al. (1990) The pharmacokinetics of polymer-bound adriamycin. *Biochem Pharmacol* 39:1125–1131.
 99. Ulbrich K., Subr V. (2010) Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 62:150–66.
 100. Ríhová B., Kovár M. (2010) Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers. *Adv Drug Deliv Rev* 62:184–91.
 101. Allmeroth M., Moderegger D., Gündel D., et al. (2013) HPMA-LMA copolymer drug carriers in oncology: an in vivo pet study to assess the tumor line-specific polymer uptake and body distribution. *Biomacromolecules* 14:3091–3101.
 102. Hoffmann S., Vystrčilová L., Ulbrich K., et al. (2012) Dual fluorescent HPMA copolymers for passive tumor targeting with pH-sensitive drug release: synthesis and characterization of distribution and tumor accumulation in mice by noninvasive multispectral optical imaging. *Biomacromolecules* 13:652–63.
 103. Besheer A., Hause G., Kressler J., Mäder K. (2007) Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Starch: Synthesis, Characterization, and Aqueous Self-Assembly into Nano-Sized Polymeric Micelles and Vesicles. *Biomacromolecules* 8:359–367.
 104. Allmeroth M., Moderegger D., Biesalski B., et al. (2011) Modifying the body distribution of HPMA-based copolymers by molecular weight and aggregate formation. *Biomacromolecules* 12:2841–2849.
 105. Kopeček J., Kopečková P., Minko T., Lu ZR. (2000) HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: Design, activity, and mechanism of action. *Eur J Pharm Biopharm* 50:61–81.
 106. Vasey PA., Kaye SB., Morrison R., et al. (1999) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Clin Cancer Res* 5:83–94.
 107. Meerum Terwoegt JM., ten Bokkel Huinink WW., Schellens JH., et al. (2001) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anticancer Drugs* 12:315–323.
 108. Chiefari J., Chong YKB., Ercole F., et al. (1998) Living free-radical polymerization by reversible addition - fragmentation chain transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* 31:5559–5562.
 109. Scales CW., Vasilieva YA., Convertine AJ., et al. (2005) Direct, controlled synthesis of the nonimmunogenic hydrophilic polymer, poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) via RAFT in aqueous media. *Biomacromolecules* 6:1846–1850.
 110. Eberhardt M., Mruk R., Zentel R., Théato P. (2005) Synthesis of pentafluorophenyl(meth)acrylate polymers: New precursor polymers for the synthesis of multifunctional materials. *Eur Polym J* 41:1569–1575.
 111. Herth MM., Barz M., Moderegger D., et al. (2009) Radioactive labeling of defined HPMA-based polymeric structures using [¹⁸F]FETos for in vivo imaging by positron emission tomography. *Biomacromolecules* 10:1697–1703.
 112. Barz M., Luxenhofer R., Zentel R., Kabanov A V. (2009) The uptake of N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide based homo, random and block copolymers by human multi-drug resistant breast adenocarcinoma cells. *Biomaterials* 30:5682–

- 5690.
113. Seymour LW., Duncan R. (1987) Effect of molecular weight (mw) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J Biomed Mater Res* 21:1341–1358.
 114. Chytil P., Etrych T., Koňák Č., et al. (2008) New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting. *J Control Release* 127:121–130.
 115. Moffitt M., Khougaz K., Eisenberg a. (1996) Micellization of ionic block copolymers. *Acc Chem Res* 29:95–102.
 116. Gref R., Domb A., Quellec P., et al. (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev* 16:215–233.
 117. Allmeroth M., Moderegger D., Gündel D., et al. (2013) PEGylation of HPMA-based block copolymers enhances tumor accumulation in vivo: A quantitative study using radiolabeling and positron emission tomography. *J Control Release* 172:77–85.
 118. Harris JM., Chess RB. (2003) Effect of PEGylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2:214–221.
 119. Bissett D., Cassidy J., de Bono JS., et al. (2004) Phase I and pharmacokinetic (PK) study of MAG-CPT (PNU 166148): a polymeric derivative of camptothecin (CPT). *Br J Cancer* 91:50–55.
 120. Ulbrich K., Etrych T., Chytil P., et al. (2003) HPMA copolymers with pH-controlled release of doxorubicin: In vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity. *J Control Release* 87:33–47.
 121. Seymour LW., Ferry DR., Kerr DJ., et al. (2009) Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *Int J Oncol* 34:1629–1636.
 122. Seymour BLW., Ferry DR., Anderson D., et al. (2009) Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer bound doxorubicin. *J Clin Oncol* 20:1668–1676.
 123. Rademaker-Lakhai JM., Terret C., Howell SB., et al. (2009) A phase I study of the safety and pharmacokinetics (PK) of XMT-1001 given as an intravenous (IV) infusion once every three weeks to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 10:3386–3395.
 124. Nowotnik DP., Cvitkovic E. (2009) ProLindac (AP5346): A review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic. *Adv Drug Deliv Rev* 61:1214–1219.
 125. Chang G., Li C., Lu W., Ding J. (2010) N-Boc-Histidine-Capped PLGA-PEG-PLGA as a Smart Polymer for Drug Delivery Sensitive to Tumor Extracellular pH. *Macromol Biosci* 10:1248–1256.
 126. Liu Y., Wang W., Yang J., et al. (2013) pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery. *Asian J Pharm Sci* 8:159–167.
 127. Dongin K., Eun Seong L., Kyung Taek O., et al. (2009) Doxorubicin-Loaded Polymeric Micelle Overcomes Multidrug Resistance of Cancer by Double-Targeting Folate Receptor and Early Endosomal pH. *Small* 4:2043–2050.
 128. Chen C-K., Law W-C., Aalinkeel R., et al. (2014) Biodegradable Cationic Polymeric

- Nanocapsules for Overcoming Multidrug Resistance and Enabling Drug-Gene Co-Delivery to Cancer Cells. *Nanoscale* 6:1567–1572.
129. Bu H., Gao Y., Li Y. (2010) Overcoming multidrug resistance (MDR) in cancer by nanotechnology. *Sci China Chem* 53:2226–2232.
 130. Minko T. (2010) HEMA copolymers for modulating cellular signaling and overcoming multidrug resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 62:192–202.
 131. Sahay G., Alakhova DY., Kabanov A V. (2010) Endocytosis of Nanomedicines. *J Control Release* 145:182–195.
 132. Hillaireau H., Couvreur P. (2009) Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 66:2873–2896.
 133. Rabinovitch M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5:85–87.
 134. Doherty GJ., McMahon HT. (2009) Mechanisms of Endocytosis. *AnnuRevBiochem* 78:857–902.
 135. Black CD V., Gregoriadis G. (1974) Intracellular fate and effect of liposome entrapped actinomycin D injected into rats. *Biochem Soc Trans* 2:869–871.
 136. Couvreur P., Tulkens P., Roland M., et al. (1977) Nanocapsules: A new type of lysosomotropic carrier. *FEBS Lett* 84:323–326.
 137. Heath TD., Lopez NG., Papahadjopoulos D. (1985) The effects of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-gamma-aspartate to cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 820:74–84.
 138. Conner SD., Schmid SL. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
 139. Damke H., Baba T., Warnock DE., Schmid SL. (1994) Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation. *J Cell Biol* 127:915–934.
 140. Rappoport JZ. (2008) Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 143:415–423.
 141. Heuser JE., Biology C. (1988) Deep-Etch Visualization of Proteins Involved in Clathrin Assembly. *J Cell Biol* 107:877–886.
 142. Xu S., Olenyuk BZ., Okamoto CT., F. H-AS. (2014) Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv Drug Deliv Rev* 65:121–138.
 143. Parton RG., Simons K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:185–194.
 144. Nyholm P., Brunton JL., Lingwood CA. (1995) Modelling of the interaction of verotoxin-1 (VT1) with its glycolipid receptor, globotriaosylceramide (Gb3). *J Biol Macromol* 17:199–204.
 145. Holmgren J., Lönnroth I., Mansson J., Svennerholm L. (1975) Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Proc Natl Acad Sci* 72:2520–2524.
 146. Voigt J., Christensen J., Shastri VP. (2014) Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae. *PNAS* 111:2942–2947.
 147. Oba M., Aoyagi K., Miyata K., et al. (2008) Polyplex Micelles with Cyclic RGD Peptide

- Ligands and Disulfide Cross-Links Directing to the Enhanced Transfection via Controlled Intracellular Trafficking. *Mol Pharm* 5:1080–1092.
148. Oviezzo FIR., Irino GIC., Essa WICS. (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6:1362–1367.
 149. Gonzalez E., Nagiel A., Lin AJ., et al. (2004) Small Interfering RNA-mediated Down-regulation of Caveolin-1 Differentially Modulates Signaling Pathways in Endothelial Cells *. *J Biol Chem* 279:40659–40669.
 150. Abulrob A., Giuseppin S., Andrade MF., et al. (2004) Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. *Oncogene* 23:6967–6979.
 151. Isshiki M., Anderson RGW. (2003) Function of Caveolae in Ca²⁺ Entry and Ca²⁺ - Dependent Signal Transduction. *Traffic* 4:717–723.
 152. Pani B., Singh BBS. (2010) Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* 45:625–633.
 153. Mercer J., Helenius A. (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11:510–520.
 154. Kerr MC., Teasdale RD. (2009) Defining Macropinocytosis. *Traffic* 10:364–371.
 155. Francis C., Ryan T., Jones B., et al. (1993) Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364:639–642.
 156. Fabbri A., Falzano L., Travaglione S., et al. (2002) Rho-activating Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: macropinocytosis of apoptotic bodies in human epithelial cells Alessia. *Int J Med Microbiol* 291:551–554.
 157. Pike LJ. (2003) Lipid rafts : bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44:655–667.
 158. Sabharanjak S., Sharma P., Parton RG., Mayor S. (2002) GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct cdc42-Regulated , Clathrin-Independent Pinocytic Pathway. *Dev Cell* 2:411–423.
 159. Harush-Frenkel O., Debotton N., Benita S., Altschuler Y. (2007) Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 353 353:26–32.
 160. Yeung T., Gilbert GE., Shi J., et al. (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319:210–213.
 161. Kou L., Sun J., Zhai Y., He Z. (2013) The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J Pharm Sci* 8:1–8.
 162. Zauner W., Farrow NA., Haines AMR. (2001) In vitro uptake of polystyrene microspheres : effect of particle size , cell line and cell density. *J Control Release* 71:39–51.
 163. Gratton SEA., Ropp PA., Pohlhaus PD., et al. (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci* 105:11613–11618.
 164. Kobiasi M Al., Chua BY., Tonkin D., et al. (2012) Control of size dispersity of chitosan biopolymer microparticles and nanoparticles to influence vaccine trafficking and cell uptake. *J Biomed Mater Res - Part A* 100 A:1859–1867.
 165. Shurety W., Stewart NL., Stow JL. (1998) Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug

- Jasplakinolide. *Mol Biol Cell* 9:957–975.
166. Mayor S., Pagano RE. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603–12.
 167. Qian ZM., Li H., Sun H., Ho K. (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54:561–587.
 168. Torgersen ML., Skretting G., van Deurs B., Sandvig K. (2001) Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 114:3737–3747.
 169. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien RY. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–50.
 170. Ozkan P., Mutharasan R. (2002) A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1572:143–148.
 171. Schwartz M. (1961) A biomathematical approach to clinical tumor growth. *Cancer* 14:1272–1294.
 172. Ozerdem U., Hargens AR. (2005) A simple method for measuring interstitial fluid pressure in cancer tissues. *Microvasc Res* 70:116–20.
 173. Freudinger R., Silbernagl S., Gekle M., Mildenerger S. (1995) Kinetics of receptor-mediated endocytosis of albumin in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells): influence of Ca^{2+} and cAMP. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 430:374–380.
 174. Bergman J a., McAteer J a., Evan a. P., Soleimani M. (1991) Use of the pH-sensitive dye BCECF to study pH regulation in cultured human kidney proximal tubule cells. *J Tissue Cult Methods* 13:205–209.
 175. Chaillet JR., Boron WF. (1985) Intracellular calibration of a pH-sensitive dye in isolated, perfused salamander proximal tubules. *J Gen Physiol* 86:765–794.
 176. Frank J., Gündel D., Drescher S., et al. (2015) Injectable LiNc-BuO loaded microspheres as in vivo EPR oxygen sensors after co-implantation with tumor cells. *Free Radic Biol Med* 89:741–749.
 177. Riemann A., Schneider B., Ihling A., et al. (2011) Acidic environment leads to ROS-Induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One* 6:e22445.
 178. Zhao D., Ran S., Constantinescu A., et al. (2003) Tumor oxygen dynamics: correlation of in vivo MRI with histological findings. *Neoplasia* 5:308–18.
 179. Guerin C., Lathera J., Drewes LR., et al. (1992) Vascular expression of glucose transporter in experimental brain neoplasms. *Am J Pathol* 140:417–25.
 180. Mpekris F., Angeli S., Pirentis AP., Stylianopoulos T. (2015) Stress-mediated progression of solid tumors: effect of mechanical stress on tissue oxygenation, cancer cell proliferation, and drug delivery. *Biomech Model Mechanobiol* 14:1391–1402.
 181. Song CW., Levitt SH. (1971) Quantitative study of vascularity in Walker carcinoma 256. *Cancer Res* 31:587–589.
 182. Kunjachan S., Błauż A., Möckel D., et al. (2012) Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations. *Eur J Pharm Sci* 45:421–8.
 183. Oliver Thews, Martin Nowak, Christoph Sauvant and MG., Thews O., Nowak M., et al. (2011) Hypoxia-Induced Extracellular Acidosis Increases p-Glycoprotein Activity and Chemoresistance in Tumors in Vivo via p38 Signaling Pathway. *Oxyg Transp to*

- tissue 701:115–121.
184. Höckel M., Vaupel P. (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93:266–276.
 185. Olive PL., Durand RE., Raleigh J a., et al. (2000) Comparison between the comet assay and pimonidazole binding for measuring tumour hypoxia. *Br J Cancer* 83:1525–1531.
 186. Ljungkvist ASE., Bussink J., Rijken PFJW., et al. (2000) Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:1529–1538.
 187. Huang T., Civelek a C., Zheng H., et al. (2013) (18)F-misonidazole PET imaging of hypoxia in micrometastases and macroscopic xenografts of human non-small cell lung cancer: a correlation with autoradiography and histological findings. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 3:142–153.
 188. Grierson JR., Link JM., Mathis C a., et al. (1989) A Radiosynthesis of fluorine- 18 Fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 30:343–350.
 189. Carreau A., Hafny-Rahbi B El., Matejuk A., et al. (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15:1239–1253.
 190. Bencze M., Behuliak M., Zicha J. (2013) The Impact of Four Different Classes of Anesthetics on the Mechanisms of Blood Pressure Regulation in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol Res* 62:471–478.
 191. Brown JM., Wilson WR. (2004) Exploiting Tumour Hypoxia in Cancer Treatment. *Nat Rev Cancer* 4:437–447.
 192. Thews O., Nowak M., Christoph S., Gekle M. (2011) Hypoxia-Induced Extracellular Acidosis Increases p-Glycoprotein Activity and Chemoresistance in Tumors in Vivo via p38 Signaling Pathway. *Oxyg Transp to tissue* 701:115–121.
 193. Wang Z., Su M-Y., Nalcioglu O. (2002) Applications of dynamic contrast enhanced MRI in oncology: measurement of tumor oxygen tension. *Technol Cancer Res Treat* 1:29–38.
 194. Lyng H., Sundfør K., Tropé C., Rofstad EK. (1996) Oxygen tension and vascular density in human cervix carcinoma. *Br J Cancer* 74:1559–1563.
 195. Bussink J., Kaanders JH a M., Van Der Kogel AJ. (2003) Tumor hypoxia at the micro-regional level: Clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* 67:3–15.
 196. Kaanders JHAM., Wijffels KIEM., Marres HAM., et al. (2002) Pimonidazole Binding and Tumor Vascularity Predict for Treatment Outcome in Head and Neck Cancer Pimonidazole Binding and Tumor Vascularity Predict for Treatment Outcome in. *Cancer Res* 62:7066–7074.
 197. Colliez F., Gallez B., Jordan BF. (2017) Assessing Tumor Oxygenation for Predicting Outcome in Radiation Oncology: A Review of Studies Correlating Tumor Hypoxic Status and Outcome in the preclinical and clinical settings. *Front Oncol* 7:1–16.
 198. Gullino PM., Grantham FH., Smith SH., Haggerty AC. (1965) Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors. *J Natl Cancer Inst* 34:857–869.
 199. Chen LQ., Howison CM., Jeffery JJ., et al. (2014) Evaluations of extracellular pH within in vivo tumors using acidoCEST MRI. *Magn Reson Med* 72:1408–17.

200. Sheth VR., Li Y., Chen LQ., et al. (2012) Measuring in vivo tumor pHe with CEST-FISP MRI. *Magn Reson Med* 67:760–768.
201. Vere AL., Biddlecombe GB., Spees WM., et al. (2009) A Novel Technology for the Imaging of Acidic Prostate Tumors by Positron Emission Tomography. *Cancer Res* 69:4510–4516.
202. Lotz C., Kelleher DK., Gassner B., et al. (2007) Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. *Oncol Rep* 17:239–244.
203. Wojtkowiak JW., Verduzco D., Schramm KJ., Gillies RJ. (2011) Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm* 8:2032–2038.
204. Chytil P., Hoffmann S., Schindler L., et al. (2013) Dual fluorescent HPMA copolymers for passive tumor targeting with pH-sensitive drug release II: Impact of release rate on biodistribution. *J Control Release* 172:504–512.
205. Heinrich A-K., Lucas H., Schindler L., et al. (2016) Improved Tumor-Specific Drug Accumulation by Polymer Therapeutics with pH-Sensitive Drug Release Overcomes Chemotherapy Resistance. *Mol Cancer Ther* 15:998–1007.
206. Liu J., Bauer H., Callahan J., et al. (2010) Endocytic uptake of a large array of HPMA copolymers: Elucidation into the dependence on the physicochemical characteristics. *J Control Release* 143:71–79.
207. Mohr N., Barz M., Forst R., Zentel R. (2014) A Deeper Insight into the Postpolymerization Modification of Polypenta Fluorophenyl Methacrylates to Poly(N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide). *Macromol Rapid Commun* 35:1522–1527.
208. Shiah J-G., Dvořák M., Kopečková P., et al. (2001) Biodistribution and antitumour efficacy of long-circulating N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer–doxorubicin conjugates in nude mice. *Eur J Cancer* 37:131–139.
209. Lai SK., Hida K., Chen C., Hanes J. (2008) Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles. *J Control Release* 125:107–111.
210. Jokerst J V., Lobovkina T., Zare RN., Gambhir SS. (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 6:715–728.
211. Duncan R., Cable HC., Rejmanova P., et al. (1984) N- (2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymers have been proposed as a potential lysosomotropic drug delivery system . HPMA copolymers bearing tyrosinamide residues , bound either directly to the polymer backbone or via a glycyglycine spacer ,. *Biochim Biophys Acta* 799:1–8.
212. Hemmelmann M., Metz V V., Koynov K., et al. (2012) Amphiphilic HPMA-LMA copolymers increase the transport of Rhodamine 123 across a BBB model without harming its barrier integrity. *J Control Release* 163:170–177.
213. Friberg EG., ČunderlíKová B., Pettersen EO., Moan J. (2003) pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett* 195:73–80.
214. Mok H., Ji WP., Tae GP. (2008) Enhanced intracellular delivery of quantum dot and adenovirus nanoparticles triggered by acidic pH via surface charge reversal. *Bioconjug Chem* 19:797–801.
215. Mok H., Veiseh O., Fang C., et al. (2010) PH-sensitive siRNA nanovector for targeted gene silencing and cytotoxic effect in cancer cells. *Mol Pharm* 7:1930–1939.

216. Ben-Dov N., Korenstein R. (2012) Enhancement of cell membrane invaginations, vesiculation and uptake of macromolecules by protonation of the cell surface. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0035204
217. Neshatian M., Chung S., Yohan D., et al. (2015) Uptake of Gold Nanoparticles in Breathless (Hypoxic) Cancer Cells. *J Biomed Nanotechnol* 11:1162–1172.
218. Jain S., Coulter JA., Butterworth KT., et al. (2017) Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions. *Radiother Oncol* 110:342–347.
219. Bourseau-Guilmain E., Menard JA., Lindqvist E., et al. (2016) Hypoxia regulates global membrane protein endocytosis through caveolin-1 in cancer cells. *Nat Commun* 7:11371.
220. Wheaton WW., Chandel NS. (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol - Cell Physiol* 300:C385–C393.
221. Garrett WS., Chen L-M., Kroschewski R., et al. (2000) Developmental Control of Endocytosis in Dendritic Cells by Cdc42. *Cell* 102:325–334.
222. Krook MA., Nicholls LA., Scannell CA., et al. (2014) Stress-Induced CXCR4 Promotes Migration and Invasion of Ewing Sarcoma. *Mol Cancer Res* 12:953 LP-964.
223. Damaghi M., Wojtkowiak JW., Gillies RJ. (2013) pH sensing and regulation in cancer. *Front Physiol* 4:370.
224. Mohammadpour R., Safarian S., Buckway B., Ghandehari H. (2017) Comparative Endocytosis Mechanisms and Anticancer Effect of HPMA Copolymer- and PAMAM Dendrimer-MTCP Conjugates for Photodynamic Therapy. *Macromol Biosci* 17:1–15.
225. Hussain KM., Leong KLJ., Ng MML., Chu JJH. (2011) The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. *J Biol Chem* 286:309–321.
226. Kühling L., Schelhaas M. (2014) Systematic Analysis of Endocytosis by Cellular Perturbations. In: Ivanov AI (ed) *Exocytosis Endocytosis*. *Methods Mol. Biol.* (Methods Protoc., 2nd ed. Humana Press, New York, pp 19–46
227. Wang Y., Roche O., Yan MS., et al. (2009) Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nat Med* 15:319–324.
228. Bareford LM., Swaan PW. (2008) Endocytotic Mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59:748–758.
229. Gündel D., Allmeroth M., Reime S., et al. (2017) Endocytotic uptake of HPMA-based polymers by different cancer cells: impact of extracellular acidosis and hypoxia. *Int J Nanomedicine* 12:5571–5584.
230. Sahay G., Batrakova E V., Kabanov A V. (2008) Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug Chem* 19:2023–2029.
231. Martínez D., Vermeulen M., Trevani A., et al. (2006) Extracellular Acidosis Induces Neutrophil Activation by a Mechanism Dependent on Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK Pathways. *J Immunol* 176:1163–1171.
232. Gerke V., Creutz CE., Moss SE. (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:449.
233. Canton J., Schlam D., Breuer C., et al. (2016) Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in

- macrophages. *Nat Commun* 7:11284.
234. Koivusalo M., Welch C., Hayashi H., et al. (2010) Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol* 188:547–63.
 235. Quinn SJ., Bai M., Brown EM. (2004) pH Sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 279:37241–37249.
 236. Tennakoon S., Aggarwal A., Kállay E. (2016) The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863:1398–1407.
 237. Vidal-Quadras M., Gelabert-Baldrich M., Soriano-Castell D., et al. (2011) Rac1 and Calmodulin Interactions Modulate Dynamics of ARF6-Dependent Endocytosis. *Traffic* 12:1879–1896.
 238. Ho Y., Joyal JL., Li Z., Sacks DB. (1999) IQGAP1 Integrates Ca²⁺ / Calmodulin and Cdc42 Signaling *. *J Biol Chem* 274:464–470.
 239. Frantz C., Karydis A., Nalbant P., et al. (2007) Positive feedback between Cdc42 activity and H⁺ efflux by the Na-H exchanger NHE1 for polarity of migrating cells. *J Cell Biol* 179:403–410.
 240. Sandvig K., Olsnes S., Petersen OW. (1987) Acidification of the Cytosol Inhibits Endocytosis from Coated Pits Ultrastructural Immunocytochemical Detection of. *J Cell Biol* 105:679–689.

7.5. Erklärung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2011 bis 2015 im Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Teile der vorliegenden Arbeit sind in Publikationen eingegangen. Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet sowie verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche aufgeführt. Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde. Ich versichere, dass ich mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Daniel Gündel

Halle (Saale), den

7.6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Daniel Gündel
Adresse	Kantstr. 30, 04275 Leipzig, Deutschland
Geburtsdatum	14.03.1981
Geburtsort	Rodewisch
Nationalität	deutsch

Ausbildung

2015 -	Wissenschaftlicher Mitarbeiter , Universitätsklinikum Halle (Saale), Department für Strahlenmedizin, Abteilung Nuklearmedizin
2011 - 2015	Doktorand/Wissenschaftlicher Mitarbeiter , Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät, MLU Halle-Wittenberg, Deutschland; Betreuer: Prof. Oliver Thews Thema: "Tumor cell line specific uptake of pHPMA-based drug carriers – Affection of the pathophysiological tumor parameters acidosis and hypoxia"
2008 - 2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter , Max-Planck-Gesellschaft für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle, Deutschland Thema: FK506 binding proteins as potential targets in neuropathological diseases
2001 - 2008	Diplom Biologie , MLU Halle - Wittenberg, Deutschland Hauptfach: Genetik, Nebenfach: Immunologie, Biotechnologie, Zoologie Abschlussarbeit: Probiodrug AG, Betreuer: Dr. J.-U. Rahfeld "Investigations of DP4-like enzymes in different rat brain areas"
1999 - 2000	Zivildienst

1992 - 1999 | Pestalozzi – Gymnasium, Rodewisch, Deutschland

Zertifikate

2013	Felasa B, Universität Leipzig, Med. Fak.
2016	Strahlenschutzkunde S2.2 und S4.2
2017	Gentechniksicherheitsverordnung §§15 und 17 (Projektleiter für gentechnische Arbeiten und Beauftragter für Biologische Sicherheit)

Publikationen

2017	<p>Daniel Gündel et al., “Assessing glomerular filtration in small animals using [⁶⁸Ga]-DTPA and [⁶⁸Ga]-EDTA with PET imaging”; <i>Molecular Imaging and Biology</i></p> <p>Daniel Gündel, et al.; “Endocytotic uptake of HPMA-based polymers by different cancer cells: impact of extracellular acidosis and hypoxia.”; <i>International Journal of Nanomedicine</i></p>
2015	Juliane Frank and Daniel Gündel ; et al.; “Injectable LiNc-BuO loaded microspheres and their use as in vivo EPR oxygen sensors after co-implantation with tumor cells”; <i>Contrast Media and Molecular Imaging</i> ; (geteilte Erstauthorschaft)
2014	Riemann, Anne; Schneider, Bettina; Gündel, Daniel ; et al.; „Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells.“; <i>Pflügers Archiv : European journal of physiology</i>
2013	<p>Allmeroth, Mareli; Moderegger, Dorothea; Gündel, Daniel; et al.; „PEGylation of HPMA-based Block-Copolymers enhances tumor accumulation in vivo: A quantitative study using radiolabeling and positron emission tomography.“; <i>Journal of controlled release</i></p> <p>Allmeroth, Mareli; Moderegger, Dorothea; Gündel, Daniel; et al.; „HPMA-LMA copolymer drug carriers in oncology: an in vivo pet study to assess</p>

the tumor line-specific polymer uptake and body distribution.";
Biomacromolecules

Konferenzbeiträge

2017	“Impact of hypoxia and acidosis on endocytotic uptake of macromolecules in tumor cells”, ISOTT 2017, Halle (Saale), Germany
2016	“Evaluation of glomerular kidney function with ⁶⁸ Ga-DTPA in small animal PET/CT”, Theranostics World Congress 2016, Melbourne, Australien
2015	“Role of intracellular pH and Ca ²⁺ -concentration on the pH-dependent endocytosis of macromolecules in tumor cells”, 94 th Meeting of the German Physiological Society, Magdeburg
	“Impact of pH and pO ₂ on endocytosis of nano-scaled drug carriers in tumor cells“, Precision Medicine for Cancer, EACR – OECl conference, Luxembourg
2014	„pH-dependent endocytosis into tumor cell lines“, 93 th Meeting of the German Physiological Society, Mainz
2013	„Modified hydroxypropyl methacrylate polymers (HPMAs) – Drug carriers for tumor targeting“, 92 th Meeting of the German Physiological Society, Heidelberg

Mitgliedschaften

2014-...	European Association of Cancer Research (EACR)
2017-...	European Association of Nuclear Medicine (EANM)
2017-...	International Society on Oxygen Transport to Tissue (ISOTT)

Extracurriculäre Aktivitäten

- | | | |
|---------|---|---|
| 01/2004 | – | Studentischer wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für |
| 07/2004 | | Molekulargenetik, MLU Halle -Wittenberg |
| 01/2005 | – | Studentischer wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für |
| 10/2006 | | Molekularbiologie, Probiodrug AG, Halle / Saale |