

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. med. Nicolai Maass)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EVALUATION DER PHARMAKOLOGISCHEN  
WIRKUNG DES NEUEN ANTIMETABOLIT-  
BISPHOSPHONAT-KONJUGATS 5-FDU-ALENDRONAT  
AUF DIE OSSÄRE METASTASIERUNG DES  
MAMMAKARZINOMS AUF ZELLULÄRER EBENE  
SOWIE AM KLINIKNAHEN MAUSMODELL**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**ANNA-CHRISTINA RAMBOW**  
aus Stade

Kiel, 2016

1. Berichterstatter:

PD Dr. med. C. Schem

2. Berichterstatter:

PD Dr. med. Carsten Maik Naumann

Tag der mündlichen Prüfung:

09. März 2017

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Medizinischer Hintergrund.....	1
1.2 Zielsetzung .....	1
1.3 Knochenmetastasen bei Brustkrebs .....	2
2 Material und Methoden .....	3
2.1 Vorwort .....	3
2.2 Tiere .....	3
2.3 Tiermodell .....	4
2.4 Zellen.....	4
2.5 5-Fluoruracil (5-FU).....	5
2.6 2'-Desoxy-5-Fluoruridin (5-FdU).....	5
2.7 Alendronat .....	6
2.8 2'-Desoxy-5-Fluoruridin-Alendronat (5-FdU-ale).....	6
2.9 Zellzyklusanalyse .....	8
2.9.1 Material (alphabetisch).....	8
2.9.2 Fragestellung .....	8
2.9.3 Prinzip .....	9
2.9.4 Durchführung .....	9
2.10 MTT-Test .....	11
2.10.1 Material (alphabetisch).....	11
2.10.2 Prinzip .....	12
2.10.3 Durchführung .....	12
2.11 Anfertigung der histologischen Schnitte .....	13
2.11.1 Material (alphabetisch).....	13
2.11.2 Aufbereitung der Knochen .....	13
2.12 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) .....	14
2.12.1 Material (alphabetisch).....	14
2.12.2 Durchführung .....	14
2.13 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	15

2.13.1 Material (alphabetisch).....	15
2.13.2 Durchführung .....	16
2.14 TRAP-Färbung .....	17
2.14.1 Material (alphabetisch).....	17
2.14.2 Prinzip .....	18
2.14.3 Durchführung .....	18
2.15 TRAP-ELISA .....	19
2.15.1 Material (alphabetisch).....	19
2.15.3 Prinzip .....	19
2.15.2 Durchführung .....	19
2.16 Osteocalcin-ELISA .....	20
2.16.1 Material (alphabetisch).....	20
2.16.2 Prinzip .....	20
2.16.3 Durchführung .....	20
2.17 Statistische Methoden.....	21
3 Ergebnisse .....	21
3.1 Vorwort .....	21
3.2 Allgemeine Beobachtungen.....	22
3.3 Zellzyklusanalyse .....	22
3.4 MTT-Test .....	25
3.5 Tumorphächenausdehnung anhand Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	26
3.6 TRAP-Färbung .....	27
3.7 TRAP-ELISA .....	28
3.8 Osteocalcin-ELISA .....	29
4 Diskussion .....	29
4.1 Methodenkritik .....	29
4.1.1 Tiermodell .....	29
4.1.2 Histologische Analysen .....	30
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	30
4.2.1 <i>In-Vitro</i> -Versuche.....	30

4.2.2 <i>In-Vivo</i> -Versuche.....	31
4.3 Weitere Forschungsergebnisse .....	32
4.4 Klinische Relevanz.....	34
4.4.1 Derzeitige pharmakologische Behandlung von Knochenmetastasen .....	34
4.4.2 Bestandteile von 5-FdU-ale und ihre klinische Relevanz.....	34
4.5 Schlussfolgerung .....	35
5 Zusammenfassung .....	37
6 Literaturverzeichnis.....	39
7 Anhang .....	46
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	46
7.2 Histologische Abbildungen .....	49
7.2.1 Darstellung der Tumorareale mittels ImageJ-Software.....	49
7.2.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	50
7.2.3 TRAP-Färbung .....	51
7.3 Ergebnistabellen .....	52
7.3.1 Vorwort .....	52
7.3.2 Ergebnistabellen Zellzyklusanalyse .....	52
7.3.4 Ergebnistabellen Masson-Goldner-Trichrom-Färbung .....	53
7.3.5 Ergebnistabellen TRAP-Färbung .....	54
7.3.6 Ergebnistabellen TRAP-ELISA .....	54
7.3.7 Ergebnistabellen Osteocalcin-ELISA.....	55
7.4 Genehmigung des Tierschutzantrags.....	56
7.5 Teilnahmebestätigung des Seminars „Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung“ .....	60
7.6 Danksagungen .....	61
7.7 Lebenslauf .....	62
7.8 Veröffentlichungen und Preise .....	63

# 1 Einleitung

## 1.1 Medizinischer Hintergrund

Brustkrebs ist die häufigste invasive Tumorerkrankung der Frau. Die Neuerkrankungsrate liegt hierzulande bei rund 75.200 Frauen pro Jahr, sodass etwa jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Jede vierte Betroffene ist dabei jünger als 55 Jahre. [1] Prognosebestimmend sind neben der Tumorbiologie die Ausdehnung des Primärtumors und eine mögliche Fernmetastasierung. Diese besteht bei einem Teil der Betroffenen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder kann auch noch nach Jahren aufgrund von Therapierefraktärität entstehen. Dabei handelt es sich zu ca. 70 % um Knochenmetastasen. [2] [3] Bisphosphonate (BSP) sind als Standardtherapie bei ossärer Metastasierung von Mamma- und Ovarialkarzinomen etabliert. Sie können Skelettkomplikationen durch ihre osteoklastenhemmende Funktion signifikant reduzieren, haben aber erhebliche Nebenwirkungen wie Nierentoxizität und Kiefernekrosen. [4] Eine neue Medikamentengruppe, die BSP-Konjugate, wird zurzeit in zahlreichen Studien getestet. [5] [6] Es handelt sich um BSP, an die ein zytostatisch wirksamer Stoff, hier 2'-Desoxy-5-Fluoruridin (5-FdU), gekoppelt wird. Durch den BSP-Rest in dem konjugierten Molekül ist ein *bone targeting* möglich und nach anschließender Metabolisierung des Moleküls im Knochen eine Skelettanreicherung des gebundenen Zytostatikums und des BSP anzunehmen. Durch die metabolische Spaltung des Moleküls an unterschiedlichen chemischen Bindungen ist es möglich, dass einerseits ein verändertes BSP entsteht, andererseits auch das konjugierte Zytostatikum verändert wird, sodass eine Wirkung des zuvor gebundenen Monotherapeutikums bei vorhandener Resistenz zu vermuten ist.

Die vollständige Metabolisierung des neuen Pharmakons konnte in *in vitro* durchgeführten Vorversuchen durch Schott *et al.* allerdings nicht bestätigt werden. [7] Daher ist es dienlich, das neue Pharmakon 5-FdU-Alendronat (5-FdU-ale) in einem praxisnahen Tiermodell zu untersuchen. Die hier vorherrschende komplexe Enzym- und Stoffwechsellumgebung ist in *In-Vitro*-Versuchen nicht nachahmbar, wird für die Spaltung des Medikaments allerdings als obligat angesehen. Dazu wird ein am UKSH Kiel entwickeltes, neues präklinisches Tiermodell verwendet, welches, im Vergleich zu den bislang etablierten, eine Aussage über Tumorwachstum und insbesondere das Metastasierungsverhalten menschlicher Primärtumore in sehr realistischer Weise zulässt.

## 1.2 Zielsetzung

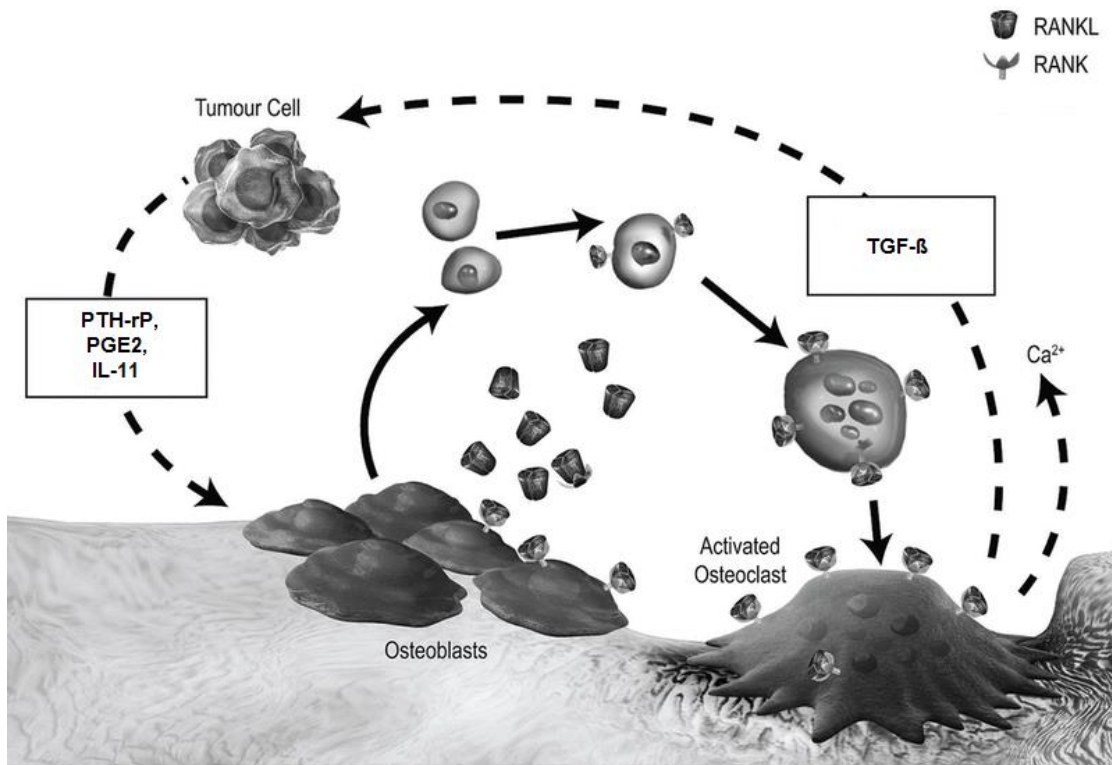
Das neue Konjugat 5-FdU-ale soll in Bezug auf seine Wirkung auf die Ausbildung von Knochenmetastasen in der Knieregion der mit humanen Mammakarzinomzellen injizierten Mäuse untersucht werden. Demgegenüber stehen die Wirkungen der Einzelkomponenten des Moleküls

5-FdU und Alendronat. Auf zellulärer Ebene soll zunächst der zytotoxische Effekt von 5-FdU-ale nachgewiesen werden. Dazu dienen ein MTT-Zellviabilitätstest und eine Zellzyklusanalyse mithilfe von Durchflusszytometrie. Die antiosteolytische Wirkung des Konjugats soll *in vivo* analysiert werden. Dazu werden TRAP- und Calcitonin-Assays aus dem Serum der Mäuse angefertigt und zusätzlich immunhistochemische TRAP-Färbungen an histologischen Präparaten der Knieregionen erstellt. Schließlich werden die Knochenmetastasen der Knieregion histologisch aufbereitet und quantifiziert. Anhand dieser *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten soll ein Benefit von 5-FdU-ale gegenüber seinen Einzelkomponenten bestätigt oder widerlegt werden.

### 1.3 Knochenmetastasen bei Brustkrebs

Knochenmetastasen sind eine häufige Komplikation des Mammakarzinoms. Etwa 65-80 % aller Patienten mit metastasiertem Brustkrebs entwickeln Metastasen im Knochen. [2] [3] Dies führt nicht nur zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen durch Knochenschmerzen und pathologische Frakturen, das Knochenmark kann auch schlafenden Tumorzellen als Nische dienen, dort der zytostatischen Therapie zu entgehen und Jahre später erneut zu Zweitmalignomen heranzuwachsen. [8] Zahlreiche Mechanismen für dieses spezielle Metastasierungsverhalten konnten bereits identifiziert werden. Ein Überblick soll im Folgenden gegeben werden.

Maßgeblich für das Einnisten von Krebszellen in den Knochen ist das Rekrutieren von Osteoklasten und Osteoblasten, die sowohl den Knochenumbau unterhalten als auch das Mikromilieu durch die Freisetzung von verschiedensten Mediatoren aus der Knochenmatrix bestimmen. Das aus der Knochenmatrix freigesetzte TGF- $\beta$  stimuliert beispielsweise die Produktion von Parathormon-related Protein (PTH-rP) [9], Prostaglandin E2 (PGE2) [10] und Interleukin-11 (IL-11) [11] in den Tumorzellen, die wiederum den Knochenabbau durch Osteoklasten fördern. Diese osteolytischen Faktoren führen darüber hinaus in Osteoblasten und Stromazellen zu einer erhöhten Freisetzung von Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL). Diese Substanz nimmt eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Knochenabbaus ein. RANKL bindet an seinen Rezeptor RANK auf Osteoklasten, welche dadurch zum Abbau von Knochensubstanz angeregt werden. Es entsteht ein *Circulus vitiosus* aus Abbau von Knochenmatrix und Metastasenwachstum. [12] In diesem Zusammenhang ist außerdem erwähnenswert, dass RANKL auch eine wichtige Rolle in der Mammogenese spielt. RANKL- oder RANK-Knockout-Mäuse zeigen gleiche Störungen in der Ausbildung der Brustdrüse wie Mäuse, die keine Progesteron- oder Prolactin-Rezeptoren ausbilden. [13] [14] Brustkrebszellen bilden zum Teil selber RANKL und RANK aus, um damit autokrin ihre Tumorgenese zu stimulieren. [15] Diese Zusammenhänge geben erste Aufschlüsse über das präferentielle Metastasierungsverhalten des Mammakarzinoms in den Knochen und sind weiter Gegenstand intensiver Forschung.



**Abb. 1:** Circulus vitiosus der Knochenmetastasierung mit Interaktion von Tumorzellen, Osteoklasten und Osteoblasten durch Zytokine und Wachstumsfaktoren (modifiziert nach: Roodman, 2004 [16]).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Vorwort

Im Folgenden finden sich die genauen Anleitungen zur Durchführung der Versuche und histologischen Färbungen. Um dies möglichst übersichtlich zu gestalten, geht jeder Beschreibung eine tabellarische, alphabetisch geordnete Auflistung der verwendeten Materialien voran, aus der die Details, wie Herstellerangaben, entnommen werden können. Die Bedeutungen sämtlicher verwendeter Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis im Anhang alphabetisch aufgeführt.

### 2.2 Tiere

Fünf Wochen alte weibliche immundefiziente Balb/c Nacktmäuse wurden für die Versuchsreihe verwendet (Charles River, Wilmington, MA, USA). Die Tiere wurden in temperatur- und luftfeuchtigkeitkontrollierten Räumen mit einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden gehalten und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Der Tierschutzantrag (V312-7224.121-10, s. Kapitel 7.4) wurde von der Ethikkommission für Tierexperimente der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt und die Mäuse entsprechend der Vorschriften behandelt.



## 2.3 Tiermodell

Das verwendete Tiermodell wurde bereits von Yoneda *et al.* etabliert und für die Untersuchung des ossären Metastasierungsverhaltens der MDA-MB-231BO/luc Mammakarzinomzellen genutzt. [17]

Den immundefizienten Mäusen wurden zu Versuchsbeginn  $1,4 \times 10^5$  Zellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231BO/luc als Suspension in ca. 100  $\mu$ l PBS (DPBS, Gibco®, Life Technologies, #14190144, Darmstadt, D) unter sonographischer Kontrolle in den linken Ventrikel des Herzens injiziert.

Die Tiere wurden in folgende Versuchsgruppen eingeteilt: Kontroll-, Alendronat- (100  $\mu$ g/kg, i.p.), 5FdU- (100 mg/kg, i.p.) und 5FdU-ale-Gruppe (191 mg/kg, i.p.). Die Alendronatdosis wurde äquivalent zur klinisch verwendeten Dosis sowie anhand von bereits publizierten Arbeiten gewählt. [17] [18] Die maximal tolerierte Dosis des neuen Medikaments 5-FdU-ale wurde anhand einer *in vivo* durchgeführten Dosisfindung mit steigenden Medikamentendosen ermittelt. Als sicher wurden 191 mg/kg/Woche 5-FdU-ale identifiziert. [19] Dies entspricht dem molaren Äquivalent von 100 mg/kg 5-FdU. Die Gruppen enthielten jeweils 12 bis 16 Tiere.

Nach einer fünfwöchigen Versuchsreihe, in der den Mäusen wöchentlich das entsprechende Medikament subkutan bzw. intraperitoneal in den o.g. Dosen injiziert wurde, wurden die Tiere zwecks Knochenentnahme von Femur und Tibia mittels Genickluxation euthanasiert.

Durch dieses Tiermodell kann direkt die Situation eines sekundären, d.h. metastasierten Tumorgeschehens realisiert werden. Anhand dessen kann sowohl die Gesamtwirkung der Substanzen auf das Metastasierungsverhalten als auch die regionale Wirkung der Medikamente auf die Zellen im Knochen in histologischen Analysen evaluiert werden.

## 2.4 Zellen

Für das Projekt wurden Zellen der Zelllinie MDA-MB-231BO/luc von Dr. Gabri Van der Pluijm (Leiden University Medical Center, NL) zur Verfügung gestellt. Diese modifizierten humanen Brustkrebszellen wachsen östrogenunabhängig und haben eine hohe Affinität zu Knochen (*bone homing*), da sie PTHrP sezernieren. Sie bilden nachweislich osteolytische Knochenmetastasen aus. [20] [21]

Diese Zellen wurden mit dem Luciferase-Gen transfiziert, sodass Akkumulationen dieser Zellen *in vivo* mithilfe der Biolumineszenzmessung in der NightOwl (*in vivo* Imaging System, Berthold Technologies, Bad Wildbad, D) nach Gabe des Substrates d-Luciferin (150 mg/kg KG, Sigma-Adrich, #L9504-50MG, Steinheim, D) sichtbar gemacht werden können. Diese Eigenschaft wurde für die Detektion der Knochenmetastasen sowie deren Vermessung *in vivo* genutzt, worauf in dieser Arbeit nur kurz in der Diskussion eingegangen werden soll.

## 2.5 5-Fluoruracil (5-FU)

5-Fluoruracil (5-FU) ist fester Bestandteil der polychemotherapeutischen Behandlung des Mammakarzinoms und wird in Kombination mit Anthrazyklinen und Mitosehemmern z.B. in Therapieschemata wie FEC (5-FU, Epirubicin, Cyclophosphamid) eingesetzt. [22] Darüber hinaus finden zahlreiche Prodrugs des 5-FU in der zytostatischen Therapie Anwendung (z.B. Capecitabin, Tegafur). Sie werden im Körper zum wirksamen Medikament verstoffwechselt. [23]

5-FU wirkt durch zwei Mechanismen zytostatisch. Einerseits wirkt 5-FU als Antimetabolit, d.h., es wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu den DNA-Nukleotiden Cytosin und Thymin bzw. des RNA-Nukleotids Uracil in die Erbinformation eingebaut und verhindert dadurch die Verlängerung dieser in der S-Phase des Zellzyklus. Die Zellteilung wird in der S-Phase inhibiert und die Zellen gehen in Apoptose. Andererseits wirkt es auf ein Schlüsselenzym der Nukleotidsynthese, die Thymidylatsynthase, ein, die für die *de novo* Synthese der Nukleinbase Thymin verantwortlich ist. Der aktive 5-FU-Metabolit Fluordesoxyuridinmonophosphat (5-FdUMP) bindet an die Nukleotidbindestelle des Enzyms und inhibiert so die Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), was letztendlich in einem erhöhten Vorkommen fehlerhafter, instabiler Desoxynukleotiden resultiert, welche in die DNA eingebaut werden und diese beschädigen. [24]

## 2.6 2'-Desoxy-5-Fluoruridin (5-FdU)

(syn. 5-Fluor-2'-Desoxyuridin, Floxuridin)

2'-Desoxy-5-Fluoruridin ist ein Nukleosid, welches sich aus der Nukleinbase 2'-Desoxy-5-Fluoruracil und einer Desoxyribose zusammensetzt. 2'-Desoxy-5-Fluoruracil und 5-Fluoruracil unterscheiden sich lediglich im Vorhandensein eines Wasserstoffatoms an der 2'-Position des heterocyclischen Rings.

In zahlreichen präklinischen *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass 5-FdU eine höhere zytotoxische Wirkung und damit geringere IC<sub>50</sub>-Werte als 5-FU hat. [25] Dies deutet auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden Substanzen hin. Nach dem Vergleich zahlreicher Studien über die Unterschiede in den Wirkmechanismen der beiden Metabolite gehen van Laar *et al.* [25] davon aus, dass die Hauptwirkung von 5-FU auf der Inkorporation in die RNA beruht, während 5-FdU vor allem mit der DNA interagiert. 5-FdU kann durch die Thymidinkinase direkt zum 5-FdU-Monophosphat (5-FdUMP) phosphoryliert werden und so die Thymidylatsynthase hemmen. [26] Im klinischen Gebrauch wird in der systemischen Anwendung 5-FU dem 5-FdU, aufgrund von geringeren unerwünschten toxischen Effekten und geringeren Kosten, vorgezogen. [27] In den 1960er Jahren durchgeführte Studien über die systemische Anwendung von 5-FU und 5-FdU zeigten darüber hinaus meist keine signifikanten Wirksamkeitsunterschiede. [25] Neuere klinische Studien fehlen. Eine Indikation für die Behandlung mit 5-FdU ist die regionale Leberarterien-Infusion beim metastasierten kolorektalen Karzinom. [28]

## 2.7 Alendronat

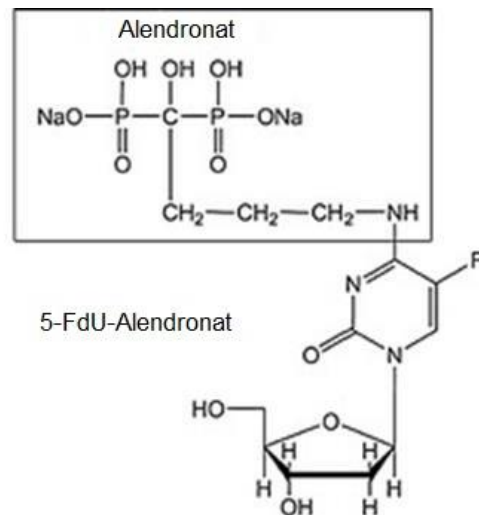
Bisphosphonate (BSP) werden in der Therapie der Osteoporose, wie sie z.B. als Folge von antihormonellen Behandlungen beim Mammakarzinom auftreten kann, sowie bei Metastasierung in die Knochen eingesetzt. Ihr P-C-P-Grundgerüst hat eine hohe Affinität zu den Hydroxyapatitkristallen der Knochenmatrix und lagert sich so dort ein. Osteoklasten internalisieren diese nicht verstoffwechselbaren Moleküle im Zuge des Knochenumbaus. BSP wirken über zwei intrazelluläre Wirkmechanismen, die letztendlich zur Apoptose der phagozytierenden Zellen führen. Einerseits kommt es zur Akkumulation von Metaboliten aus dem BSP und ATP, welche wiederum die mitochondriale Adeninnukleotid-Translokase hemmen, andererseits zeigen neuere Amino-BSP, wie Pamidronat und Alendronat, einen inhibitorischen Effekt auf ein Schlüsselenzym des Mevalonat-Stoffwechselwegs, die Farnesyl-Diphosphat-Synthase. Zwischenprodukte dieses Stoffwechselzyklus, wie Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat, sind von essentieller Bedeutung für die posttranslationale Modifikation von G-Protein gekoppelten Proteinen wie Ras, Rho und Rac. [29] Findet die Prenylierung dieser wichtigen intrazellulären Signalmoleküle nicht statt, bricht die Zellhomöostase zusammen und die Osteoklasten sterben. [25] Durch diese osteoklastenhemmende Funktion kommt es zu einem verringerten Abbau von Knochensubstanz. So kann Osteoporose, Knochenfrakturen und Knochenschmerzen entgegenwirkt werden. Dabei hat das am Knochen gebundene Alendronat eine sehr lange terminale HWZ von mind. zehn Jahren. [29]

Neuere Studien zeigen außerdem eine positive Wirkung von BSP auf die Aktivität der Osteoblasten, was einen weiteren knochenstabilisierenden Effekt erklärt. [30] [31] [32]

In zahlreichen *in vitro* sowie im Tiermodell durchgeführten Versuchen konnte darüber hinaus eine zytostatische Wirkung der Amino-BSP gegenüber Krebszellen belegt werden, die vermutlich ebenfalls auf einer mangelnden posttranslationalen Prenylierung der o.g. G-Protein gekoppelten Signalproteine und anschließender Apoptose beruht. [33] [34] Synergistische Effekte mit anderen zytostatisch wirkenden Substanzen konnten außerdem im Tiermodell nachgewiesen werden. [35] Weitere Mechanismen, die diesen Anti-Tumor-Effekt erklären können, wie direkte Induktion von Apoptose durch Aktivierung von Caspasen, Verhinderung von Tumorzelladhäsion im Knochen, Bildung von ATP-Analoga und antiangiogenetische Effekte, werden in der Literatur beschrieben. [36] [37]

## 2.8 2'-Desoxy-5-Fluoruridin-Alendronat (5-FdU-ale)

5-FdU-ale vereinigt die zytostatische Wirkung des 5-FdU und die hohe Knochenaffinität des Alendronats in sich und vermag so eine zielgerichtete Antitumorwirkung am Knochen zu erzielen.



**Abb. 2:** Strukturformel des Antimetabolit-Bisphosphonat-Konjugats 5-FdU-ale (modifiziert nach: Schott *et al.*, 2012 [7]).

Alendronat und 5-FdU sind in 5-FdU-ale über eine N-4-alkyl-Verbindung kovalent miteinander gekoppelt (s. Abb. 2). Es gibt jedoch zwei labile Verbindungen in diesem Molekül, die *in vivo* enzymatisch gespalten werden können und so möglicherweise zur Entstehung unterschiedlicher Einzelmoleküle führen, die wiederum individuelle pharmakologische Effekte erzielen, Synergien ausbilden und Resistenzen vermeiden können.

*„So entsteht durch die Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Desoxyribose und Nucleobase ein neues Aminobisphosphonat, dessen Alkylkette einen 5-Fluoropyrimidin-Rest des 5-FdU enthält, und durch die Spaltung der N-4-alkyl-Bindung die Edukte Alendronat und 5-FdU.“* aus dem Englischen übersetzt nach Schott *et al.*, 2012 [7]

In *In-Vitro*-Versuchen konnte die zytostatische Wirkung von 5-FdU-ale bisher nicht gezeigt werden, vermutlich weil der Metabolismus des Konjugats *in vitro* ausbleibt. [7] Das oben vorgestellte Tiermodell ist im Gegensatz dazu voraussichtlich in der Lage, die Wirkung des Medikaments auf intakte Zellkomplexe zu zeigen.

## 2.9 Zellzyklusanalyse

### 2.9.1 Material (alphabetisch)

<b>Material</b>	<b>Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land</b>
5-FdU	Sigma Aldrich, #F0503-100MG, Steinheim, D
5-FdU-ale	PD Dr. Sarah Schott, Universitätsklinikum Heidelberg, D
Alendronate sodium trihydrate	Sigma-Aldrich, #A4978, Steinheim, D
DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (no calcium, no magnesium)	Gibco®, Life Technologies, #14190144, Darmstadt, D
Durchflusszytometer	FACSCalibur™, BD Biosciences, San José, USA
EDTA – Ethylenaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate 99+%	Sigma-Adrich, #E5134-250G, Steinheim, D
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Falcon®, BD Bioscience, #9250563, Bedford, USA
FCS – Fetal calf serum	Biochrom GmbH, #S0115, Berlin, D
Inkubator	Steri Cult CO2-Inkubator HEPA Class 100, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Pipetten	Eppendorf Reference® und Eppendorf Research®, Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Propidium Iodid	Merck Millipore, #25535-16-4, Darmstadt, D
RNase	Quiagen, #1589222, Hilden, D
Sterilwerkbank	Bench Sterile Work Flow Class II, NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Trypsin	Biochrom GmbH, #L2143, Berlin, D
Vortexmischer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flask, #83.1811.002, Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifuge	Laborfuge GL, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifugenröhrchen (50 ml, steril)	Sarstedt, #62.547.254, Nümbrecht, D

<b>Software</b>	<b>Entwickler, Institut, Ort, Land</b>
WinMDI Flow Cytometry Software (Version 2.8)	Joseph Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, USA

### 2.9.2 Fragestellung

5-FdU ist ein Derivat der Nukleinbase Uracil und wird vor allem als Zytostatikum in der Chemotherapie des Colon- und Mammakarzinoms eingesetzt. Der Antimetabolit wird während der Zellteilung anstelle der physiologischen Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin in DNA, bzw. als Uracil in RNA, eingebaut und führt so zum Kettenabbruch des DNA- bzw. RNA-Strangs. Daher wirkt 5-Fluoruracil phasenabhängig vor allem in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus, in der die

DNA dupliziert wird. Die Tumorzellen werden in der G1/S-Phase arretiert und gehen in Apoptose. [38] [39]

Um die Wirkung des 5-FdU sowohl als Einzelsubstanz als auch im Konjugat 5-FdU-ale nachzuweisen, wurde eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse durchgeführt.

### 2.9.3 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem in kurzer Zeit hohe Zellzahlen in Bezug auf spezifische zelluläre Parameter analysiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wird diese Methode verwendet, um anhand des DNA-Gehaltes der Zellen auf deren Stadien im Zellzyklus zu schließen.

Der Zellzyklus gliedert sich in fünf Phasen und dient der Teilung der Zelle in zwei identische Tochterzellen. Die G1-Phase dient der Synthese verschiedener Proteine, die für die anschließende Synthese-Phase unerlässlich sind. Es entstehen z.B. Zytoplasmabestandteile, Zellorganellen und Replikationsenzyme. In der darauffolgenden S-Phase kommt es zur Verdopplung des diploiden Chromosomensatzes (1n) in einen tetraploiden (2n), um diesen, nach der zwischengeschalteten G2-Phase, in der M-Phase im Rahmen der Mitose auf zwei Tochterzellen zu verteilen (2x 1n). Die Zellen treten nun wieder in die G1-Phase ein und der Zyklus beginnt von neuem oder sie verweilen in einer Art Ruhestadium, der G0-Phase.

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Emission von optischen Signalen der Zellen, die aus einer Suspension angesogen werden und dann einzeln mit hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl passieren. Propidiumjodid (PI) ist eine fluoreszierende Substanz, die mit doppelsträngiger DNA interkaliert und in Abhängigkeit vom DNA-Gehalt einer Zelle ein entsprechend helles Licht emittiert, welches von einem Detektor erfasst wird. PI hat eine Exzitationswellenlänge von 488 nm, die Emissionswellenlänge liegt bei 600 nm. Da PI ein unspezifisches Bindungsverhalten ausweist und auch an doppelsträngige RNA bindet, muss diese zunächst mit RNase verdaut werden, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. So ist es möglich, die Zellen den detektierten Fluoreszenzsignalen entsprechend den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen (G0/1: diploid = Chromosomensatz 1n; G2: tetraploid = Chromosomensatz 2n; S: zwischen di- und tetraploid = Chromosomensatz zwischen 1n und 2n). [40]

### 2.9.4 Durchführung

250.000 MDA-MB-231BO/luc Zellen wurden über mehrere Tage in DMEM bei 37 °C im Inkubator herangezüchtet. Nach der elften Passage wurde mit der Vorbereitung des Tests begonnen. Es wurde jeweils ein dreifacher Ansatz jeder Versuchsgruppe angefertigt.

Die Zellen wurden wie folgt vorbereitet (nach Ammerpohl O., Tiwari S., Kalthoff H. [41]):

1. Entfernung des Mediums (dieses aufheben, um die gelösten Zellen ebenfalls analysieren zu können)
2. Hinzufügen von vorgewärmtem (37 °C) DPBS (no calcium, no magnesium) bis alle Zellen bedeckt sind ( $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  stören die Trypsin-Einwirkung)
3. Entfernen des DPBS durch Aspiration
4. Bedecken der Zellen mit Trypsin-Lösung (300  $\mu\text{l}$ )
5. Zellen für ca. 10 min in den Inkubator stellen, bis sie sich vom Flaschengrund abgelöst haben; dies kann durch einige leichte Schläge der Flasche gegen die offene Hand beschleunigt werden
6. Beenden der Trypsin-Reaktion durch Hinzufügen des gleichen Volumens an Zellkultur-Medium, welches 10 % FCS enthält (das enthaltene Protein stoppt die Trypsin-Wirkung)
7. Überführen der Zellen und des Mediums in ein Zentrifugen-Röhrchen; Medium mit gelösten Zellen aus Schritt 1 dazugeben
8. Zentrifugieren bei 500 g (entspricht etwa 1400 rpm) für 5 min
9. Vorsichtiges Aspirieren des Überstandes, ohne das Zellpellet zu beschädigen
10. Vorsichtiges Resuspendieren des Pellets in 24 ml DMEM
11. Aussäen der Zellen in 6-Well-Platten (jeweils 2 ml)
12. 24 h bei 37 °C inkubieren
13. Wechsel des Mediums und Beimpfen der Zellen mit dem jeweiligen Medikament (jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) im 3-fach-Ansatz: Alendronat, 5-FdU, 5-FdU-ale, Kontrolle (=DPBS)
14. 24 h bei 37°C inkubieren
15. Verfahren mit den Proben wie in Schritt eins bis 9 beschrieben, um die Zellen zu lösen und zu pelletieren
16. Vorsichtiges Resuspendieren der Zellen in 5 ml DPBS
17. Ermitteln der Zellzahl mithilfe einer Zählkammer
18. Die restlichen, nicht zum Zählen verwendeten Zellen erneut zentrifugieren (500 g, 5 min)
19. DPBS bis zu einer Konzentration von ca.  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml hinzufügen
20. Jeweils 3 ml der Proben entnehmen ( $\cong$  ca.  $4,5 \times 10^5$  Zellen) und in ein neues Zentrifugen-Röhrchen überführen
21. Auf dem Vortexer vorsichtig 1 ml Ethanol (abs.) tröpfchenweise hinzugeben
22. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
23. Zentrifugieren (500 g, 5 min)
24. Vorsichtig den Überstand abgießen und verbleibende Flüssigkeit mit einem absorbierfähigen Papier entfernen
25. 500  $\mu\text{l}$  DPBS, welches 1 mM EDTA enthält, hinzufügen

26. 2,5 µl RNase-A-Lösung hinzufügen und Pellet durch vorsichtiges Schnipsen gegen das Röhrchen resuspendieren
27. Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführen
28. Zentrifugieren (500 g, 5 min)
29. Vorsichtig den Überstand abgießen und verbleibende Flüssigkeit mit einem absorbierfähigen Papier entfernen
30. Zellpellet in 500 µl DPBS, welches 200 µg/ml PI enthält, resuspendieren
31. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
32. Mindestens 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubieren

Für die Analyse wurde ein FACSCalibur™ Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences verwendet. Die Daten wurden mithilfe der WinMDI Flow Cytometry Software (Version 2.8) ausgewertet.

Um die Messung von Zellclustern zu vermeiden, (zwei Zellen in der G1-Phase könnten mit einer Zelle in der G2-Phase verwechselt werden) wurden die FACS-Röhrchen direkt vor der Messung noch einmal auf dem Vortexer gemischt. Außerdem wurde mithilfe der Kontrollzellen ein FL2-A vs. FL2-W Dot Plot angefertigt und die Parameter FL2-H, FL2-A und FL2-W so adjustiert, dass die Zellen in der G1-Phase ungefähr bei Kanal 200 auf einer Geraden lagen. Daneben wurden die Zellen in der S-Phase (200-400), Zellen in der G2/M-Phase (400) und apoptotische Zellen (<200) weiter untersucht und Zellaggregate (Zellen außerhalb der Geraden) so von der Erstellung der Histogramme ausgeschlossen.

## 2.10 MTT-Test

### 2.10.1 Material (alphabetisch)

Material	Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land
96-Well-Platten	Sarstedt, #83.3924, Nümbrecht, D
5-FdU	Sigma Aldrich, #F0503-100MG, Steinheim, D
5-FdU-ale	PD Dr. Sarah Schott, Universitätsklinikum Heidelberg, D
Alendronate sodium trihydrate	Sigma-Aldrich, #A4978, Steinheim, D
CellTiter96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega GmbH, #4000, Mannheim, D
DMEM Kulturmedium (high glucose and pyruvate)	Gibco Products, Invitrogen Corp., #31966, Grand Island, NY, USA
DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (no calcium, no magnesium)	Gibco®, Life Technologies, #14190144, Darmstadt, D
Inkubator	Steri Cult CO <sub>2</sub> -Inkubator HEPA Class 100, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Mikrotiterplatten-Photometer	Sunrise™, Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK



Pipetten	Eppendorf Reference <sup>®</sup> und Eppendorf Research <sup>®</sup> , Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilwerkbank	Bench Sterile Work Flow Class II, NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Vortexmischer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flask, #83.1811.002, Sarstedt, Nümbrecht, D

### 2.10.2 Prinzip

Der MTT-Test dient der Bestimmung der Zellviabilität und soll die zytotoxischen Wirkungen der einzelnen Substanzen auf die Karzinomzellen *in vitro* ermitteln. MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, der durch stoffwechselaktive, d.h. vitale Zellen, in das blau-violette wasserunlösliche Formazan reduziert wird. Diese Reduktion ist sowohl von einer funktionierenden Atmungskette in den Mitochondrien als auch von extramitochondrialen Reaktionen, die die Coenzyme NADH und NADPH nutzen, abhängig. [42] Nur lebendige Zellen verfügen über diese Stoffwechselfvorgänge und sind in der Lage MTT umzuwandeln. Das Reaktionsprodukt Formazan kann schließlich wieder in Lösung gebracht werden und spektrophotometrisch gemessen werden. Die gemessene Absorption ist proportional zur Anzahl an vitalen Zellen. [43]

### 2.10.3 Durchführung

Für die Durchführung wurde das CellTiter96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay der Firma Promega verwendet. Je Versuchsgruppe und Medikamentenkonzentration wurden drei Ansätze hergestellt und gemessen, um eine möglichst hohe Validität sicherzustellen. Als Kontrollgruppen dienten unbeimpfte Zellen, die lediglich in Kulturmedium kultiviert wurden. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet. Per Well wurden 90 µl mit 10.000 Zellen ausgesät und mit den entsprechenden Medikamenten (5-FdU-ale, 5-FdU, Alendronat) in steigenden Konzentrationen (1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1 mM verdünnt in RPMI-Medium) für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde stets unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank gearbeitet. Im Anschluss wurden 15 µl der MTT-enhaltenden Dye Solution per Well hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Solubilization Solution/Stop Mix gestoppt und die entstandenen Formazankristalle solubilisiert. Die Absorption wurde nach 1 h und erneutem Mischen im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Als Referenzwellenlänge wurden 700 nm gewählt. Um Messungenauigkeiten zu

vermeiden, wurden zuvor beim Mischen entstandene Blasen mit einer Nadel entfernt und die 96-Well-Platten nur mit Handschuhen angefasst, da auch Fingerabdrücke die Messung stören könnten.

## 2.11 Anfertigung der histologischen Schnitte

### 2.11.1 Material (alphabetisch)

Material	Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land
Aqua dest., entmineralisiert nach VDE 0510	Klax, CHEMICA Chemische Produkte Abfüll- & Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, D
DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline (Lsg.)	Gibco®, Life Technologies, #14190144, Darmstadt, D
EDTA Na <sub>2</sub> -Salt	SERVA Electrophoresis GmbH, #11280.02, Heidelberg, D
Formaldehyd (37 %, Lsg.)	Sigma-Aldrich, #252549-500ML, Steinheim, D
NaOH (Pellets) – Sodium hydroxide	Sigma-Aldrich, #221465-500G, Steinheim, D
Mikrotom	HN 40, Reichert-Jung, New York, USA
Paraffin	MEDITE PURE™ Polymer Free, MEDITE Gesellschaft für Medizintechnik mbH, #40-0021-00, Burgdorf, D
Paraffin-Streckbad	1052, GFL, Burgwedel, D

Angesetzte Färbelösungen	Bestandteile
Fixier-Lösung	10,8 ml Formaldehyd 37% + 89,2 ml DPBS Lsg., pH 6,8-7,2
EDTA-Lsg. (0,5 M, gepuffert)	186,15 g EDTA Na <sub>2</sub> -Salt + 1000 ml Aqua dest., mit NaOH-Pellets auf pH 7-8 einstellen

### 2.11.2 Aufbereitung der Knochen

Die für sieben Tage in 10 % Formalin fixierten Präparate wurden für sechs Wochen in einer 0,5 molaren gepufferten EDTA-Lösung entkalkt. Die Lösung wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die dekalzifizierten Knochen der Mäuse wurden anschließend in Paraffin eingebettet, am Mikrotom in 4 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

Es wurden fortlaufend 12er-Serien angefertigt (jeweils zwei Schnitte pro Objektträger), von denen jeder erste sowie jeder zwölfte Schnitt HE gefärbt wurde. So wurde verfahren bis mikroskopisch der Schnitt mit der größten Tumorfläche ermittelt werden konnte. Als Kriterien wurden festgelegt, dass sich die Tumoren im Bereich der distalen Femora bzw. der proximalen Tibiae befinden und sie direkten Kontakt zum Knochen haben müssen, auch wenn sich ihre Hauptausdehnung auf die umgebenden Weichteile erstreckt. Die Gesamttumormasse eines jeden Schnittes wurde beurteilt und mehrere Tumorherde addiert. Anhand dessen wurden Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen von denjenigen Schnitten angefertigt, die denen mit dem größten Tumorareal im HE-Schnitt am nächsten

lagen. Diese Färbemethode eignet sich besonders, um bindegewebige Strukturen darzustellen. Dazu zählen Knochen mit ihrem hohen Anteil an kollagenem Bindegewebe.

## 2.12 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

### 2.12.1 Material (alphabetisch)

Material	Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land
Eosin	Merck Millipore, #115935, Darmstadt, D
Ethanol abs. (99 %, vergällt)	TYP 642, BÜFA Chemikalien GmbH & Co. KG, #64-17-7, Hude, D
HCl (37 %) – Hydrochloric Acid	Sigma-Aldrich, #258148-100ML, Steinheim, D
Mayers Hämalaulösung	Merck Millipore, Darmstadt, D
Pertex®	Medite GmbH, #41-4011-00, Burgdorf, D
Xylol (M=106,17 g/mol)	BAKER, Deventer, NL

Angesetzte Färbelösungen	Bestandteile
Eosin-Färbelösung	17 g Eosin + 1000 ml Ethanol 96 % + 1 ml Essigsäure (kurz vor Verwendung zufügen)
HCl-Alkohol-Gemisch	375 ml Ethanol abs. + 125 ml Aqua dest. + 5 ml HCl 37 %

### 2.12.2 Durchführung

#### 1. Deparaffinieren

- 2 x 10 min Xylol
- 1 x Xylol-Alkohol-Gemisch (1:1)
- Spülen in absteigender Alkoholreihe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %)
- Spülen in H<sub>2</sub>O, dann in Aqua dest.

#### 2. 10 min Kernfärbung mit Hämatoxylin

#### 3. Kurz Differenzieren in HCl-Alkohol-Gemisch

#### 4. 10 min Bläuen unter fließendem, lauwarmen Wasser

#### 5. Spülen in Aqua dest.

#### 6. 7 min Färben in Eosin-Färbelösung

#### 7. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe

- 1 x 70 % (kurz)
- 2 x 96 %

- 2 x 100 %

- 3 x Xylol-Alkohol-Gemisch (1:1)

8. 3 x Spülen in Xylol

9. Eindecken mit Pertex®

## 2.13 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

### 2.13.1 Material (alphabetisch)

Material	Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land
Aqua dest., entmineralisiert nach VDE 0510	Klax, CHEMICA Chemische Produkte Abfüll- & Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, D
Azophloxin	Sigma-Aldrich, #11640-25G, Steinheim, D
Deckgläser 24x50 mm, 24x60 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Essigsäure (99-100 %) – Acetic Acid	J.T. BAKER, #6052, Deventer, NL
Ethanol abs.	BAKER, #82282500PE, Deventer, NL
Goldner-Lsg. I (Ponceau-Säurefuchsin)	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, #0088663, Leipzig, D
Goldner-Lsg. II (Orange-G-Lsg.)	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, #0088663, Leipzig, D
HCl (37 %) – Hydrochloric Acid	Sigma-Aldrich, #258148-100ML, Steinheim, D
Lichtgrün SF gelblich	Fluka Chemie AG, #62110, Buchs, CH
Mayers Hämalanlösung	Merck Millipore, #1092490500, Darmstadt, D
Pertex®	Medite GmbH, #41-4011-00, Burgdorf, D
Objektträger	SuperFrost, Menzel GmbH, Braunschweig, D
Weigerts Eisenhämatoxylin Kit	Merck Millipore, #1.15973.0002, Darmstadt, D
Xylol	BAKER, #80802500, Deventer, NL

Angesetzte Färbelösungen	Bestandteile
Hämatoxylin-Lsg.	100 ml Lösung I + 100 ml Lösung II aus Weigerts Eisenhämatoxylin Kit
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin	40 ml Goldner-Lsg. I + 20 ml Azophloxin + 2 Tropfen Essigsäure + 140 ml Aqua dest.
Lichtgrün-Lsg. (0,5 %)	1 g Lichtgrün SF gelblich + 400 µl Essigsäure + 200 ml Aqua dest.

Software	Entwickler, Institut, Ort, Land
ColorTypeSeparator-Plugin	Dr. Arndt Rohwedder, Sektion für Molekulare Onkologie, UKSH Kiel, D
ImageJ (Version 1.47)	Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health Bethesda, Maryland, USA
MosaicJ-Plugin	Philippe Thévenaz, Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, CH

### 2.13.2 Durchführung

Es wurde folgendes Protokoll aus dem Institut für Pathologie des UKSH Kiel genutzt:

1. Deparaffinieren (Details s.o.)
2. 3 min Kernfärbung in Weigerts Eisenhämatoxylin
3. Kurz Differenzieren in HCl-Alkohol
4. 3 min Spülung in warmem fließenden Wasser
5. Spülen in Aqua dest.
6. 5 min in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin
7. Spülen in 1 % Essigsäure
8. 2 min Differenzierung in Orange-G-Lösung (=Goldner Lsg. 2)
9. Spülen in 1 % Essigsäure
10. 5 min Gegenfärbung mit 0,5 % Lichtgrün in 0,2 % Essigsäure
11. Spülen in 100 % Alkohol
12. 3 x Spülen in Alkohol-Xylol-Gemisch (1:1)
13. 3 x Spülen in Xylol
14. Eindecken mit Pertex®

Nach Anfertigung der Färbung wurden die Schnitte noch einmal mit den HE gefärbten Schnitten verglichen um sicherzustellen, das größte Tumoreal auf den Masson-Goldner-Trichrom-Schnitten abgebildet zu haben. Ansonsten wurde entsprechend neu gefärbt.

Die maximale zweidimensionale Tumorausdehnung wurde mithilfe des Programmes ImageJ 1.47 quantifiziert.

Dazu wurden die Schnitte unter dem Mikroskop mit einer fünfzigfachen Vergrößerung mit der Kamera abfotografiert und die Teilbilder mithilfe des ImageJ-Plugins MosaicJ zusammengefügt.

Die Tumoreale wurden mithilfe des ColorTypeSeparators herausgefiltert und die Umrisse programmgesteuert markiert, sodass anschließend die Gesamtfläche des Tumors berechnet werden konnte. Das Plugin ColorTypeSeparator unterscheidet die Relativwerte der Farben Rot, Grün und Blau im markierten Tumorbereich und isoliert so alle Bildabschnitte, die eine vergleichbare Farbverteilung aufweisen und überträgt diese in ein neues Bild (s. Abschnitt 7.2.1, Abb. I). Es handelt sich somit um ein Freistellungswerkzeug, welches das Tumoreal vom umgebenden Gewebe isoliert darstellt. Dies

wurde zusätzlich mikroskopisch kontrolliert, da die Farbnuancen des physiologischen Knochenmarks und des das Knochenmark infiltrierenden Tumors zum Teil sehr ähnlich sind.

## 2.14 TRAP-Färbung

### 2.14.1 Material (alphabetisch)

<b>Material</b>	<b>Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land</b>
Aqua dest., entmineralisiert nach VDE 0510	Klax, CHEMICA Chemische Produkte Abfüll- & Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, D
Deckgläser 24x50 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Ethanol abs.	BAKER, #82282500PE, Deventer, NL
Färbegestell mit Griff (für 16 OT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Fast Red TC Salt	Sigma-Aldrich Co., #F8764-1G, Steinheim, D
Kamera	AxioCam MRc, ZEISS, Oberkochen, D
Küvetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Mayers Hämalaulösung	Merck Millipore, #1092490500, Darmstadt, D
Mikroskop	DIASTAR, Reichert, New York, USA
Naphtol-AS-MX	Sigma-Aldrich Co., #N4875-500MG, Steinheim, D
Objektträger	SuperFrost® Plus, Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
pH-Meter	766 Calimatic pH/Pt Sensor 1000 (pH 0-14), Knick, Berlin, D
Roti®-Mount Aqua	Carl Roth GmbH & Co. KG, #2848.2, Karlsruhe, D
Schüttler, beheizbar	Promax 1020, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Sodium acetat trihydrate	Sigma-Aldrich Co., #S8625-25G, Steinheim, D
Tartaric acid	Sigma-Adrich Co., #T109-500G-A, Steinheim, D
Xylol	BAKER, #80802500, Deventer, NL

<b>Angesetzte Färbelösungen</b>	<b>Bestandteile</b>
TRAP-Färbelösung	bestehend aus 25 mg Naphtol-AS-MX + 55 mg Fast Red TC Salt + 100 ml TRAP-Puffer, pH 5
TRAP-Puffer	bestehend aus 2,7216 g Sodium acetate trihydrate + 750,45 mg Tartaric acid + 100 ml Aqua dest., pH 5

<b>Software</b>	<b>Entwickler, Institut, Ort, Land</b>
ImageJ (Version 1.47)	Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health Bethesda, Maryland, USA
MosaicJ-Plugin	Philippe Thévenaz, Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, CH

### 2.14.2 Prinzip

Die TRAP-Färbung dient der Anfärbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP), einem Metalloenzym, das vor allem in Osteoklasten vorhanden ist. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäureester, wie sie unter anderem bei der Knochenresorption von Bedeutung ist. [44]

Die Osteoklasten stellen sich in dieser Antikörper-Färbung rot dar, da die TRAP das Naphtol AS-Mix Phosphat enzymatisch hydrolysiert. Dieses reagiert daraufhin mit dem Fast Red Salt (beides enthalten in der TRAP-Färbelösung) zu einem wasserunlöslichen roten Azofarbstoff, der TRAP-haltige Osteoklasten anfärbt. [45]

### 2.14.3 Durchführung

Zunächst wurden die Schnitte mit der größten Gesamttumorfläche ausgewählt (s.o.). Die deparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden für insgesamt 20 min auf dem beheizbaren Schüttler in eine Küvette mit dem TRAP-Puffer gestellt. Nach 10 min wurde die Küvette langsam auf 37 °C erwärmt. Dann wurden die Schnitte in eine zweite Küvette überführt, die bereits angewärmte TRAP-Färbelösung enthielt. Nach 1 h wurde die Färbung mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion mittels Waschen in Aqua dest. beendet. Bei nicht zufriedenstellendem Farbergebnis kann die Farbentwicklung für bis zu 4 h fortgesetzt werden. Die Schnitte wurden daraufhin mit Hämalaun für 4 min gegengefärbt und anschließend 45 min unter fließendem Wasser gebläut. Das Material wurde aus dem wässrigen Medium mittels Roti<sup>®</sup>-Mount Aqua eingedeckt.

Die Schnitte wurden in fünfzigfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotografiert und die Einzelbilder mittels MosaicJ zusammengefügt.

Um eine möglichst genaue Quantifizierung mittels ImageJ sicherstellen zu können, wurde folgendes Konzept entwickelt: Zunächst wurden auf jedem Objektträger die Areale mit den meisten angefärbten Osteoklasten ausgewählt und mittels einer 300 x 150 Pixel großen vertikal oder horizontal ausgerichteten *region of interest* (ROI) markiert. Für jeden Schnitt wurde ein Areal ausgewählt, welches die Grenze zwischen Tumor und Kortikalis enthält. Innerhalb dieser markierten Areale wurde dann die enthaltene Knochenoberfläche gemessen (Strecken-Tool in ImageJ) und die mit dieser Oberfläche in Kontakt stehenden Osteoklasten ausgezählt, sodass das Verhältnis Osteoklasten/Knochenoberfläche gebildet werden konnte. Dies erfolgte am PC unter ständiger mikroskopischer Kontrolle, da für die Identifizierung dieser großen Zellen eine Feinadjustierung mittels leichten Drehens an der Mikrometerschraube unerlässlich ist.

Die zu zählenden Zellen wurden wie folgt definiert: Die Zelle musste eine deutliche rote Färbung ausweisen, in direktem Kontakt zur Knochenoberfläche stehen und mindestens einen kleinen Anschnitt eines Zellkerns aufweisen. Diese Richtlinien wurden konsequent für alle Schnitte angewendet und die Beurteilung fand unter Verblindung der Gruppenzugehörigkeit der histologischen Schnitte statt.

## 2.15 TRAP-ELISA

### 2.15.1 Material (alphabetisch)

Material	Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land
Aqua dest., entmineralisiert nach VDE 0510	Klax, CHEMICA Chemische Produkte Abfüll- & Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, D
ELISA-Reader	SpectraFluor Plus Microplate Reader, Tecan, Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Micro-Kanüle (23G x 3/4)	Sarstedt, # 85.923, Nümbrecht, D
Mikro-Schraubröhrchen (1,5 ml, steril)	Sarstedt, #72.692.100, Nümbrecht, D
Mouse TRAP™ Assay	Immunodiagnostic Systems Ltd., Frankfurt am Main, D
NaCl 0,9% – Natriumchlorid	Isotone Natriumchloridlösung, #2350720, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Pipetten	Eppendorf Reference® und Eppendorf Research®, Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifuge	Laborfuge GL, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

### 2.15.3 Prinzip

Das verwendete TRAP-Assay ist spezifisch für TRAP 5b, welches von Osteoklasten sezerniert wird, und weist kein TRAP 5a nach, welches aktivierte Makrophagen produzieren. [46] [47] Wie Chu *et al.* nachweisen konnten, korreliert die TRAP-5b-Aktivität im Serum mit der Anzahl aktiver Osteoklasten im Knochen. [48]

Klinische Studien konnten zeigen, dass die TRAP-5b-Konzentrationen im Blutserum an Brustkrebs erkrankter Frauen ein normales Level hat, wohingegen etwa 80 % der Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom erhöhte Serumwerte aufweisen. [47]

### 2.15.2 Durchführung

Blutproben wurden aus den Schwanzvenen der Mäuse entnommen und das Serum mithilfe einer Zentrifuge (2500 rpm, 5 min) gewonnen. Die darin enthaltene TRAP-Konzentration wurde mit dem MouseTRAP™ Assay von Immunodiagnostic Systems Ltd. nach Anleitung des Herstellers bestimmt.



Da es sich hierbei um ein medizintechnisches Routineverfahren handelt, ist das genaue Prozedere hier nicht aufgeführt, sondern kann der Anleitung des Herstellers entnommen werden (Immunodiagnostic Systems Ltd., #SB-TR103). Bei dem verwendeten Assay handelt es sich um einen Festphasen-ELISA, bei dem zunächst das nachzuweisende Antigen (hier TRAP 5b) über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden wird. Ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper bindet diesen Komplex und es findet eine enzymatische Farbreaktion statt. Der entstandene Farbstoff kann schließlich mit einem Photometer gemessen werden.

## 2.16 Osteocalcin-ELISA

### 2.16.1 Material (alphabetisch)

Material	Ggf. Bezeichnung, Firma, ggf. Artikelnummer, Ort, Land
Aqua dest., entmineralisiert nach VDE 0510	Klax, CHEMICA Chemische Produkte Abfüll- & Verpackungs GmbH & Co. KG, Sarstedt, D
ELISA-Reader	SpectraFluor Plus Microplate Reader, Tecan, Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Micro-Kanüle (23G x 3/4)	Sarstedt, # 85.923, Nümbrecht, D
Mikro-Schraubröhrchen (1,5 ml, steril)	Sarstedt, #72.692.100, Nümbrecht, D
Osteocalcin-EIA (Mouse)	DRG Instruments GmbH, #EIA-4010, Marburg, D
Pipetten	Eppendorf Reference <sup>®</sup> und Eppendorf Research <sup>®</sup> , Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilwerkbank	Bench Sterile Work Flow Class II, NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Zentrifuge	Laborfuge GL, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

### 2.16.2 Prinzip

Das Peptidhormon Osteocalcin ist ein Marker für Knochenaufbau und wird von Osteoblasten gebildet. Es bindet im Knochen an Calcium und Hydroxylapatit und macht so 1-2 % der Knochenmatrix aus. Das Hormon wirkt der Mineralisierung der Knochenmatrix entgegen und hat nach neuesten Forschungsergebnissen wichtige regulatorische Funktionen in Bezug auf den Insulin- und Fettstoffwechsel sowie die Fertilität männlicher Mäuse. [49] [50]

### 2.16.3 Durchführung

Der Osteocalcin-Gehalt in den Seren der Mäuse wurde nach der Versuchsdauer von fünf Wochen bestimmt. Dazu diente der Osteocalcin-EIA-Test, der nach dem gleichen Prinzip funktioniert wie der TRAP-ELISA (s.o.). Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (DRG Instruments GmbH, #EIA-4010, Version 4.1).

## 2.17 Statistische Methoden

Sämtliche statistische Berechnungen und Graphen wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism (Version 5.04, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) erstellt. Für die Erstellung der Tabellen wurde das Tabellenkalkulationssystem Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) genutzt. Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte mithilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ Version 1.47 (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, USA) mit den Plugins MosaicJ (Philippe Thévenaz, Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, CH) und ColorTypeSeparator (Dr. Arndt Rohwedder, Sektion für Molekulare Onkologie, UKSH Kiel, D).

Allen Balkengraphen liegt eine statistische Auswertung mittels ungepaartem Zweistichproben-t-Tests mit der Welch-Satterthwaite-Methode zugrunde, um die Annahme gleicher Varianzen zu vermeiden. Ausreißer wurden mithilfe des Grubbs-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0,01 festgestellt und von den Ergebnissen ausgeschlossen. Dies trifft in einem Fall für die Auswertung der Ergebnisse zur Größenausdehnung der Tumore in den histologischen Schnitten zu.

Die MTT-Testergebnisse wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.04, s.o.) als semilogarithmische Drei-Parameter-Dosis-Wirkungskurve dargestellt und daraus die  $\log IC_{50}$ -Dosen abgeleitet.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner fünf Prozent ( $p < 0,05$ ) angesehen.

## 3 Ergebnisse

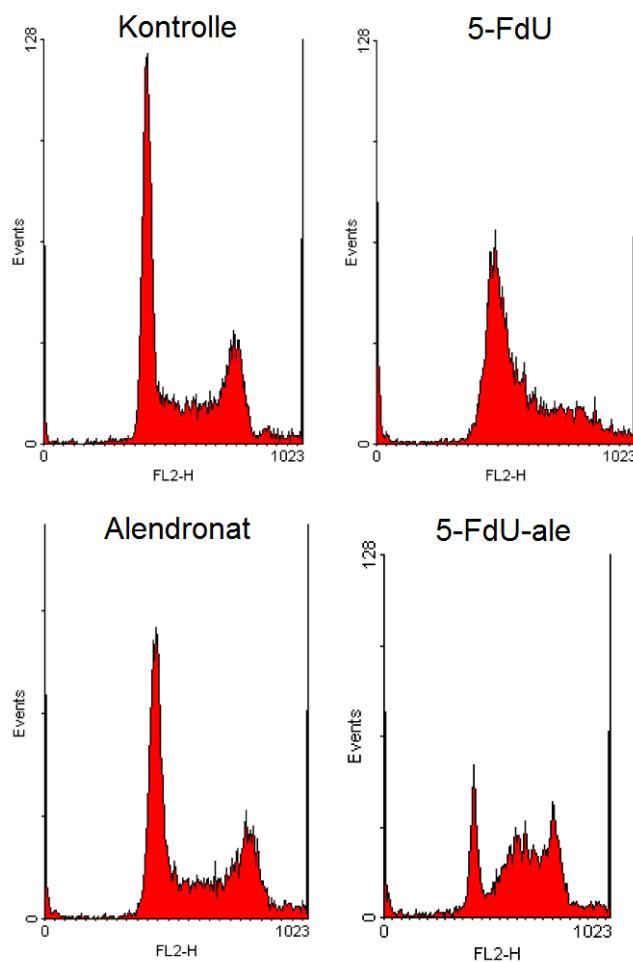
### 3.1 Vorwort

In der folgenden Darstellung der Ergebnisse bezieht sich die statistische Signifikanz jeweils auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, wenn nicht anders angegeben. Die Balkengraphen enthalten jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung und zeigen ebenfalls die Signifikanzen zwischen einer Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe an. Diese sind jeweils mit Sternchen (\*) gekennzeichnet (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). Soll die statistische Signifikanz zwischen zwei anderen Versuchsgruppen hervorgehoben werden, so wird dies durch einen waagerechten Strich über den zwei zu vergleichenden Gruppen angezeigt. In den erläuternden Texten sind jeweils die wichtigsten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte aufgeführt. Alle weiteren Daten sind den jeweiligen Ergebnistabellen im Anhang zu entnehmen.

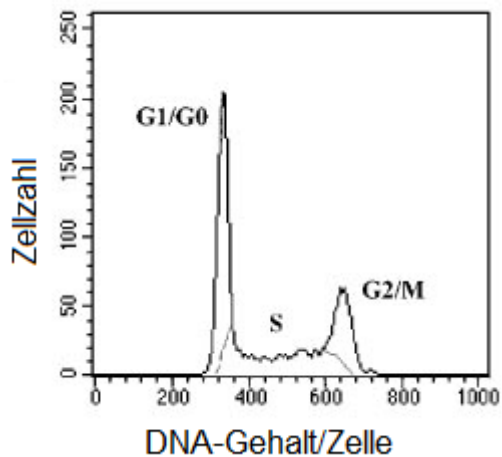
### 3.2 Allgemeine Beobachtungen

Insgesamt bildeten sich bei 61 % der Versuchstiere Knochenmetastasen in den Knieregionen aus (Alendronat: 6/12; 5-FdU: 10/12; Kontrolle: 8/16; 5-FdU-ale: 10/16). Da einige Tiere an beiden unteren Extremitäten Metastasen entwickelten, konnten folgende Anzahlen an Präparaten pro Gruppe ausgewertet werden: Alendronat: 10; Kontrolle: 14; 5-FdU: 19; 5-FdU-ale: 10. Weiterhin wurden Weichteilmetastasen in der Nähe des Injektionsortes der Karzinomzellen und Knochenmetastasen anderer Lokalisationen beobachtet, welche mithilfe eines Biolumineszenz-Verfahrens (NightOwl *in vivo* Imaging System, Berthold Technologies, Bad Wildbad, D) detektiert wurden, aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind (siehe dazu Abschnitt 4.3).

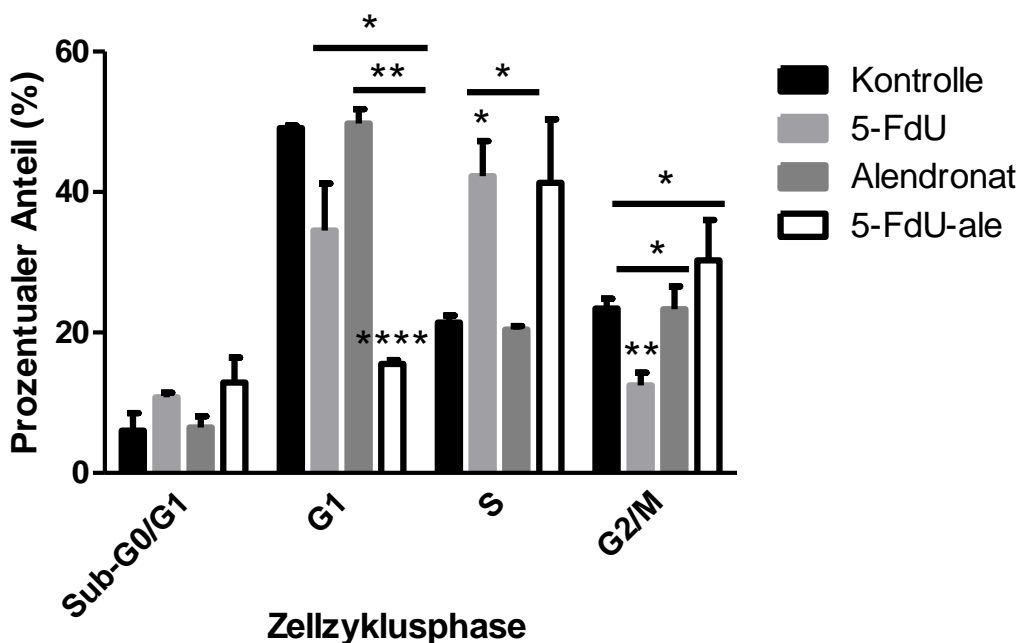
### 3.3 Zellzyklusanalyse



**Abb. 3:** Zellzyklus-Histogramme der einzelnen Versuchsgruppen im logarithmischen FLH-2-Mode.



**Abb. 4:** Darstellung eines Zellzyklus-Histogramms mit natürlicher Zellverteilung im Zellzyklus (verändert nach: Hang und Fox, 2004 [40]).



**Abb. 5:** Darstellung der prozentualen Anteile der Gesamtzellzahl an den einzelnen Zellzyklusphasen in den verschiedenen Versuchsgruppen im Balkengraphen.

Die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie zeigt anhand des DNA-Gehaltes der Zellen, in welcher Phase des Zellzyklus sich diese befinden. Abb. 4 zeigt eine natürliche Zellverteilung im Zellzyklus. Zellen in der G1-Phase haben einen diploiden Chromosomensatz (1n) und stellen so den ersten Peak dar. In der G2/M-Phase haben die Zellen ihren Chromosomensatz verdoppelt (2n, 2. Peak). Dazwischen liegen diejenigen Zellen, die sich in der S-Phase befinden und gerade ihren

Chromosomensatz verdoppeln (zwischen  $1n$  und  $2n$ ). Der prozentuale Anteil der Zellen in einer Phase des Zellzyklus hängt dabei von der relativen Dauer dieser Phase ab.

Vergleicht man die Abb. 4 mit den in der Abb. 3 dargestellten Histogrammen, erkennt man die Ähnlichkeit der Zellverteilungen des natürlichen Zellzyklus mit denen der Kontroll- und der Alendronatgruppe.

Der Balkengraph (Abb. 5) zeigt, dass sich die größten Zellanteile in der Alendronat- und der Kontrollgruppe in der G1-Phase befinden ( $49,80 \% \pm 1,163 \%$  und  $49,15 \% \pm 0,1743 \%$ ) und sich die Zellverteilungen in diesen beiden Versuchsgruppen in keiner Zellzyklusphase statistisch signifikant voneinander unterscheiden.

Der Großteil der Zellen in der 5-FdU- und der 5-FdU-ale-Gruppe befindet sich hingegen in der S-Phase des Zellzyklus ( $42,25 \% \pm 2,894 \%$  und  $41,32 \% \pm 5,234 \%$ ).

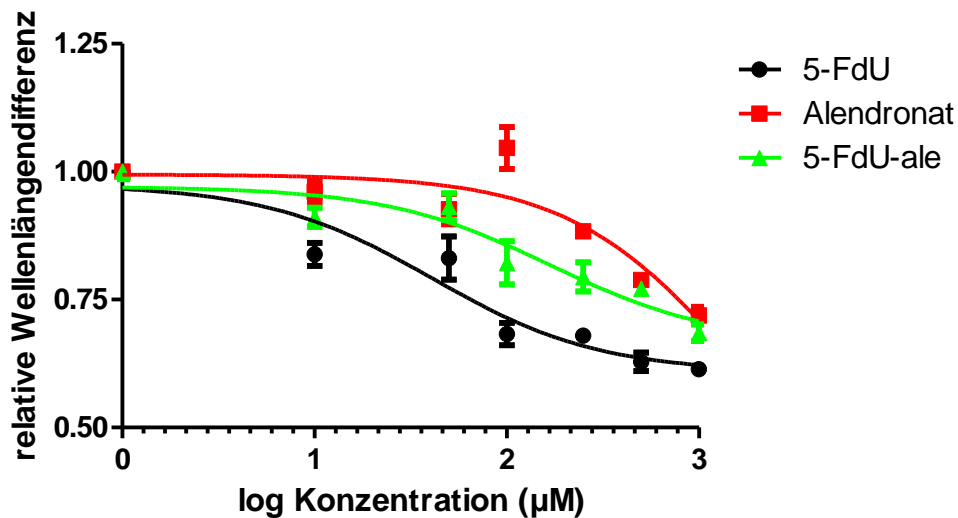
Die Anteile der toten Zellen, welche sich als Sub-G0/G1-Fraktion präsentieren, unterscheiden sich in allen Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander. Sie machen im Durchschnitt einen Anteil von  $9,03 \%$  am Zellzyklus aus. Es zeigt sich aber ein Trend zu größeren Fraktionen der mit 5-FdU ( $p=0,0880$ ) und der mit 5-FdU-ale ( $p=0,0717$ ) behandelten Zellen.

Den größten Anteil an Zellen in der G1-Phase haben die mit Alendronat behandelten ( $49,80 \% \pm 1,163 \%$ ) und unbehandelten Zellen ( $49,15 \% \pm 0,1743 \%$ ). Die mit 5-FdU inkubierten Zellen haben den nächstkleineren Anteil mit  $34,53 \% \pm 3,853 \%$ , welcher sich nicht signifikant von den Erstgenannten unterscheidet ( $p=0,0630$ ,  $p=0,0631$ ). Mit  $15,51 \% \pm 0,3330 \%$  hat die 5-FdU-ale-Gruppe den kleinsten Anteil an Zellen, die sich in der G1-Phase befinden. Dieser unterscheidet sich statistisch hochsignifikant von dem der Kontrollgruppe ( $p=<0,0001$ ) und signifikant von dem der Alendronat- ( $p=0,0012$ ) und der 5-FdU-Gruppe ( $p=0,0390$ ).

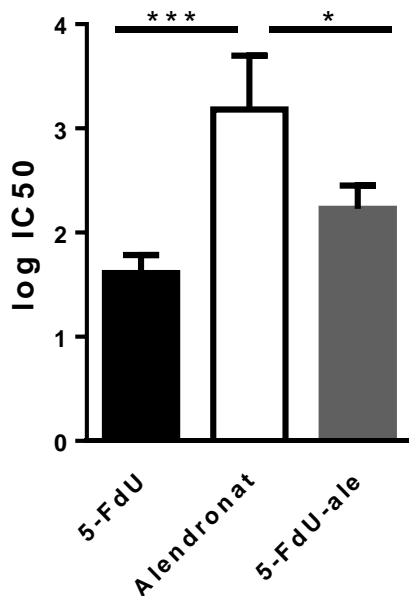
Die größten relativen Anteile an Zellen in der S-Phase haben die 5-FdU-Gruppe mit  $42,25 \% \pm 2,894 \%$  und die 5-FdU-ale-Gruppe mit  $41,32 \% \pm 5,234 \%$ . Es unterscheidet sich nur die 5-FdU-Gruppe von der Kontroll- ( $21,41 \% \pm 0,5746 \%$ ,  $p=0,0195$ ) und der Alendronat-Gruppe ( $20,41 \% \pm 0,3028 \%$ ,  $p=0,0173$ ).

In der G2/M-Phase unterscheiden sich die Anteile der Kontroll- und Alendronat-Gruppe mit Anteilen von  $23,40 \% \pm 0,8275 \%$  und  $23,32 \% \pm 1,886 \%$  wiederum kaum voneinander. 5-FdU-ale hat mit einer Fraktion von  $30,29 \% \pm 3,321 \%$  den größten Anteil an Zellen in dieser Zellzyklusphase. Die mit 5-FdU inkubierten Zellen machen den kleinsten Anteil der G2/M-Phase aus ( $12,47 \% \pm 1,055 \%$ ). Dies ist statistisch hoch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ( $p=0,0039$ ) und statistisch signifikant gegenüber den beiden anderen Versuchsgruppen (Alendronat:  $p=0,0152$ , 5-FdU-ale:  $p=0,0362$ ).

### 3.4 MTT-Test



**Abb. 6:** Semilogarithmische Inhibitionskurve, welche die Zellviabilität (MTT-Test) bei steigenden Medikamentendosen darstellt, mit logarithmischer Auftragung der verwendeten Medikamentenkonzentrationen.



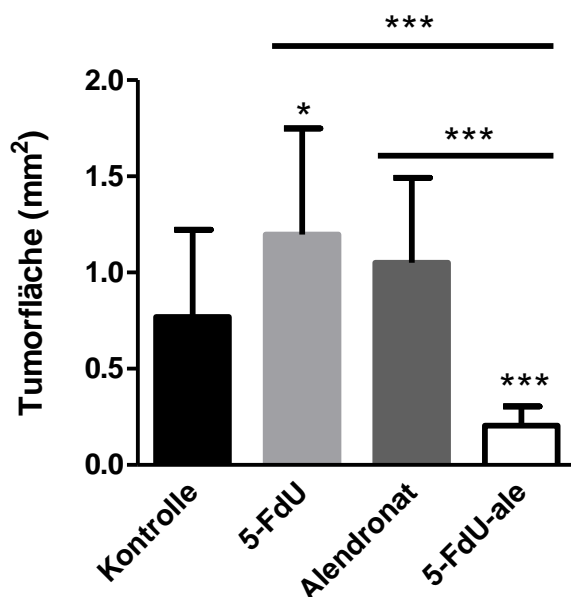
**Abb. 7:** Darstellung der anhand des MTT-Tests ermittelten logarithmischen IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der einzelnen Versuchsgruppen.

In diesem Falle wurde die Berechnung der genauen Zellzahlen vernachlässigt und stattdessen die gemessenen Absorptionen der einzelnen Versuchsgruppen verglichen. Dazu wurde zunächst der Mittelwert der drei Versuchsansätze ermittelt. Trägt man die Konzentrationen der Medikamente semilogarithmisch gegen die gemessene Absorption auf, erhält man eine annähernd invers-sigmoidal verlaufende Dosis-Wirkungs-Kurven (s. Abb. 6). Die Absorption verhält sich proportional zur Zellviabilität. [43] Alendronat hat die geringste Toxizität der drei getesteten Medikamente. Das

Zytostatikum 5-FdU zeigt einen deutlich negativeren Effekt auf das Überleben der Zellen. Bei einer Dosis von 100  $\mu\text{M}$  leben nach 24 h noch etwa 70 % der Zellen. 5-FdU-ale zeigt eine intermediäre Zellzytotoxizität zwischen seinen beiden Einzelkomponenten Alendronat und 5-FdU.

Die aus den Dosis-Wirkungs-Kurven berechneten  $\text{IC}_{50}$ -Levels (=mittlere inhibitorische Konzentration) zeigen diese Zusammenhänge noch einmal eindrücklich (s. Abb. 7). Alendronat hat eine  $\text{IC}_{50}$  von 1519  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50}$ : 3,181), 5-FdU von 41,05  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50}$ : 1,613) und 5-FdU-ale von 169,3  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50}$ : 2,229). Die mittleren inhibitorischen Konzentrationen von 5-FdU und 5-FdU-ale unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,0577$ ), sind allerdings signifikant kleiner als die des BSP ( $p=<0,0001$ ,  $p=0,0437$ ).

### 3.5 Tumorfächenausdehnung anhand Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

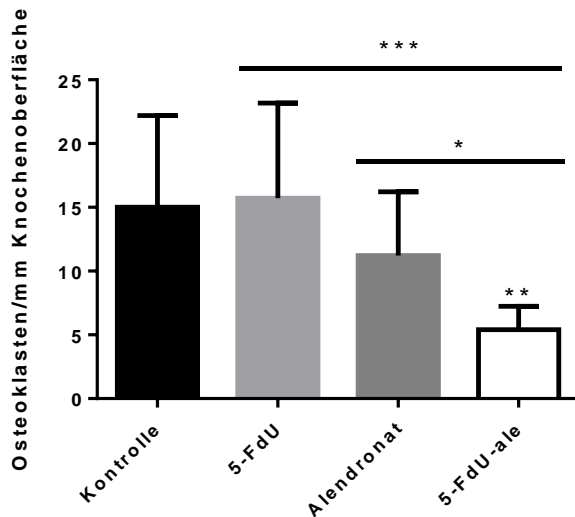


**Abb. 8:** Balkengraph zur ermittelten zweidimensionalen Tumorausdehnungen (mm<sup>2</sup>) anhand der Masson-Goldner-Trichrom gefärbten histologischen Präparate.

Bei der Auswertung der Tumorausdehnungen zeigt sich, dass Mäuse, die mit 5-FdU-ale behandelt wurden, die kleinste durchschnittliche Tumorfäche aufweisen ( $0,2046 \text{ mm}^2 \pm 0,03305 \text{ mm}^2$ ). Dies ist statistisch höchst signifikant im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen (5-FdU:  $1,197 \text{ mm}^2 \pm 0,1267 \text{ mm}^2$ ,  $p=<0,0001$ ; Alendronat:  $1,051 \text{ mm}^2 \pm 0,1395 \text{ mm}^2$ ,  $p=0,0002$ ; Kontrolle:  $0,7687 \text{ mm}^2 \pm 0,1211 \text{ mm}^2$ ,  $p=0,0005$ ). Die 5-FdU-Gruppe zeigt signifikant größere Tumoren als die Kontrollgruppe ( $p=0,0207$ ). Die durchschnittlichen Tumorareale der unbehandelten und der mit Alendronat behandelten Tiere unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,1437$ ). Des Weiteren werden in der 5-FdU-Gruppe, im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen, ausgeprägte Nekrosen in den Tumorarealen beobachtet. Eine Abbildung

ausgewählter histologischer Schnitte mit repräsentativen Tumorarealen jeder Versuchsgruppe ist im Abschnitt 7.2.2 (Abb. II) zu finden.

### 3.6 TRAP-Färbung



**Abb. 9:** Balkendiagramm zur Darstellung der ermittelten Osteoklastenzahlen pro Millimeter Knochenoberfläche entlang der Tumor-Kortikalis-Grenze anhand der TRAP-Färbung.

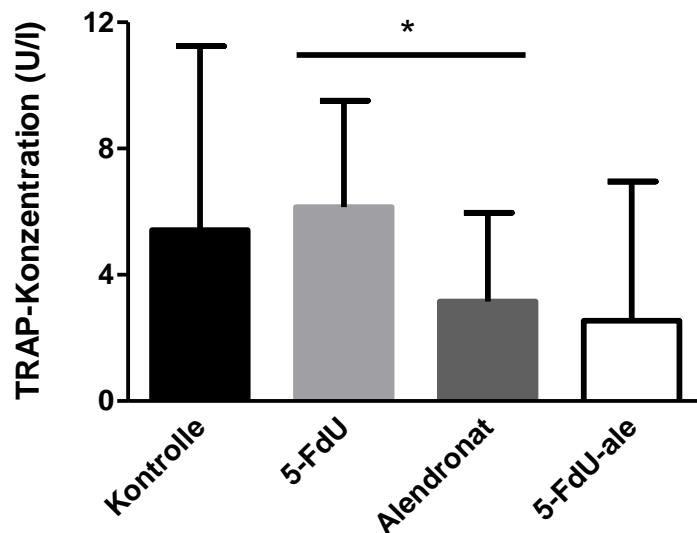
In der immunhistochemischen Färbung stellen sich die Osteoklasten durch die Anfärbung der TRAP rot dar. Die Abb. III in Abschnitt 7.2.3 zeigt repräsentative Ausschnitte der TRAP-gefärbten histologischen Schnitte jeder Versuchsgruppe.

Alle Versuchstiergruppen zeigten angefärbte Osteoklasten, wobei sich eine große Spannweite von 0 bis 21 Osteoklasten entlang der Tumor-Knochen-Grenze zeigte (Min.: 5-FdU-ale; Max.: 5-FdU, Alendronat).

Die durchschnittliche Osteoklastenzahl der Versuchstiere, die mit 5-FdU-ale behandelt wurden, beträgt  $5,408/\text{mm} \pm 0,7516/\text{mm}$  und ist damit signifikant geringer als die der mit Alendronat oder 5-FdU behandelten Tiere ( $11,21/\text{mm} \pm 1,896/\text{mm}$ ,  $p=0,0248$  und  $15,71/\text{mm} \pm 2,156/\text{mm}$ ,  $p=0,0006$ ). Auch die Alendronat-Gruppe zeigt geringere Osteoklastenzahlen gegenüber der Kontroll- und der 5-FdU-Gruppe, dies aber nicht in statistisch signifikantem Maße ( $15,02/\text{mm} \pm 2,393/\text{mm}$ ,  $p=0,2347$  und  $p=0,1365$ ).



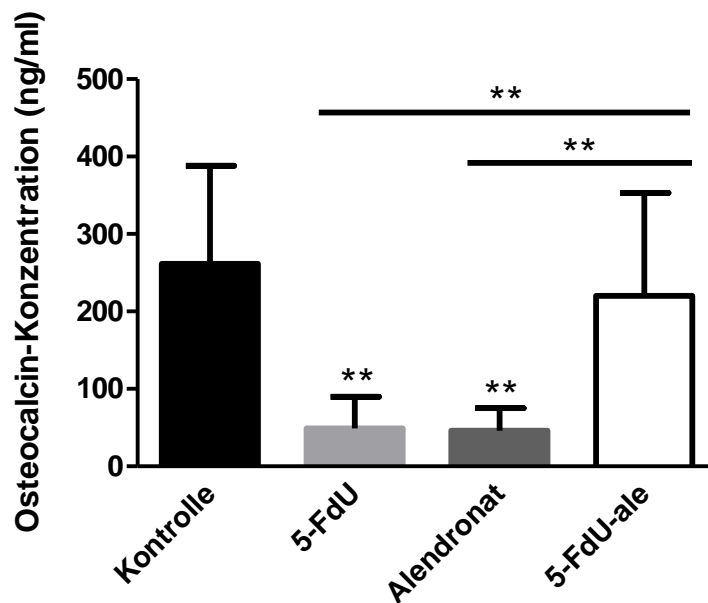
### 3.7 TRAP-ELISA



**Abb. 10:** Darstellung der gemessenen TRAP-Konzentrationen (U/l) in den Seren der Versuchstiere.

Die Abb. 10 zeigt die im Serum gemessenen TRAP-Konzentrationen (U/l) der einzelnen Versuchsgruppen nach einer fünfwöchigen Versuchsreihe mit wöchentlichen Injektionen der Medikamente. Die mit 5-FdU-ale behandelten Tiere weisen die geringste durchschnittliche TRAP-Konzentration im Serum auf. Es zeigt sich ein Trend bezüglich geringerer TRAP-Konzentration bei den mit 5-FdU-ale behandelten Mäusen. Dieser unterscheidet sich aber nicht statistisch signifikant von den anderen Versuchsgruppen ( $p=0.0736$  vs. 5-FdU). Lediglich die TRAP-Konzentration in den Seren der mit Alendronat behandelten Mäuse ist signifikant geringer als die der 5-FdU-Mäuse ( $p=0,0276$ ), welche insgesamt die höchsten Konzentrationen aufweisen.

### 3.8 Osteocalcin-ELISA



**Abb. 11:** Balkengraph zur Darstellung der gemessenen Osteocalcin-Konzentrationen (ng/ml) in den Seren der Versuchstiere.

Die Grafik (Abb. 11) zeigt ein Balkendiagramm der gemessenen Osteocalcin-Konzentrationen in den Seren der Mäuse, nachdem ihnen über fünf Wochen einmal wöchentlich das entsprechende Medikament injiziert wurde. Die höchsten Osteocalcin-Konzentrationen finden sich in den Seren der Kontroll-Mäuse, die keine Medikation erhielten (261,6 ng/ml ± 44,80 ng/ml). Ähnliche Level weisen auch die mit 5-FdU-ale behandelten Tiere auf (220,1 ng/ml ± 47,05 ng/ml). Sowohl die Alendronat- als auch die 5-FdU-Gruppe zeigen statistisch hochsignifikant geringere Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe (45,90 ng/ml ± 8,496 ng/ml,  $p=0,0021$  und 48,82 ng/ml ± 11,86 ng/ml,  $p=0,0025$ ), die Alendronat-Gruppe auch gegenüber der 5-FdU-ale-Versuchsgruppe ( $p=0,0083$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

#### 4.1.1 Tiermodell

An Tiermodellen untersuchte Sachverhalte sind aufgrund von Interspeziesunterschieden nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar. Dass in dieser Studie humane Karzinomzellen verwendet wurden, kann für die Übertragbarkeit auf den Menschen von Vorteil sein und stellt einen guten Ausgangspunkt für weitere Studien dar. Darüber hinaus ist darauf hinzuweisen, dass aus ethischen Gründen bei Tierversuchen im Allgemeinen lediglich kleine Fallzahlen möglich sind. Zum Zeitpunkt

der Durchführung der Experimente wurde von der Ethikkommission noch keine biometrische Berechnung zur Effektstärke gefordert, sodass die Ergebnisse dieser Studie am ehesten auf hypothesengenerierender Basis als Hinweis auf mögliche Zusammenhänge zu verstehen sind.

#### 4.1.2 Histologische Analysen

Histologische Schnitte zeigen ein zweidimensionales Abbild der zellulären Strukturen eines Gewebes. Die Tumorausdehnung wurde anhand der Bestimmung der größten Flächenausdehnung ( $\text{mm}^2$ ) und nicht anhand eines Volumens ( $\text{mm}^3$ ) beurteilt, wobei dies sicherlich ein präziseres Maß für die dreidimensionale Ausdehnung der Tumore wäre. Auch wenn es nicht gelingt, mit histologischen Verfahren dreidimensionale Strukturen darzustellen, so kommt das angewendete Verfahren dem doch recht nahe, da die angefertigten Schnitte fortlaufend begutachtet wurden (ähnlich einer Schnittbildtechnik, wie sie im CT oder MRT angewendet wird) und so ein guter Eindruck der Form und der Gesamtausdehnung der Tumorareale gewonnen werden konnte.

Histologisch wurde außerdem die Osteoklastenaktivität an der Tumor-Kortikalis-Grenze untersucht. Um dieses Verfahren möglichst valide zu gestalten, wurden vor Versuchsbeginn definierte Einschlusskriterien für TRAP-positive Zellen festgelegt und streng eingehalten. Die Auszählung erfolgte außerdem bei Verblindung der Gruppenzugehörigkeit der Präparate, um eine mögliche Beeinflussung des Beurteilenden auszuschließen. Zusätzlich wurde als weitere Methode der Bestimmung der TRAP-Aktivität ein ELISA-Verfahren gewählt. So konnte zusätzlich die Gesamtosteoklastenaktivität aller Skelettabschnitte aus dem Serum bestimmt werden.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 *In-Vitro*-Versuche

In den *In-Vitro*-Versuchen wurden humane Mammakarzinomzellen verwendet. Dies stellt eine gute Basis für die Anwendbarkeit der Experimente beim Menschen dar. Die durchgeführte durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der mit den verschiedenen Medikamenten beimpften Zellen unterstreicht die Wirkung des Antimetabolits 5-FdU als Inhibitor des Zellzyklus in der S-Phase. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigen sowohl 5-FdU als auch 5-FdU-ale deutlich erhöhte Zellzahlen in der S-Phase (5-FdU:  $42,25 \% \pm 2,894 \%$ ,  $p=0,0195$ ; 5-FdU-ale:  $41,32 \% \pm 5,234 \%$ ,  $p=0,0634$ ). Sowohl die Kontroll- als auch die Alendronatgruppe weisen deutlich geringere Zellzahlen in der S-Phase auf (Kontrolle:  $21,41 \% \pm 0,5746 \%$ ; Alendronat:  $20,41 \% \pm 0,3028 \%$ ,  $p=0,2201$  vs. Kontrolle). Dies zeigt, dass der zytostatische Bestandteil des 5-FdU-ale auch in der Zellkultur eine Wirkung entfalten kann. Entsprechend weniger Zellen der 5-FdU-Gruppe erreichen die G2/M-Phase ( $p=0,0039$ ) und gehen in Apoptose. 5-FdU-ale führt ebenfalls zu einer hohen Apoptoserate mit einem entsprechend großen Anteil an Zellen in der Sub-G0/G1-Phase ( $p=0,0717$ ).

Unterschiede in diesen beiden Versuchsgruppen zeigen sich allerdings in der G1- und der G2/M-Phase. Es fällt eine sehr geringe Zellzahl in der G1-Phase der mit 5-FdU-ale behandelten Zellen gegenüber den anderen Versuchsgruppen auf (5-FdU-ale: 15,51 %  $\pm$  0,3330 %,  $p=0,0390$  vs. 5-FdU; 5-FdU: 34,53 %  $\pm$  3,853 %), wohingegen viele Zellen die G2/M-Phase erreichen (5-FdU-ale: 30,29 %  $\pm$  3,321 %,  $p=0,0362$  vs. 5-FdU; 5-FdU: 12,47 %  $\pm$  1,055%). Dies könnte einerseits aufgrund der ungenauen durchflusszytometrischen Distinktion am Übergang der G1/S-Phase bzw. der S/G2-Phase durch den fließenden Übergang zwischen di- und tetraploidem Chromosomensatz zu erklären sein, andererseits kann es durch unzureichenden Metabolismus des Konjugates 5-FdU-ale *in vitro* zu einer geringeren Konzentration an wirksamem 5-FdU gekommen sein, sodass die Wirkung nicht der des in äquivalenter Dosis zugegebenen freiem 5-FdU entspricht. [7] Alendronat hat wesentlich geringere Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Verteilung im Zellzyklus unterscheidet sich nicht statistisch signifikant von der der Kontrollgruppe. Beide sind vergleichbar mit der in Abb. 4 dargestellten natürlichen Verteilung von Zellen im Zellzyklus.

Der MTT-Test diente zur Testung der Zytotoxizität der einzelnen Medikamente. Alendronat zeigte die geringsten zytotoxischen Effekte. Dennoch führte die Gabe von Alendronat zu einem Absterben von Zellen und es konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von 1519  $\mu M$  ermittelt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen zahlreicher anderer Studien, die ebenfalls eine eigene zytostatische Aktivität von Alendronat bereits bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  M nachweisen konnten. [51] [52] 5-FdU und 5-FdU-ale zeigten vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte. Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander, wobei 5-FdU-ale eine etwas geringere Zytotoxizität zeigte als das freie 5-FdU (169,3  $\mu M$  vs. 41,05  $\mu M$ ). Dieses Ergebnis deckt sich nur zum Teil mit den Ergebnissen von S. Schott *et al.* [7] Sie führten eine  $IC_{50}$ -Bestimmung mithilfe eines ATP-Chemosensitivitätsassays an MDA-MB-231 Zellen durch und kamen zu einem signifikant höheren  $IC_{50}$ -Wert für 5-FdU-ale (44,9  $\mu M$  (25,0-67,9  $\mu M$ ) vs. 12,8  $\mu M$  (1,0-29,3  $\mu M$ ); 72 h Inkubation). Als möglichen Grund für die geringere Zytotoxizität von 5-FdU-ale, welches sie aufgrund der Kombination der beiden zytotoxisch wirkenden Substanzen 5-FdU und Alendronat als effektiver eingeschätzt hätten, nannten sie die unzureichende Metabolisierung *in vitro*. Diese Daten zeigen wiederum, dass die Ergebnisse von MTT-Test und ATP-Chemosensitivitätstest aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionsweisen nicht direkt miteinander verglichen werden können, wie in vergleichenden Artikeln ebenfalls gezeigt werden konnte. [53] [54]

#### 4.2.2 *In-Vivo*-Versuche

Die *in vivo* durchgeführten Versuche imitieren die metabolischen Verhältnisse, wie sie im menschlichen Organismus vorhanden sind und zu einer Spaltung von 5-FdU-ale in zwei aktive Substanzen führen können. Um diese Hypothese zu stützen und eine überlegene Wirksamkeit von 5-FdU-ale im metabolisch aktiven Mikromilieu des Knochens nachzuweisen, wurden zunächst anhand

von histologischen Präparaten die maximalen zweidimensionalen Tumorausdehnungen nach einer Versuchsdauer von fünf Wochen mit wöchentlicher Medikamenteninjektion verglichen. 5-FdU-ale zeigt insgesamt die kleinste Tumorfläche, allerdings mit einer hohen Varianz ( $0,2046 \text{ mm} \pm 0,03305 \text{ mm}$ ). Ein Präparat dieser Gruppe wurde als Ausreißer deklariert und aus dem Ergebnis ausgeschlossen. Auffallend ist, dass die Kontrollgruppe im Durchschnitt die zweitkleinsten Tumorareale zeigt und die Behandlung sowohl mit 5-FdU als auch mit Alendronat das Tumorwachstum sogar zu begünstigen scheint. Dies lässt sich anhand der zusätzlich durchgeführten Biolumineszenzmessung der Tumore nicht bestätigen. Hier zeigen alle drei Medikamentengruppen sowohl eine signifikante Reduktion der Anzahl der Tumore pro Maus als auch der durchschnittlichen Tumorgröße. [55] Auf eine mögliche Beeinflussung von 5-FdU auf die Biolumineszenzwerte wird in Abschnitt 4.3 eingegangen.

Mithilfe der histologischen Auszählung der TRAP-positiven Osteoklasten entlang der Tumor-Kortikalis-Grenze im Bereich der mit Tumoren befallenen Knieregionen können die lokalen Knochenabbauprozesse dargestellt werden, wohingegen die im Serum bestimmten TRAP-Werte die Osteoklastenaktivität im gesamten Organismus widerspiegeln. Dementsprechend sind die Ergebnisse isoliert betrachtet nicht direkt miteinander vergleichbar. Es zeigen sich aber gleiche Tendenzen, was dafür spricht, dass sowohl die Gesamtosteoklastenaktivität als auch die lokale Aktivität im Bereich von Knochenmetastasen gleichermaßen durch die Medikamente beeinflusst werden. Dabei wirkt 5-FdU-ale als einziges Medikament verstärkt lokal und übt eine geringere Beeinflussung auf den Gesamtorganismus aus. Die Anzahl der TRAP-positiven Zellen in der 5-FdU-ale-Gruppe ist signifikant geringer als bei allen anderen Versuchsgruppen, wohingegen die durchschnittliche TRAP-Konzentration im Serum gegenüber allen anderen Versuchsgruppen nicht signifikant reduziert ist.

### 4.3 Weitere Forschungsergebnisse

Darüber hinaus wurden zu diesem Projekt weitere Versuche gemacht, deren Durchführung und Ergebnisse in dieser Arbeit bisher keine Erwähnung fanden, da sie vorwiegend von anderen Mitgliedern der Forschungsgruppe durchgeführt wurden. Trotzdem sollen diese Ergebnisse im Folgenden kurz dargestellt und erläutert werden, um dem Leser alle bisher gewonnenen Erkenntnisse zugänglich zu machen. Dabei handelt es sich zum Teil um bereits veröffentlichte Daten (s. Abschnitt 7.8). Noch unpublizierte Daten sind als solche kenntlich gemacht.

Anhand des Mausmodells und der mit dem Luciferase-Gen transfizierten Mammakarzinomzellen konnten Größe und Lokalisation der Metastasen auch während des Versuchszeitraums von fünf Wochen evaluiert werden. Dazu diente, wie oben kurz beschrieben, die Biolumineszenzmessung in der NightOwl (*in vivo* Imaging System, Berthold Technologies, Bad Wildbad, D) nach Gabe des Substrates D-Luciferin (150mg/kg KG, Sigma-Adrich, #L9504-50MG, Steinheim, D). Alle Versuchsgruppen zeigten verglichen mit den Kontrolltieren eine geringere Auftretshäufigkeit sowie

geringere mittlere Größen von biolumineszierenden Tumoren. Im Gegensatz zur hier beschriebenen histologischen Auswertung der Tumorgrößen (s. Abschnitt 3.5) konnte in der Biolumineszenzmessung keine Überlegenheit von 5-FdU-ale seinen Einzelsubstanzen gegenüber nachgewiesen werden. Ein Erklärungsansatz dafür lieferten Zhang Y. *et al.* Sie fanden 2007 heraus, dass die Expression des ABCG2/BCRP-Transporters die D-Luciferin-basierte Biolumineszenzmessung beeinflusst. [56] In einer FACS-Analyse konnte schließlich gezeigt werden, dass die Gabe von 5-FdU zu einem signifikanten Anstieg von ABCG2-exprimierenden Zellen führt (bisher unveröffentlichte Daten). Einen weiteren Vorteil der histologischen Auswertung gegenüber der Biolumineszenzmessung stellt die Darstellbarkeit von Tumornekrosen dar. Durch die Avitalität der Zellen im Nekrosebereich werden diese Areale anhand der Biolumineszenzaufnahmen nicht erfasst und die Größe des Tumors daher unterschätzt.

Das in dieser Arbeit beschriebene Mausmodell diene darüber hinaus zur Auswertung der Beeinflussung verschiedener Knochenparameter durch die Medikamente anhand von Micro-CT-Aufnahmen. Diese konnten zeigen, dass Mäuse, die mit 5-FdU-ale oder freiem Alendronat behandelt wurden, statistisch signifikant höhere Knochendichten aufwiesen, als unbehandelte oder mit 5-FdU behandelte Tiere. Auch die Knochenvolumendichte (BV/TV), d.h. das Volumen mineralisierten Knochens pro Volumen Knochen, zeigte für 5-FdU-ale, verglichen mit den anderen Versuchsgruppen, signifikant höhere Werte, was dafür spricht, dass Osteoblasten von 5-FdU-ale nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden. Einen weiteren Hinweis darauf ergaben angefertigte Subtraktionsbilder der proximalen Tibiae der Mäuse, die darstellten, dass Alendronat lediglich die Knochenresorption hemmt, wohingegen 5-FdU-ale die Knochenresorption hemmt und die Knochenneubildung fördert. [55] Dies wird darüber hinaus durch die Ergebnisse des Osteocalcin-Assays untermauert (s.o.).

Um den Vorteil des *bone targeting* und die Stabilität des neuen Medikaments *in vivo* zu testen, wurden gesunden Versuchstieren die Medikamente 5-FdU-ale und 5-FdU injiziert (Dosierungen und Applikation wie oben beschrieben) und die Speicherung der beiden Substanzen im Knochen über die Zeit gemessen. 5-FdU-ale zeigte signifikant höhere Retentionswerte nach einer Versuchsdauer von einem Tag und verblieb in signifikant höheren Konzentrationen im Knochen als 5-FdU für einen Zeitraum von zwei Wochen nach der einmaligen Medikamentenapplikation (bisher unveröffentlichte Daten).

F. J. Pérez-Zúñiga *et al.* konnten 2008 zeigen, dass Bisphosphonate, darunter auch Alendronat, die 5-Fluoruracil-Wirkung *in vitro* steigern können. Bisphosphonate wirken als Aktivatoren der Phosphoribosyltransferase in Hefekulturen und beschleunigen damit die Bildung der Metabolite 5-Fluoruridinmonophosphat (5-FUMP) und Uridinmonophosphat (UMP) aus 5-FU. Diese führen nach einem weiteren Schritt der Aktivierung zu 5-FdUMP zur kompetitiven Hemmung der Thymidylatsynthese und zur DNA-Schädigung. [57] Da sich Bisphosphonate vor allem im Knochen in ausreichend hohen Konzentration anreichern und zum *bone targeting* des Konjugates 5-FdU-ale

beitragen, könnte sich dieser Effekt vor allem bei der Behandlung von Knochenmetastasen mit 5-FdU-ale positiv auswirken.

## 4.4 Klinische Relevanz

### 4.4.1 Derzeitige pharmakologische Behandlung von Knochenmetastasen

Effektive Alternativen in der Behandlung von Knochenmetastasen, nicht nur bei Brustkrebs, werden dringend benötigt. Mehr als 90 % der Patienten mit Knochenmetastasen leiden unter Schmerzen [58], was sich nicht nur negativ auf die Lebensqualität auswirkt, sondern auch auf die Überlebensprognose von Patienten mit fortgeschrittenem Krebsleiden. [59] Die bisher angewendeten Strategien in der Behandlung von Knochenmetastasen und den damit verbundenen Symptomen wie Knochenschmerzen, Hyperkalzämie und erhöhtes Frakturrisiko sind nicht zufriedenstellend und stellen noch immer einen rein palliativen Therapieansatz dar. Denosumab, ein Antikörper gegen RANKL, beispielsweise, zeigt in verschiedenen Studien einen Benefit gegenüber Placebo, führt aber lediglich zu einer Verzögerung des Eintritts von Knochenschmerzen und skelettbedingten Komplikationen. Ähnliche Resultate erzielt die Anwendung des Bisphosphonates Zoledronat (z.B. Cleeland *et al.*: Zeitliche Verzögerung bis zur Verstärkung der Knochenschmerzen: Denosumab 394 Tage vs. Zoledronat 310 Tage). [60] Außerdem kann die Einnahme dieser Medikamente zu Nebenwirkungen wie Nierentoxizität und Kiefernekrosen führen. In großen randomisierten Phase-III-Studien traten Kiefernekrosen bei 2 % der mit Denosumab behandelten Patienten und bei 1,4 % bzw. 1 % der mit Zoledronat behandelten Patienten auf. [61] [62] Insgesamt traten ernsthafte unerwünschte Arzneimittelwirkungen in der Studie von Fizazi *et al.* von 2011 bei 63 % der Patienten in der Denosumab-Gruppe und bei 60 % der Patienten in der Zoledronat-Gruppe auf. [62]

Daher werden neue, nebenwirkungsärmere Medikamente dringend benötigt. 5-FdU-ale kann ein neuer Ansatz für die Behandlung von Knochenmetastasen, nicht nur beim Mammakarzinom, sein. Die bisherigen am Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse versprechen einen Benefit gegenüber der Monotherapie mit Alendronat in Bezug auf die Metastasengröße und die Knochenstabilität aufgrund des verbesserten Knochenaufbaus. Dadurch könnte auch das Risiko für pathologische Frakturen positiv beeinflusst werden. Die Nebenwirkungen des Zytostatikums 5-FU können durch das gezielte *bone targeting* mit signifikant höheren lokalen Konzentrationen von 5-FdU-ale vermutlich deutlich gesenkt werden. Insgesamt zeigt die Wirkung von 5-FdU-ale bisher vielversprechende Resultate.

### 4.4.2 Bestandteile von 5-FdU-ale und ihre klinische Relevanz

Bisphosphonate werden in der Therapie von Knochenerkrankungen eingesetzt, die mit dem Verlust an Knochensubstanz einhergehen. Alendronat ist in Deutschland zur Behandlung der Osteoporose zugelassen, wird aber weniger in der Osteonkologie verwendet. Im klinischen Bereich werden vor

allem andere Vertreter dieser Wirkstoffgruppe wie Zoledronat, Pamidronat und Clodronat verwendet. [63]

Wie im Abschnitt 2.6 beschrieben, ist auch 5-FdU nicht die erste Wahl bei der Behandlung des Mammakarzinoms. Hier findet sein Strukturverwandter, das 5-FU, Anwendung. Gründe dafür sind geringere Kosten und eine geringere systemische Zytotoxizität. In zahlreichen präklinischen Studien konnte allerdings eine klare Überlegenheit des 5-FdU dem 5-FU gegenüber bestätigt werden [25] und auch einzelne klinische Studien zeigen eine bessere Effektivität. [64] Gerade in der lokalen Anwendung scheint 5-FdU einen Vorteil zu bieten. [65] Dieses Prinzip der gezielten regionalen Anwendung wird auch bei 5-FdU-ale verfolgt. Die meisten klinischen Studien, die die beiden Medikamente miteinander vergleichen, wurden allerdings schon in den 1960er Jahren durchgeführt und neuere Studien, welche heutigen Standards entsprechen, fehlen.

#### 4.5 Schlussfolgerung

In Zusammenschau der gesammelten Daten konnte gezeigt werden, dass 5-FdU-ale sowohl im Tiermodell als auch in *in vitro* durchgeführten Versuchen seine anti-Tumor-Wirkung entfalten kann. Im klinischen Mausmodell führte die Behandlung mit 5-FdU-ale zu hochsignifikant kleineren Tumoren im Vergleich zur Monotherapie mit 5-FdU oder Alendronat. Darüber hinaus lässt sich aus der Bestimmung der osteoklasten- und osteoblastenspezifischen Parameter ableiten, dass 5-FdU-ale Knochenabbauprozesse hemmt und gleichzeitig den Knochenaufbau fördert, sodass die Knochenstabilität insgesamt zunimmt. Dies konnte auch durch Micro-CT-Aufnahmen bestätigt werden. Das BSP Alendronat konnte in den durchgeführten Experimenten lediglich einen positiven Trend in Bezug auf seine osteoklastenhemmende Funktion zeigen und führte zu keiner Osteoblastenaktivierung. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, würde sich die Durchführung eines MTT-Tests an Osteoklasten und Osteoblasten eignen.

*In vitro* entfaltete 5-FdU-ale eine ähnlich zytotoxische Wirkung wie freies 5-FdU und führte ebenso zu einem Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase des Zellzyklus.

Der erhoffte Vorteil von 5-FdU-ale, dass durch Metabolisierung unterschiedliche Teilsubstanzen entstehen könnten, die eine stärkere Wirkung als 5-FdU alleine haben oder sogar bei vorliegenden Resistenzen noch wirksam sind, konnte in den Versuchen nicht bestätigt werden. Dazu sollten weitere Experimente mit 5-FdU-resistenten Mammakarzinomstämmen durchgeführt werden und die entstehenden Einzelkomponenten von 5-FdU-ale nach enzymatischer Spaltung z.B. mit chromatographischen Verfahren detektiert werden.

Ein wichtiger Benefit des Antimetabolit-BSP-Konjugates ist allerdings seine deutlich längere biologische Halbwertszeit im Knochengewebe, die nach einmaliger Medikamentenapplikation auch noch nach zwei Wochen signifikant höher ist als die der Einzelsubstanzen (bislang nicht



veröffentlichte Daten). Dies ist ein entscheidender Hinweis, dass das angestrebte *bone targeting*, d.h. eine Akkumulation der Substanz im Knochen, tatsächlich stattfindet. So könnten auch die systemischen Nebenwirkungen der zytostatischen Therapie herabgesetzt werden. Dies gilt es in weiteren tierexperimentellen Studien zu untersuchen. Darüber hinaus sollten weitere tierexperimentelle Studien zur erneuten Evaluation der Metastasengrößen nach vorheriger Fallzahlberechnung angestrebt werden, da die histologische Auswertung und die Biolumineszenzdaten z.T. unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Dabei sollte möglichst ein bildgebendes Verfahren gewählt werden, welches die genauen Volumina der Knochenmetastasen in allen Knochenabschnitten abbilden kann und dabei nicht von äußeren Faktoren beeinflusst wird.

## 5 Zusammenfassung

Brustkrebs ist in Deutschland mit einer Erkrankungshäufigkeit von etwa 1:8 Frauen die häufigste bösartige Erkrankung der Frau. [1] Viele der Betroffenen erleiden im Laufe ihrer Erkrankung Zweittumoren. Dabei handelt es sich zu etwa 70 % um Knochenmetastasen. [3] [4]

Ziel dieser Arbeit war es, den neuen kombinierten Wirkstoff 2'-Desoxy-5-Fluoruridin-Alendronat (5-FdU-ale) anhand von *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Versuchen auf seine Wirksamkeit gegenüber der Entstehung und des Wachstums von Knochenmetastasen beim metastasierenden Mammakarzinom zu testen.

5-FdU-ale setzt sich aus dem Zytostatikum 2'-Desoxy-5-Fluoruridin (5-FdU) und dem Aminobisphosphonat Alendronat zusammen. Dieses Molekül vereint somit die hohe Knochenaffinität (*bone targeting*) des Alendronats und die zytostatische Komponente des 5-FdU in sich und wirkt so potentiell hochspezifisch und mit wenigen systemischen Nebenwirkungen gegen Knochenmetastasen.

Für die Versuche wurde die humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231BO/luc verwendet, welche nachweislich eine hohe Affinität für Knochen aufweisen. [20]

*In vitro* wurde einerseits ein Zellviabilitätsassay (MTT-Test) zur Toxizitätsprüfung und andererseits eine FACS-Analyse zur Untersuchung der Auswirkungen der einzelnen Medikamente auf den Zellzyklus durchgeführt.

Zur *in vivo* Evaluation wurde ein klinisches Mausmodell verwendet, wie es von Yoneda *et al.* beschrieben wurde. [20] Den Mäusen wurden zu Versuchsbeginn die humanen Mammakarzinomzellen intrakardial appliziert und so ein metastasierendes Tumorgeschehen imitiert. In wöchentlichen Intervallen wurden den Versuchstieren die Medikamente 5-FdU-ale, 5-FdU oder Alendronat gespritzt. Eine Kontrollgruppe erhielt keine Medikation. Nach 5 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, ihre Seren gewonnen und Tibiae und Femora zur histologischen Aufarbeitung präpariert.

Die entstandenen Knochenmetastasen der Knieregionen wurden anhand eines histomorphometrischen Verfahrens an Masson-Goldner-Trichrom-gefärbten Schnitten analysiert. Knochenstoffwechselparameter wie das osteoblastenspezifische Osteocalcin und die von aktivierten Osteoklasten gebildete Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) wurden anhand enzymatischer Immunadsorptionsverfahren aus den Seren der Tiere bestimmt. Die lokale Osteoklastenaktivität an der Tumor-Korikalis-Grenze wurde zusätzlich anhand einer immunhistochemischen TRAP-Färbung der Knochen bestimmt.

*In vitro* zeigte 5-FdU-ale eine vergleichbare mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) wie das freie 5-FdU und in einer Zellzyklusanalyse konnte bei beiden Medikamenten ein Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase festgestellt werden, sodass angenommen werden kann, dass 5-FdU-ale auch in der Zellkultur zu seinen wirksamen Metaboliten verstoffwechselt wird.

In der histomorphometrischen Aufarbeitung der Knochen zeigten sich signifikant kleinere Tumoren in der 5-FdU-ale-Gruppe als in den anderen Versuchsgruppen. Signifikant höhere Osteocalcin-Spiegel fanden sich in den Seren der mit 5-FdU-ale behandelten Tiere gegenüber den Tieren, die lediglich Einzelkomponenten 5-FdU oder Alendronat erhielten. Sowohl die TRAP-Konzentration in den Seren der Versuchstiere als auch die anhand der TRAP-Färbung ermittelte Osteoklastenzahl war unter 5-FdU-ale-Therapie deutlich geringer, sodass 5-FdU-ale insgesamt eine osteoklastenhemmende und osteoblastenaktivierende Wirkung aufweist und von einer knochenstabilisierenden Wirkung ausgegangen werden kann. Das untersuchte Bisphosphonat Alendronat wies hingegen nur eine osteoklastenhemmende Funktion auf.

Insgesamt zeigten diese ersten Versuche zur Evaluation der Wirkung von 5-FdU-ale auf die Entstehung und das Wachstum von Knochenmetastasen vielversprechende Ergebnisse. Weitere tierexperimentelle Studien mit höheren Fallzahlen und Studien zur Ermittlung des Nebenwirkungsprofils des Medikaments sind allerdings vonnöten, um diese Ergebnisse zu sichern.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] P. Kaatsch, C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, E. Kriehoff-Henning, B. Kunz, A. Penzkofer, K. Treml, K. Wittenberg, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke und U. Wolf, „Krebs in Deutschland 2009/2010“, Nr. 9, pp. 68-71, 2013.
- [2] R. Coleman, „Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies“, *Cancer Treat Rev*, Bd. 27, pp. 165-176, 2001.
- [3] G. Mundy, „Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities“, *Nature Rev Cancer*, Bd. 2, pp. 584-93, 2002.
- [4] M. Bonomi, R. Nortilli, A. Molino, T. Sava, A. Caldara und G. Cetto, „Renal toxicity and osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with bisphosphonates: a long-term retrospective analysis“, *Med Oncol*, Bd. 2, pp. 224-9, 2010.
- [5] K. Miller, C. Clementi, D. Polyak, A. Eldar-Boock, L. Benayoun, I. Barshack, Y. Shaked, G. Pasut und R. Satchi-Fainaro, „Poly(ethylene glycol)-paclitaxel-alendronate self-assembled micelles for the targeted treatment of breast cancer bone metastases“, *Biomaterials*, Bd. 34, pp. 3795-806, 2013.
- [6] H. Schott, D. Goltz, T. Schott, C. Jauch und R. Schwentender, „N4-[Alkyl-(hydroxyphosphono)phosphonate]-cytidine-new drugs covalently linking antimetabolites (5-FdU, araU or AZT) with bone targeting bisphosphonates (alendronate or pamidronate)“, *Bioorg Med Chem*, Bd. 19, pp. 3520-6, 2011.
- [7] S. Schott, M. Wallwiener, B. Kootz, H. Seeger, T. Fehm und H. Neubauer, „Cytotoxicity of the new antimetablote-bisphosphonate (5-FdU-alendronate) in comparison to standard therapeutics on breast and ovarian cancer cell lines in the ATP tumor chemosensitivity assay“, *Invest New Drugs*, Bd. 30, pp. 1750-5, 2012.
- [8] S. Braun, C. Kentenich, W. Janni, F. Hepp, J. de Waal, F. Willgeroth, H. Sommer und K. Pantel, „Lack of effect of adjuvant chemotherapie on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients“, *J Clin Oncol*, Bd. 18, pp. 80-6, 2000.
- [9] J. Yin, K. Selander, J. Chirgwin, M. Dallas, B. Grubbs, R. Wieser, J. Massagué, G. Mundy und T. Guise, „TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development“, *J Clin Invest*, Bd. 103, pp. 197-206, 1999.

- 
- [10] T. Hiraga, A. Myoui, M. Choi, H. Yoshikawa und T. Yoneda, „Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer“, *Cancer Res*, Bd. 66, pp. 2067-73, 2006.
- [11] Y. Morinaga, N. Fujita, K. Ohshi und T. Tsuruo, „Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor-beta and tumor cell factors“, *Int J Cancer*, Bd. 71, pp. 422-8, 1997.
- [12] K. Weilbaecher, T. Guise und L. McCauley, „Cancer to bone: a fatal attraction“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 11, pp. 411-25, 2011.
- [13] D. Schramek, A. Leibbrandt, V. Sigl, L. Kenner, J. Posposolok, H. Lee, R. Hanada, P. Joshi, A. Aliprantis, L. Glimcher, M. Pasparakis, R. Khokha, C. Ormandy, M. Widschwendter, G. Schett und J. Penninger, „Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer“, *Nature*, Bd. 468, pp. 98-102, 2010.
- [14] E. Gonzalez-Suarez, A. Jacob, J. Jones, R. Miller, M. Roudier-Meyer, R. Erwert, J. Pinkas, D. Branstetter und W. Dougall, „RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis“, *Nature*, Bd. 468, pp. 103-7, 2010.
- [15] T. Yoneda, S. Tanaka und K. Hata, „Role of RANKL/RANK in primary and secondary breast cancer“, *World J Orthop*, Bd. 4, pp. 178-85, 2013.
- [16] G. Roodman, „Mechanisms of bone metastasis“, *N Engl J Med*, Bd. 350, pp. 1655-64, 2004.
- [17] D. Pierroz, N. Bonnet, P. Baldock, M. Ominsky, M. Stolina, P. Kostenuik und S. Ferrari, „Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL“, *J Biol Chem*, Bd. 285, pp. 28164-73, 2010.
- [18] M. Stearns und M. Wang, „Effects of alendronate and taxol on PC-3 ML cell bone metastases in SCID mice“, *Invasion Metastasis*, Bd. 16, pp. 116-31, 1996.
- [19] S. Schott, S. Vallet, R. Tower, S. Noor, S. Tiwari, C. Schem und C. Busch, „In vitro and in vivo toxicity of 5-FdU-alendronate, a novel cytotoxic bone-seeking duplex drug against bone metastasis“, *Invest New Drugs*, Bd. 33, pp. 816-26, 2015.
- [20] T. Yoneda, P. Williams, T. Hiraga, M. Niewolna und R. Nishimura, „A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro“, *J Bone Miner Res*, Bd. 16, 2001.

- [21] F. Nutter, I. Holen, H. Brown, S. Cross, C. Evans, M. Walker, R. Coleman, J. Westbrook, P. Selby, J. Brown und P. Ottewell, „Different molecular profiles are associated with breast cancer cell homing compared with colonisation of bone: evidence using a novel bone-seeking cell line“, *Endocr Relat Cancer*, Bd. 21, pp. 327-41, 2014.
- [22] M. Levine, V. Bramwell, K. Pritchard, B. Norris, L. Shepherd, H. Abu-Zahra, B. Findlay, D. Warr, D. Bowman, J. Myles, A. Arnold, T. Vandenberg, R. MacKenzie, J. Robert, J. Ottaway, M. Burnell, C. Williams und D. Tu, „Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer“, *J Clin Oncol*, Bd. 8, pp. 2651-8, 1998.
- [23] M. Malet-Martino, P. Jolimaitre und R. Martino, „The prodrugs of 5-fluorouracil“, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, Bd. 2, pp. 267-310, 2002.
- [24] D. Longley, D. Harkin und P. Johnston, „5-Fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 3, pp. 330-8, 2003.
- [25] J. van Laar, Y. Rustum, S. Ackland, C. van Groeningen und G. Peters, „Comparison of 5-fluoro-2'-deoxyuridine with 5-fluorouracil and their role in the treatment of colorectal cancer“, *Eur J Cancer*, Bd. 34, pp. 296-306, 1998.
- [26] Y. Uchikubo, T. Hasegawa, S. Mitani, H. Kim und Y. Wataya, „Mechanism of cell death induced by 5-fluoro-2'deoxyuridine (FUdR) – necrosis or apoptosis after treated with FUdR“, *Nucleid Acids Res Suppl*, pp. 245-6, 2002.
- [27] G. Weckbecker, „Biochemical pharmacology and analysis of fluoropyrimidines alone and in combination with modulators“, *Pharmacol Ther*, Bd. 50, pp. 367-424, 1991.
- [28] H. Schulze-Bergkamen und D. Jäger, „Interdisziplinarität bei der Behandlung von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen“, *Viszeralmedizin*, Bd. 28, pp. 43-9, 2012.
- [29] A. Stenzel, T. Fehm, L. Hofbauer und F. Jakob, „Therapie von osseären Metastasen“, in *Knochenmetastasen*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, pp. 71-80, 2014.
- [30] J. Ho, „Bisphosphonate stimulation of osteoblasts and osteoblastic metastasis as a mechanism of hypocalcaemia“, *Med Hypotheses*, Bd. 78, pp. 377-9, 2012.
- [31] K. Komatsu, A. Shimada, T. Shibata, S. Wada, H. Ideno, K. Nakashima, N. Amizuka, M. Noda und A. Nifuji, „Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model“, *J Endocrinol*, Bd. 219, pp. 145-58, 2013.

- [32] „Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study“, *Clin Orthop Relat Res*, Bd. 467, pp. 3121-8, 2009.
- [33] T. Hiraga, P. Williams, G. Mundy und T. Yoneda, „The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases“, *Cancer Res*, Bd. 61, pp. 4418-24, 2001.
- [34] S. Senaratne, G. Pirianov, J. Mansi, T. Arnett und K. Colston, „Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines“, *Br J Cancer*, Bd. 82, pp. 1459-68, 2000.
- [35] T. Michigami, T. Hiraga, P. Williams, M. Niewolna, R. Nishimura, G. Mundy und T. Yoneda, „The effect of the bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs“, *Breast Cancer Res Treat*, Bd. 75, pp. 249-58, 2002.
- [36] J. Green, „Bisphosphonates: preclinical review“, *Oncologist*, Bd. 9, pp. 3-13, 2004.
- [37] L. Knight, M. Conroy, A. Fernando, M. Polak, C. Kurbacher und I. Cree, „Pilot studies of the effect of zoledronic acid (Zometa) on tumor-derived cells ex vivo in the ATP-based tumor chemosensitivity assay“, *Anticancer Drugs*, Bd. 16, pp. 969-76, 2005.
- [38] H. Liu, G. Chen, A. Vlantis, B. Leung, M. Tong und C. van Hasselt, „5-fluorouracil mediates apoptosis and G1/S arrest in laryngeal squamous cell carcinoma via a p53-independent pathway“, *Cancer J*, Bd. 12, pp. 482-93, 2006.
- [39] H. Liu, G. Chen, A. Vlantis, M. Tong, P. Chan und C. van Hasselt, „Induction of cell cycle arrest and apoptosis by 5-fluorouracil in laryngeal cancer cells containing HPV16 E6 and E7 oncoproteins“, *Clin Biochem*, Bd. 41, pp. 1117-25, 2008.
- [40] H. Hang und M. Fox, „Analysis of the mammalian cell cycle by flow cytometry“, *Methods Mol Biol*, Bd. 241, pp. 23-35, 2004.
- [41] O. Ammerpohl, S. Tiwari und H. Kalthoff, „Target gene discovery for novel therapeutic agents in cancer treatment“, *Methods Mol Biol*, Bd. 576, pp. 427-45, 2010.
- [42] M. Berridge und A. Tan, „Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction“, *Arch Biochem Biophys*, Bd. 303, pp. 474-82, 1993.
- [43] T. Mosmann, „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays“, *J Immunol Methods*, Bd. 65, pp. 55-63, 1983.

- [44] G. Oddie, G. Schenk, N. Angel, N. Walsh, L. Guddat, J. de Jersey, A. Cassady, S. Hamilton und D. Hume, „Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase“, *Bone*, Bd. 27, pp. 575-84, 2000.
- [45] M. Newa, K. Bhandari, L. Tang, R. Kalvapalle, M. Suresh und M. Doschak, „Antibody-mediated "universal" osteoclast targeting platform using calcitonin as a model drug“, *Pharm Res*, Bd. 5, pp. 1131-43, 2011.
- [46] J. Halleen, S. Alatalo, H. Suominen, S. Cheng, A. Janckila und H. Väänänen, „Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption“, *J Bone Miner Res*, Bd. 15, pp. 1337-45, 2000.
- [47] J. Halleen, „Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption“, *Anticancer Res*, Bd. 23, pp. 1027-9, 2003.
- [48] P. Chu, T. Chao, Y. Lin, A. Janckila und L. Yam, „Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis“, *Am J Kidney Dis*, Bd. 41, pp. 1052-9, 2003.
- [49] F. Oury, G. Sumara, O. Sumara, M. Ferron, H. Chang, C. Smith, L. Hermo, S. Suarez, B. Roth, P. Ducy und G. Karsenty, „Endocrine regulation of male fertility by the skeleton“, *Cell*, Bd. 144, pp. 796-809, 2011.
- [50] M. Ferron, E. Hinoi, G. Karsenty und P. Ducy, „Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 105, pp. 5266-70, 2008.
- [51] N. Bivi, M. Romanello, R. Harrison, I. Clarke, D. Hoyle, L. Moro, F. Ortolani, A. Bonetti, F. Quadrifoglio, G. Tell und D. Delneri, „Identification of secondary targets of N-containing bisphosphonates in mammalian cells via parallel competition analysis of the barcoded yeast deletion collection“, *Genome Biol*, Bd. 10, p. 93, 2009.
- [52] P. Clézardin, P. Fournier, S. Boissier und O. Peyruchaud, „In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates“, *Curr Med Chem*, Bd. 10, pp. 173-80, 2003.
- [53] R. Petty, L. Sutherland, E. Hunter und I. Cree, „Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number“, *J Biolumin Chemilumin*, Bd. 10, pp. 29-34, 1995.
- [54] E. Ulukaya, F. Ozdikicioglu, A. Oral und M. Demirci, „The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested“, *Toxicol In Vitro*, Bd. 22, pp. 232-9, 2008.



- [55] S. Schott, S. Tiwari, R. Tower, A. Rambow, P. Kneissl, O. Will, G. Trompke, A. Trauzold, F. Roesel, C. Sohn, W. Jonat, C. Glüer und C. Schem, „Antimetabolite-bisphosphonate duplex drug and cytostatic targeting of tumor in a murine breast cancer bone metastases model“, *ASCO Annual Meeting 2014 (Abstract Number: 131721)*, *J Clin Oncol*, Bd. 32, 2014.
- [56] Y. Zhang, J. Bressler, J. Neal, B. Lal, H. Bhang, J. Laterra und M. Pomper, „ABCG2/BCRP expression modulates D-Luciferin based bioluminescence imaging“, *Cancer Res*, Bd. 67, pp. 9389-97, 2007.
- [57] F. Pérez-Zúñiga, M. Günther Sillero und S. A., „Bisphosphonates activate the 5-fluorouracil/uracil phosphoribosyltransferase activity present in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts: implications for tumor treatments“, *Biochem Pharmacol*, Bd. 76, pp. 825-30, 2008.
- [58] H. Smith, „Painful osseous metastases“, *Pain Physician*, Bd. 14, pp. 373-403, 2011.
- [59] K. Weinfurt, Y. Li, L. Castel, F. Saad, J. Timbie, G. Glendenning und K. Schulman, „The significance of skeletal-related events for the health-related quality of life of patients with metastatic prostate cancer“, *Ann Oncol*, Bd. 16, pp. 579-84, 2005.
- [60] C. Cleeland, D. Patrick, L. Fallowfield, M. Clemons, A. Lipton, N. Masuda, Y. Qian, A. Braun und K. Chung, „Comparing the effects of Denosumab and zoledronic acid on pain interference with daily functioning in a randomized phase 3 trial of patients with breast cancer and bone metastases“, *The 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (Abstrakt: P1-13-01)*, *Cancer Res*, Bd. 70, 2010.
- [61] A. Stopeck, A. Lipton, J. Body, G. Steger, K. Tonkin, R. de Boer, M. Lichinitser, Y. Fujiwara, D. Yardley, M. Viniegra, M. Fan, Q. Jiang, R. Dansey, S. Jun und A. Braun, „Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study“, *J Clin Oncol*, Bd. 28, pp. 5132-9, 2010.
- [62] K. Fizazi, M. Carducci, M. Smith, R. Damião, J. Brown, L. Karsh, P. Milecki, N. Shore, M. Rader, H. Wang, Q. Jiang, S. Tadros, R. Dansey und C. Goessl, „Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study“, *Lancet*, Bd. 377, pp. 813-22, 2011.
- [63] Kommission Mamma (vertreten durch: A. Scharl), „Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs - Empfehlungen 2015“, *AGO e.V.*, pp. 406, unter: [http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2015/de/2015D\\_Alle\\_aktuellen\\_Empfehlungen.pdf](http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2015/de/2015D_Alle_aktuellen_Empfehlungen.pdf) (abgerufen am 02.02.2016).

- [64] F. Ansfield und A. Curreri, „Further clinical comparison between 5-fluorouracil (5-FU) and 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5-FUDR)“, *Cancer Chemother Rep*, Bd. 32, pp. 101-5, 1963.
- [65] R. Bartkowski, M. Berger, J. Aguiar, T. Henne, J. Dörsam, G. Geelhaar, P. Schlag und C. Herfarth, „Experiments on the efficacy and toxicity of locoregional chemotherapy of liver tumors with 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) and 5-fluorouracil (5-FU) in an animal model“, *J Cancer Res Clin Oncol*, Bd. 111, pp. 42-6, 1986.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-FdU: 2'-Desoxy-5-Fluoruridin	Co.: Compagnie, Kompanie
5-FdU-ale: 2'-Desoxy-5-Fluoruridin- Alendronat	CO <sub>2</sub> : Kohlenstoffdioxid
5-FdUMP: 5-FdU-Monophosphat	Corp.: Corporation, Körperschaft
5-FU: 5-Fluoruracil	CT: Computertomograph(ie)
5-FUMP: 5-Fluoruridinmonophosphat	D: Deutschland
Abb.: Abbildung	DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft
ABCG2: ATP-binding cassette sub-family G member 2	d.h.: das heißt
abs.: absolut	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Aqua dest.: Aqua destillata, destilliertes Wasser	DNA: Desoxyribonukleinsäure
ad libitum: zur freien Verfügung	dTMP: Desoxythymidinmonophosphat
ATP: Adenosintriophosphat	EDTA: Ethylendiamintetraacetat
BCRP: breast cancer resistance protein	EIA: Enzymimmunoassay
Bd.: Band	ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
BD: Becton Dickinson	et al.: et alii/aliae/alia, und andere
BSP: Bisphosphonat	FACS: fluorescence-activated cell sorting, Fluss-Sortierer
BV/TV: bone volume/total volume, Knochenvolumen/Gesamtvolumen	FEC: 5-FU, Epirubicin, Cyclophosphamid
bzw.: beziehungsweise	g: Gramm / Erdbeschleunigung
C: Kohlenstoff	G-Phase: gap phase, Lücken-Phase
ca.: circa	ggf.: gegebenenfalls
Ca <sup>2+</sup> : Calcium	GmbH: Gesellschaft mit beschränkter Haftung
CH: Schweiz	

---

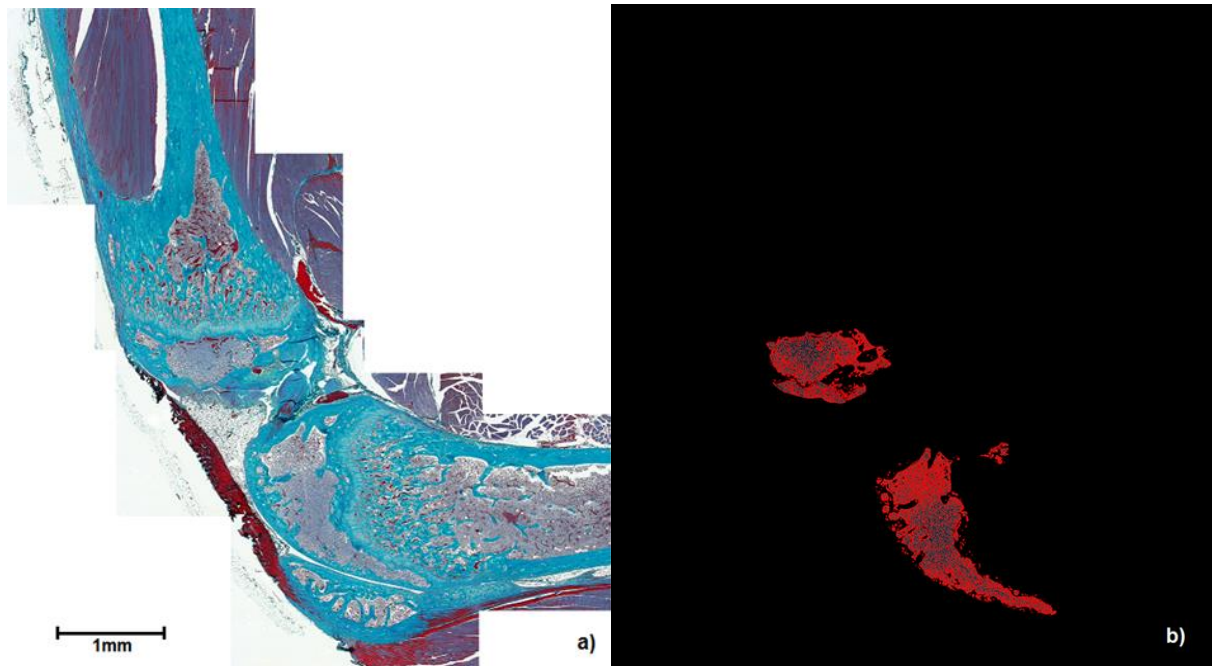
GmbH & Co. KG: Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft	mm <sup>3</sup> : Kubikmillimeter mM: Millimolar M-Phase: Mitose-Phase MRT: Magnetresonanztomograph(ie) MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazoliumbromid
h: hora, Stunde	n: Stichprobe / Chromosomenanzahl
HCl: Chlorwasserstoff	N: Stickstoff
HE-Färbung: Eisen-Hämatoxylin-Färbung	ns: nicht signifikant
H <sub>2</sub> O: Wasser	NADH: Nikotinamidadenindinukleotid NADPH: Nicotinamidadenindinukleotid- phosphat
HWZ: Halbwertszeit	ng: Nanogramm
IC <sub>50</sub> : mittlere inhibitorische Konzentration	nm: Nanometer
IL-11: Interleukin-11	nmol: Nanomol
Inc.: Incorporation	NaOH: Natronlauge
in vitro: im Glas	NL: Niederlande
in vivo: im Lebendigen	o.g.: oben genannt/e/es
i.p.: intraperitoneal	OT: Objektträger
i.v.: intravenös	p./pp.: pagina/e, Seite/n
KG: Körpergewicht	P: Phosphor
kg: Kilogramm	PBS: Phosphate buffered saline
Kontr.: Kontrollgruppe	PC: Personal Computer
log: Logarithmus	PGE 2: Prostaglandin E2
Lsg.: Lösung	PhD: Doctor of Philosophy, anglo-amerikanischer Doktorgrad
Ltd.: Limited Company	PI: Propidiumjodid
M: molar	post injectionem: nach der Injektion
Max.: Maximum	PTH-rP: Parathormon-related Protein
mg: Milligramm	
min: Minute	
Min.: Minimum	
ml: Milliliter	
mm: Millimeter	
mm <sup>2</sup> : Quadratmillimeter	

---

p-Wert: probability value, Wahrscheinlichkeitswert	UKSH: Uniklinikum Schleswig-Holstein
RANK: Receptor Activator of NF- $\kappa$ B	U/l: units/liter, Einheiten/Liter
RANKL: Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand	UMP: Uridinmonophosphat
RKI: Robert-Koch-Institut	USA: United States of America
RNA: Ribonukleinsäure	VDE: Verband der Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik
ROI: region of interest	vs.: versus, im Vergleich zu
rpm: rounds per minute, Runden/Minute	z.B.: zum Beispiel
RPMI: Roswell Park Memorial Institute	$\mu$ CT: Mikro-Computertomograph(ie)
s.c.: subcutaneous, subkutan	$\mu$ g: Mikrogramm
s.: siehe	$\mu$ l: Mikroliter
SD: standard deviation, Standardabweichung	$\mu$ m: Mikrometer
SEM: standard error of the mean, Standardfehler	$\mu$ M: Mikromolar
s.o.: siehe oben	®: registered Trade Mark
S-Phase: Synthese-Phase	™: unregistered Trade Mark
Tab.: Tabelle	*: statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )
TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta, Transformierender Wachstumsfaktor beta	** : statistisch sehr signifikant ( $p < 0,01$ )
t-Test: Hypothesentest	***: statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ )
TRAP: Tartrat-resistente saure Phosphatase	****: statistisch höchst signifikant ( $p < 0,0001$ )
	°C: Grad Celsius
	#: Artikel-/Bestellnummer

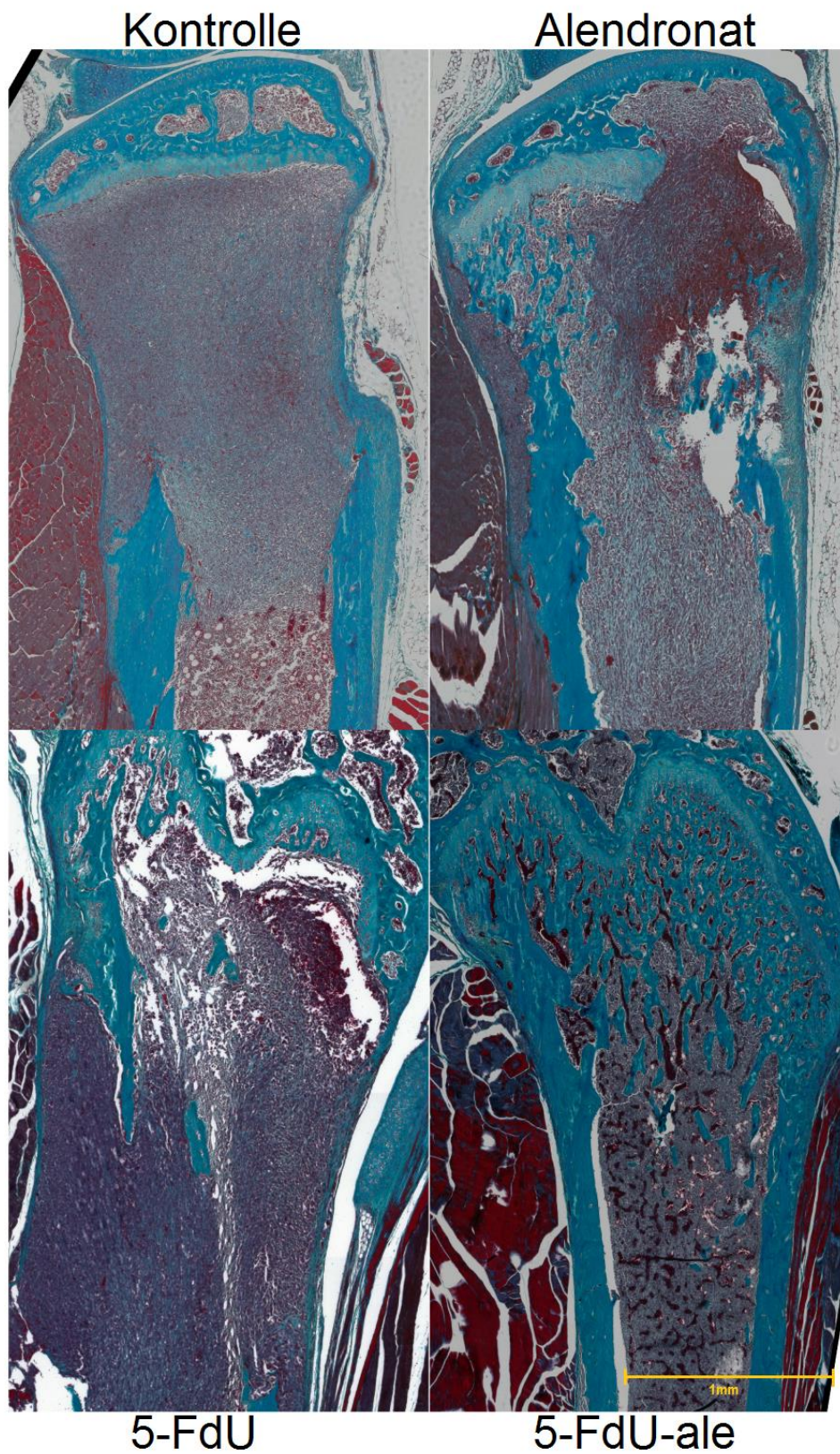
## 7.2 Histologische Abbildungen

### 7.2.1 Darstellung der Tumorareale mittels ImageJ-Software



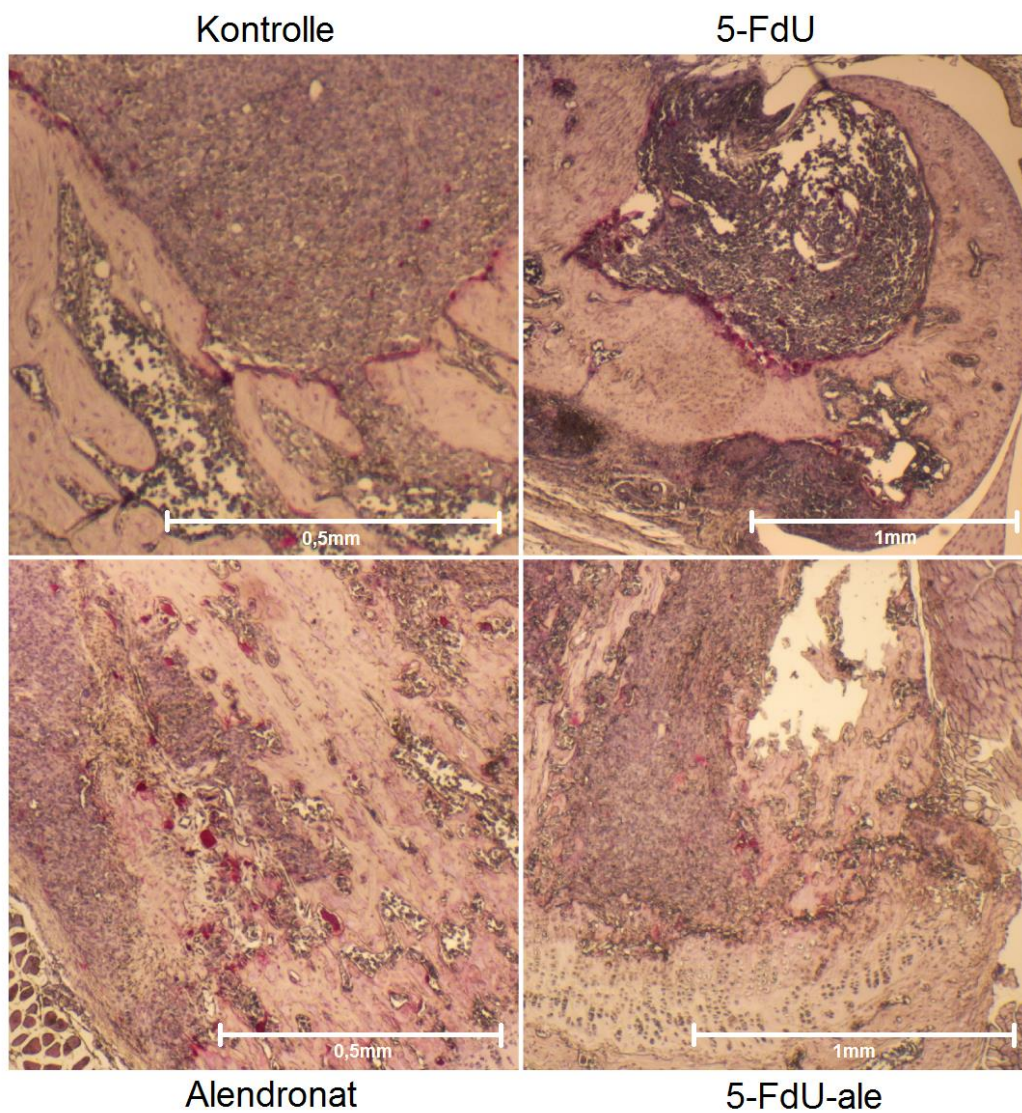
**Abb. I:** Repräsentativer histologischer Schnitt durch die Knieregion eines Versuchstieres aus der 5-FdU-ale-Versuchsgruppe. **a)** Mittels MosaicJ zusammengefügtes Bild der Knieregion, Masson-Goldner-Trichrom gefärbt; im oberen Bildabschnitt Tibia und Fibula, im unteren Femur mit angeschnittener Patella. **b)** Darstellung der Tumorareale nach Bearbeitung des histologischen Bildes mittels ImageJ-Software.

## 7.2.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung



**Abb. II:** Darstellung Masson-Goldner-Trichrom gefärbter Knieregionen der einzelnen Versuchsgruppen mit repräsentativen Tumoranteilen; Knochen erscheint homogen blau, Tumorgewebe erscheint inhomogen violett. In den Ausschnitten der 5-FdU- sowie Alendronat-Gruppe zeigen sich Tumorzellnekrosen.

## 7.2.3 TRAP-Färbung



**Abb. III:** Repräsentative TRAP-gefärbte Knieregionen der einzelnen Versuchsgruppen; Osteoklasten erscheinen rot.



## 7.3 Ergebnistabellen

### 7.3.1 Vorwort

In den folgenden Tabellen werden die gleichen Abkürzungen zur Darstellung der statistischen Signifikanzen verwendet wie sie in Abschnitt 3.1 erläutert werden. Nicht signifikant unterschiedliche Ergebnisse sind mit der Abkürzung „ns“ gekennzeichnet.

### 7.3.2 Ergebnistabellen Zellzyklusanalyse

	Mittelwert $\pm$ SD (%)			
	<i>Sub-G0/G1</i>	<i>G1</i>	<i>S</i>	<i>G2/M</i>
Kontrolle	6,038 $\pm$ 1,447	49,15 $\pm$ 0,1743	21,41 $\pm$ 0,5746	23,40 $\pm$ 0,8275
5-FdU	10,75 $\pm$ 0,3915	34,53 $\pm$ 3,853	42,25 $\pm$ 2,894	12,47 $\pm$ 1,055
Alendronat	6,475 $\pm$ 0,9215	49,80 $\pm$ 1,163	20,41 $\pm$ 0,3028	23,32 $\pm$ 1,886
5-FdU-ale	12,88 $\pm$ 2,044	15,51 $\pm$ 0,3330	41,32 $\pm$ 5,234	30,29 $\pm$ 3,321

**Tab. 1:** Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der im dreifachen Ansatz angefertigten durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse mit Angabe der prozentualen Anteile der Versuchsgruppen an den Phasen des Zellzyklus.

<i>Sub-G0/G1</i>	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		ns (0,088)	ns (0,8153)	ns (0,0717)
5-FdU	ns (0,088)		ns (0,0507)	ns (0,4130)
Alendronat	ns (0,8153)	ns (0,0507)		ns (0,1037)
5-FdU-ale	ns (0,0717)	ns (0,4130)	ns (0,1037)	

<i>G1</i>	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		ns (0,0631)	ns (0,6376)	****(< 0,0001)
5-FdU	ns (0,0631)		ns (0,0630)	* (0,0390)
Alendronat	ns (0,6376)	ns (0,0630)		** (0,0012)
5-FdU-ale	****(< 0,0001)	* (0,0390)	** (0,0012)	

<i>S</i>	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		* (0,0195)	ns (0,2201)	ns (0,0634)
5-FdU	* (0,0195)		* (0,0173)	ns (0,8859)
Alendronat	ns (0,2201)	* (0,0173)		ns (0,0575)
5-FdU-ale	ns (0,0634)	ns (0,8859)	ns (0,0575)	

<i>G2/M</i>	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		** (0,0039)	ns (0,9725)	ns (0,1819)
5-FdU	** (0,0039)		* (0,0152)	* (0,0362)
Alendronat	ns (0,9725)	* (0,0152)		ns (0,1657)
5-FdU-ale	ns (0,1819)	* (0,0362)	ns (0,1657)	

**Tab. 2:** Nach Zellzyklusphasen gegliederte Tab. mit Angabe der p-Werte zu den Daten aus Tab. 1.

7.3.3 Ergebnistabellen MTT-Test (IC<sub>50</sub>)

	IC <sub>50</sub> (µM)	log IC <sub>50</sub>
5-FdU	41,05	1,613
Alendronat	1519	3,181
5-FdU-ale	169,3	2,229

**Tab. 3:** Anhand des MTT-Tests bestimmte IC<sub>50</sub>-Werte (µM) sowie log IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Medikamente.

<i>p</i> -Werte	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
5-FdU		**** (< 0,0001)	ns (0,0577)
Alendronat	**** (< 0,0001)		* (0,0437)
5-FdU-ale	ns (0,0577)	* (0,0437)	

**Tab. 4:** Tab. mit den *p*-Werten der anhand des MTT-Tests ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte aus Tab. 3.

## 7.3.4 Ergebnistabellen Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

	n	Mittelwert ± SD (mm <sup>2</sup> )
Kontrolle	14	0,7687 ± 0,1211
5-FdU	19	1,197 ± 0,1267
Alendronat	10	1,051 ± 0,1395
5-FdU-ale	9	0,2046 ± 0,03305

**Tab. 5:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der histologisch aufgearbeiteten und Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Knieregionen ermittelten zweidimensionalen Tumorausdehnungen (mm<sup>2</sup>).

<i>p</i> -Werte	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		* (0,0207)	ns (0,1437)	*** (0,0005)
5-FdU	* (0,0207)		ns (0,4459)	**** (< 0,0001)
Alendronat	ns (0,1437)	ns (0,4459)		*** (0,0002)
5-FdU-ale	*** (0,0005)	**** (< 0,0001)	*** (0,0002)	

**Tab. 6:** Tab. mit den *p*-Werten zu den Daten der Tumorflächenberechnung aus Tab. 5.

### 7.3.5 Ergebnistabellen TRAP-Färbung

	n	Mittelwert $\pm$ SD (Osteoklasten/mm Knochenoberfläche)
Kontrolle	9	15,02 $\pm$ 2,393
5-FdU	12	15,71 $\pm$ 2,156
Alendronat	7	11,21 $\pm$ 1,896
5-FdU-ale	6	5,408 $\pm$ 0,7516

**Tab. 7:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand der TRAP-Färbung ermittelten Osteoklastenzahlen pro mm Knochenoberfläche der einzelnen Versuchsgruppen.

<i>p</i> -Werte	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		ns (0,8314)	ns (0,2347)	** (0,004)
5-FdU	ns (0,8314)		ns (0,1365)	*** (0,0006)
Alendronat	ns (0,2347)	ns (0,1365)		* (0,0248)
5-FdU-ale	** (0,004)	*** (0,0006)	* (0,0248)	

**Tab. 8:** Tab. mit den *p*-Werten zu den Daten der TRAP-Färbung aus Tab. 7.

### 7.3.6 Ergebnistabellen TRAP-ELISA

	n	Mittelwert $\pm$ SD (U/l)
Kontrolle	8	5,414 $\pm$ 2,061
5-FdU	12	6,148 $\pm$ 0,9724
Alendronat	12	3,151 $\pm$ 0,8120
5-FdU-ale	8	2,541 $\pm$ 1,562

**Tab. 9:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand des TRAP-ELISAs ermittelten TRAP-Konzentrationen (U/l) in den Seren der Versuchstiere der einzelnen Gruppen.

<i>p</i> -Werte	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		ns (0,7541)	ns (0,3336)	ns (0,2868)
5-FdU	ns (0,7541)		* (0,0277)	ns (0,0736)
Alendronat	ns (0,3336)	* (0,0277)		ns (0,7363)
5-FdU-ale	ns (0,2868)	ns (0,0736)	ns (0,7363)	

**Tab. 10:** Tab. mit den *p*-Werten zu den Daten des TRAP-ELISAs aus Tab. 9.

### 7.3.7 Ergebnistabellen Osteocalcin-ELISA

	n	Mittelwert $\pm$ SD (ng/ml)
Kontrolle	8	261,6 $\pm$ 44,80
5-FdU	12	48,82 $\pm$ 11,86
Alendronat	12	45,90 $\pm$ 8,496
5-FdU-ale	8	220,1 $\pm$ 47,05

**Tab. 11:** Stichprobengrößen (n), Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der anhand des Osteocalcin-ELISAs ermittelten Osteocalcin-Konzentrationen (ng/ml) in den Seren der Versuchstiere der einzelnen Gruppen.

<i>p</i> -Werte	Kontrolle	5-FdU	Alendronat	5-FdU-ale
Kontrolle		** (0,0025)	** (0,0021)	ns (0,5336)
5-FdU	** (0,0025)		ns (0,8435)	** (0,0096)
Alendronat	** (0,0021)	ns (0,8435)		** (0,0083)
5-FdU-ale	ns (0,5336)	** (0,0096)	** (0,0083)	

**Tab. 12:** Tab. mit den p-Werte zu den Daten des Osteocalcin-ELISAs aus Tab. 11.

## 7.4 Genehmigung des Tierschutzantrags

EINGEGANGEN

01. AUG. 2012

Ministerium für Energiewende,  
Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein

# 614

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrag vom: 30.04.2012

Herrn  
PD Dr. Christian Schem  
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Michaelisstr. 16  
24105 Kiel

Mein Zeichen: V 312-7224.121-10 (76-5/12)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042nachrichtlich:Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

30. Juli 2012

**Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Sehr geehrter Herr Dr. Schem,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom  
18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl.  
I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des VersuchsvorhabensPräklinische Evaluation des neuen Antimetabolit-Bisphosphonat-Konjugats  
-5-FdU-Alendronat- im kliniknahen Mausmodell für das metastasierte Mammakarzinom

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 5 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Juli 2015 befristet.  
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert  
werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen  
eingetreten sind.

- 2 -

3. Leiter des Versuchsvorhabens:  
Herr PD Dr. Christian Schem
4. Sein Stellvertreter:  
Herr Sanjay Tiwari, PhD
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:  
Herr Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:  
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf den Teil I des Vorhabens (Pilotversuch). Danach ist ein Zwischenbericht vorzulegen.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

**Rechtsbehelfsbelehrung**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Sekulla

Eingegangen

19. März 2013

Ministerium für Energiewende,  
Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-HolsteinMinisterium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Anträge vom: 01. und 15.02.2013

Herrn  
PD Dr. Christian Schem  
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Arnold\_Heller-Str. 3, Haus 24  
24105 Kiel

Mein Zeichen: V 312-7224.121-10 (76-5/12)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042nachrichtlich:Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

15. März 2013

**Durchführung eines Tierversuchsvorhabens**

Sehr geehrter Herr Dr. Schem,

gegen die Änderung der Versuchsplanung bezüglich der zusätzlichen Evaluation einer tolerablen Dosierung im Rahmen des genehmigten Tierversuchsvorhabens „Präklinische Evaluation des neuen Antimetabolit-Bisphosphonat-Konjugats -5-FdU-Alendronat- im klinikenahen Mausmodell für das metastasierte Mammakarzinom“ erhebe ich keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Sekulla

#614

Ministerium für Energiewende,  
Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrage vom: 10.04.2013

Herrn  
PD Dr. Christian Schem  
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Arnold\_Heller-Str. 3, Haus 24  
24105 Kiel

Mein Zeichen: V 312-7224.121-10 (76-5/12)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:  
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

EINGEGANGEN

07. MAI 2013


3. Mai 2013

#### Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Dr. Schem,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 30. Juli 2012 für das Versuchsvorhaben „Präklinische Evaluation des neuen Antimetabolit-Bisphosphonat-Konjugats -5-FdU-Alendronat- im kliniknahen Mausmodell für das metastasierte Mammakarzinom“ weitere 50 Mäuse verwendet werden.

Mit freundlichen Grüßen

  
Buttchereit



## 7.5 Teilnahmebestätigung des Seminars „Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung“

Wissenschaftliche Weiterbildung  
**Teilnahmebestätigung**  
Fortbildung Hochschulpersonal

**Anna-Christina Rambow**

hat an dem Seminar Nr. **A122061**

### **Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung - Einführung -**

- Einführung
- Ziele und Inhalte
- Relevante Gesetze (TierSchG, AVV)
- Versuchsplanung und Biometrie, Genetik und Zucht
- Hygiene und Infektionskrankheiten
- Praktische Übungen
- Handling von Versuchsnagern
- Tötungsverfahren

am 31.10. und 01.11.  
jeweils von 08:00 bis 18:00 Uhr  
teilgenommen.

Kiel, den 01.11.2012

  
Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Dozent

## 7.6 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Christian Schem für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Tipps sowie konstruktive Kritik während der Versuchsplanung und beim Abfassen dieser Arbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. Sanjay Tiwari und M. Sc. Rob Tower für Ihre Betreuung während der gesamten Dauer des Projektes.

Bei PD Dr. Sarah Schott des Universitätsklinikums Heidelberg bedanke ich mich für die Bereitstellung des neuen Medikaments 5-FdU-ale.

Außerdem danke ich Gabriele Trompke für die Aufarbeitung der Mäuseknochen und Anfertigung der histologischen Schnitte sowie die Einführung in die histologischen Färbetechniken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Sigrid Hamann und Frank Rösel aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH Campus Kiel für Ihre Unterstützung bei der Anfertigung der TRAP-Färbung und der *In-Vitro*-Zellkultur-Versuche.

Für die Einführung in die ImageJ-Software sowie die Bereitstellung seines eigens entwickelten Plugins ColorTypeSeparator danke ich herzlich Dr. rer. nat. Arndt Rohwedder.

Abschließend möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projektes bei der Forschergruppe 1586 SKELMET der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Forschungsförderungsprogramm des Landes Schleswig-Holstein sowie der Europäischen Union durch den European Regional Development Fund (ERDF; MOIN CC, Zukunftsprogramm Wirtschaft) bedanken.

## 7.7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Anna-Christina Rambow  
Geburtsdatum: 06. März 1991 in Stade  
Anschrift: Bergstraße 24, 24103 Kiel  
E-Mail: anna-chr.rambow@arcor.de

### Schulbildung

08/1997 - 07/2001 Grundschule Assel  
08/2001 - 07/2003 Orientierungsstufe der Elbmarschenschule Drochtersen  
08/2003 - 07/2007 Gymnasialzweig der Elbmarschenschule Drochtersen  
08/2007 - 06/2010 Vincent-Lübeck-Gymnasium Stade, Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium

08/2010 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
08/2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2012 - 02/2016 Erstellen der vorliegenden Dissertation an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel  
10/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Zulassung zum Praktischen Jahr  
11/2015 – 03/2016 Erstes Tertial des Praktischen Jahres an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel

## 7.8 Veröffentlichungen und Preise

P. Kneissl, A.C. Rambow, S. Tiwari, C.C. Glüer, H. Halthoff, S. Schott, C. Schem, „Präklinische Evaluation des neuen Antimetabolit-Bisphosphonat-Konjugats – 5-FdU-Alendronat – im klinischen Mausmodell für das metastasierte Mammakarzinom“, *Vortrag TraFo Symposium der AGO Bergisch Gladbach*, 2013.

S. Tiwari, R.J. Tower, S. Schott, P. Kneissl, A.C. Rambow, C.C. Glüer, W. Jonat, C. Schem, „Preclinical evaluation of a covalently linked antimetabolite (5-FdU) with alendronate in a breast cancer bone metastasis mouse model“, *Vortrag Osteologie-Kongress München*, 2014.

S. Schott, S. Tiwari, R. Tower, A.C. Rambow, P. Kneissl, O. Will, G. Trompke, A. Trauzold, F. Roesel, C. Sohn, W. Jonat, C.C. Glüer, C. Schem, „Antimetabolite-bisphosphonate duplex drug and cytostatic targeting of tumor in a murine breast cancer bone metastases model“, *ASCO Annual Meeting 2014 (Abstrakt: 131721)*, *J Clin Oncol*, Bd. 32, 2014.

C. Schem, R. Tower, P. Kneissl, A.C. Rambow, G. Campbell, T. Heilmann, W. Jonat, C.C. Glüer, C. Sohn, S. Schott, S. Tiwari, „Evaluation of the covalently linked antimetabolite 5-FdU with alendronate in a preclinical breast cancer bone metastases mouse model“, *60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2014 (Poster: PO\_Onko01\_13)*, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, Bd. 74, 2014.

Ehrung der Arbeitsgruppe für die Erkenntnisse zum Antimetabolit-Bisphosphonat-Konjugat 5-FdU-ale mit dem 2. Wissenschaftspreis der Deutschen Gesellschaft für Senologie e.V., *34. Jahrestagung der DGS in Berlin*, 2014.

C. Schem, R.J. Tower, P. Kneissl, A.C. Rambow, G.M. Campbell, T. Heilmann, A. Trauzold, W. Jonat, C.C. Glüer, S. Schott, S. Tiwari, „Inhibition of osteolytic tumor growth by 5-FdU-alendronate, a bisphosphonate conjugate that maintains bone formation: Implications for treatment of osteolytic bone lesions“, *San Antonio Breast Cancer Symposium 2014 (Abstrakt: 386/ P6-17-02)*, *Cancer Res*, Bd. 75, 2015.