

Charakterisierung von  
 $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat  
als potentieller Tracer  
für die Positronen-Emissions-Tomographie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt  
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von  
Diplom-Biologin Heike Rodig  
geboren am 27.05.75 in Annaberg-Buchholz

Gutachter: Prof. Dr. Johannsen  
Prof. Dr. Vollmer  
Dr. Brust

Eingereicht am: 25.01.2002

Tag der Verteidigung: 08.05.2002

# Inhaltsverzeichnis

## ALLGEMEINER TEIL

<b>1</b>	<b>Problemstellung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	3
2.1	Entstehung von Brustkrebs.....	3
2.2	Physiologische Bedeutung der Estronsulfatase im Säuger-Organismus.....	4
2.3	Nuklearmedizinische Diagnoseverfahren.....	7
2.4	Therapie von Brustkrebs.....	8
2.5	Bewertung eines Radiotracers.....	10

## EXPERIMENTELLER TEIL

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	12
3.1	Geräte.....	12
3.2	Material.....	13
3.1.1	Plastikmaterial.....	13
3.1.2	Zellkulturmaterial.....	13
3.1.3	Tiere, Zellen und Enzyme .....	14
3.1.4	Radioaktiv markierte Substanzen.....	14
3.1.5	Substanzen für Molekularbiologie .....	15
3.1.6	Biochemikalien.....	15
3.1.7	Enzym-Inhibitoren .....	15
3.1.8	Sonstige Chemikalien.....	16
3.1.9	Selbst hergestellte Lösungen und Nährmedien .....	16
3.3	Methoden.....	18
3.3.1	Allgemeine Bedingungen für die Zellzucht .....	18
3.3.2	Biochemische Methoden .....	19
3.3.2.1	Bestimmung des Proteingehaltes .....	19
3.3.2.2	Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität .....	20
3.3.2.3	Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität .....	21

3.3.3	Molekularbiologische Methoden.....	23
3.3.3.1	Isolierung der mRNA von Zellen .....	23
3.3.3.2	Isolierung von Ratten-mRNA .....	25
3.3.3.3	RT-PCR.....	25
3.3.3.4	Elektrophorese .....	27
3.3.4	Autoradiographie.....	27
3.3.5	Messung der Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]FESDS in Zellen.....	30
3.3.6	Tierversuche .....	31
3.3.6.1	Tumortransplantation .....	31
3.3.6.2	<i>In-vivo</i> -Tracerverteilung .....	31
3.3.6.3	Bindung von [ <sup>18</sup> F]FESDS in Erythrocyten .....	32
3.3.6.4	Positronen-Emissions-Tomographie.....	33
3.3.6.5	Metaboliten-Analytik von [ <sup>18</sup> F]FESDS .....	33
3.3.7	Statistik.....	34

## HAUPTTEIL

<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
4.1	FESDS - ein Inhibitor der Estronsulfatase.....	35
4.1.1	Expression der Estronsulfatase in verschiedenen Organen der Ratte .....	35
4.1.2	Expression der Estronsulfatase in humanen Tumorzellen .....	36
4.1.3	Messung der Estronsulfatase in Gewebs- und Zellhomogenaten.....	37
4.1.4	Hemmung der Estronsulfatase durch FESDS und andere Substanzen .....	39
4.1.5	Aufnahme und Bindung von [ <sup>18</sup> F]FESDS an Tumorzellen und Gewebe- schnitten .....	41
4.2	FESDS - ein Inhibitor der Carboanhydrase.....	44
4.2.1	Expression der Carboanhydrase in verschiedenen Organen der Ratte.....	44
4.2.2	Expression der Carboanhydrase in humanen Tumorzellen.....	45
4.2.3	Messung der Esterase-Aktivität von Carboanhydrase I und II .....	46
4.3	<sup>18</sup> F-markiertes FESDS als Radiotracer.....	47
4.3.1	Die Carboanhydrase - ein Target von [ <sup>18</sup> F]FESDS .....	47
4.3.2	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen mit [ <sup>18</sup> F]FESDS humanen Tumorzellen .....	50
4.3.3	<i>In-vitro</i> -Autoradiographie mit [ <sup>18</sup> F]FESDS am Ratten- und Schweinehirn.....	53

4.3.4	<i>In-vitro</i> -Autoradiographie mit [ <sup>18</sup> F]FESDS an verschiedenen Organen der Ratte .....	55
4.3.5	<i>In-vitro</i> -Autoradiographie mit [ <sup>18</sup> F]FESDS am MCF-7-Tumor .....	56
4.3.6	Untersuchung der Verteilung von [ <sup>18</sup> F]FESDS nach intravenöser Injektion der Ratte.....	56
4.3.7	Untersuchung der Verteilung von [ <sup>18</sup> F]FESDS in tumortragenden Nacktmäusen nach intravenöser Injektion .....	61
4.3.8	<i>Ex-vivo</i> -Autoradiographie nach intravenöser Injektion von [ <sup>18</sup> F]FESDS.....	63
4.3.9	Positronen-Emissions-Tomographie an der Ratte und am Schwein .....	66
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	69
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
5.1	Vorkommen der Estronsulfatase.....	72
5.1.1	Vorkommen der Estronsulfatase in verschiedenen Organen und Tumorzellen...	72
5.1.2	Vorkommen der Estronsulfatase im Hirn.....	77
5.2	FESDS - ein Inhibitor der Estronsulfatase.....	80
5.3	[ <sup>18</sup> F]FESDS – ein Radiotracer zur Darstellung der Estronsulfatase.....	85
5.4	Die Carboanhydrase - ein zusätzliches diagnostisches Target.....	88
5.4.1	Physiologische Bedeutung der Carboanhydrase .....	89
5.4.2	Expression der Carboanhydrase .....	92
5.4.3	FESDS - ein Inhibitor der CA.....	93
5.4.4	[ <sup>18</sup> F]FESDS - ein Radiotracer zur Darstellung der Carboanhydrase.....	96
5.5	Selektive Darstellung der Estronsulfatase durch Hemmung der Carboanhydrase.....	99
5.5.1	<i>In-vitro</i> -Experimente.....	99
5.5.2	<i>In-vivo</i> -Experimente.....	102
5.6	Zusammenfassende Betrachtung zur Eignung von [ <sup>18</sup> F]FESDS als PET-Tracer.....	106
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>109</b>
 <b>ANHANG</b>		
<b>I.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>127</b>

## ALLGEMEINER TEIL

### 1 Problemstellung

In der Bundesrepublik Deutschland verstarben im Jahr 2000 nach Erhebungen des Statistischen Bundesamtes etwa 17.900 Frauen an Brustkrebs (Mammakarzinom). Diese Erkrankung steht damit in Deutschland an erster Stelle der krebsbedingten Todesursachen bei Frauen. Jede 10. Frau muß damit rechnen, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken; beim Mann hingegen ist Brustkrebs eine Rarität. Das Erkrankungsrisiko steigt ab dem vierten Lebensjahrzehnt bzw. nach der Menopause. Insgesamt hat die Häufigkeit dieser Krebsform in Europa in den letzten 20 Jahren zugenommen. Die Anzahl der Neuerkrankungen ist in der westlichen Welt 5-fach höher als in Asien (Sakamoto und Sugano, 1991).

Die Prognose für den Patienten ist meist gut, wenn das Mammakarzinom frühzeitig erkannt wird. Derzeit in der Diagnostik angewandte bildgebende Verfahren sind Mammographie, Sonographie (Ultraschall), Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Die Mammographie ist in der Brustkrebs-Diagnostik noch immer das bedeutendste bildgebende Verfahren, während die Sonographie gegenwärtig ihren Platz als wichtigste Zusatzuntersuchung neben der Mammographie eingenommen hat. Mit modernen hochauflösenden Sonographiegeräten können bereits sehr kleine Karzinome unter 5 mm Größe nachgewiesen werden. Diagnostizierte suspekte Veränderungen werden in der Regel histologisch (Gewebeprobe) durch eine Nadel-Biopsie abgeklärt, um den Malignitätsgrad zu ermitteln.

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie und der Single-Photon-Emissions-Computertomographie handelt es sich um nuklearmedizinische Diagnoseverfahren. Die Besonderheit dieser beiden bildgebenden Verfahren ist der Einsatz von verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen, die mit speziellen Geräten detektiert werden. Beide Methoden erlauben eine dreidimensionale Darstellung der Aktivitätsverteilung. Reske *et al.* (1996) sind der Ansicht, dass die PET beim Mammakarzinom zur Diagnostik von Primärtumoren, Lymphknoten-Rezidiven und Fernmetastasen sowie für Lymphknoten-Staging und Therapiekontrolle hilfreich ist. Es werden heute vorwiegend die PET-Tracer 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-Glucose (FDG) und 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluor-17 $\beta$ -estradiol (FES) eingesetzt, wobei Mammakarzinome nicht sicher genug diagnostiziert werden können. Das Problem bei der Anwendung von FES ist, dass lediglich zwei Drittel der Mammakarzinome, die den Estrogenrezeptor (ER) exprimieren,

dargestellt werden können. Die ER-negativen Tumoren können mit FES nicht nachgewiesen werden. Eine andere Möglichkeit für die Entwicklung eines für Brustkrebs spezifischen PET-Tracers bietet die Estronsulfatase, deren Vorkommen in den Tumoren unabhängig vom Rezeptorstatus ist (Santner *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1994). Die Expression der Estronsulfatase ist in malignem Brustgewebe signifikant höher als in nichtmalignem Gewebe (Pasqualini *et al.*, 1997; Utsumi *et al.*, 2000). Von Kasch *et al.* (1998) wurde eine Verbindung entwickelt, die zur Estronsulfatase eine hohe Affinität hat: 16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat (FESDS). Römer *et al.* (2001) gelang die  $^{18}\text{F}$ -Markierung von FESDS; in 90 min konnte bis zu 10 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS hergestellt werden.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es, die neuartige radiochemische Verbindung 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat umfassend biochemisch und radiopharmakologisch zu charakterisieren und zu prüfen, ob sie möglicherweise einen geeigneten Ansatz für die PET-Diagnostik beim Mammakarzinom bieten kann.

## 2 Einleitung

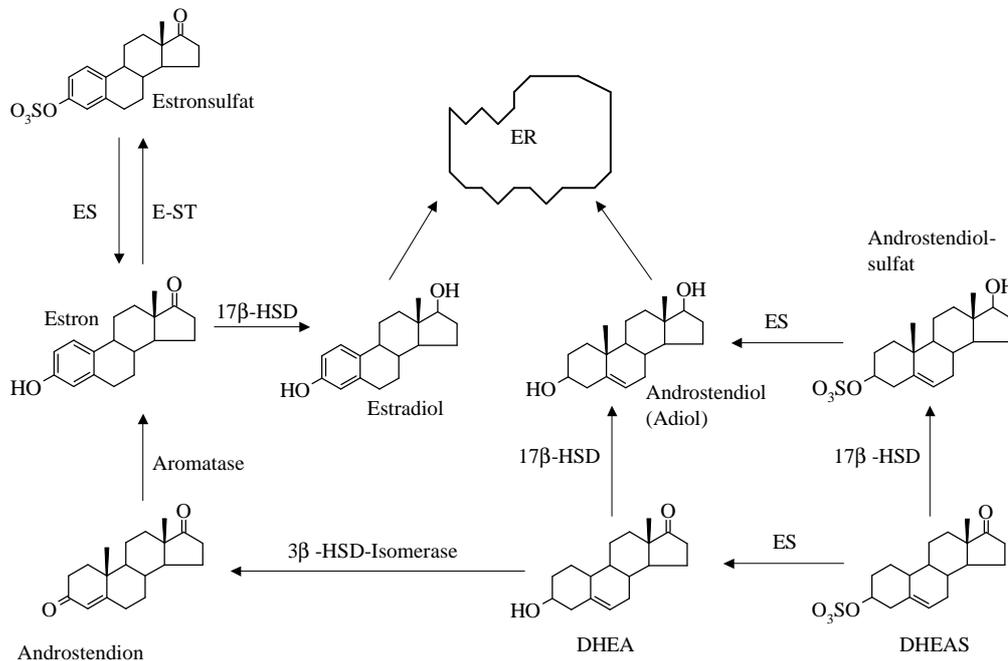
### 2.1 Entstehung von Brustkrebs

Die Entstehung von Brustkrebs kann durch verschiedene Faktoren gefördert werden. Dazu gehören (in der Reihenfolge des Risikopotentials): familiäre Belastung durch Brustkrebs-Erkrankungen in der Verwandtschaft, ein Alter über 50 Jahre, eine bereits aufgetretene gut-artige Brusterkrankung, späte Schwangerschaft und späte Menopause, frühe Menarche sowie die Hormon-Ersatztherapie (Armstrong *et al.*, 2000). Mit dem höchsten Risiko ist derzeit das Vorliegen einer Mutation des Tumorsuppressor-Genes BRCA1 behaftet (Hamann, 2000).

Viele der genannten Risikofaktoren haben eine verstärkte Hormon-Exposition der Patientin zur Folge. Es ist tatsächlich so, dass die Genese des Mammakarzinomes durch Sexualsteroiden gefördert wird. Wie in Abb. 2-1 zu sehen ist, können Estradiol und Androstendiol den Estradiolrezeptor (ER) aktivieren. Dadurch wird die G1-Phase des Zellzyklus (Phase nach der Zellteilung) stimuliert und der Zellzyklus insgesamt verkürzt, d.h. die Zellen teilen und vermehren sich schneller. Im Verlauf der Karzinogenese werden überdies die Zellen so verändert, dass sie immer weniger auf Estrogene als Proliferationssignal angewiesen sind, sondern vermehrt auf Fibroblasten-Wachstumsfaktoren reagieren (McLeskey *et al.*, 1998). Somit werden ehemals hormonabhängige Tumoren hormonunabhängig.

Fast alle Mammakarzinome (ca. 95–97 %) sind zumindest in frühen Stadien hormonabhängig bzw. ER-positiv (Henderson *et al.*, 1988). Da einige Tumoren ihre Empfindlichkeit für Estradiol verlieren, sind nur noch zwei Drittel der Mammakarzinome zum Zeitpunkt der Diagnose hormonabhängig (Roodi *et al.*, 1995). Wird der Tumor von Steroidhormonen unabhängig, so sind in diesen komplexen Prozeß viele Faktoren involviert: es treten Varianten des Estrogenrezeptors, der Wachstumsfaktoren und Onkogene auf (Pasqualini, 1997). Es sei angemerkt, dass der Prozeß immer noch nicht vollständig verstanden ist. Die Estrogenrezeptoren können mutationsbedingt ihre Ansprechbarkeit auf Estrogene verlieren. Auch das c-erb-B2-Onkogen, das für einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor aus der Familie der Epidermis-Wachstumsfaktoren (EGF) kodiert, kann in hormonunabhängigen Tumoren mutiert sein (Kaptain *et al.*, 2001). Außerdem ist bei den hormonunabhängigen Tumoren die mRNA des Enzyms Estronsulfatase (ES) zwar exprimiert und funktionsfähig, das Protein hat aber eine geringe Enzymaktivität (Pasqualini *et al.*, 1995). Es gibt noch einen weiteren Unterschied: in den ER-positiven Tumo-

ren katalysiert das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase die Reaktion von Estron zu Estradiol und bei ER-negativen Tumoren die umgekehrte Reaktion.



**Abb. 2-1:** Bildung von Steroidhormonen und Aktivierung des Estradiolrezeptors der Zelle. Abkürzungen: ES – Estronsulfatase, ER – Estradiolrezeptor, DHEA – Dehydroepiandrosteron, DHEAS – Dehydroepiandrosteronsulfat, E-ST – Estronsulfotransferase, 17 $\beta$ -HSD – 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

## 2.2 Physiologische Bedeutung der Estronsulfatase im Säuger-Organismus

Estrogene stimulieren das Wachstum und die Entstehung von Mammakarzinomen. Ihre Biosynthese erfolgt in den Ovarien und in der Nebennierenrinde. Letztere produziert neben Estrogenen auch Androgene, die durch die Aromatase in Estrogene umgesetzt werden können. Nach der Menopause, wenn die Ovarien keine Estrogene mehr bilden, werden die Estrogene ausschließlich von extraovariellen Organen bereitgestellt.

Bevor die Steroidhormone in das Blut sezerniert werden, wird ein großer Anteil durch die Estron- bzw. Dehydroepiandrosteron-Sulfotransferase sulfatisiert. In das Blut abgegebene Steroide binden dort an Plasma-Albumin und Sexualhormon-Bindungs-Globulin, sie werden so zum Zielgewebe transportiert. Freies Estradiol wird sehr schnell in der Leber glucuronidiert und in die Galle exkretiert. Estronsulfat dagegen kann in der Leber entweder zu Estradiolsulfat reduziert oder durch die Estronsulfatase zu Estron hydrolysiert werden und in den Blutkreislauf zurückkehren.

Estronsulfat und DHEAS dienen aufgrund ihrer hohen Halbwertszeit (HWZ) und Konzentration im Blut als Steroidhormon-Reservoir. Estronsulfat hat eine HWZ von 10-12 h und eine Konzentration von 420 ng/l gegenüber Estron mit 0,5 h und 46 ng/l (Ruder *et al.*, 1972; Santen, 1986). Die Plasma-Konzentration von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) beträgt 1-3 mg/l und die von Dehydroepiandrosteron (DHEA) 4-7 µg/l (Hildebrandt, 1998). Erst im Gewebe erfolgt die selektive Hydrolyse der Steroidsulfate durch die Estronsulfatase. Die ES hydrolysiert neben Estronsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) auch die Substrate Dehydroandrosteronsulfat, Dehydroisoandrosteronsulfat, Androstendiol-3-sulfat, Estradiol-3-sulfat und Cholesterolsulfat.

Nur die freien Steroide Estradiol, Estron und Androstendiol können den intrazellulären Estradiolrezeptor (ER) binden und ihn durch Phosphorylierung aktivieren (Krishnan *et al.*, 2001). Der ER bindet nach der Aktivierung meist als Dimer an die DNA (Hormon-Respons-Element eines Genes) und modifiziert so direkt die Transkription dieses Genes. Dadurch wird die Replikation von verschiedenen Enzymen für Neurotransmitter, Neuropeptide, Rezeptorproteine, Transporter sowie Signalmoleküle (second messenger) initiiert bzw. reprimiert. Die transkriptionale Aktivität des ER wird durch extrazelluläre Signale wie Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF), Transformierender Wachstumsfaktor (TGF), Insulin, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-I (IGF-I) und Dopamin stimuliert (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993; Aronica und Katzenellenbogen, 1993). Estradiol kann aber auch direkt und unabhängig von der Transkription wirken und so z.B. die mitogenaktivierte Protein-Kinase (MAPK) aktivieren oder das Kalzium-Gleichgewicht in der Zelle regulieren (Improta-Brears *et al.*, 1999).

Im folgenden werden die wichtigsten Wirkungen von Steroidhormonen im Organismus aufgeführt. Die Vorgänge der weiblichen Reproduktion, wie z.B. Follikelreifung, Auslösung der ovulatorischen Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon, Eitransport, Proliferation des Endometriums in der ersten Zyklushälfte, Zusammensetzung der Sekrete von Uterus und Cervix und die Beschaffenheit der Vaginalschleimhaut, werden durch Estrogene gesteuert (Hildebrandt, 1998). Estrogene können die Immunantwort durch Verbesserung der T-Zell-vermittelten Immunität verstärken. Dies hat einen günstigen Effekt auf kollageninduzierte rheumatische Arthritis. Dagegen verschlechtern Estrogene die auf B-Zell-vermittelter Immunantwort basierenden Erkrankungen Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) und Glomerulonephritis (Enmark und Gustafsson, 1999). Estrogene sind für Knochenreifung und –metabo-

lismus essentiell (Quigley *et al.*, 1987). Durch Estrogene wird die Blutgerinnung gesteigert, da die Faktoren I und VIII vermehrt gebildet werden (Hildebrandt, 1998).

Die Estronsulfatase kommt in besonders hohen Konzentrationen in der Plazenta vor. Dort hydrolysiert sie DHEAS, das in der frühen Schwangerschaft von der Nebenniere der Mutter und später von der fetalen Nebenniere sezerniert wird. DHEAS wird zu Androstendiol, Estron, Estadiol und Estriol umgesetzt, die sowohl in den mütterlichen als auch in den fetalen Kreislauf eingehen. Es wird vermutet, dass die ES eine regulatorische Funktion bei der Hirnentwicklung spielt (Purinton *et al.*, 1999), und den Aktivitätsmodus von Neurosteroiden im adulten Hirn kontrolliert (Le Roy *et al.*, 1999).

Das durch die Hydrolyse aus DHEAS entstehende DHEA hat vielversprechende pharmakologische Wirkungen (Pepping, 2000). Im Tierversuch verbessert es die Immunität und das Gedächtnis, verhindert Arteriosclerosis, Krebs, Diabetes und Fettleibigkeit. Klinische Studien zeigen, dass durch Applikation von DHEA die Knochendichte bei postmenopausalen Frauen erhöht und der Zustand von HIV-Infizierten verbessert wird. Es besteht die Möglichkeit der Behandlung des Systemischen Lupus Erythematosus und von Depressionen mit DHEA.

Beim vollständigen Fehlen der ES liegt eine Sulfatase-Defizienz vor. Die ausgeprägte ES-Defizienz in Form einer X-chromosomalen (Xp22.3) Ichtyosis kommt bei 1 von 5000-6000 Männern vor (Shapiro *et al.*, 1978a und 1978b). Die Patienten haben eine fischartig verhornte Haut (Ichtyosis) sowie verminderte ES-Enzymaktivitäten in den Fibroblasten u.a. Geweben. Des Weiteren wurde bei den Erkrankten eine erhöhte Cholesterolsulfat-Konzentration im Plasma, in den Erythrocyten-Membranen und im Stratum corneum der Haut gemessen (Bergner und Shapiro, 1981; Williams und Elias, 1981); die Konzentration der sulfatierten Steroide im Plasma ist zu 31-82 % erhöht (Ruokonen *et al.*, 1986). Eine Hydrolyse von den Steroidsulfaten ist dennoch nicht ausgeschlossen, da die Steroidsulfate die enterohepatische Zirkulation durchlaufen. Die Mikroflora des Darmes weist Sulfatasen auf, die Steroidsulfate spalten können (Bergner und Shapiro, 1988).

Eine zu hohe Konzentration von Estrogenen kann die Entstehung und das Wachstum von Brustkrebs fördern. Untersuchungen von humanen Gewebeproben zeigen, dass in malignem Brustgewebe die Estronsulfatase signifikant höher exprimiert ist als in gesundem Gewebe (Pasqualini *et al.*, 1997; Utsumi *et al.*, 2000). So ist das Tumorgewebe mit dem wichtigsten

Enzym ausgestattet, das die Versorgung mit Estrogenen gewährleistet. Die Estrogene können den Estrogenrezeptor aktivieren und die G1-Phase des Zellzyklus verkürzen, die Tumorzellen teilen sich schneller. Antiestrogene wie z.B. Tamoxifen<sup>®</sup> hemmen den ER und arretieren die Tumorzellen. (Osborne, 1998). Ein Teil der Mammakarzinome exprimiert jedoch keinen ER und kann weder durch Estrogene stimuliert noch durch Antiestrogene gehemmt werden, es handelt sich um estrogenunabhängige Tumoren (Israel und Saez, 1978).

### 2.3 Nuklearmedizinische Diagnoseverfahren

Zu den gängigen diagnostischen Verfahren bei Brustkrebs wurden bereits im vorigen Abschnitt Angaben gemacht. Im folgenden wird auf die nuklearmedizinischen Methoden Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) näher eingegangen. Die PET gestattet wie auch die SPECT eine dreidimensionale Darstellung von Aktivitätsverteilungen. Anstatt jedoch einzelne Photonen zu detektieren, basiert die PET auf dem Nachweis von jeweils zwei Gammaquanten pro Ereignis (Koinzidenzdetektion). Als SPECT-Nuklid findet z.B. Technetium-99m (<sup>99m</sup>Tc) Anwendung. Die Strahlungsverteilung der emittierten Photonen wird mit rotierenden Gamma-Kamera-Systemen aus verschiedenen Winkelpositionen aufgenommen. Der Vorteil von SPECT liegt in dem einfach verfügbaren Radionuklid <sup>99m</sup>Tc, das sehr kostengünstig und leicht handhabbar ist. <sup>99m</sup>Tc hat eine Halbwertszeit (HWZ) von 6 Stunden, verfügt über strahlenphysikalisch ideale Eigenschaften und ist in Form eines einfach zu betreibenden Generatorsystems leicht verfügbar. So ist SPECT in der Routine breiter anwendbar als PET. Es werden für die Brustkrebs-Diagnostik z.B. die Radiopharmazeutika <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi, <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin, <sup>111</sup>In-DTPA-Octreotid und <sup>131</sup>I-16-Estradiol eingesetzt (Khalkhali und Vargas, 2001).

Man erwartet jedoch, dass PET in Zukunft eine größere Rolle für die Brustkrebs-Diagnostik spielen wird (Jochelson, 2001). PET hat zwei wesentliche Vorteile gegenüber SPECT: die biologische Aktivität der radioaktiv markierten Moleküle ist in der Regel kaum verändert, da die Wasserstoff- oder Hydroxylgruppen im Molekül durch Fluor-18 ersetzt werden können. Der zweite Vorteil von PET ist die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Radioaktivitäts-Konzentration im Körper. So ist es möglich, biochemische und metabolische Veränderungen *in vivo* zu messen. Die zur radioaktiven Markierung verwendeten Nuklide sind Fluor-18 (<sup>18</sup>F; HWZ 109,7 min), Kohlenstoff-11 (<sup>11</sup>C; HWZ 20,4 min), Stickstoff-13 (<sup>13</sup>N; HWZ 9,96 min) und Sauerstoff-15 (<sup>15</sup>O; HWZ 2,07 min). Die kurzen Halbwertszeiten

machen ein Zyklotron zur Erzeugung der Nuklide in unmittelbarer Nähe der PET-Kamera erforderlich.  $^{18}\text{F}$  ist aufgrund seiner relativ langen Halbwertszeit für viele Anwendungen das günstigste Nuklid und deshalb am weitesten verbreitet.

Mit PET können physiologische und biochemische Stoffwechselfvorgänge durch Positronen emittierende Isotope dargestellt werden. Das bei der Umwandlung eines Protons in ein Neutron emittierte Positron verbindet sich mit einem Elektron der Umgebung unter Umwandlung beider Ruhemassen in Gammastrahlung. Bei dieser Annihilation (Vernichtung) werden 2 Gammaquanten der Energie von 511 keV in entgegengesetzte Richtungen (ca.  $180^\circ$ ) ausgesendet. Die beiden Photonen werden dann in zwei der ringförmig angeordneten Strahlerdetektoren des Tomographen bei einem nahezu simultanen Eintreffen als Koinzidenz-Ereignis registriert. Dieses Verfahren der Koinzidenz-Messung erlaubt eine indirekte Detektion des Positronenzerfalls, und damit die Lokalisation des Tracers im Körper. Eine zusätzliche Messung der Photonenabsorption mit externen radioaktiven Quellen, die um den Patienten rotieren (Transmissions-Korrektur), schafft die Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung der regionalen Tracer-Konzentration im Körper. Die örtliche Auflösung der PET ist mit weniger als 5 mm besser als bei der SPECT. Sie ist von der Anzahl und Anordnung der Detektoren auf dem Ring abhängig. Eine physikalische Höchstgrenze der Auflösung ist allerdings durch den Weg des Protons im Gewebe bis zur Kollision mit einem Elektron und die Winkelunschärfe (keine exakten  $180^\circ$ ) der erzeugten Photonen auf etwa 2-3 mm gegeben.

#### 2.4 Therapie von Brustkrebs

Die therapeutischen Möglichkeiten beim Mammakarzinom bestehen in der chirurgischen Tumorentfernung, der Strahlentherapie zur Inaktivierung von Tumorresten sowie der Hormon- und Chemotherapie. Meist werden mehrere therapeutische Verfahren miteinander kombiniert. Das Therapieverfahren der Wahl ist die operative Tumorentfernung, eventuell mit vorangegangener Chemo- oder Strahlentherapie zur Verkleinerung des Tumors. Die Nachbehandlung beinhaltet Strahlentherapie (20 MeV), Chemotherapie und/oder Hormontherapie. Die klassische Chemotherapie erfolgt nach dem CMF-Prinzip mit den Substanzen Cyclophosphamid, Metotrexat, 5-Fluorouracil. Eine Chemotherapie wird vorzugsweise bei ER-negativen Tumoren angewandt, wohingegen die Hormontherapie für ER-positive Fälle geeignet ist. Für die Hormontherapie werden Antiöstrogene eingesetzt wie z.B. Tamoxifen<sup>®</sup> (Schneider *et al.*, 1994). Leider wurde durch den Einsatz von Tamoxifen<sup>®</sup> ein 2-5-facher Anstieg des Erkan-

kungsrisikos für Endometriumkrebs festgestellt (Smith *et al.*, 2000). Einige Tumoren sind gegen Tamoxifen<sup>®</sup> resistent, und in einigen Fällen erhöhte sich die Aromatase-Aktivität nach der Therapie (McLeskey *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 1990). Weitere Antiestrogene, die in therapeutischer Anwendung sind, sind Letrozol (Femara<sup>®</sup>) und Anastrozol (Arimedex<sup>®</sup>). Zielsetzung ist dabei eine Ausschaltung der Estradiolrezeptoren von hormonsensitiven Tumoren zur Verlangsamung des Tumorwachstums. Der Einsatz von Antiestrogenen ist im übrigen nur nach der Menopause bzw. nach der Entfernung der Ovarien sinnvoll. Bei einer Chemotherapie werden Medikamente verabreicht, die das Wachstum von (Tumor-)Zellen hemmen (Cytostatika; Chemotherapeutika). Das allgemeine Ziel ist, bei möglichst geringen Nebenwirkungen und geringer Toxizität, möglichst viele Tumorzellen zu vernichten und so die erkrankungsfreie Überlebenszeit zu verlängern.

Ergänzend zu den klassischen Therapieformen sollten Enzyme, die an der lokalen Synthese von freien Steroiden im Brustkrebsgewebe beteiligt sind, gehemmt werden. Aus Abb. 2-1 ist zu ersehen, dass für diesen Ansatz die Enzyme Estronsulfatase, Aromatase und 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Frage kommen. Da jedoch Estronsulfat, Adiolsulfat und DHEAS Vorstufen von ER-bindenden Hormonen sind, ist es am sinnvollsten, deren Hydrolyse durch die Hemmung der Estronsulfatase zu unterbinden. Die Aromatase wird zu therapeutischen Zwecken mit Letrozol und Anastrozol gehemmt. Da aber so nur die Bildung von Estron und nicht die von DHEA und Adiol unterbunden wird (Abb. 2-1), ist dieser Ansatz wenig effektiv. Wird nur die Aromatase inhibiert, kann dennoch Adiol den Estrogenrezeptor aktivieren und damit das Tumorwachstum fördern. Aus diesem Grund ist die Inhibition der Bildung von Adiol neben der von Estron und DHEA durch die Estronsulfatase am günstigsten.

Es gibt weitere Gründe, die verdeutlichen, warum die Hemmung der ES gegenüber der Hemmung der Aromatase sinnvoller ist. Die ES kommt bei 90 % der untersuchten Brustkrebsproben vor, die Aromatase lediglich bei 60–70 % (James *et al.*, 2001). Bei physiologischen Substrat-Konzentrationen wird von humanen Mammatumoren 10-fach mehr Estron über den Sulfatase-Weg als über den Aromatase-Weg synthetisiert (2,8 pmol/g Protein/h gegenüber 0,27 pmol/g Protein/h; Santner *et al.*, 1984). Die Hydrolyse von Estronsulfat zu Estron durch die Estronsulfatase ist somit die wichtigste Quelle für Estrogene in Tumoren.

Es sind mehrere Verbindungen bekannt, die das Enzym Estronsulfatase hemmen. Zuerst wurden von verschiedenen Forschungsgruppen steroidale Analoga synthetisiert. Estron-3-O-sul-

famat (EMATE) war mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 80 nM der erste starke irreversible Hemmer der Estronsulfatase (Reed *et al.*, 1994). Der entscheidende Nachteil, der die onkogene Therapie mit EMATE verbietet, ist seine estrogene Wirkung. Das Problem wurde durch nicht-steroidale Verbindungen wie z.B. Coumarin-7-O-sulfamat und 4-Methylcoumarin-7-O-sulfamat (COUMATE) gelöst (Woo *et al.*, 1996). Sie haben im Gegensatz zu EMATE keine estrogene Eigenschaften.

Der genannte Therapieansatz wurde von Kasch (HKI Jena) aufgegriffen und auf steroidale Analoga des Estradiol übertragen. Er fand, dass die 3-Monosulfamate mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,07  $\mu$ M und 0,09  $\mu$ M die Estronsulfatase stärker als die 17-Monosulfamate ( $IC_{50}$ -Werte 2,5 $\mu$ M bis 25  $\mu$ M) hemmen (Kasch *et al.*, 1999). Die Inhibition durch 3,17-Disulfamate mit  $IC_{50}$ -Werten von 0,020  $\mu$ M bis 0,035  $\mu$ M ist noch stärker. Die 2. Sulfamatgruppe in Position 17 bewirkte, dass die ES sehr viel stärker gehemmt wird und dass die estrogene Wirkung reduziert wird. 16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat (FESDS) ist mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 25 nM einer der stärksten Inhibitoren der Estronsulfatase, wobei die Hemmung als reversibel angesehen wird.

## 2.5 Bewertung eines Radiotracers

Grundsätzlich muß jeder Radiotracer, der für PET eingesetzt werden soll, ähnlich wie ein herkömmliches Pharmakon, auf seine Eignung geprüft werden. Dafür gibt es bestimmte Kriterien, die Eckelman und Gibson (1993) wie folgt zusammengefasst haben:

- Auswahl eines geeigneten Targets
- Bestimmung der Affinität des Substrates des Targets
- Bestimmung der Affinität der nicht radioaktiven Verbindung
- Untersuchung der Verteilung des Radiotracers *in vivo*
- Hemmung des Radiotracers mit der nicht markierten Verbindung *in vivo*
- Korrelation von Bioverteilung mit dem Vorkommen des Targets

Die entscheidenden Kriterien für die Anwendung am Menschen und die Vergleichbarkeit mit anderen diagnostischen Methoden sind eine hohe Spezifität und Sensitivität. Dabei ist die Sensitivität die Fähigkeit des diagnostischen Tests, Personen mit einer fraglichen Erkrankung

als Kranke zu erkennen und die Spezifität die Eignung des Tests, Personen ohne eine fragliche Erkrankung als Nichtkranke zu erkennen.

In der vorliegenden Arbeit können über die Sensitivität und Spezifität nur qualitative Aussagen getroffen werden, die Quantifizierung müßte durch klinische Studien erfolgen. Die biologische Anforderung an den Tracer ist eine Bindungsaffinität im (sub-) nanomolaren Bereich zur Gewährleistung einer hohen Sensitivität. Diese ist für die Bestimmung einer krankhaften Veränderung der Bindungsstellen-Konzentration bzw. der Enzymaktivität essentiell. Die Anreicherung des Tracers sollte mit der Anzahl der Bindungsstellen korrelieren.

Ein in allen PET-Zentren häufig eingesetzter Tracer ist die 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-Glucose (FDG). Ursprünglich zur Untersuchung des Glucose-Stoffwechsels am Hirn eingesetzt (Baxter, 1990), stellte sich insbesondere im Zuge der Verbesserung der PET-Kameras heraus, dass die Verbindung auch zur Darstellung vieler Tumorarten geeignet ist. Der biologische Hintergrund dafür liegt in der von Warburg (1925) gewonnenen Erkenntnis, dass Tumorzellen im Gegensatz zu nicht malignen Zellen sehr viel Glucose für die Aufrechterhaltung ihres Metabolismus benötigen und in die Zelle aufnehmen. Daher wird mit Glucose auch FDG in die Tumorzellen aufgenommen. Die FDG-PET bereitet Probleme besonders in der Diagnostik von Metastasen und Tumoren, die kleiner als 1 cm sind. Schirrmeyer *et al.* (2001) ermittelte die Sensitivität und Spezifität für die Darstellung von Mammakarzinomen mit FDG (n = 117). Primärtumoren wurden mit 93 % Sensitivität und 75 % Spezifität durch FDG nachgewiesen. Für Metastasen in der Axilla betrug die Sensitivität 79 % und die Spezifität 92 %.

Um Mammakarzinome mit hoher Sensitivität und Spezifität darstellen zu können, wurde 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluor-17 $\beta$ -estradiol (FES) synthetisiert (Katzenellenbogen *et al.*, 1997; Römer *et al.*, 1999). Die Traceraufnahme korreliert mit der Konzentration des Estrogenrezeptors (Mintun *et al.*, 1988). Die Gruppe von Katzenellenbogen synthetisierte auch das Progestin 21-[<sup>18</sup>F]-Fluor-16 $\alpha$ -ethyl-19-norprogesteron (FENP), das jedoch keine Korrelation zwischen Tumoraufnahme und Rezeptordichte aufwies (Dehdashti *et al.*, 1991). Das Problem der Anwendung von FES ist, dass nur zwei Drittel der Mammakarzinome dargestellt werden können. Es handelt sich dabei um Tumoren, die den Estrogenrezeptor (ER) exprimieren (Roodi *et al.*, 1995). Die ER-negativen Tumoren können mit FES nicht diagnostiziert werden. Möglicherweise ist der neuartige Radiotracer 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluor-17 $\beta$ -estradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat ([<sup>18</sup>F]FESDS) zu einem sicheren Nachweis aller Mammakarzinome mit der PET geeignet.

**EXPERIMENTELLER TEIL****3 Material und Methoden**

## 3.1 Geräte

Brutschrank Hera cell	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
Autoklav Varioklav	H + P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Sterilwerkbank SterilGard	The Baker Company (Stanford, USA)
Fluoreszenz-Spektrophotometer F-4500	Hitachi (Tokyo, Japan)
Anthos htII Photometer	Anthos Labtec Instruments (Salzburg, Österreich)
Schüttler IKA Vibrax-VXR	IKA-Labortechnik (Staufen)
Dispergiergerät Ultra-Turrax T25	IKA-Labortechnik (Staufen)
Gefriermikrotom Leica CM 1850	Leica Instruments GmbH (Nussloch)
Bildplatte BAS MP 2040	Raytest (Straubenhardt)
Radioluminographiegerät BAS 2000	Fujix (Tokyo, Japan)
PET-Scanner ECAT EXACT HR+	Siemens Medical Systems (Knoxville, USA)
Kalibrator M2102	Robotron (Dresden)
$\gamma$ -Strahlungsmeßgerät Cobra	Canberra-Packard GmbH (Dreieich)
Flüssigszintillationszähler TR Tri-Carb 2100	Canberra-Packard GmbH (Dreieich)
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Elektrophoresekammer Owl B1	Owl Separation Systems Inc. (Portsmouth, USA)
UV-Detektor FLX-20.M	Vilber Lourmat (Marne La Vallee, Frankreich)
Eppendorf-Zentrifuge 5403	Eppendorf (Schönenbuch, Schweiz)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Schönenbuch, Schweiz)
HPLC-Säule ET 125/4 Nucleosil 120-5 C <sub>18</sub>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
HPLC-Säule Zobrax Eclipse XDB-C <sub>18</sub>	Agilent Technologies GmbH (Waldbronn)
Dünnschicht Alufolie Kieselgel 60	Merck KGaA (Darmstadt)

## 3.2 Material

## 3.2.1 Plastikmaterial

Mikrotiterplatten (96 Loch)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
24-Loch-Platten	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (75 und 182 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one (Frickenhausen)
PCR-Röhrchen Micro Amp	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Poly-Prep Chromatographiesäulen	Bio-Rad (München)
Szintillations-Meßröhrchen	Canberra-Packard GmbH (Dreieich)
Objektträger	Merck KgaA (Darmstadt)

## 3.2.2 Zellkulturmaterial

RPMI 1640 mit Glutamax-I	Life Technologies (Karlsruhe)
DMEM mit Glutamax-I	Biochrom KG (Berlin)
Fetales Bovines Serum (Charge 546 U)	Biochrom KG (Berlin)
Gestripptes Fetales Bovines Serum (Charge 833029)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom KG (Berlin)
MEM-Aminosäuren (50fach)	Biochrom KG (Berlin)
HEPES (1 M)	Biochrom KG (Berlin)
Penicillin / Streptomycin (10.000 E / 10.000 µg/ml)	Biochrom KG (Berlin)
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
β-Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Trypsin / EDTA (0,5 % / 0,2 %)	Biochrom KG (Berlin)
Hank's BSS	Biochrom KG (Berlin)
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

## 3.2.3 Tiere, Zellen und Enzyme

Wistar-Ratten	Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde
Tumortragende Nacktmäuse	Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Carl-Gustav Carus, Dresden
Ferkel	Sauenzuchtanlage, Nebelschütz
MCF-7-Zellen (Mammakarzinom)	DSMZ (Heidelberg)
T-47D-Zellen (Mammakarzinom, pleurale Effusion)	DKFZ (Heidelberg)
HepG2-Zellen (Hepatozelluläres Karzinom)	ATCC (Manassas, USA)
FaDu-Zellen (Plattenepithelkarzinom, Pharynx)	ATCC (Manassas, USA)
Humane Carboanhydrase I (HCA I) von Erythrocyten 100-500 W-A U/mg Protein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Humane Carboanhydrase II (HCA II) von Erythrocyten >3000 W-A U/mg Protein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Rinder-Carboanhydrase II (RCA II) 1800 U/mg	Bachem BioChemika GmbH (Heidelberg)

## 3.2.4 Radioaktiv markierte Substanzen

Ammonium-[ <sup>3</sup> H]Estronsulfat (1961 GBq/mmol)	NEN (Boston, USA)
16 $\alpha$ -[ <sup>18</sup> F]Fluorestradiol-3,17 $\beta$ - disulfamat ([ <sup>18</sup> F]FESDS) (10-440 GBq/ $\mu$ mol)	eigene Herstellung, FZ Rossendorf, Abt. PET-Tracer

### 3.2.5 Substanzen für Molekularbiologie

Von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) wurden Agarose, Ethidiumbromid, Bromphenolblau, Xylencyanol FF, TRIS–Aminomethan, EDTA, NaCl, Natriumazetat, Wasser, DEPC, Chloroform und SDS bezogen.

mRNA Enrichment Kit	peqLab (Erlangen)
Oligo(dT)Cellulose	Life Technologies GmbH (Karlsruhe)
Trizol	Life Technologies GmbH (Karlsruhe)
RNA PCR Core Kit GeneAmp	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Oligonucleotid-Primer	Life Technologies GmbH (Karlsruhe)
1 Kb Plus DNA-Leiter (1 µg/ml)	Life Technologies GmbH (Karlsruhe)

### 3.2.6 Biochemikalien

Diese Biochemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) erworben: TRIS–Aminomethan, TRIS–Base, TRIS–HCl, TRIS–Sulfat, EDTA, EGTA, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaClO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Glucose, Lowry-Reagenz, Dithio-treit (DTT), Kalium-Estronsulfat, Natriumazetat, p-Nitrophenolat, p-Nitrophenylazetat, Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V).

### 3.2.7 Enzym-Inhibitoren

Die Inhibitoren Naringin, Danazol, Azetazolamid, Benzolamid, Ethoxazolamid, Hydrochloro-thiazid, Furosemid wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) erworben.

16α-Fluorestradiol-3,17β- disulfamat (FESDS)	Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Abt. Biostruktur-Chemie (Jena)
16α-Fluorestradiol-3- monosulfamat (FESMS)	Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Abt. Biostruktur-Chemie (Jena)
Quercetin	Merck KGaA (Darmstadt)

## 3.2.8 Sonstige Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen: Protein Assay Kit, EDTA,  $\beta$ -Estradiolbenzoat, Methylbutan und Urethan. Von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) wurden DMSO, Toluol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril, Ethylazetat, Ether, Petrolether, Essigsäure, Eisessig, Papanicolaous Färbelösung 1a, 2a und 3a sowie Kresylechtviolett verwendet.

Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Rothi-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Ultimagold	Packard Bioscience B.V. (Groningen, Niederlande)
Erdnußöl	Apothekenabfüllung (DAB 10)
Glycerin	Riedel-de Haen (Hannover)
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
Pancuronium	Curamed Pharma GmbH (Karlsruhe)

## 3.2.9 Selbst hergestellte Lösungen und Nährmedien

RPMI-Medium: RPMI 1640 mit Glutamax-I, 10 % gestripptes Fetales Bovines Serum, 20 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % MEM-Aminosäuren, 1 % Penicillin / Streptomycin, 10  $\mu$ g/ml Insulin, 5 nM  $\beta$ -Estradiol (Konzentration nach James *et al.* 2001; Pasqualini *et al.*, 1995)

DMEM-Medium: DMEM mit Glutamax-I, 10 % Fetales Bovines Serum, 20 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % MEM-Aminosäuren, 1 % Penicillin / Streptomycin

Einfriermedium: 90 % Fetales Bovines Serum; 10 % DMSO

PBS<sup>-</sup>: 16,0 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 2,0 l Aqua dest.

PBS<sup>+</sup>: 16,0 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O; 0,26 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 2,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 2,0 l Aqua dest.

- Isotonische Kochsalzlösung (0,9 %) : 9,0 g NaCl in 1,0 l Aqua dest.
- Krebs-Henseleit-Puffer: 6,90 g NaCl; 0,35 g KCl; 0,29 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O;  
0,22 g EDTA; 2,08 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,03 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
0,49 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 2,00 g Glucose  
in 1,0 l Aqua dest. (pH 7,4)
- 75 % Ethanol: 75 ml Ethanol, 25 ml Aqua dest. (mit 0,1 % DEPC, autoklaviert)
- Elutionspuffer: 10 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,2 % SDS
- Beladungspuffer: 10 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,5 % SDS; 0,5 M NaCl
- DNA-Färbelösung (6fach; nach Sambrook *et al.*, 1989): 0,25 % Bromphenolblau;  
0,25 % Xylencyanol; 30 % Glycerol / Aqua dest.
- TAE (= 0,04 M TRIS-Azetat / 0,001 M EDTA; nach Sambrook *et al.*, 1989):  
50-fach: 242 g TRIS-Base; 57,1 ml Eisessig; 100 ml EDTA (0,5 M,  
pH 8,0) in 1,0 l Aqua dest.
- Fällungsreagenz: 95,5 g NaClO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 60,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O und 44,4 ml konzentrierte HClO<sub>4</sub> wurden in 250 ml Aqua dest. gelöst. Dazu wurden 5 ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Stammlösung (2 M) und 20 ml EGTA (100 mM) gegeben und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.

Die Bezeichnung Aqua dest. bezieht sich auf Wasser, welches einer Reinstwasser-Anlage entstammt und einen für HPLC geeigneten Reinheitsgrad hat.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Allgemeine Bedingungen für die Zellzucht

Die Kultivierung von humanen Tumorzellen war für die folgenden Experimente nötig:

- Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität (3.3.2.2)
- mRNA-Isolierung für die RT-PCR (3.3.3.1)
- Zellaufnahme-Experimente mit [<sup>18</sup>F]FESDS (3.3.5)
- Tumortransplantation auf Nacktmäuse (3.3.6.1)

Für die MCF-7-Zellen (Mammakarzinom) und die T-47D-Zellen (Mammakarzinom, pleurale Effusion) wurde RPMI-Medium, wie in 3.2.9 angegeben, verwendet, HepG2-Zellen (Hepatozelluläres Karzinom) und FaDu-Zellen (Plattenepithelkarzinom, Pharynx) erhielten DMEM-Medium. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 24-Loch-Platten bzw. Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank mit erhöhter Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage durch frisches ersetzt. Bei Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert, d.h. sie wurden zuerst mit 3-mal 12 ml Hank's BSS sorgfältig gespült und danach durch eine 3-5-minütige Einwirkung von 5 ml Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,02%) von der Plastikoberfläche der Flasche abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit Nährmedium abgestoppt und die Zellsuspension für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Die suspendierten Zellen wurden in der Regel in Zellkulturflaschen von 75 bzw. 182 cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche ausgesät. Nur für Bindungsexperimente wurden sie in 24-Loch-Platten ausgesät. Für eine dauerhafte Konservierung wurden die Zellen in eisgekühltem Einfriermedium suspendiert ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml), in Kryoröhrchen abgefüllt, 24 h bei -80°C in einer Gefrierbox mit Isopropanol langsam eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff bei -210°C dauerhaft aufbewahrt.

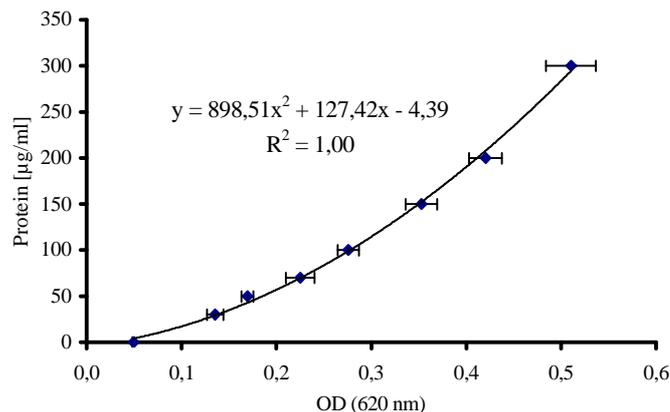
### 3.3.2 Biochemische Methoden

#### 3.3.2.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Für die folgenden Experimente wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration nötig:

- Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität (3.3.2.2)
- *In-vitro*-Autoradiographie (3.3.4)
- Zellaufnahme-Experimente mit [<sup>18</sup>F]FESDS (3.3.5)

Der Proteingehalt der Proben wurde nach Lowry *et al.* (1951) mit einem Protein Assay Kit der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bestimmt, wobei nach der Vorschrift des Herstellers vorgegangen wurde. Als Standard wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 10–400 µg/ml verwendet. Waren die Proben in TRIS-Puffer gelöst, so mußte das Protein zusätzlich mit Essigsäure gefällt werden. Für den Assay wurden Aliquots von 50 µl der Proben bzw. Standards sowie 150 µl Lowry-Reagenz in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei 200 rpm geschüttelt (Vibrax-VXR). Nach Zugabe von 70 µl Folin-Reagenz wurde erneut für 30 min bei 200 rpm geschüttelt. Die Extinktion wurde bei 620 nm an einem Mikroplatten-Photometer (Anthos htII) gemessen. In Abb. 3-1 ist eine quadratische Eichkurve dargestellt, die bei jedem Meßansatz neu erstellt werden mußte. Sie diente dazu, die Proteinkonzentration der Proben zu ermitteln.



**Abb. 3-1:** Eichkurve zur Berechnung der Proteinkonzentration in einer Lösung (n = 3). Unbekannte Proteinkonzentrationen können durch die im Diagramm gezeigte quadratische Funktion berechnet werden.

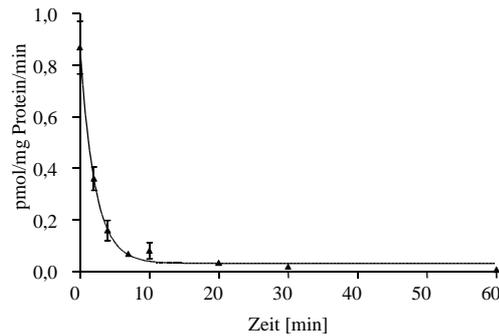
### 3.3.2.2 Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität

Die radioaktiv markierte Verbindung [<sup>18</sup>F]FESDS war mit der Zielstellung entwickelt worden, Tumoren, die das Enzym Estronsulfatase (ES) überexprimieren, mit der PET nachzuweisen. Es war daher erforderlich, die Enzymaktivität der ES in verschiedenen Rattenorganen, Tumorzellen und Tumoren zu bestimmen. Hierfür wurden Homogenate aus Organen von 6 Wochen alten weiblichen Wistar-Ratten, humanen Tumorzellen (MCF-7, T-47D, HepG2, FaDu) und transplantierten Tumoren von Nacktmäusen (MCF-7, FaDu) verwendet.

Es wurden jeweils ca. 0,5 g Organ in 10 ml TRIS-HCl (0,05 M; 0,1 % DTT; pH 7,4) mit dem Dispergiergerät Ultra-Turrax homogenisiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der ES-Aktivität erfolgte nach Reed und Ohno (1976). Für den Assay wurde zu 20 µM Kalium-Estronsulfat in Ethanol / TRIS-HCl (1:40) Ammonium-[<sup>3</sup>H]Estronsulfat zugegeben, so dass die Radioaktivität dieser Lösung 9250 Bq/ml betrug. Die verwendeten Inhibitoren der Estronsulfatase waren Naringin, Quercetin, Danazol und FESDS. Sie wurden in einer Konzentration von 10 mM in 60 % DMSO gelöst und in Aqua dest. bis 10<sup>6</sup>-fach weiter verdünnt. Zur Erhaltung der Stabilität von Naringin und Quercetin wurde 0,5 mM EDTA zugegeben (Boulton *et al.*, 1999).

Die Homogenate wurden aufgetaut und mit TRIS-HCl / DTT soweit verdünnt, dass die Proteinkonzentration zwischen 50 und 100 µg/ml betrug und für 2 min homogenisiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt 300 µl verdünntes Organ- bzw. Zellhomogenat in TRIS-HCl / DTT, 100 µl [<sup>3</sup>H]Estronsulfat-Lösung (20 µM, 925 Bq) und 100 µl Inhibitor-Lösung. Die Reaktionsansätze wurden für 3 min bei 37°C in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Thermomixer inkubiert. Es wurde eine Inkubationsdauer von 3 min gewählt, da bereits ab 10 min die Enzymaktivität beträchtlich sank (Abb. 3-2).

Die Inkubationen wurden durch Zugabe von 1,5 ml Toluol auf Eis abgestoppt. Zur Verteilung des Reaktionsproduktes in der Toluol-Phase wurde jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß 30 s bei 200 rpm geschüttelt und anschließend bei 12.000 g für 2 min zentrifugiert. Danach wurde 1,0 ml der organischen Phase abgenommen, mit 4,0 ml Ultimagold durch 10 s Schütteln gemischt und dessen Radioaktivität (R) im Flüssigszintillationszähler Tri-Carb gemessen. Von der eingesetzten radioaktiven Estronsulfat-Lösung dienten 3-mal 10 µl als Standard.



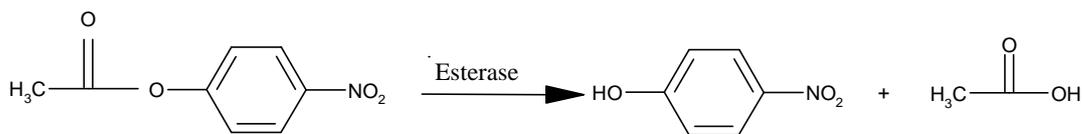
**Abb. 3-2:** Abhängigkeit der Enzymaktivität der Estronsulfatase von der Inkubationszeit (n = 3).

Die Berechnung der Enzymaktivität (A) erfolgte aus eingesetzter Radioaktivität (R), spezifischer Aktivität von [<sup>3</sup>H]Estronsulfat (SA), Inkubationszeit (t) und Proteingehalt (c):

$$A \text{ [fmol/mg Pr./min]} = \frac{R \text{ [Bq]} \cdot 1,5}{SA \text{ [GBq/mmol]} \cdot t \text{ [min]} \cdot c \text{ [mg]}}$$

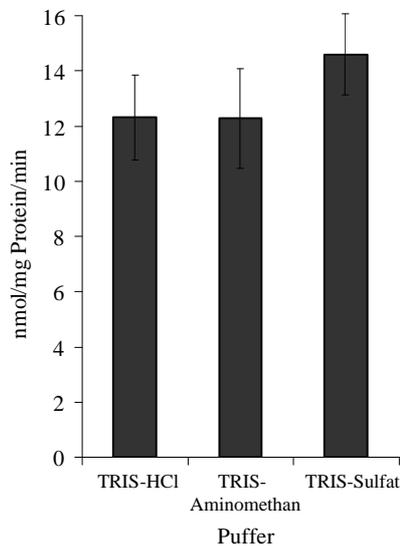
### 3.3.2.3 Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität

In den Tierversuchen (3.3.6.2) zeigte sich, dass [<sup>18</sup>F]FESDS zu einem hohen Anteil im Blut der Ratte gebunden wird. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei um eine Bindung an die Carboanhydrase (CA) der Erythrocyten handelt. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde geprüft, ob FESDS in der Lage ist, die CA zu hemmen. Zum Vergleich wurden neben FESDS auch 16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3-monosulfamat (FESMS) und die bekannten CA-Inhibitoren Azetazolamid, Hydrochlorothiazid, Ethoxzolamid und Furosemid eingesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität der CA erfolgte nach einem von Verpoorte *et al.* (1967) beschriebenen Assay, bei dem die Esterase-Aktivität der CA bestimmt wird. Dabei reagiert das Substrat p-Nitrophenylazetat zu p-Nitrophenolat und Azetat, wobei ein gelber Farbstoff entsteht, der spektrophotometrisch bei 340 nm gemessen werden kann (Abb. 3-3).

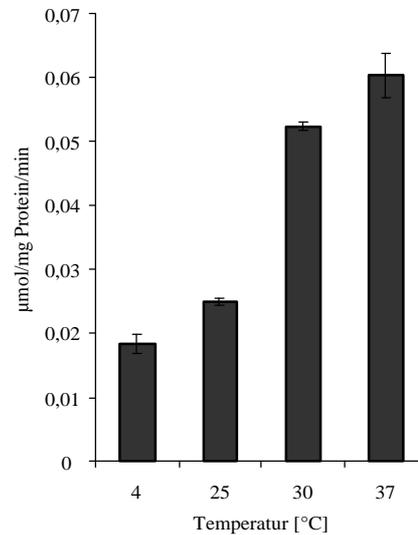


**Abb. 3-3:** Reaktion von p-Nitrophenylazetat zu p-Nitrophenolat und Azetat. Sie ist das Prinzip zur Bestimmung der CA-Aktivität, wobei die Esterase-Aktivität der CA ausgenutzt wird.

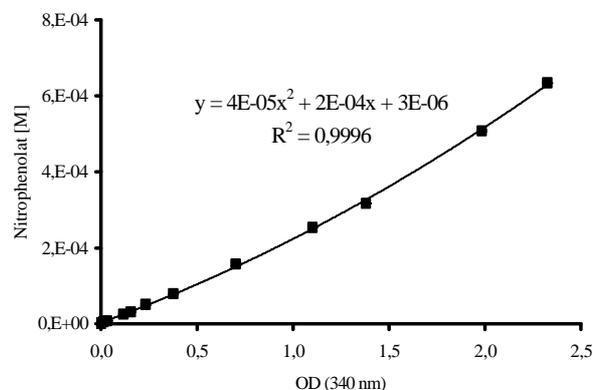
Es wurden die Carboanhydrasen I und II von Mensch (HCA I, HCA II) und Rind (RCA II) verwendet. Die eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen ( $10^{-10}$  bis  $10^{-3}$  M) wurden ausgehend von 10 mM Stammlösungen (in 60 % DMSO) durch Verdünnen in Aqua dest. hergestellt. Die Inkubation erfolgte in 2-ml-Reaktionsgefäßen, die 233  $\mu$ l TRIS-Puffer (50 mM, pH 7,4), 200  $\mu$ l p-Nitrophenylazetat (0,375 mM), 50  $\mu$ l Inhibitor sowie 17  $\mu$ l CA I (1,0 mg/ml) bzw. CA II (0,5 mg/ml) enthielten. Die Inkubationsbedingungen wurden bezüglich Puffer und Temperatur variiert. Als Puffer wurden TRIS-HCl, TRIS-Aminomethan bzw. TRIS-Sulfat verwendet; die Inkubations-Temperaturen betragen 4, 25, 30 oder 37°C. Als optimal stellte sich die Verwendung von TRIS-Sulfat-Puffer und eine Inkubationstemperatur von 37°C heraus (Abb. 3-4 und 3-5).



**Abb. 3-4:** Abhängigkeit der Enzymaktivität der CA II vom Inkubationspuffer (n = 3)



**Abb. 3-5:** Abhängigkeit der Enzymaktivität der CA II von der Inkubationstemperatur (n = 3)



**Abb. 3-6:** Abhängigkeit der Extinktion bei 340 nm von der Nitrophenolat-Konzentration (n = 3). Unter Verwendung der ermittelten Kurvenparameter kann die Konzentration des Reaktionsproduktes Nitrophenolat berechnet werden.

Aus Abb. 3-6 ist ersichtlich, dass der Substratumsatz anhand der gemessenen Absorption bei 340 nm durch eine Standardkurve mit dem Reaktionsprodukt p-Nitrophenolat berechnet werden kann. Die  $IC_{50}$ -Werte für die verschiedenen Inhibitoren wurden aus sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven mit der Software Prism 3.0 ermittelt.

### 3.3.3 Molekularbiologische Methoden

Zum Nachweis der Expression der mRNA von Estronsulfatase sowie Carboanhydrase I und II in den verschiedenen Zellen und Rattenorganen wurde die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) herangezogen. Vor der PCR wird eine reverse Transkription (RT) durchgeführt, da die eingesetzte mRNA erst in DNA umgeschrieben werden muß. Die Isolierung von mRNA und die Durchführung der RT-PCR wird nachfolgend beschrieben. Zur Herstellung von Lösungen wurde Aqua dest. mit 0,1 % DEPC eingesetzt, zur Solubilisierung von RNA und DNA sowie für die PCR wurde ein speziell für molekularbiologische Anwendungen aufbereitetes Wasser von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH verwendet.

#### 3.3.3.1 Isolierung der mRNA von Zellen

Für die Präparation der Gesamt-RNA einer Zelllinie wurden je 5 Flaschen einer Oberfläche von 182 cm<sup>2</sup> mit konfluenten Zellen verwendet. Die Flaschen wurden auf Eis gelegt. Das Medium wurde gründlich entfernt und jede Flasche mit 10 ml PBS<sup>-</sup> (0,1 % DEPC) gespült. Mit 15 ml Trizol pro Flasche erfolgte unter rotierenden Bewegungen die Ablösung der Zellen. Durch mehrfaches intensives Pipettieren wurde dabei die DNA zerstört. Die Trizol-Zell-Lösung wurde in 50-ml-Röhrchen gegeben und geschüttelt. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol und erneutem Schütteln blieb die Lösung 15 min bei RT stehen. Anschließend wurde 15 min bei 4°C zentrifugiert (< 12.000 g), die obere wässrige Phase sorgfältig abgetrennt und in ein frisches 50-ml-Röhrchen überführt. In diese wurden 0,5 ml Isoopropanol pro ml Trizol pipettiert, vorsichtig geschüttelt und für 30 min bei 4°C zentrifugiert (< 12.000 g). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit insgesamt 20 ml 75%igem Ethanol gelöst und 30 min bei < 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet, das die RNA enthielt, bei 37°C im Trockenschrank getrocknet. Die Gesamt-RNA wurde in 4 ml Wasser gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Extinktion der RNA-Lösung bei 260 nm, wobei OD = 1 einer Konzen-

tration von 40 µg/ml RNA entspricht (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  ermittelt. Dieser Quotient drückt die Verunreinigung der RNA-Lösung mit Protein aus und sollte > 1,7 betragen.

Für die Präparation der mRNA aus der Gesamt-RNA wurden Beladungs- und Elutionspuffer hergestellt. Danach wurden je 150 mg Oligo(dT)Cellulose in ein 50-ml-Röhrchen gefüllt und 2-mal mit Elutionspuffer und 1-mal mit Beladungspuffer gewaschen (je 10 ml). Anschließend wurde die Oligo(dT)Cellulose in 10 ml Beladungspuffer aufgenommen und in die Poly-Prep-Chromatographiesäule gefüllt, danach RNA aufgetragen und mit Beladungspuffer durchspült.

Es wurde vorerst die Hälfte (= 2 ml) der gewonnenen Gesamt-RNA zur Isolation der mRNA verwendet. Die RNA wurde zur Entwindung der Knäuel für 10 min bei 70°C im Wasserbad erwärmt und sofort für mindestens 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden zu 9 Volumenteilen (VT) RNA-Lösung 1 VT einer 5 M NaCl-Lösung zugesetzt und damit die vorbereitete Poly-Prep-Chromatographiesäule beladen. Das Eluat wurde aufgefangen und noch 5-mal auf die Säule aufgetragen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die gesamte mRNA an die Oligo(dT)Cellulose gebunden wurde.

Die Säule wurde dann 3-mal mit Beladungspuffer gewaschen (10 ml, 5 ml und 5 ml). Zur Ablösung der mRNA wurde 4-mal mit je 0,5 ml Elutionspuffer (50°C) in 4 einzelne Eppendorf-Reaktionsgefäße eluiert. Anschließend wurde 10 min bei 12.000 g zentrifugiert, der Überstand in je 4 neue Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben (Pellet = Cellulose) und 0,15 vol% einer 2 M Na-Azetat-Lösung zugefügt. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde durch Zugabe von 100%igem Ethanol vollständig gefüllt und blieb bei -70°C mindestens 60 min stehen. Es wurde dann für 30 min erneut bei 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, 2 ml 75 % Ethanol in jedes Gefäß gegeben und gemixt. Danach erfolgte wiederum eine 30-minütige Zentrifugation bei 12.000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C im Trockenschrank getrocknet. Die gesamte erhaltene mRNA wurde in 20 µl Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

### 3.3.3.2 Isolierung von Ratten-mRNA

Da bei der Präparation der Rattenorgane gleichzeitig viele Proben anfielen, wurde es nötig, eine effizientere mRNA-Isolierungsmethode als die unter 3.3.3.1 beschriebene zu nutzen. Dies wurde durch Anwendung des mRNA Enrichment Kits (peqLab) möglich. 5 weibliche Wistar-Ratten im Alter von 6 Wochen wurden mit Urethan narkotisiert (3.3.6.2) und getötet. Gleich im Anschluß wurden die Tiere mit Krebs-Henseleit-Puffer (mit 0,1 % DEPC, autoklaviert) über einen in die Aorta eingeführten Katheder perfundiert. So sollte der Blutanteil und damit die Kontamination durch mRNA VON Carboanhydrase in den Organen gering gehalten werden. Anschließend wurden die Organe entnommen und die Hirnregionen präpariert. Sie wurden bei  $-50^{\circ}\text{C}$  in Methylbutan / Trockeneis eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zuerst wurde die Gesamt-RNA präpariert. Dazu wurden jeweils 0,5 g des Organes entnommen, aufgetaut und in Krebs-Henseleit-Puffer gespült. Der Puffer wurde entfernt, 8 ml Trizol hinzugegeben und mit dem Dispergiergerät (Ultra-Turrax T25) homogenisiert. Jeweils 2 ml des Homogenats wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, geschüttelt, bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 0,4 ml Chloroform dazugegeben. Nach kurzem Schütteln wurden die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur stengelassen und danach bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min zentrifugiert. Die weiteren Schritte des Waschens mit Isopropanol und Ethanol wurden wie in 3.3.3.1 durchgeführt. Die RNA wurde anschließend in 200  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die mRNA der Organe wurde aus der Gesamt-RNA mit dem mRNA-Enrichment-Kit (peqLab) präpariert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die gewonnene mRNA wurde in 10  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.3.3.3 RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit einem „RNA PCR Core Kit GeneAmp“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Die verwendeten Oligonucleotid-Primer (50 nmol) für humane Estronsulfatase und Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase (GAPDH) als Marker der DNA-Amplifikation wurden analog zu Pasqualini *et al.* (1994) gewählt. Alle weiteren Oligonucleotid-Primer (Tabelle 3-1) wurden

selbst mit dem Programm Oligo (Version 6, MedProbe) nach den Kriterien hoher Stringenztät und geringer Temperaturdifferenz ( $\Delta T < 0,5^\circ\text{C}$ ) ausgewählt. Sie wurden von der Firma Life Technologies GmbH synthetisiert.

Tabelle 3-1: Sequenzen der Oligonucleotid-Primer für die RT-PCR

Oligonucleotid-Primer	Spezies	Produktgröße [bp]	Bindungstemperatur [ $^\circ\text{C}$ ]	Sequenz: Sense und Antisense
GAPDH	Mensch, Ratte	762	53,7-61,4	TCCCATCACCATCTTCCA GTCCACCACCCTGTTGCT
ES	Mensch	355	60,0	GAAATCCTCAAAGTCATGCAGGAAG CCTCCAGTTGAGTAGCTGTTGAGCT
ES	Ratte	347	61,4	TTTCTCTGTGCTGCCCGTCTT ACAAGCCCGGTGGTGTAGCC
CA I	Mensch	350	56,0	TATTCTGCCGAGCTTCACGTA AGAAGGCTGCGGAATTGTG
CA I	Ratte	179	53,7	TGGCCTGGCAATCCTT TCAGAGAGCCAAAGTAGGTCC
CA II	Mensch	629	58,1	CGGACCTGAGCACTGGCATAA GCTCGCTGCTGACGCTGA T
CA II	Ratte	203	54,3	TGGTGATTTCAGATCCCGACT GGAGAAGCAAGAGGCCATATC

Zuerst wurde ein Mix aus 1  $\mu\text{l}$  Random Hexamers (2,5  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)<sub>16</sub>-Primer und 1  $\mu\text{l}$  mRNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) hergestellt, das PCR-System wurde mit folgenden Parametern gestartet:

Temperatur [ $^\circ\text{C}$ ]	Dauer [min]	Zweck
70	10	Streckung der RNA
4	5	Bildung von Knäulen

Anschließend erfolgte die reverse Transkription durch Zugabe von 17  $\mu\text{l}$  eines RT-Master-Mixes (4  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu\text{l}$  10facher PCR-Puffer, 1  $\mu\text{l}$  Wasser, je 2  $\mu\text{l}$  der Desoxyribonucleosid-Triphosphate dGTP, dATP, dTTP und dCTP, je 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor und reverse Transkriptase) und diesen Parametern:

Temperatur [ $^\circ\text{C}$ ]	Dauer [min]	Zweck
25	10	Oligo(dT) <sub>16</sub> -Primer legen sich an DNA an
42	60	Reverse Transkription
99	5	RNA wird gestreckt, evtl. Bindungen brechen auf, dsRNA-DNA getrennt
5	5	ssDNA bildet Knäuel

Für die eigentliche PCR wurden dem Ansatz 80 µl des PCR-Master-Mixes (6 µl MgCl<sub>2</sub>, 8 µl 10-facher PCR-Puffer, 61,5 µl Wasser, je 1 µl Sense- und Antisense-Primer (15 µM), 0,5 µl DNA-Polymerase Ampli Taq) zugegeben. Das PCR-Programm lief wie folgt ab:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zweck
95	15	DNA wird gestreckt
35 Zyklen folgender 3 Schritte:		
- 94	1	Denaturierung
- Primer-spezifisch	0,5	Oligonucleotid-Primer binden
- 72	1	Synthese des neuen Stranges durch Taq-Polymerase
72	30	Reparatur einzelner Fehler
4	dauerhaft	

### 3.3.3.4 Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch eine Elektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Dazu wurden 7,5 µl PCR-Produkt mit 1,5 µl DNA-Färbelösung (6-fach) gemischt und auf ein Gel aus 1%iger Agarose (2,5 g in 250 ml TAE; 12,5 µl Ethidiumbromid) aufgetragen. Außerdem wurde 9 µl DNA-Lösung (30 µl DNA-Leiter, 50 µl DNA-Färbelösung, 220 µl Wasser) als Größenstandard aufgetragen. Als Laufpuffer wurde TAE verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80 V über 90 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht angesehen und zur Dokumentation fotografiert.

### 3.3.4 Autoradiographie

Es wurden sowohl *In-vitro*- als auch *Ex-vivo*-Autoradiographie durchgeführt. Ziel der *In-vitro*-Autoradiographie war es, die Bindungseigenschaften von FESDS an die Estronsulfatase und an die Carboanhydrase in Organschnitten zu charakterisieren. Dazu wurden die Bindungskapazität (Anzahl der Bindungsstellen; B<sub>max</sub>) und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K<sub>d</sub>) bestimmt. Eine Methode zur Ermittlung von K<sub>d</sub> und B<sub>max</sub> sind Hemmungsexperimente, in denen bei gleichbleibend relativ niedriger Konzentration des Radioliganden (10<sup>-10</sup> M) steigende Konzentrationen an unmarkiertem Ligand eingesetzt werden. Dadurch verringert sich die spezifische Aktivität des Radioliganden. Dies kann in sigmoidalen Displacement-Kurven dargestellt werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte (Inhibitor-Konzentration, bei der 50% der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt sind) wurden mit Prism 3.0 berechnet.

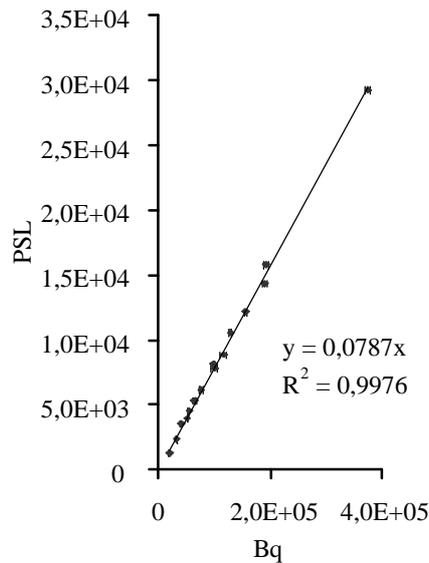
Der erhaltene  $IC_{50}$ -Wert steht in engem Zusammenhang mit der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Inhibitors ( $K_i$ ). Der  $K_i$ -Wert kann nach Cheng und Prusoff (1973) berechnet werden, wobei  $[L]$  der Konzentration des freien Liganden entspricht:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(1 + [L] / K_d)}$$

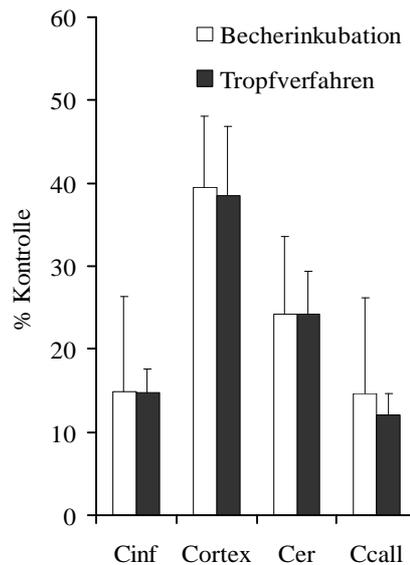
Für die Gewinnung der Organschnitte wurden 5 weibliche Wistar-Ratten im Alter von 6 Wochen mit Urethan narkotisiert (3.3.6.2), getötet und mit jeweils 30-50 ml Krebs-Henseleit-Puffer über die Aorta perfundiert. Dadurch wurde der Blutanteil in den Organen vermindert. Von Nacktmäusen wurden Tumore (MCF-7, FaDu) gewonnen sowie Hirne von 3 Monate alten Schweinen. Die Organe wurden entnommen und bei  $-50^\circ\text{C}$  in Methylbutan / Trockeneis eingefroren und bis zum Schneiden bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Es wurden 20  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte verblieben nach dem Schneiden für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) zum Trocknen. Sie wurden dann bis zur Durchführung des Experiments bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Kurz vor Beginn des Experimentes wurden die Schnitte bei RT aufgetaut. Danach erfolgte eine 20-minütige Vorinkubation in  $\text{PBS}^+$  mit 5 g/l BSA (pH 7,4) bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Inkubation der Schnitte mit dem Radiotracer erfolgte bei  $25^\circ\text{C}$  für 60 min. Der Inkubationspuffer enthielt  $\text{PBS}^+$  mit 5 g/l BSA (pH 7,4), ca.  $10^{-10}$  M  $[^{18}\text{F}]\text{FESDS}$  und  $10^{-10}$ – $10^{-4}$  M Inhibitoren. Nach der Inkubation wurde 4-mal in  $\text{PBS}^+$  mit 5 g/l BSA und 2-mal in  $\text{PBS}^+$  für je 1 min bei  $4^\circ\text{C}$  gewaschen. Als Aktivitäts-Standards wurden auf die Objektträger 1-10  $\mu\text{l}$  der Inkubationslösung aufgetropft. Alle Objektträger wurden nach ihrer Trocknung mit einer Bildplatte (BAS MP 2040) für 30 min exponiert. Danach wurde die Bildplatte im digitalen Radioluminografiegerät (BAS 2000) mit Laserabtastung abgelesen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Aida 2.11 (Raytest). Die Software erlaubt es, beliebige Regionen (ROIs) zu definieren, in denen die Radiolumineszenz bestimmt wird.

Es wurde untersucht, in welchem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Radioaktivität (in Bq) und der gemessenen photostimulierten Lumineszenz (PSL) besteht. In Abb. 3-7 ist zu sehen, dass eine Linearität der Abhängigkeit bis mindestens  $4 \cdot 10^5$  Bq besteht. Auf Grundlage dieses linearen Zusammenhanges können die mit Aida ermittelten PSL in die Maßeinheit Bq umgerechnet werden. Die Aktivität der Standardlösung wurde zuvor mit dem Kalibrator ermittelt.

Zu Beginn der Arbeiten wurden die Inkubationen in 350 ml fassenden Plastikgefäßen durchgeführt, wobei die Schnitte 60 min vertikal darin eingetaucht verblieben. Später wurde ein anderes Verfahren entwickelt, um den Einsatz von FESDS, [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS und Puffer zu minimieren. Dabei wurden die Objektträger waagrecht in eine Plastikwanne gelegt und pro Objektträger 1 ml Inkubationspuffer aufgetropft. Abb. 3-8 zeigt, dass die Ergebnisse beider Methoden vergleichbar sind.



**Abb. 3-7:** Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen photostimulierter Lumineszenz (PSL) und Radioaktivität (Bq) ( $n = 6$ )



**Abb. 3-8:** Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS/10  $\mu\text{M}$  FESDS bei Becherinkubation und Tropfverfahren am Rattenhirn ( $n = 4$ ), Abk. s. Abkürzungsverzeichnis.

Bei der *Ex-vivo*-Autoradiographie sollte die Anreicherung der Aktivität in den Substrukturen von Organen untersucht werden. Dazu wurden von den aus den Tierversuchen präparierten Organen Hirn und Leber sowie von den MCF-7-Tumoren Gefrierschnitte angefertigt. Es wurde wie oben beschrieben vorgegangen, d.h. die 20  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte auf Objektträgern wurden ebenfalls mit der Bildplatte BAS MP 2050 für 30 min exponiert und anschließend gescannt. Die erhaltenen  $\text{Bq}/\text{mm}^2$  wurden durch einen Faktor, der aus den Tierversuchsdaten hervorgeht, in % ID/g umgerechnet.

### Färbung der Organschnitte

Ein Teil der für die Autoradiografie verwendeten Gewebeschnitte wurde zur genauen histologischen Zuordnung der ROIs zu den Organregionen nach Papanicolaou gefärbt (Burck, 1988). Dabei wurden die Zellkerne blau und das Plasma azidophiler Zellen rosa bzw. das Plasma basophiler Zellen blaugrün dargestellt. Es wurde mit Papanicolaous Färbelösung 1a, 2a und 3a nacheinander für je 2 min gefärbt, in steigenden Ethanolkonzentrationen (2-mal 96%ig,

1-mal 100%ig) und Rotihistol für jeweils 1 min dehydratisiert. Zur Konservierung wurden die gefärbten Schnitte mit einem Tropfen Rothi-Histokitt und einem Deckgläschen versehen.

Die Hirnschnitte wurden nach Nissl mit Kresylechtviolett gefärbt (Paxinos und Watson, 1986). Zur Bereitung einer 0,5%igen Kresylviolett-Lösung (pH 3,9) wurden folgende Komponenten gemischt: 2,5 g Kresylechtviolett; 300 ml Aqua dest.; 30 ml 1,0 M Natriumazetat; 170 ml 1,0 M Essigsäure. Diese Lösungen wurden zusammen in eine Flasche gegeben und für mindestens 7 Tage mit einem Magnetrührer gerührt. Vor Gebrauch wurde die Kresylviolett-Lösung durch einen Papierfilter filtriert.

### 3.3.5 Messung der Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in Zellen

Mit den Aufnahmeexperimenten sollte geprüft werden, ob eine Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an die Estronsulfatase *in vitro* nachweisbar ist. Dieser Versuchsansatz liefert ein Ergebnis, das die Kombination aus Transport und Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS sowie deren Beeinflussung durch Inhibitoren darstellt. Es wurden die humanen Tumorzellen MCF-7, T-47D, HepG2 und FaDU verwendet, die in 24-Loch-Platten bis zur Konfluenz gewachsen waren (3.3.1). Das Nährmedium wurde abgesaugt und durch frisches Nährmedium (evl. mit  $10^{-4}$  M Azetazolamid zur Hemmung der Carboanhydrase) ersetzt. Diese Vorinkubation dauerte 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem mit  $\text{CO}_2$  begasten (5 %  $\text{CO}_2$ ) Brutschrank.

Danach wurde das Medium abgesaugt und ein Inkubationsmedium aus Nährmedium (pH 7,4; 40 mM HEPES), 0,1-3,0 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS/ml und  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M Inhibitoren zugegeben. Bei den Inhibitoren der ES handelte es sich FESDS, Quercetin, Naringin und Danazol, bei den Inhibitoren der CA um Azetazolamid, Benzolamid und Ethoxazolamid. Bei Quercetin und Naringin wurde der Lösung 0,5 mM EDTA zusetzt. In einem Vorversuch konnte bestätigt werden, dass EDTA wie von Boulton *et al.* (1999) beschrieben, die Hemmung durch Quercetin signifikant verbessert (38 % stärkere Hemmung bei MCF-7-Zellen). Die Inkubation erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank und dauerte 60 min. Danach wurden die 24-Loch-Platten auf Eis gesetzt und die Zellen 4-mal mit eiskaltem  $\text{PBS}^+$  gespült. Anschließend wurden pro Loch 500  $\mu\text{l}$  Lowry-Reagenz zur Lyse der Zellen hinzugegeben. Die Platten wurden 30 min bei 200 rpm geschüttelt. 350  $\mu\text{l}$  der lysierten Zellen diente der Aktivitätsmessung im  $\gamma$ -Strahlungsmeßgerät. Von der übrigen Lösung wurde der Proteingehalt der Zellen bestimmt (3.3.2.1).

### 3.3.6 Tierversuche

#### 3.3.6.1 Tumortransplantation

Die Prüfung der Tumoranreicherung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS erfolgte an tumortragenden Nacktmäusen (3.3.6.2). Diese stellte das Universitätsklinikum Carl-Gustav Carus, Klinik für Strahlentherapie bereit. Es wurden 7–14 Wochen alte weibliche Nacktmäuse mit einer Dosis von 4 Gy ganzkörperbestrahlt und anschließend 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension (=  $10^7$  Zellen in Hank's BSS) ohne Narkose subcutan in die Axilla injiziert.

Da das Wachstum von MCF-7-Tumoren hormonabhängig erfolgt (James *et al.*, 2001), waren zusätzliche Estradiolgaben von 0,5 mg/kg  $\cdot$  Woche  $\beta$ -Estradiolbenzoat (Kubota *et al.*, 1983) nötig. Dazu wurde 3-mal pro Woche eine entsprechende Dosis in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Erdnußöl in die Nähe des Tumors subcutan injiziert. Nach einer Zeit von 3-4 Wochen hatten die Tumoren einen Durchmesser von 7-10 mm erreicht. Die HepG2-Tumoren wurden ebenso durch Spritzen von Zellen in die Axilla gewonnen und unmittelbar für die entsprechenden Versuche (3.3.6.2) eingesetzt.

Die FaDu-Tumoren wurden nunmehr aus der Axilla der Spendertiere entnommen, geteilt und auf Rücken von neuen Empfängertieren verpflanzt. Nachdem diese Tumoren einen Durchmesser von 10 mm erreicht hatten, wurden sie nochmals geteilt und in kleinen Stückchen subcutan auf je einen Oberschenkel neuer Empfängertiere verpflanzt. Nicht verwendete Reste wurden eingefroren und gegebenenfalls später transplantiert. Nachdem die FaDu-Tumoren 10 mm Durchmesser erreicht hatten, wurden die Tiere für die entsprechenden Untersuchungen (3.3.6.2) verwendet.

#### 3.3.6.2 *In-vivo*-Tracerverteilung

Anhand von Tierversuchen sollte die *In-vivo*-Verteilung des Radiotracers ermittelt werden. Die Experimente wurden an weiblichen Wistar-Ratten und tumortragenden Nacktmäusen durchgeführt. Die Versuche waren nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes behördlich genehmigt. Die Tiere wurden vor dem Experiment über Nacht ohne Futter gehalten. Pro Gruppe wurden 5 Tiere verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die 6 Wochen alten und ca. 200 g schweren Ratten durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Urethan (0,6 g/ml) narkotisiert. Die 7–14 Wochen alten und ca. 30 g schweren Mäuse wurden leicht mit Ether narkoti-

sirt und anschließend wurde intravenös (i.v.) eine Dosis von 2,5–5,0 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS pro Tier injiziert. Das applizierte Volumen betrug 0,5 ml bei Ratten und 0,2 ml bei Mäusen, wobei der Gesamt-Ethanolgehalt der Injektionslösung 2 % betrug. Für Hemmexperimente an Ratten wurde der Inhibitor (in 60 % DMSO/ physiologische Kochsalzlösung) in einem Volumen von 0,2 ml 10 min vor dem Tracer i.v. injiziert. Folgende Inhibitoren wurden jeweils in einer Dosis von 5 mg/kg verwendet: Azetazolamid, Ethoxazolamid, Quercetin, Naringin und FESDS. Die Injektion der Inhibitoren (0,1 ml) bei den Mäusen erfolgte zeitgleich mit dem Tracer. Während des gesamten Versuches lagen die Tiere zur Konstanthaltung der Körpertemperatur auf einer Wärmedecke.

Die Tiere wurden 5 bzw. 60 min nach Tracer-Injektion mit Ether getötet und die Organe entnommen. Es wurden dabei Tumoren (bei Mäusen), Blut, 6 Hirnregionen (Cerebellum, Colliculi, Cortex, Thalamus, Striatum, Pons), Hypophyse, Ovar, Uterus, Pankreas, Milz, Nebenniere, Niere, Fettgewebe, Muskel, Herz, Lunge, Thymus (außer bei Mäusen), Leber, Femur und Därme präpariert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Masse (M) und der enthaltenen Radioaktivität (R). Zur Bestimmung der injizierten Dosis (ID) wurden Aliquots der Injektionslösung (100  $\mu\text{l}$ ) und die in den Spritzen verbliebene Restaktivität gemessen. Die Ergebnisse wurden als Prozent der injizierten Dosis (D) pro Gramm Gewebe berechnet:

$$\% \text{ ID/g} = \frac{R_{\text{Organ}} [\text{cpm}]}{\text{ID} [\text{cpm}] \cdot M [\text{g}]} \cdot 100 \%$$

### 3.3.6.3 Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in Erythrocyten

In den Tierversuchen wurde gezeigt, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS besonders im Blut gebunden wird. In Bindungsexperimenten sollte die Kinetik der Bindung des Radiotracers an Erythrocyten bestimmt werden. Dazu wurde 0,5 ml heparinisiertes frisches Humanblut bei 37°C mit 0,05 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Thermoschüttler inkubiert (0–30 min). Anschließend wurde 5-mal in isotonischer Kochsalzlösung gewaschen, bei 200 g zentrifugiert und die Radioaktivität aller Überstände ( $R_{\text{Ü}}$ ) und der Erythrocyten ( $R_{\text{Ery}}$ ) mit der Cobra gemessen. Es wurde die prozentual in den Erythrocyten akkumulierte Aktivität (A) nach dieser Gleichung berechnet:

$$A [\%] = \frac{R_{\text{Ery}} [\text{cpm}]}{\sum_1^5 R_{\text{Ü}} [\text{cpm}] + R_{\text{Ery}} [\text{cpm}]} \cdot 100 \%$$

#### 3.3.6.4 Positronen-Emissions-Tomographie

Der Radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS sollte auf sein Potential der Tumordarstellung mit Positronen-Emissions-Tomographie untersucht werden. Dazu wurde zwei anästhesierten weiblichen Ratten je 5 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS i.v. injiziert. Um die Carboanhydrase zu hemmen, und damit die Estronsulfatase selektiv darstellen zu können, wurde einer der Ratten zusätzlich zum Tracer 5 mg/kg Azetazolamid zeitgleich i.v. injiziert.

Für Studien an Ferkeln wurden 6-Wochen-alte weibliche Tiere verwendet. Die beiden Tiere wogen 13 und 15 kg und standen unter Narkose (0,5 % Isofluran in einem Gasgemisch von 70 %  $\text{NO}_2$  / 30 %  $\text{O}_2$  über einen endotracheale Schlauch mit volumengeregeltem Ventilator). Pancuronium wurde mit einer Rate von 0,3 mg/kg/h zugeführt. Die Blutgase, das ausgeatmete  $\text{CO}_2$  und die Körpertemperatur wurden ständig kontrolliert. Ca. 490 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wurde in die linke Vena jugularis injiziert (Dauer: 2 min). Der PET-Scan wurde simultan mit der Injektion gestartet. Das 2. Ferkel erhielt 24 min später eine zusätzliche i.v.-Injektion von Azetazolamid (5 mg/kg). Die PET-Aufnahme (35 dynamische Bilder von 0,5-10 min Länge bei einer Gesamtlänge von 120 min) wurde an einem ECAT EXACT HR+ Scanner mit einer transaxialen Auflösung von 4-5 mm aufgenommen. Die Rekonstruktion wurde nach einem Standardprotokoll mit einem Hanning-Filter und einer cutoff-Frequenz von 0,5 durchgeführt. Für die Schwächungskorrektur wurde ein Transmissions-Scan mit 3 rotierenden  $^{68}\text{Ge}$ -Punktquellen durchgeführt. Während des PET-Scans wurden arteriell Blutproben entnommen. Dies geschah zu definierten Zeitpunkten mit dem Start der Radiotracer-Infusion und in Intervallen zwischen 15 s und 30 min. Die Proben wurden sofort auf Eis gebracht, zentrifugiert und das Plasma im  $\gamma$ -Strahlungsmeßgerät Cobra gemessen.

#### 3.3.6.5 Metaboliten-Analytik von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS

Zur Prüfung der *In-vivo*-Stabilität von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wurden analytische Untersuchungen an venösem Blut und Urin von Ratten und tumortragenden Nacktmäusen (MCF-7) durchgeführt. Die zur Anwendung gekommenen Analysenmethoden waren HPLC und Dünnschicht-Chromatographie. 400  $\mu\text{l}$  Plasma- und Urinproben wurden mit je 300  $\mu\text{l}$  Fällungsreagenz (3.2.9) gefällt.

Für die Ratten- und Maus-Metaboliten wurden unterschiedliche HPLC-Systeme verwendet. Bei den Ratten-Metaboliten wurde die Säule ET 125/4 Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub> (Größe 4,0 mm · 125 mm, Porengröße 5 µm) verwendet. Der Gradient des Elutionsmittels war folgender:

0-10 min	20 % Ethanol
10-13 min	20-100 % Ethanol
13-15 min	20 % Ethanol

Die Trennung der Plasmaproben der Mäuse erfolgte an einer Zobrax-Eclipse-XDB-C<sub>18</sub>-Säule (Größe 4,6 mm · 75 mm, Porengröße 5 µm) mit folgendem Gradienten:

0-3 min	5 % Acetonitril
3-12 min	5-70 % Acetonitril
12-15 min	70-90 % Acetonitril

Für die Dünnschichtanalytik wurden Alufolie-Kieselgel-60-Platten verwendet. Von den Proben wurden jeweils 2 µl aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit Petrolether / Ethylacetat (1:1). Nach Trocknung wurden die Dünnschichtplatten auf einer Bildplatte (BAS MP 2040) für 30 min exponiert. Danach wurden die Bildplatten im digitalen Radioluminografiergerät (BAS 2000) durch Laserabtastung gescannt. Der R<sub>f</sub>-Wert wurde aus dem Verhältnis zwischen der Laufstrecke des Laufmittels und der Laufstrecke der Proben berechnet.

### 3.3.7 Statistik

Von den Messwerten wurden arithmetische Mittelwerte (n = 3-6) und deren Standardabweichung ermittelt. Anhand des Student's T-Test wurde die Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P) berechnet. Es lag Signifikanz bei P < 0,05 vor, wobei folgende Abstufungen galten: P < 0,05 (\*); P < 0,01 (\*\*); P < 0,001 (\*\*\*)

## HAUPTTEIL

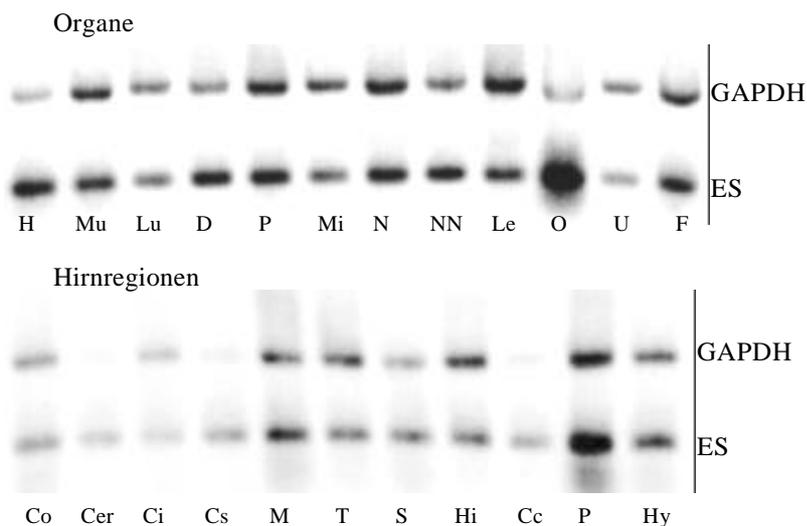
### 4 Ergebnisse

#### 4.1 FESDS - ein Inhibitor der Estronsulfatase

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS zur *In-vivo*-Darstellung des Enzyms Estronsulfatase (ES) und damit ein für onkologische Fragestellungen geeigneter Tracer für die Positronen-Emissions-Tomographie ist. Es wurde geprüft, ob die in der Einleitung genannten Kriterien von Eckelman und Gibson (1993) von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS erfüllt werden. Die dazu erforderlichen Arbeiten wurden hauptsächlich an humanen Tumorzellen, Ratten und Mäusen durchgeführt. Zur Beurteilung der Radiotracerverteilung *in vivo* ist es notwendig, die Expression und Enzymaktivität der ES in verschiedenen Zellen und Geweben zu kennen. Dazu wurden entsprechende molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen durchgeführt.

##### 4.1.1 Expression der Estronsulfatase in verschiedenen Organen der Ratte

Die Expression der Messenger-RNA (mRNA) der Estronsulfatase in den Rattenorganen wurde mit RT-PCR nachgewiesen. Da mRNA als Matrize dient, ist vor der eigentlichen PCR eine reverse Transkription (RT) nötig, die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umschreibt. Zusätzlich zu der mRNA der ES wird die mRNA des ubiquitären Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz amplifiziert. Wie Abb. 4-1 zeigt, wird die mRNA der ES in allen untersuchten Rattenorganen (Herz, Muskel, Lunge, Darm, Pankreas, Milz, Niere, Nebenniere, Leber, Ovar, Uterus, Fett) und Hirnregionen (Cortex, Cerebellum, Colliculi inferiores, Colliculi superiores, Mesencephalon, Thalamus, Striatum, Hippocampus, Corpus callosum, Pons, weibliche und männliche Hypophyse) exprimiert. Obwohl mit der gewählten Methode keine quantitativen Aussagen getroffen werden können, so scheint dennoch im Ovar eine deutlich stärkere Expression der ES als in den übrigen Organen vorzuliegen. Das kommt dadurch zum Ausdruck, dass die ES-Bande beim Ovar sehr viel dicker als die GAPDH-Bande ist, was bei den anderen Organen nicht der Fall ist. Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität (4.1.2) bestätigt dies im übrigen nicht. Das Ovar hat zwar eine hohe, aber nicht die höchste ES-Aktivität.



**Abb. 4-1:** Agarose-Gelelektrophorese der mit RT-PCR amplifizierten mRNA von Estronsulfatase (ES) an Organen (oben) und Hirnregionen (unten) der weiblichen Wistar-Ratte. PCR-Bedingungen: 1 min Denaturierung (94,0°C), 0,5 min Primerbindung (61,4°C) und 1 min DNA-Synthese (72,0°C) in 35 Zyklen.

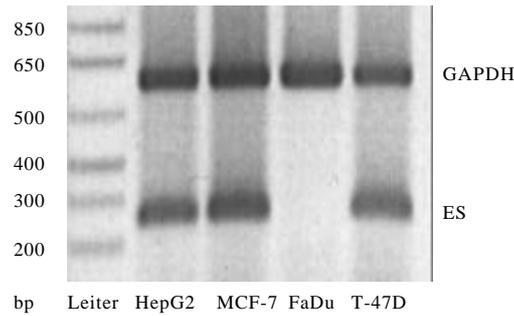
Organe von links nach rechts: Herz, Muskel, Lunge, Darm, Pankreas, Milz, Niere, Nebenniere, Leber, Ovar, Uterus, Fett.

Hirnregionen von links nach rechts: Cortex, Cerebellum, Colliculi inferiores, Colliculi superiores, Mesencephalon, Thalamus, Striatum, Hippocampus, Corpus callosum, Pons, Hypophyse.

#### 4.1.2 Expression der Estronsulfatase in humanen Tumorzellen

Es ist bekannt, dass in den humanen Tumorzellen MCF-7 (Mammakarzinom) und T-47D (Mammakarzinom, Metastase) Estronsulfatase vorkommt (Pasqualini *et al.*, 1994). Aus diesem Grund sind die beiden Zelllinien eine Positivkontrolle für die Expression der mRNA der ES. Bei den HepG2-Zellen (Hepatozelluläres Karzinom) ist es sehr wahrscheinlich, dass die ES exprimiert ist, da die ES auch in der gesunden humanen Leber nachgewiesen wurde (Huang *et al.*, 1997). Für FaDu-Zellen (Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx) konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden.

Zur Untersuchung der mRNA-Expression von Estronsulfatase in den humanen Tumorzelllinien MCF-7, T-47D, HepG2 und FaDu wurde eine RT-PCR durchgeführt. In Abb. 4-2 ist zu sehen, dass die mRNA des Enzyms ES in den MCF-7-, T-47D- und HepG2-Zellen exprimiert ist, nicht jedoch in den FaDu-Zellen. Aufgrund des Fehlens von mRNA der ES bei den FaDu-Zellen besteht die Möglichkeit, diese Zellen als Negativkontrolle zu nutzen.



**Abb. 4-2:** Agarose-Gelelektrophorese der mit RT-PCR amplifizierten mRNA von Estronsulfatase (ES) an humanen Tumorzellen. PCR-Bedingungen: 1 min Denaturierung (94,0°C), 0,5 min Primerbindung (60,0°C) und 1 min DNA-Synthese (72,0°C) in 35 Zyklen

#### 4.1.3 Messung der Estronsulfatase in Gewebs- und Zellhomogenaten

In den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 wurde das Vorkommen der mRNA der ES in allen Rattenorganen und den meisten Zellen durch RT-PCR nachgewiesen. Es ist erforderlich, die Enzymaktivität in diesen Organen und Zellen quantitativ zu bestimmen. Dies erfolgte mit einem Assay von Reed und Ohno (1976), bei dem die Spaltung des Substrates [<sup>3</sup>H]Estronsulfat gemessen wird (3.3.2.2).

Tabelle 4-1: Aktivität der Estronsulfatase in Organ-Homogenaten von 6 Wochen alten weiblichen Wistar-Ratten (n = 6)

Organ	ES-Aktivität [pmol/mg Protein/min]
Herz	51,1 ± 5
Lunge	93,6 ± 15
Leber	92,8 ± 9
Darm	63,1 ± 1
Milz	35,6 ± 2
Pankreas	48,1 ± 5
Nebenniere	211,4 ± 51
Niere	21,9 ± 13
Ovar	349,1 ± 1
Uterus	416,5 ± 85
Fett	281,0 ± 1
Muskel	52,3 ± 9

Bedingung des ES-Assays: 925 Bq [<sup>3</sup>H]Estronsulfat in 4 µM Estronsulfat, 37°C, 3 min

Tabelle 4-1 zeigt, dass bei 6 Wochen alten weiblichen Wistar-Ratten die höchsten ES-Aktivitäten im Ovar und Uterus (349 und 417 pmol/mg Protein/min) auftreten, gefolgt von Fett mit 281 pmol/mg Protein/min und Nebenniere mit 211 pmol/mg Protein/min. Niere und Milz weisen mit 21,9 und 35,6 pmol/mg Protein/min eine ca. 10-fach geringere ES-Aktivität auf.

Die Estronsulfatase-Aktivität wurde zusätzlich in verschiedenen Hirnregionen der Ratte bestimmt. Mit Ausnahme der Hypophyse wurden Homogenate weiblicher Tiere verwendet, da die Erkrankung Mammakarzinom fast ausschließlich ein weibliches Problem darstellt. Wie aus Tabelle 4-2 ersichtlich ist, haben Striatum, Mesencephalon, Corpus callosum sowie Hippocampus hohe ES-Aktivitäten (zwischen 266 und 372 pmol/mg Protein/min). Die höchste ES-Aktivität wurde jedoch in der männlichen Hypophyse gemessen: 2667 pmol/mg Protein/min; sie ist damit 14-fach höher als die der weiblichen Hypophyse.

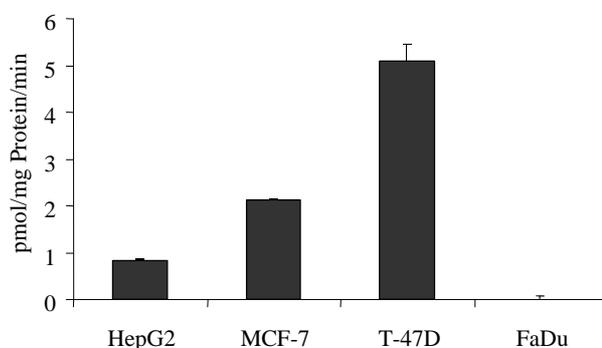
Tabelle 4-2: Aktivität der Estronsulfatase (ES) in Homogenaten verschiedener Regionen des Hirns von 6 Wochen alten weiblichen Wistar-Ratten (n = 6)

Hirnregion	ES-Aktivität [pmol/mg Protein/min]
Cortex	50,1 ± 6
Corpus callosum	368,9 ± 90
Hippocampus	372,0 ± 44
Striatum	265,7 ± 62
Thalamus	162,3 ± 51
Colliculi superiores	239,3 ± 104
Mesencephalon	310,5 ± 117
Colliculi inferiores	47,7 ± 10
Cerebellum	36,7 ± 13
Pons	25,6 ± 8
Hypophyse, weiblich	195,7 ± 19
Hypophyse, männlich	2666,7 ± 95

Bedingung des ES-Assays: 925 Bq [<sup>3</sup>H]Estronsulfat in 4 µM Estronsulfat, 37°C, 3 min

In Abb. 4-3 ist gezeigt, dass die ES-Aktivität der untersuchten humanen Tumorzellen generell sehr niedrig ist. Die beiden Zelllinien MCF-7 und T-47D wurden aus Mammakarzinomen isoliert, wobei die MCF-7-Zellen aus einem Primärtumor und die T-47D-Zellen aus einer Metastase stammen. Mit 5,1 pmol/mg Protein/min haben die T-47D-Zellen eine 2,4-fach höhere

ES-Aktivität als die MCF-7-Zellen (2,12 pmol/mg Protein/min). Die ES-Aktivität der HepG2-Zellen beträgt 0,82 pmol/mg Protein/min. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der RT-PCR (4.1.2) konnte bei den FaDu-Zellen keine Estronsulfatase-Aktivität gemessen werden.



**Abb. 4-3:** Aktivität der Estronsulfatase in Homogenaten verschiedener humaner Tumorzellen (n = 6). Die Ordinate zeigt die Menge an gebildetem Toluol-löslichem Produkt, bezogen auf die Proteinmenge. Bedingung des ES-Assays: 925 Bq [<sup>3</sup>H]Estronsulfat in 4 µM Estronsulfat, 37°C, 3 min.

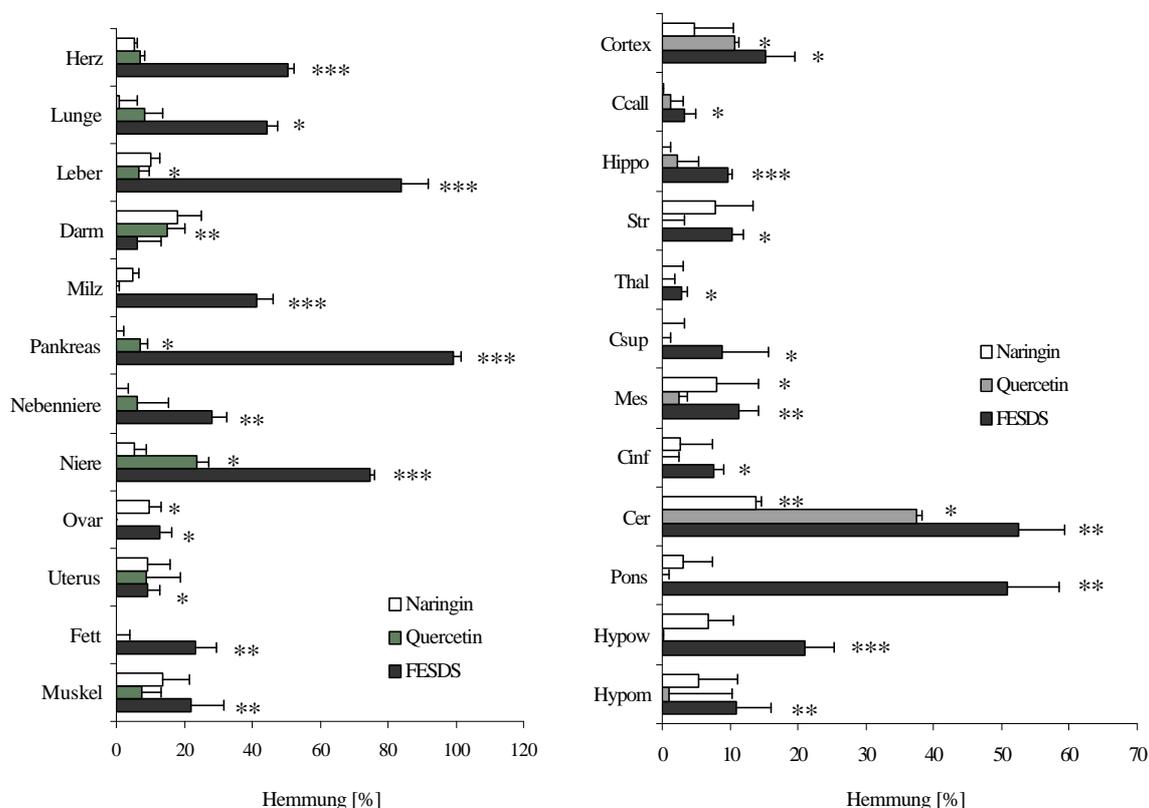
#### 4.1.4 Hemmung der Estronsulfatase durch FESDS und andere Substanzen

Zum Nachweis der spezifischen Bindung von FESDS an das Enzym Estronsulfatase können entsprechende Hemmstoffe dienen. Dazu wurden die bekannten ES-Inhibitoren Quercetin, Naringin und Danazol in Bezug auf ihre Hemmwirkung mit FESDS verglichen.

Abb. 4-4 zeigt die prozentuale Hemmung der ES in ausgewählten Rattenorganen und Hirnstrukturen, die durch Naringin, Quercetin und FESDS in der eingesetzten Konzentration von 10 µM ausgelöst wird. FESDS hemmt die Estronsulfatase zu 99 % im Pankreas und zu 84 % in der Leber, aber nur zu 6 % im Darm. Bei den Hirnregionen beträgt die Inhibition durch FESDS 52 % im Cerebellum und 51 % im Pons, im Thalamus lediglich 3 %. Für die jeweiligen Organe und Hirnregionen ist mit Ausnahme des Darmes die Inhibition durch FESDS am stärksten. Im Darm beträgt die Hemmung durch Naringin und Quercetin 15 % und 18 % gegenüber 3 % durch FESDS. Die Flavonoide weisen in den meisten Fällen keine signifikante Hemmung auf. Lediglich in der Niere hemmt Quercetin die Estronsulfatase zu 24 %, im Cerebellum zu 38 % und Naringin im Cerebellum zu 14 %.

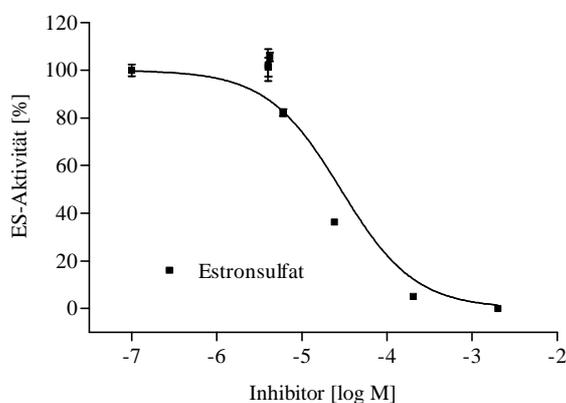
An der männlichen Hypophyse, die von allen gemessenen Organen die höchste ES-Aktivität hat (4.1.3), wurde der IC<sub>50</sub>-Wert der Hemmung durch das Enzymsubstrat Estronsulfat be-

stimmt. Der  $IC_{50}$ -Wert entspricht der Inhibitor-Konzentration, bei der 50 % der spezifischen Bindung des Radiotracers gehemmt sind und beträgt  $28,6 \pm 1 \mu\text{M}$  (Abb. 4-5).



**Abb. 4-4:** Hemmung der Estronsulfatase in ausgewählten Organen und Hirnregionen von weiblichen Wistar-Ratten ( $n = 6$ ) durch Naringin, Quercetin und FESDS (je  $10 \mu\text{M}$ ). Bedingung des ES-Assays:  $925 \text{ Bq } [^3\text{H}]\text{Estronsulfat}$  in  $4 \mu\text{M}$  Estronsulfat,  $37^\circ\text{C}$ , 3 min. Signifikanz gegenüber der ungehemmten Probe:  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) und  $P < 0,001$  (\*\*\*)

Abkürzungen der Hirnregionen: Ccall – Corpus callosum, Hippo – Hippocampus, Str – Striatum, Thal – Thalamus, Csup – Colliculi superiores, Mes – Mesencephalon, Cinf - Colliculi inferiores, Cer – Cerebellum, Hypow - weibliche Hypophyse, Hypom – männliche Hypophyse.



**Abb. 4-5:** Hemmung der ES-Aktivität in Homogenaten männlicher Rattenhypophyse durch Estronsulfat. Bedingung des ES-Assays:  $925 \text{ Bq } [^3\text{H}]\text{Estronsulfat}$  in  $4 \mu\text{M}$  Estronsulfat,  $37^\circ\text{C}$ , 3 min.

An Homogenaten humaner Tumorzellen wurden  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung durch Naringin, Quercetin und Danazol bestimmt. Tabelle 4-3 zeigt, dass Danazol mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 50  $\mu$ M (HepG2-Zellen) und 86  $\mu$ M (MCF-7-Zellen) die ES stark hemmt. Quercetin erwies sich wiederum an HepG2-Zellen als sehr guter Inhibitor ( $IC_{50} = 27,8 \mu$ M), hat allerdings bei den beiden anderen Zelllinien eine deutlich geringere Hemmwirkung. Naringin ist bei allen drei Zelllinien der schwächste ES-Inhibitor.

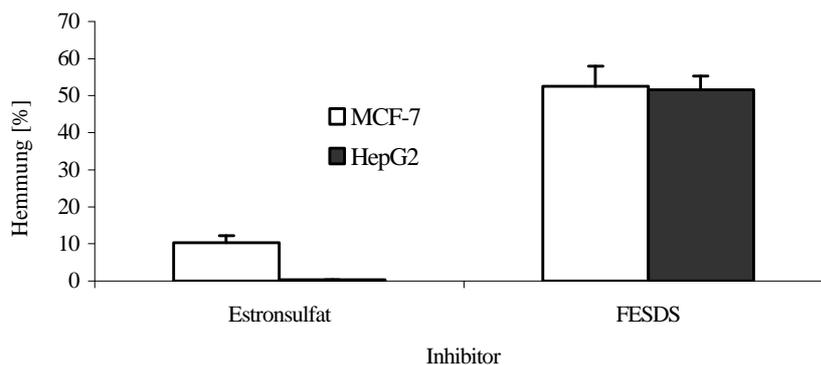
Tabelle 4-3:  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu$ M) der Hemmung der ES in Homogenaten humaner Tumorzellen (n = 3)

Inhibitor	MCF-7	T-47D	HepG2
Naringin	721 $\pm$ 48	405 $\pm$ 34	626 $\pm$ 37
Quercetin	346 $\pm$ 27	132 $\pm$ 6	28 $\pm$ 2
Danazol	86 $\pm$ 12	88 $\pm$ 8	50 $\pm$ 4

Bedingung des ES-Assays: 925 Bq [ $^3$ H]Estronsulfat in 4  $\mu$ M Estronsulfat, 37°C, 3 min

#### 4.1.5 Aufnahme und Bindung von [ $^{18}$ F]FESDS an Tumorzellen und Gewebeschnitten

Die Expression von Estronsulfatase in Zellen und Geweben sowie die deutliche Hemmbarkeit des Enzyms durch FESDS lassen vermuten, dass der Radiotracer [ $^{18}$ F]FESDS spezifisch an die ES bindet. Um weitere Hinweise für eine solche spezifische Bindung zu erhalten, wurden Zellen und Gewebeschnitte mit [ $^{18}$ F]FESDS inkubiert und Verdrängungs-Experimente mit ES-Inhibitoren durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass bei dem gewählten experimentellen Ansatz eine strenge Unterscheidung zwischen aufgenommener und an die ES gebundener Aktivität nicht zu treffen ist. Es wurde an konfluenten humanen Tumorzellen geprüft, ob FESDS und Estronsulfat in einer Konzentration von 5  $\mu$ M die Aufnahme von [ $^{18}$ F]FESDS in die Zellen hemmen. Die in Abb. 4-6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung mit 52 % bei den MCF-7- und HepG2-Zellen am stärksten durch FESDS erfolgt. Estronsulfat hemmt die Traceraufnahme in die HepG2-Zellen nicht und die in die MCF-7-Zellen lediglich zu 10,4 %.



**Abb. 4-6:** Hemmung der Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in konfluente Tumorzellen durch 5  $\mu\text{M}$  FESDS bzw. Estronsulfat ( $n = 4$ ). Bedingungen der Zellaufnahme: 1,0 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ , 60 min.

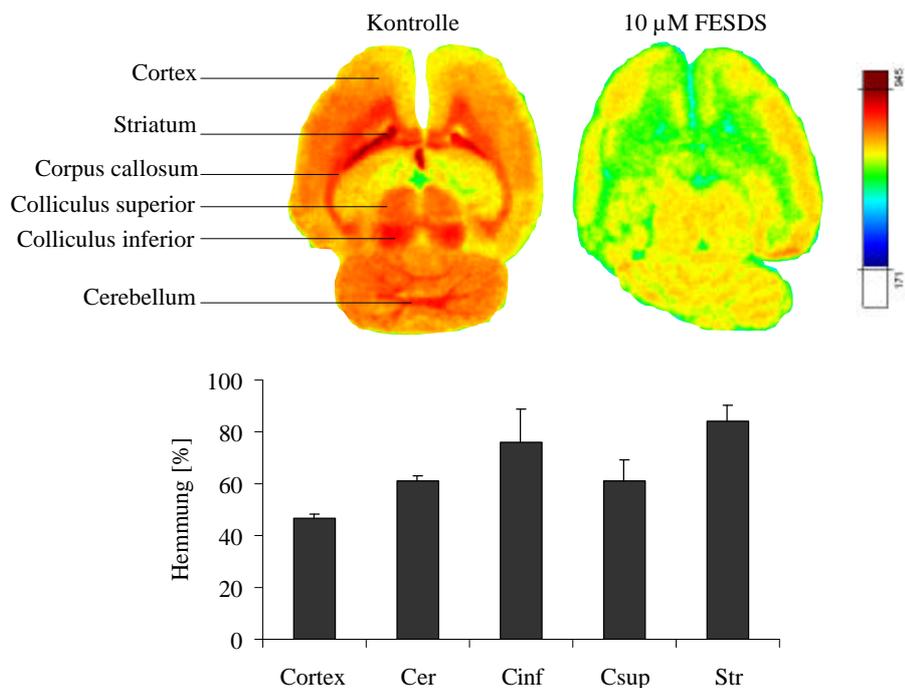
Zusätzlich wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Hemmung der Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS durch FESDS und Estronsulfat bestimmt. Wie Tabelle 4-4 zeigt, wirkt FESDS mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten um 100 nM sowohl an MCF-7- als auch an HepG2-Zellen stärker inhibitorisch als Estronsulfat.

Tabelle 4-4: Hemmung der Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in konfluente humane Tumorzellen ( $n = 4$ )

Inhibitor	MCF-7 $\text{IC}_{50}$ [nM]	HepG2 $\text{IC}_{50}$ [nM]
Estronsulfat	1898 $\pm$ 55	7012 $\pm$ 350
FESDS	108 $\pm$ 2	104 $\pm$ 1

Bedingungen der Zellaufnahme: 3,0 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ , 60 min

An 20  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten des Hirnes weiblicher 6 Wochen alter Ratten wurde die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS autoradiographisch nachgewiesen. Das linke Autoradiogramm in Abb. 4-7 zeigt die Gesamtbindung des Radiotracers, während das rechte Autoradiogramm die Bindung bei Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  FESDS in der Inkubationslösung repräsentiert. Die deutlich strukturierte Darstellung der einzelnen Hirnregionen ist nach Zugabe von FESDS nicht mehr zu verzeichnen. Besonders in Regionen mit hohen Anteilen an weißer Substanz (Colliculi, Corpus callosum, weiße Substanz des Cerebellum) geht die Aktivität stark zurück. Die mehr oder weniger homogene Verteilung des Radiotracers ist ein Indiz dafür, dass er spezifisch von seinen Bindungsstellen verdrängt wurde und dass nur noch eine unspezifische Bindung vorliegt. Die Hemmung durch FESDS ist am stärksten im Striatum (84 %) und am geringsten im Cortex (46 %).



**Abb. 4-7:** Hemmung der Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an Rattenhirn-Schnitten durch 10  $\mu\text{M}$  FESDS. Der rechte Hirnschnitt wurde zusätzlich mit 10  $\mu\text{M}$  FESDS inkubiert, wodurch die Aktivitätsanreicherung deutlich vermindert wurde. Die prozentuale Hemmung für ausgewählte Regionen ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, 25°C, 60 min. Abkürzungen: Cer - Cerebellum, Cinf – Colliculi inferiores, Csup – Colliculi superiores, Str – Striatum.

Zur Prüfung der Spezifität der Tracerbindung an die ES wurden an Ratten-Hirnschnitten die Inhibitoren Estronsulfat, Naringin und Quercetin eingesetzt. Allerdings zeigt sich keine signifikante Hemmung, was als Hinweis darauf gewertet wird, dass die ES in diesem Fall nicht als Target für die spezifische Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS dient. Unter gleichen Bedingungen wird auch an Nieren- und Leberschnitten mit Naringin und Quercetin keine Hemmung nachgewiesen. Nur FESDS hemmte die Radiotracerbindung um 75 % an Leber- und Nierenschnitten. An FaDu-Tumorschnitten, die keine ES exprimieren, kann mit 10  $\mu\text{M}$  FESDS eine Hemmung von 82 % erzielt werden.

Insgesamt sprechen die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente eher gegen eine nachweisbare spezifische Bindung des Radiotracers [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS.

## 4.2 FESDS - ein Inhibitor der Carboanhydrase

Die im vorangegangenen Abschnitt festgestellte Tatsache, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS *in vitro* zwar sättigbar an Strukturen des Rattenhirnes bindet, sich aber durch die ES-Inhibitoren Naringin und Quercetin weder an Hirn- noch an Leber- und Nierenschnitten verdrängen lässt, deutet darauf hin, dass ein weiteres Target für den Radiotracer existiert. Die spezielle Struktur der Verbindung mit 2 Sulfamatgruppen legt nahe, dass das Enzym Carboanhydrase als Enzym-Target von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS dienen könnte (Maren und Sanyal, 1983), was im weiteren Verlauf der Arbeit auch bewiesen wurde. Es war erforderlich, ähnlich wie für die ES gezeigt, molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen zur Expression und Aktivität der Carboanhydrase durchzuführen.

### 4.2.1 Expression der Carboanhydrase in verschiedenen Organen der Ratte

Das Enzym Carboanhydrase (CA) hat 14 bekannte Isozyme (Hewett-Emmett, 2000). Die Isozyme CA I und CA II reagieren verschieden sensitiv auf Sulfonamide (Sly und Hu, 1995). Aus diesem Grund wurde die Expression der mRNA beider Isozyme mit RT-PCR untersucht.

Tabelle 4-5: Expression der mRNA der Carboanhydrase I und II in Organen und Hirnregionen weiblicher Wistar-Ratten, ermittelt durch RT-PCR

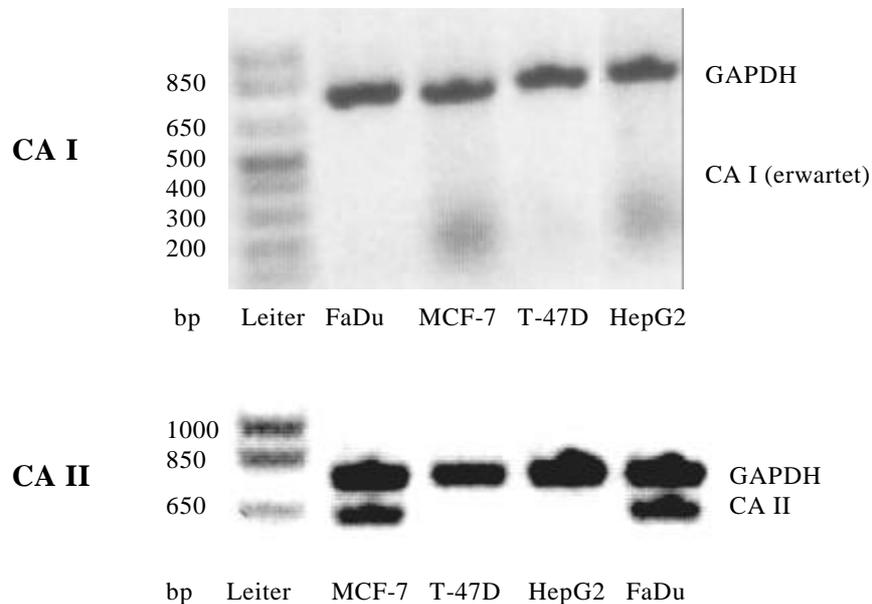
Hirnregion	CA I	CA II	Organ	CA I	CA II
Cortex	-	+	Herz	+	+
Corpus callosum	-	+	Lunge	+	+
Hippocampus	-	+	Leber	+	+
Striatum	-	+	Darm	+	+
Thalamus	-	+	Milz	+	+
Colliculi superiores	-	+	Pankreas	+	+
Mesencephalon	-	+	Nebenniere	-	+
Colliculi inferiores	-	+	Niere	+	+
Cerebellum	-	+	Ovar	-	+
Pons	-	+	Uterus	+	+
Hypophyse	-	+	Fett	+	+
			Muskel	+	+

PCR-Bedingungen: 1 min Denaturierung (94,0°C), 0,5 min Primerbindung (56,0°C für CA I und 58,1°C für CA II) und 1 min DNA-Synthese (72,0°C) in 35 Zyklen

Die in Tabelle 4-5 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die CA I in Herz, Darm, Fett, Leber, Lunge, Milz, Niere, Pankreas, Muskel und Uterus exprimiert wird; jedoch nicht in Rattenhirn, Nebenniere und Ovar. Die mRNA der CA II ist in allen Hirnstrukturen und Organen der Ratte vorhanden.

#### 4.2.2 Expression der Carboanhydrase in humanen Tumorzellen

Die Expression der CA wurde in den 4 humanen Tumorzelllinien MCF-7, T-47D, HepG2 und FaDu untersucht. Wie aus Abb. 4-8 ersichtlich ist, wird die mRNA der CA I in keiner der Zelllinien exprimiert. Die diffusen Anfärbungen im Bereich von 200 bp, die nicht der Fragmentgröße (350 bp) des PCR-Produktes von CA I entsprechen, werden als unspezifisch angesehen. Die Funktionsfähigkeit der Primer konnte jedoch an mRNA von Humanblut, dessen neutrophile Leukocyten CA I enthalten (Campbell *et al.*, 1994), nachgewiesen werden. Abb. 4-8 zeigt weiterhin, dass die mRNA der CA II nur in den FaDu- und MCF-7-Zellen vorkommt, nicht jedoch in den T-47D- und HepG2-Zellen.



**Abb. 4-8:** Agarose-Gelelektrophorese der mit RT-PCR amplifizierten mRNA von Carboanhydrase I (oben) und II (unten) der humanen Tumorzellen MCF-7, T-47D, HepG2 und FaDu. Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenz der Amplifikation verwendet. PCR-Bedingungen: 1 min Denaturierung (94,0°C), 0,5 min Primerbindung (56,0°C für CA I und 58,1°C für CA II) und 1 min DNA-Synthese (72,0°C) in 35 Zyklen

## 4.2.3 Messung der Esterase-Aktivität von Carboanhydrase I und II

In funktionellen Untersuchungen sollte nachgewiesen werden, dass die CA ein Target für FESDS ist. Nach einem von Verpoorte *et al.* (1967) beschriebenen *In-vitro*-Assay wurde mit den käuflich erworbenen Isozymen humane CA I (HCA I) und CA II (HCA II) sowie Rinder-CA II (RCA II) die Esterase-Aktivität der Carboanhydrase unter Einfluss verschiedener Inhibitoren untersucht. Es wurden die in Tabelle 4-6 dargestellten  $IC_{50}$ -Werte berechnet.

Tabelle 4-6:  $IC_{50}$ -Werte (nM) von ausgewählten CA-Inhibitoren sowie von FESMS und FESDS an humaner und Rinder-Carboanhydrase (HCA und RCA) (n = 3)

Inhibitor	HCA I	HCA II	RCA II
FESDS	288 ± 3	54 ± 1	271 ± 4
FESMS	1050 ± 12	53 ± 1	323 ± 3
Azetazolamid	219 ± 2	30 ± 1	100 ± 1
Ethoxazolamid	655 ± 8	27 ± 1	337 ± 4
Furosemid	631 ± 1	1061 ± 8	795 ± 5
Hydrochlorothiazid	15200 ± 169	7654 ± 90	4304 ± 42

Bedingungen des CA-Assays: 0,15 mM p-Nitrophenylazetat, 37°C, 30 min,

Azetazolamid erwies sich mit  $IC_{50}$ -Werten von 219, 30 bzw. 100 nM als der stärkste CA-Inhibitor für die Isozyme HCA I, HCA II und RCA II. Eine weitgehend vergleichbare Hemmung wird durch FESDS mit  $IC_{50}$ -Werten von 288, 54 bzw. 271 nM erzielt. Die analoge Verbindung Fluorestradiol-3-monosulfamat (FESMS) mit nur einer Sulfonamidgruppe weist im Vergleich zu FESDS höhere  $IC_{50}$ -Werte auf, d.h. die Carboanhydrase hat zu FESMS eine geringere Affinität als zu FESDS. Zusätzlich wurden auch die bekannten CA-Hemmer Ethoxazolamid, Furosemid und Hydrochlorothiazid untersucht. Der schwächste Inhibitor von allen ist Hydrochlorothiazid. Tabelle 4-6 zeigt weiterhin, dass die HCA II gegenüber den eingesetzten Sulfonamid-Inhibitoren stärker empfindlich ist als die HCA I und die RCA II. Nur auf Furosemid und Hydrochlorothiazid reagiert die RCA II empfindlicher als die HCA.

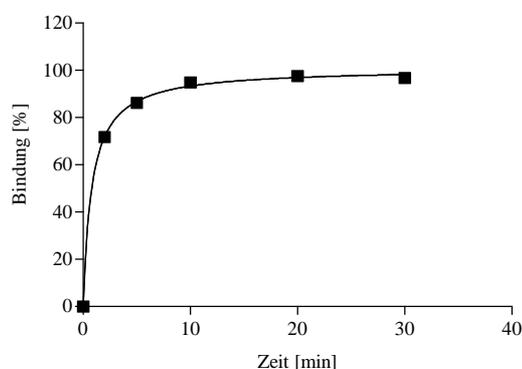
### 4.3 $^{18}\text{F}$ -markiertes FESDS als Radiotracer

Während in den vorangegangenen Abschnitten vor allem die pharmakologischen Eigenschaften von FESDS untersucht wurden, stehen die Radiotracer-Eigenschaften des  $^{18}\text{F}$ -markierten FESDS im Mittelpunkt der folgenden Abschnitte. Speziell wurde geprüft, inwieweit mit  $^{18}\text{F}$ -FESDS die Verteilung von Estronsulfatase und Carboanhydrase in Versuchstieren gemessen werden kann.

#### 4.3.1 Die Carboanhydrase - ein Target von $^{18}\text{F}$ -FESDS

In Abschnitt 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass FESDS ein starker Inhibitor insbesondere von CA II ist. Das legt die Vermutung nahe, dass  $^{18}\text{F}$ -FESDS besonders zur Darstellung der CA in Organen und Geweben geeignet ist. Erste Hinweise darauf wurden durch Untersuchungen an Erythrocyten erhalten, die bekanntermaßen einen hohen Anteil an CA aufweisen.

Abb. 4-9 zeigt die Kinetik der Bindung von  $^{18}\text{F}$ -FESDS in humanen Erythrocyten. Bereits nach 1,05 min war 50 % und nach 10,0 min war 95 % der Radioaktivität an die roten Blutkörperchen gebunden. Die Bindung blieb über einen Zeitraum von 30 min konstant.



**Abb. 4-9:** Kinetik der Bindung von  $^{18}\text{F}$ -FESDS an humanen Erythrocyten (n = 3). Inkubations-Bedingungen: 0,05 MBq  $^{18}\text{F}$ -FESDS / 0,5 ml heparinisiertes frisches Humanblut, 37°C, 0–30 min.

Die im Abschnitt 4.1.5 dargelegte sättigbare Bindung von  $^{18}\text{F}$ -FESDS an Rattenhirn-Schnitten läßt vermuten, dass hierbei die Carboanhydrase ein Enzym-Target ist. Entsprechend wurden bei analogen autoradiographischen Untersuchungen die CA-Inhibitoren Azetazolamid und Benzolamid eingesetzt. In Tabelle 4-7 sind die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Hemmung der  $^{18}\text{F}$ -FESDS-Bindung von 4 ausgewählten Hirnregionen aufgeführt. Auffallend ist die klare Korrelation aller 3 Inhibitoren in bezug auf ihre regionale Wirksamkeit. Das wird als deutliches Indiz dafür gesehen, dass  $^{18}\text{F}$ -FESDS die Verteilung von CA im Rattenhirn darstellen

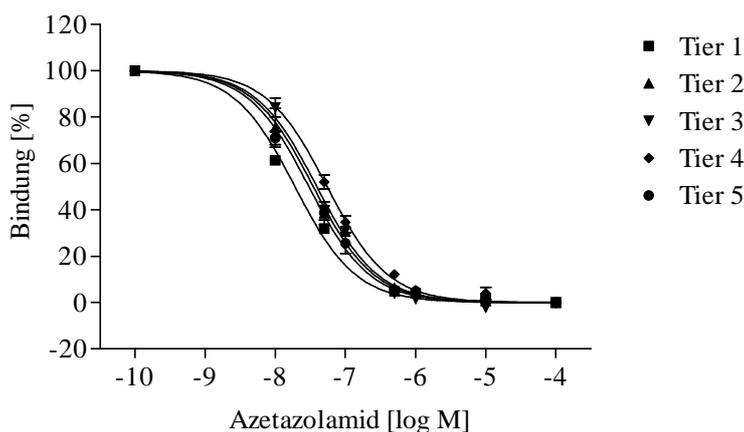
kann. Ebenso wie im CA-Assay (4.2.3) ermittelt; ist Azetazolamid auch hier der wirkungsvollste CA-Hemmer.

Tabelle 4-7: IC<sub>50</sub>-Werte (nM) für die Hemmung der Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS an die CA im weiblichen Rattenhirn (n = 5)

Hirnregion	FESDS	Azetazolamid	Benzolamid
Cortex	136,9 ± 42	5,04 ± 0,7	22,1 ± 0,1
Cerebellum	123,1 ± 36	4,54 ± 1,1	21,3 ± 0,1
Colliculi	54,1 ± 6	3,47 ± 0,5	12,2 ± 0,1
Corpus callosum	33,8 ± 5	2,80 ± 0,3	6,97 ± 0,1

Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [<sup>18</sup>F]FESDS, 25°C, 60 min

In allen nachfolgenden Experimenten wurde Azetazolamid zur Hemmung der Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS an die Carboanhydrase verwendet. Azetazolamid ist im CA-Assay (4.2.3) bei allen 3 untersuchten Carboanhydrasen der stärkste Inhibitor. In Hinblick auf eine Anwendung am Patienten ist es von Vorteil, dass Azetazolamid bereits als Therapeutikum (Diamox<sup>®</sup>) auf dem Markt ist. Zur Untersuchung der Selektivität wurde überprüft, ob Azetazolamid auch einen Einfluß auf die Estronsulfatase-Aktivität hat. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass dies selbst in Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-3}$  M nicht der Fall ist. Damit konnte Azetazolamid in den nachfolgenden Experimenten als selektiver CA-Inhibitor eingesetzt werden.



**Abb. 4-10:** Hemmung der Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS an Gefrierschnitten von Rattennieren durch Azetazolamid (n = 5). Die Autoradiogramme wurden quantifiziert und ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $40,7 \pm 1$  nM ermittelt. Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M Azetazolamid sind die Bindungsstellen an die CA vollständig blockiert; es ist keine spezifische Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS mehr nachweisbar. Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [<sup>18</sup>F]FESDS, 37°C, 60 min.

Eine wichtige Zielstellung dieser Arbeit bestand darin, mit [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS die Verteilung des Enzyms Estronsulfatase zu messen, um dieses Prinzip gegebenenfalls für den Tumornachweis nutzen zu können. Dazu war es erforderlich, die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an die CA vollständig zu hemmen. Anhand von Bindungskurven wurde die Azetazolamid-Konzentration bestimmt, die die spezifische Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS vollständig hemmt (Abb. 4-10). Für das Hirn war eine Azetazolamid-Konzentration von  $10^{-6}$  M nötig, um die CA vollständig zu hemmen, bei Leber und Niere  $10^{-5}$  M, bei Ovar, Uterus, Milz, Pankreas und Herz  $10^{-4}$  M (Tabelle 4-8). Zusätzlich wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für Azetazolamid bestimmt; sie betragen zwischen 2,8 nM beim Corpus callosum des Hirnes und 96,3 nM beim Ovar.

Tabelle 4-8:  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Hemmung der Carboanhydrase mit Azetazolamid an Rattenorganen

Organ	Region	$\text{IC}_{50}$ [nM]	Azetazolamid-Konzentration [M] zur vollständigen Hemmung der CA
Hirn	Cortex	$5,0 \pm 1,1$	$10^{-6}$
Hirn	Corpus callosum	$2,8 \pm 0,3$	$10^{-6}$
Hirn	Colliculi superiores	$5,1 \pm 0,1$	$10^{-6}$
Hirn	Colliculi inferiores	$3,5 \pm 0,5$	$10^{-6}$
Hirn	Cerebellum	$4,5 \pm 0,7$	$10^{-6}$
Herz		$11,4 \pm 0,1$	$10^{-5}$
Leber		$12,9 \pm 0,1$	$10^{-5}$
Milz		$93,9 \pm 2,2$	$10^{-4}$
Pankreas		$40,2 \pm 2,3$	$10^{-4}$
Niere	Rinde	$39,7 \pm 0,1$	$10^{-5}$
Niere	Cortex	$41,7 \pm 0,3$	$10^{-5}$
Ovar		$96,3 \pm 2,1$	$10^{-4}$
Uterus		$95,4 \pm 1,4$	$10^{-4}$

Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, 25°C, 60 min

### 4.3.2 *In-vitro*-Untersuchungen mit [<sup>18</sup>F]FESDS humanen Tumorzellen

Wie im Abschnitt 4.3.1 an Organschnitten gezeigt wurde, sollte auch an Tumorzellen durch Azetazolamid die spezifische Bindung des Radiotracers an die Carboanhydrase (CA) vollständig gehemmt werden. Im Abschnitt 4.2.2 wurde mit RT-PCR die Expression der mRNA der CA I und II überprüft, wobei die mRNA der CA II in MCF-7- und FaDu-Zellen nachgewiesen wurde. Es ist jedoch möglich, dass in den 4 Zelllinien weitere der insgesamt 14 bekannten CA-Isozyme vorkommen, die auch [<sup>18</sup>F]FESDS binden. Es wurde geprüft, welcher CA-Hemmer für Bindungs-Experimente mit Zellen geeignet ist.

Tabelle 4-9 zeigt die IC<sub>50</sub>-Werte für 3 CA-Inhibitoren und FESDS an den humanen Tumorzellen MCF-7 und HepG2. Bei den HepG2-Zellen ist Azetazolamid der stärkste Inhibitor und bei den MCF-7-Zellen Ethoxyzolamid. Die MCF-7-Zellen exprimieren im Gegensatz zu den HepG2-Zellen mRNA der CA II und reagieren somit viel empfindlicher auf Ethoxyzolamid. Insgesamt korrelieren die IC<sub>50</sub>-Werte nicht mit den Daten, die durch den *In-vitro*-Assay an reinen Enzymen (4.2.3) gewonnen wurden. Das ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die beiden Zelllinien weitere Isozyme der CA exprimieren und dadurch unterschiedlich empfindlich auf die Inhibitoren reagieren. Auch Transportprozesse sind am Zustandekommen der Werte beteiligt.

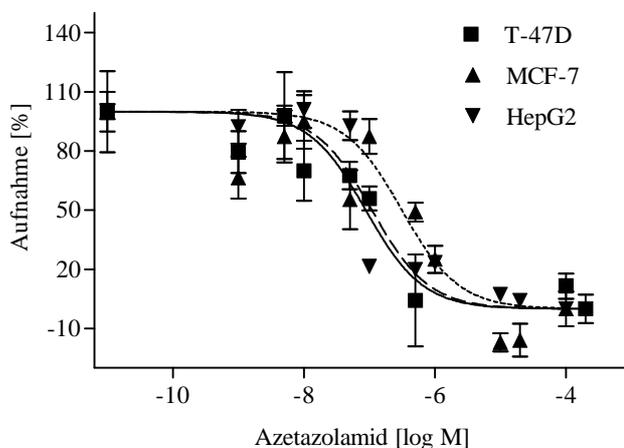
Tabelle 4-9: Hemmung der Aufnahme von [<sup>18</sup>F]FESDS in konfluente humane Tumorzellen (n = 4)

Inhibitor	MCF-7 IC <sub>50</sub> [nM]	HepG2 IC <sub>50</sub> [nM]
FESDS	159 ± 2	178 ± 2
Azetazolamid	313 ± 7	109 ± 1
Benzolamid	1612 ± 50	2198 ± 93
Ethoxyzolamid	61 ± 3	424 ± 5

Bedingungen für die Zellaufnahme: 1,0 MBq/ml [<sup>18</sup>F]FESDS, 37°C, 60 min

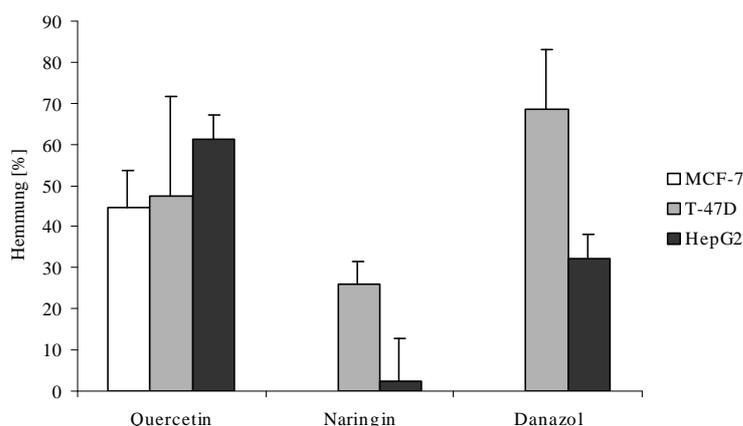
Es wurde bereits entschieden, dass Azetazolamid zur CA-Hemmung eingesetzt wird, da die Verbindung unter dem Namen Diamox<sup>®</sup> klinisch angewandt wird. Als nächster Schritt wurde geprüft, bei welcher Konzentration Azetazolamid die spezifische Bindung an die CA in den Tumorzellen vollständig hemmt. Abb. 4-11 zeigt, dass dies bei 10<sup>-4</sup> M Azetazolamid der Fall ist. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Azetazolamid betragen bei den T-47D-Zellen 88 nM, bei den MCF-7-Zellen 313 nM und bei den HepG2-Zellen 109 nM. Azetazolamid wurde in einer Konzentra-

tion von  $10^{-4}$  M zur Hemmung der CA-Bindung von [ $^{18}$ F]FESDS eingesetzt, um die Bindung des Tracers an die Estronsulfatase untersuchen zu können.



**Abb. 4-11:** Aufnahme von [ $^{18}$ F]FESDS in konfluente humane Tumorzellen in Abhängigkeit der Konzentration des CA-Hemmers Azetazolamid ( $n = 4$ ). Es ist jeweils  $10^{-4}$  M Azetazolamid zur vollständigen Hemmung der CA nötig. Bedingungen der Zellaufnahme: 1,0 MBq/ml [ $^{18}$ F]FESDS,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 60 min.

Die Estronsulfatase der humanen Tumorzellen sollte durch Quercetin, Naringin und Danazol in Gegenwart von Azetazolamid gehemmt werden, um zu prüfen, ob bei Vorliegen der CA-Hemmung noch Estronsulfatase nachweisbar ist. In Abb. 4-12 ist zu sehen, dass bei allen 3 Zelllinien mit den ES-Inhibitoren die Traceraufnahme weiter reduziert werden konnte. Das bedeutet, dass noch ES nachweisbar ist. Die T-47D-Zellen werden von Danazol am stärksten gehemmt (69 %) und die HepG2-Zellen von Quercetin (61 %). Naringin hat auf beide Zelllinien die geringste hemmende Wirkung.



**Abb. 4-12:** Hemmung der Bindung von [ $^{18}$ F]FESDS an konfluenten Tumorzellen durch 100  $\mu\text{M}$  Quercetin, Naringin bzw. Danazol ( $n = 4$ ). Bedingungen der Zellinkubation: 1,0 MBq/ml [ $^{18}$ F]FESDS, 10  $\mu\text{M}$  Azetazolamid, 0,5 mM EDTA bei Naringin und Quercetin,  $37^{\circ}\text{C}$ , 60 min.

Die besten ES-Inhibitoren Quercetin und FESDS wurden an konfluenten Tumorzellen eingesetzt und die  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung der [ $^{18}F$ ]FESDS-Aufnahme bestimmt. Wie aus Tabelle 4-10 ersichtlich ist, hemmt FESDS die Traceraufnahme am stärksten. Die  $IC_{50}$ -Werte schwanken jedoch sehr; sie betragen zwischen 63 nM (FaDu-Zellen) und 34  $\mu$ M (MCF-7-Zellen). Bei Quercetin sind die  $IC_{50}$ -Werte dagegen relativ einheitlich um 50  $\mu$ M für alle Tumorzellen.

Tabelle 4-10: Hemmung der Aufnahme von [ $^{18}F$ ]FESDS in konfluente humane Tumorzellen (n = 4)

Zellen	Quercetin $IC_{50}$ [nM]	FESDS $IC_{50}$ [nM]
MCF-7	59.230 $\pm$ 1.260	34.010 $\pm$ 1.766
T-47D	40.090 $\pm$ 650	69 $\pm$ 1
HepG2	34.360 $\pm$ 830	475 $\pm$ 12
FaDu	66.930 $\pm$ 2.190	63 $\pm$ 1

Bedingungen der Zellaufnahme: 1,0 MBq/ml [ $^{18}F$ ]FESDS, 37°C, 60 min,  $10^{-4}$  M Azetazolamid

Die für FESDS ermittelte maximale Aufnahme bzw. Bindung ( $B_{max}$ ) in den Tumorzellen ist aus Tabelle 4-11 ersichtlich. Der  $B_{max}$ -Wert ist mit 31,1 pmol/mg Protein bei den HepG2-Zellen am höchsten und mit 22,8 pmol/mg Protein bei den FaDu-Zellen am geringsten. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) für FESDS entsprechen den  $IC_{50}$ -Werten aus Tabelle 4-10. Wie bereits unter 4.1.5 erwähnt, kann mit der eingesetzten Methode nicht zwischen Transport und Bindung von [ $^{18}F$ ]FESDS unterschieden werden. Die Tatsache, dass die FESDS-Aufnahme in den FaDu-Zellen auch bei Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Azetazolamid hemmbar ist und einen ähnlichen  $B_{max}$ -Wert aufweist wie die 3 anderen Zelllinien mit ES-Expression, spricht eher dafür, dass vor allem ein Transportprozess gemessen wurde.

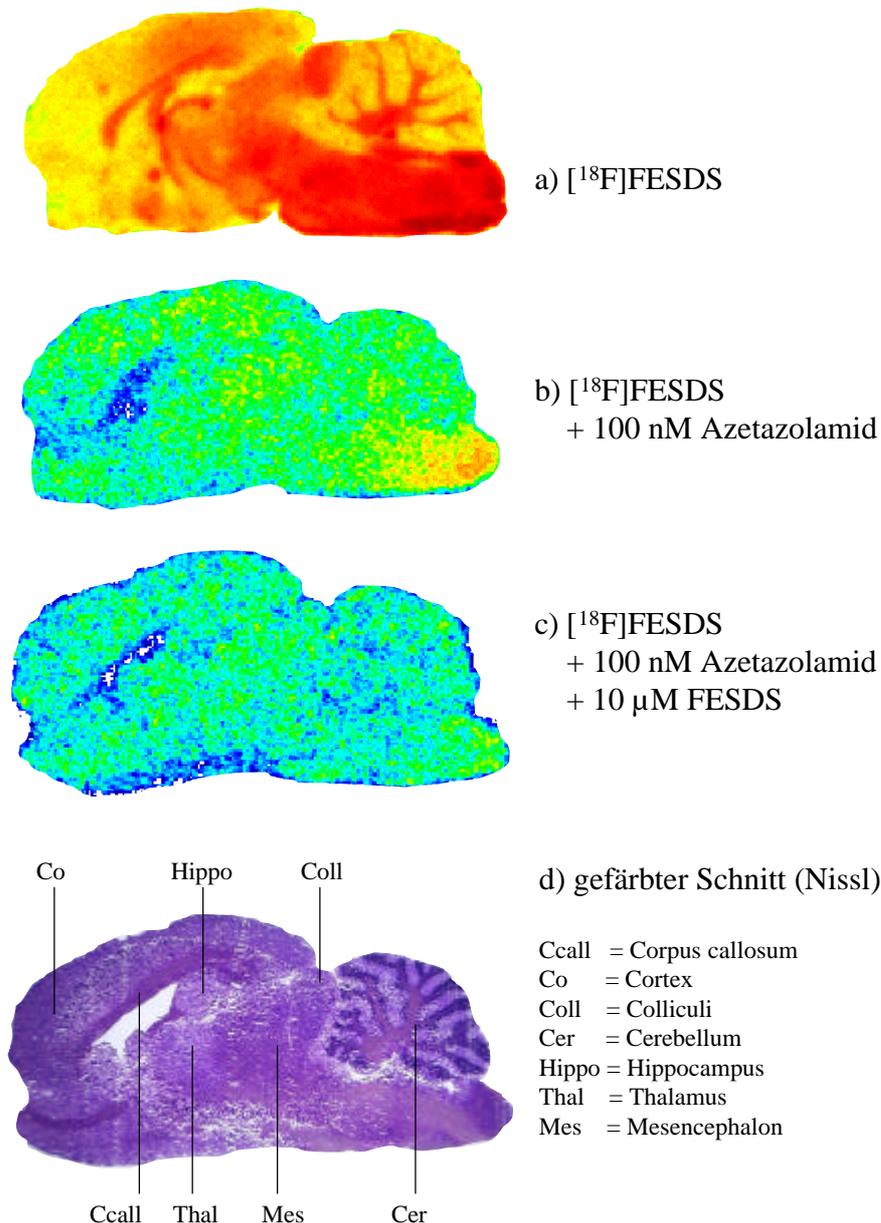
Tabelle 4-11: Aufnahme von FESDS in konfluente humane Tumorzellen (n = 4)

Zellen	$B_{max}$ [pmol/mg Protein]
MCF-7	30,9 $\pm$ 2
T-47D	23,4 $\pm$ 3
HepG2	31,1 $\pm$ 3
FaDu	22,8 $\pm$ 3

Bedingungen der Zellaufnahme: 0,1 MBq/ml [ $^{18}F$ ]FESDS, 37°C, 60 min,  $10^{-4}$  M Azetazolamid

4.3.3 *In-vitro*-Autoradiographie mit [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS am Ratten- und Schweinehirn

Vom Rattenhirn wurden für die Bindung von FESDS an die Estron-Sulfatase und die Carboanhydrase jeweils die Bindungskapazität (Anzahl der Bindungsstellen;  $B_{\max}$ ) und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) berechnet.



**Abb. 4-13:** Hemmung der Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an Rattenhirn-Schnitten durch Azetazolamid bzw. Azetazolamid und FESDS ( $n = 5$ ). Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, 25°C, 60 min

- Kontrolle
- Durch Azetazolamid wird die Anreicherung der Radioaktivität besonders in Regionen mit hohem Anteil an weißer Substanz deutlich vermindert.
- Wird zusätzlich mit FESDS inhibiert, so wird [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS nur noch unspezifisch gebunden.
- gefärbter Schnitt

In Abb. 4-13 sind die autoradiographischen Bilder dargestellt. Man erkennt, dass durch Azetazolamid die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS am Rattenhirn sehr stark vermindert wird (b), was auf die Hemmung der CA zurückzuführen ist. Durch zusätzliche Hemmung mit 10  $\mu\text{M}$  FESDS (c) werden auch die Bindungsstellen der Estronsulfatase spezifisch blockiert.

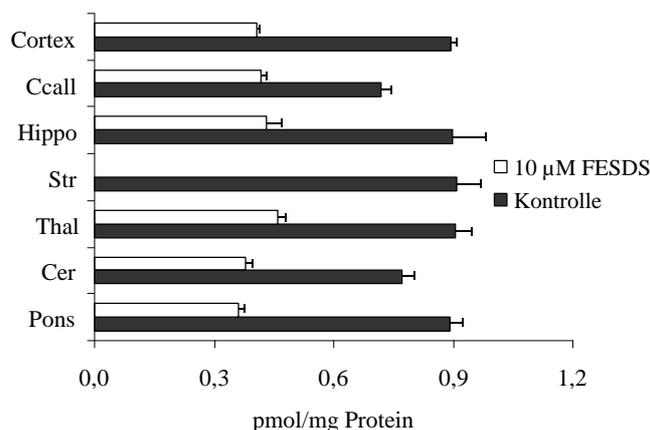
Die Ergebnisse der  $B_{\text{max}}$ - und  $K_{\text{d}}$ -Werte von Estronsulfatase und Carboanhydrase sind in Tabelle 4-12 zusammengestellt. Die Bindung von FESDS an CA erfolgt mit 14,6 pmol/mg Protein an das Cerebellum (höchster  $B_{\text{max}}$ -Wert) und 6,2 pmol/mg Protein an das Striatum (niedrigster  $B_{\text{max}}$ -Wert). Die  $K_{\text{d}}$ -Werte für die Carboanhydrase betragen zwischen 33 nM (Pons) und 166 nM (Striatum). Für die Estronsulfatase wurden  $B_{\text{max}}$ -Werte zwischen 0,29 pmol/mg Protein (Pons) und 11,5 pmol/mg Protein (Striatum) errechnet. Die  $K_{\text{d}}$ -Werte der ES betragen 42,7 nM (Pons) bis 1537 nM (Striatum). Es ist zu erkennen, dass die maximale Bindung ( $B_{\text{max}}$ ) von FESDS an die CA höher ist als an die ES; die Dissoziationskonstante ( $K_{\text{d}}$ ) ist wiederum für die CA geringer als für die ES. Das bedeutet, dass FESDS stärker und spezifischer an die Carboanhydrase als an die Estronsulfatase des Hirnes bindet. Da bei Hemmung der CA durch Azetazolamid nur eine geringe Bindung des Tracers am Hirn verbleibt (Abb. 4-13c), sind die daraus errechneten Bindungsdaten für das Enzym ES mit einem hohen Fehler behaftet. In Wiederholungsexperimenten konnte dies nicht verbessert werden.

Tabelle 4-12:  $B_{\text{max}}$ - und  $K_{\text{d}}$ -Werte für die Bindung von FESDS an Estronsulfatase und Carboanhydrase im weiblichen Rattenhirn (n = 5)

Enzym	Estronsulfatase (ES)		Carboanhydrase (CA)	
	$B_{\text{max}}$ [pmol/mg Protein]	$K_{\text{d}}$ [nM]	$B_{\text{max}}$ [pmol/mg Protein]	$K_{\text{d}}$ [nM]
Cortex	5,59 $\pm$ 2,9	950,1 $\pm$ 493	6,89 $\pm$ 2,1	136,9 $\pm$ 42
Corpus callosum	1,21 $\pm$ 0,8	90,7 $\pm$ 68	8,56 $\pm$ 1,4	33,8 $\pm$ 5
Hippocampus	1,81 $\pm$ 0,8	573,7 $\pm$ 395	7,04 $\pm$ 2,4	126,1 $\pm$ 33
Striatum	11,54 $\pm$ 8,7	1537 $\pm$ 1204	6,24 $\pm$ 2,1	166,0 $\pm$ 81
Thalamus	3,72 $\pm$ 3,1	452,3 $\pm$ 423	8,35 $\pm$ 2,6	50,2 $\pm$ 12
Colliculi superiores	1,24 $\pm$ 0,6	76,0 $\pm$ 28	10,43 $\pm$ 2,7	58,0 $\pm$ 11
Mesencephalon	1,12 $\pm$ 0,3	62,4 $\pm$ 25	9,62 $\pm$ 2,9	39,1 $\pm$ 9
Colliculi inferiores	1,79 $\pm$ 0,9	88,2 $\pm$ 46	14,34 $\pm$ 3,3	50,2 $\pm$ 10
Cerebellum	5,63 $\pm$ 2,4	727,0 $\pm$ 285	14,56 $\pm$ 5,9	123,0 $\pm$ 36
Pons	0,29 $\pm$ 0,1	42,8 $\pm$ 21	9,80 $\pm$ 6,9	32,9 $\pm$ 5

Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, 25°C, 60 min, zur ES-Bestimmung 10<sup>-6</sup> M Azetazolamid

Auch an Hirnschnitten von weiblichen 3 Monate alten Schweinen wurde die Tracerbindung und die Hemmung der Estronsulfatase mit 10  $\mu\text{M}$  FESDS bestimmt (unter Ausschaltung der CA mit  $10^{-6}$  M Azetazolamid). Abb. 4-14 zeigt, dass FESDS mit 0,71–0,91 pmol/mg Protein in den Kontroll-Hirnschnitten bindet. Die Hemmung durch 10  $\mu\text{M}$  FESDS beträgt zwischen 42 % (Corpus callosum) und 59 % (Pons) des Kontrollwertes.



**Abb. 4-14:** Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an die Estronsulfatase an Hirnschnitten 3 Monate alter weiblicher Schweine mit und ohne 10  $\mu\text{M}$  FESDS ( $n = 3$ ).

Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS,  $10^{-6}$  M Azetazolamid,  $25^\circ\text{C}$ , 60 min.

Abkürzungen: Ccall – Corpus callosum, Hippo – Hippocampus, Str – Striatum, Thal – Thalamus, Cer – Cerebellum.

#### 4.3.4 *In-vitro*-Autoradiographie mit [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an verschiedenen Organen der Ratte

Von den Organen Leber, Niere, Ovar, Uterus, Pankreas und Milz weiblicher Wistar-Ratten wurden die Bindungsdaten von FESDS durch *In-vitro*-Autoradiographie ermittelt.

Tabelle 4-13:  $B_{\text{max}}$ - und  $K_d$ -Werte für die Bindung von FESDS an die Estron-Sulfatase in ausgewählten Rattenorganen ( $n = 6$ )

Organ	$B_{\text{max}}$ [pmol/mg Protein]	$K_d$ [nM]
Leber	$36,2 \pm 1$	$272,8 \pm 172$
Milz	$116,7 \pm 58$	$167,8 \pm 7$
Pankreas	$901,5 \pm 338$	$43,9 \pm 19$
Niere	$238,2 \pm 8$	$62,5 \pm 4$
Ovar	$84,5 \pm 38$	$76,5 \pm 39$
Uterus	$107,9 \pm 48$	$28,1 \pm 5$

Autoradiographie-Bedingungen: 0,1 MBq/ml [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS,  $25^\circ\text{C}$ , 60 min,  $10^{-4}$  M Azetazolamid für Ovar, Uterus, Milz, Pankreas;  $10^{-5}$  M Azetazolamid für Leber, Niere.

Aus Tabelle 4-13 ist ersichtlich, dass die höchste FESDS-Bindung beim Pankreas gemessen wurde: 902 pmol/mg Protein. Eine deutlich geringere FESDS-Bindung ist bei den Organen Leber, Ovar und Uterus (36, 85 und 108 pmol/mg Protein) zu verzeichnen. Diese Organe weisen im Enzym-Assay (4.1.3) eine hohe ES-Aktivität auf. Die Dissoziationskonstanten betragen zwischen 28 nM (Uterus) und 273 nM (Leber).

Am Rattenuterus wurde neben FESDS ein weiterer ES-Hemmer eingesetzt: Danazol. Die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wird dabei mit 10  $\mu\text{M}$  Danazol zu  $40 \pm 13 \%$  gehemmt. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für Danazol am Rattenuterus beträgt  $34 \pm 2 \mu\text{M}$ . An Pankreas und Milz konnte mit Danazol (1 nM–20  $\mu\text{M}$ ) bei der *In-vitro*-Autoradiographie keine Hemmung der Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS erzielt werden.

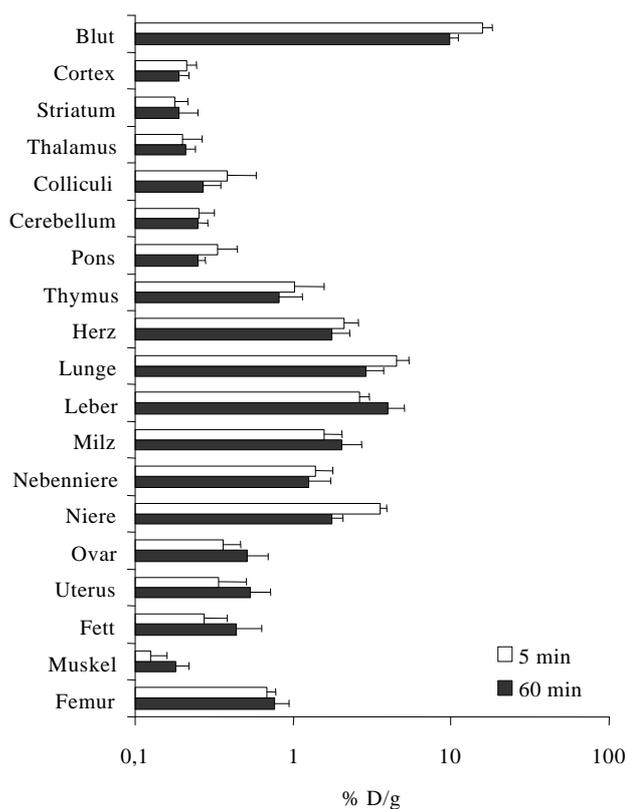
#### 4.3.5 *In-vitro*-Autoradiographie mit [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS am MCF-7-Tumor

Die MCF-7-Tumoren von Nacktmäusen, die unter 4.3.7 Verwendung fanden, wurden für eine *In-vitro*-Autoradiographie geschnitten. Dadurch sollten zusätzlich zu den *In-vivo*- auch *In-vitro*-Daten über die Bindung des Tracers an den MCF-7-Tumor erhalten werden. Die Vorgehensweise war die gleiche wie bei Rattenhirn und -organen. Es wurde für die MCF-7-Tumore mit FESDS ein  $K_d$ -Wert von  $778 \pm 98 \text{ nM}$  und ein  $B_{\text{max}}$ -Wert von  $7,25 \pm 1,6 \text{ pmol/mg Protein}$  errechnet. Die Bindung von FESDS ist aufgrund des hohen  $K_d$ -Wertes sehr gering und wenig spezifisch. Der  $B_{\text{max}}$ -Wert ist vergleichbar mit dem Rattenhirn, was der geringen ES-Aktivität, die in diesem Tumor mit dem Enzymassay gemessen wurde, entspricht.

#### 4.3.6 Untersuchung der Verteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS nach intravenöser Injektion der Ratte

Durch RT-PCR (4.1.1) wurde gezeigt, dass die mRNA der Estronsulfatase in allen untersuchten Rattenorganen vorkommt. Im Abschnitt 4.1.3 wurden die Enzymaktivitäten in den einzelnen Organen und Hirnregionen bestimmt, wobei die von Ovar und Uterus sowie von Hypophyse und Hippocampus am höchsten sind. Durch Autoradiographie (4.3.3 und 4.3.4) konnte nachgewiesen werden, dass *in vitro* eine spezifische Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS erfolgt. Diese Ergebnisse gaben Anlaß dazu, nunmehr die Eigenschaften von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS *in vivo* zu untersuchen.

Zuerst wurde die Aktivitäts-Anreicherung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in den Organen von Wistar-Ratten bei 5 und 60 min Überlebenszeit untersucht. Es fällt auf, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS mit 15,95 % der injizierten Dosis pro Gramm (5 min p.i.) besonders stark im Blut angereichert wird (Abb. 4-15). Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Bindung an Carboanhydrase, wofür bereits in vorangegangenen Untersuchungen Hinweise erhalten wurden. Die hohe initiale Blutbindung geht bei einer Überlebenszeit von 60 min zurück (9,86 % D/g), während die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in den Organen mit hoher ES-Aktivität (Ovar, Uterus, Fett und Leber) etwas ansteigt. Für alle weiteren Versuche wurde eine Überlebenszeit von 60 min gewählt.



**Abb. 4-15:** Bioverteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS (% D/g) in Organen weiblicher Wistar-Ratten 5 und 60 min nach i.v.-Injektion von 5,0 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS (n = 5).

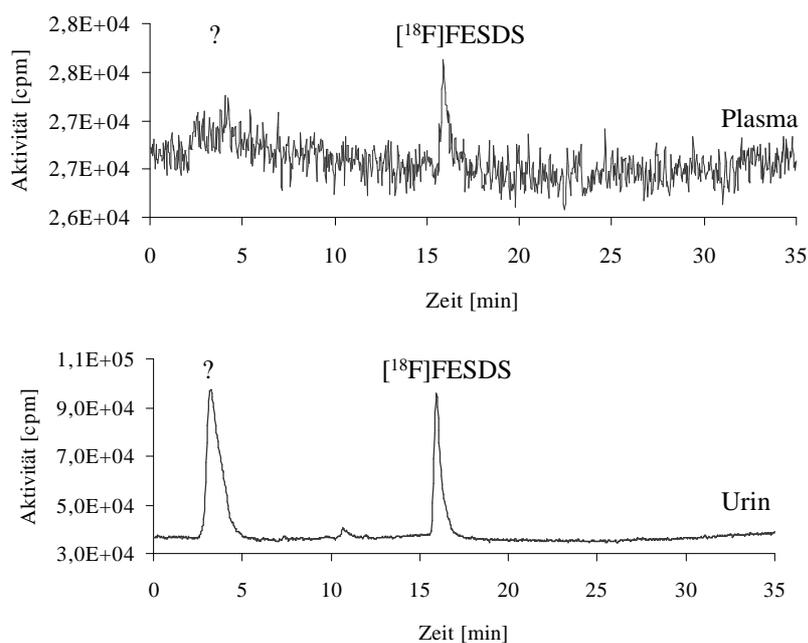
Zur Prüfung der Spezifität der Tracerbindung wurden auch *in vivo* ES-Inhibitoren eingesetzt. Tabelle 4-14 zeigt, dass die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Blut und Hirn durch Gabe von 5 mg/kg FESDS vermindert und im Uterus signifikant erhöht wird. Die Flavonoid-Inhibitoren Quercetin und Naringin inhibieren signifikant die Traceraufnahme in der Milz und Leber. Im Intestinum sank die Traceraufnahme von 18 % Dosis durch die 3 ES-Inhibitoren um ca. 50 %. Die Eliminierung des Tracers erfolgt hauptsächlich hepatobiliär; 18 % Dosis sind im Intestinum und 0,5 % Dosis im Urin nachweisbar.

Tabelle 4-14: Hemmung der [<sup>18</sup>F]FESDS-Aufnahme (% ID/g) durch die ES-Inhibitoren Quercetin, Naringin und FESDS in Organen von Wistar-Ratten (± SD)

Organ	Kontrolle (n = 23)	Quercetin 5 mg/kg (n = 6)	Naringin 5 mg/kg (n = 5)	FESDS 5 mg/kg (n = 3)
Blut	9,86 ± 1,3	10,64 ± 1,6*	12,79 ± 2,4	6,45 ± 1,6
Cortex	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,13 ± 0,02*
Striatum	0,19 ± 0,06	0,16 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,11 ± 0,08
Thalamus	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,13 ± 0,02*
Colliculi	0,27 ± 0,08	0,29 ± 0,06	0,31 ± 0,09	0,19 ± 0,07
Cerebellum	0,25 ± 0,04	0,27 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,20 ± 0,05
Pons	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,29 ± 0,03	0,20 ± 0,04
Hypophyse	0,011 ± 0,008	n.d.	n.d.	n.d.
Thymus	0,82 ± 0,3	1,32 ± 0,3	2,02 ± 1,0	1,78 ± 0,2
Herz	1,76 ± 0,5	2,48 ± 0,5	2,63 ± 1,3	0,49 ± 0,2
Lunge	2,89 ± 0,8	3,93 ± 1,9	4,19 ± 1,6	0,44 ± 0,1
Leber	4,02 ± 1,1	2,43 ± 0,6***	2,59 ± 0,6***	2,61 ± 0,2*
Milz	2,02 ± 0,7	1,38 ± 0,2**	1,44 ± 0,6*	1,31 ± 0,1
Pankreas	1,48 ± 0,4	1,74 ± 0,3	1,79 ± 0,4	n.d.
Nebenniere	1,26 ± 0,5	1,65 ± 0,3	2,03 ± 1,0	1,93 ± 0,3
Niere	1,76 ± 0,3	1,83 ± 0,3	2,05 ± 0,8	2,85 ± 0,3***
Ovar	0,51 ± 0,2	0,82 ± 0,2	0,99 ± 0,4	0,61 ± 0,1
Uterus	0,54 ± 0,2	0,76 ± 0,2	1,07 ± 0,5	0,80 ± 0,2*
Fett	0,44 ± 0,2	0,76 ± 0,2	1,13 ± 0,6	2,91 ± 0,3
Muskel	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,28 ± 0,1	2,88 ± 0,3
Femur	0,77 ± 0,2	1,06 ± 0,2	1,23 ± 0,4	0,80 ± 0,1**

Versuchsbedingungen: 3,3 MBq [<sup>18</sup>F]FESDS in 0,5 ml, 60 min p.i.; Kontrolltiere von 5 Versuchstagen.  
Signifikanz: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

Die Metabolisierung von [<sup>18</sup>F]FESDS wurde mit HPLC und DC überprüft. Abb. 4-16 zeigt, dass im Plasma und Urin der Ratte ein Metabolit von [<sup>18</sup>F]FESDS auftritt, der 64,5 % der Gesamt-Radioaktivität im Urin ausmacht; der Tracer ist noch zu 32,5 % enthalten. Um Fluorid kann es sich bei dem Produkt nicht handeln, da es bereits vor Aufnahme der Chromatogramme von der HPLC-Säule entfernt wurde. [<sup>18</sup>F]FESDS wird im Blut vorrangig an die CA der Erythrocyten gebunden, im Plasma liegt nur ein sehr geringer Aktivitätsanteil frei vor. Dies und die späte Aufnahme der HPLC-Chromatogramme ist eine mögliche Erklärung für den kleinen Peak von [<sup>18</sup>F]FESDS bei relativ hohem Untergrund im HPLC-Chromatogramm. Das Ergebnis der HPLC wird durch die Dünnschicht-Chromatographie bestätigt.



**Abb. 4-16:** HPLC-Chromatogramm von gefälltem Rattenplasma (oben) und Rattenurin (unten) 60 min nach i.v.-Injektion von 5,0 MBq [<sup>18</sup>F]FESDS. Die Proben wurden auf die HPLC-Säule ET 125/4 Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub> (Größe 4,0 mm · 125 mm, Porengröße 5 µm) aufgetragen; der Elutionsgradient war 0–10 min: 20 % Ethanol, 10-13 min: 100 % Ethanol, 13-35 min: 20 % Ethanol.

Die Akkumulation von [<sup>18</sup>F]FESDS im Blut bzw. in den Erythrocyten weist auf eine Bindung an die Carboanhydrase hin. In vorangegangenen Experimenten wurde die Eignung von Azetazolamid als CA-Inhibitor bereits verdeutlicht. Die Eignung der Substanz sollte *in vivo* geprüft werden. Zum Vergleich wurde Ethoxyzolamid eingesetzt, das sich im CA-Assay (4.2.3) sowie bei der Bindungsmessung an MCF-7-Zellen (4.3.2) ebenfalls als gut geeigneter CA-Inhibitor erwies. Wie aus Tabelle 4-15 ersichtlich ist, wird beim Einsatz beider CA-Inhibitoren die Tracerbindung in den CA-reichen Organen Blut, Milz, Lunge und Herz reduziert. Durch Azetazolamid, aber nicht durch Ethoxyzolamid, wurde die Radioaktivität in ES-reichen Organen wie Ovar, Uterus, Pankreas und Fett erhöht. Eine Hemmung der CA durch Azetazolamid stellt somit den Tracer für eine Bindung an das eigentliche Enzym-Target, die Estronsulfatase, zur Verfügung. Dadurch wird mehr Radioaktivität in diesen Organen gebunden.

Die intestinale Aufnahme von [<sup>18</sup>F]FESDS wird durch Azetazolamid 3-fach erhöht, was wahrscheinlich auf eine viel schnellere Elimination des Tracers zurückzuführen ist. Ethoxyzolamid ist zwar im Vergleich zu Azetazolamid der stärkere CA-Hemmer, der Nachteil dieser Verbindung ist jedoch, dass sie die Anreicherung von [<sup>18</sup>F]FESDS in Organen mit hoher ES-

Aktivität reduziert. Damit ist Ethoxzolamid zur besseren Darstellung der ES und der Erhöhung des Target/Nontarget-Verhältnisses ungeeignet.

Tabelle 4-15: Hemmung der [<sup>18</sup>F]FESDS-Aufnahme (% D/g) in Organen von weiblichen, 6 Wochen alten Wistar-Ratten durch die CA-Inhibitoren Azetazolamid und Ethoxzolamid ( $\pm$  SD)

Organ	Kontrolle (n = 23)	Azetazolamid (5 mg/kg) (n = 5)	Ethoxzolamid (5 mg/kg) (n = 5)
Blut	9,86 $\pm$ 1,3	0,59 $\pm$ 0,2 <sup>***</sup>	0,39 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>
Cortex	0,19 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>*</sup>
Striatum	0,19 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,02
Thalamus	0,21 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,02 <sup>*</sup>
Colliculi	0,27 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>**</sup>
Cerebellum	0,25 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04 <sup>**</sup>	0,15 $\pm$ 0,02 <sup>***</sup>
Pons	0,25 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,05 <sup>*</sup>	0,15 $\pm$ 0,03 <sup>***</sup>
Thymus	0,82 $\pm$ 0,3	0,25 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,21 $\pm$ 0,04 <sup>***</sup>
Herz	1,76 $\pm$ 0,5	0,40 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,27 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>
Lunge	2,89 $\pm$ 0,8	0,46 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,35 $\pm$ 0,2 <sup>***</sup>
Leber	4,02 $\pm$ 1,1	4,06 $\pm$ 0,3	4,84 $\pm$ 0,5
Milz	2,02 $\pm$ 0,7	0,35 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,26 $\pm$ 0,04 <sup>***</sup>
Pankreas	1,48 $\pm$ 0,4	3,08 $\pm$ 1,0 <sup>***</sup>	2,23 $\pm$ 0,5 <sup>***</sup>
Nebenniere	1,26 $\pm$ 0,5	0,96 $\pm$ 0,3	0,61 $\pm$ 0,1
Niere	1,76 $\pm$ 0,3	0,52 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,46 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>
Ovar	0,51 $\pm$ 0,2	0,66 $\pm$ 0,2	0,47 $\pm$ 0,1
Uterus	0,54 $\pm$ 0,2	0,80 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>	0,36 $\pm$ 0,1
Fett	0,44 $\pm$ 0,2	0,61 $\pm$ 0,2 <sup>*</sup>	0,33 $\pm$ 0,2
Muskel	0,18 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,02
Femur	0,77 $\pm$ 0,2	0,36 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,15 $\pm$ 0,05 <sup>***</sup>

Versuchsbedingungen: 4,6 MBq [<sup>18</sup>F]FESDS in 0,5 ml, 60 min p.i.; Kontrolltiere von 5 Versuchstagen. Signifikanz: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

#### 4.3.7 Untersuchung der Verteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in tumortragenden Nacktmäusen nach intravenöser Injektion

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass es spezifische Targets für [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Tiermodell gibt. Die hohe Blutbindung lässt sich wirkungsvoll durch die Carboanhydrase-Hemmer Azetazolamid und Ethoxyzolamid unterbinden. Da Ethoxyzolamid ungeeignet und Azetazolamid (Diamox<sup>®</sup>) ein zugelassenes Medikament ist, wurde Azetazolamid zur CA-Hemmung in diesem Versuch eingesetzt.

Tabelle 4-16: Hemmung der [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS-Aufnahme [% D/g] in Organen tumortragender weiblicher Nacktmäuse durch prä-Injektion von Azetazolamid und FESDS (Mittelwert  $\pm$  SD)

Organ	Kontrolle (n = 16)	Azetazolamid 5 mg/kg (n = 5)	Azetazolamid + FESDS 5 mg/kg (n = 4)
Blut	38,74 $\pm$ 14,4	3,20 $\pm$ 1,8 <sup>***</sup>	6,79 $\pm$ 1,6 <sup>**</sup>
Cortex	0,75 $\pm$ 0,1	0,36 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,49 $\pm$ 0,05 <sup>***</sup>
Colliculi	0,93 $\pm$ 0,1	0,44 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,52 $\pm$ 0,03 <sup>**</sup>
Cerebellum	0,90 $\pm$ 0,2	0,39 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>	0,57 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>
Hypophyse	0,013 $\pm$ 0,005	0,006 $\pm$ 0,002	0,026 $\pm$ 0,010
Herz	8,20 $\pm$ 4,9	1,18 $\pm$ 0,6 <sup>*</sup>	5,67 $\pm$ 1,0 <sup>**</sup>
Lunge	15,55 $\pm$ 5,9	2,44 $\pm$ 1,0 <sup>***</sup>	9,34 $\pm$ 1,0 <sup>**</sup>
Leber	9,69 $\pm$ 0,4	11,68 $\pm$ 3,3	26,63 $\pm$ 2,4 <sup>***</sup>
Milz	11,38 $\pm$ 0,6	2,83 $\pm$ 1,1 <sup>***</sup>	7,49 $\pm$ 0,7 <sup>**</sup>
Pankreas	3,15 $\pm$ 0,5	6,69 $\pm$ 1,6 <sup>***</sup>	9,55 $\pm$ 3,1
Nebenniere	5,55 $\pm$ 2,9	n.d.	n.d.
Niere	14,52 $\pm$ 7,3	3,11 $\pm$ 0,9 <sup>***</sup>	10,36 $\pm$ 1,1 <sup>***</sup>
Ovar	1,31 $\pm$ 0,1	3,02 $\pm$ 1,8	5,31 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>
Uterus	1,27 $\pm$ 0,2	4,11 $\pm$ 2,8 <sup>*</sup>	7,43 $\pm$ 2,6 <sup>***</sup>
Fett	1,73 $\pm$ 0,8	4,15 $\pm$ 1,3	9,80 $\pm$ 6,3 <sup>*</sup>
Muskel	0,53 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,2	2,48 $\pm$ 0,5 <sup>***</sup>
Femur	1,66 $\pm$ 0,2	1,28 $\pm$ 0,6 <sup>*</sup>	2,33 $\pm$ 0,3 <sup>*</sup>
Tumor (FaDu)	0,77 $\pm$ 0,3	n.d.	n.d.
Tumor (MCF-7)	1,59 $\pm$ 0,3	1,28 $\pm$ 0,2 <sup>*</sup>	3,11 $\pm$ 0,2 <sup>***</sup>
Tumor (HepG2)	4,35 $\pm$ 2,8	n.d.	n.d.

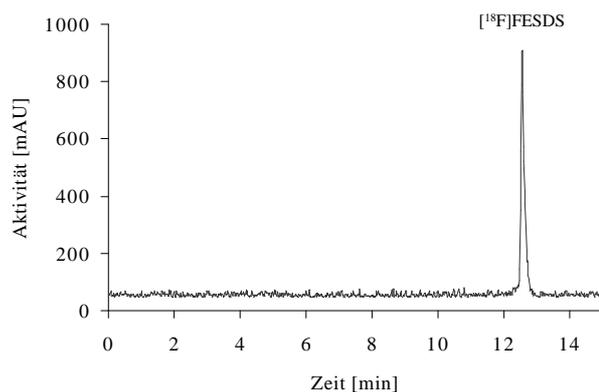
Versuchsbedingungen: 2,5–4,6 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in 0,2 ml, 60 min p.i.; Kontrolltiere von 3 Versuchstagen. Signifikanz: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

Es gelang, Tumoren von einigen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien auf Nacktmäusen zu erzeugen. Den Tieren waren FaDu-Zellen (Plattenepithelkarzinom), MCF-7-Zellen (Mammakarzinom) bzw. HepG2-Zellen in der Axilla bzw. am Bein implantiert worden. Der MCF-7-Tumor ist die Positivkontrolle und der FaDu-Tumor ist die Negativkontrolle für die Expression der Estronsulfatase (4.1.2 und 4.1.3).

Tabelle 4-16 zeigt, dass bei i.v.-Injektion von 2,5-4,6 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS die höchste Aufnahme des Tracers in Carboanhydrase-reichen Organen wie z.B. dem Blut (38,7 % D/g) auftritt. Die Blutbindung schwankt bei den verschiedenen Mäusen sehr stark; sie beträgt bei den Mäusen mit FaDu-Tumoren 26,0 % D/g, bei denen mit MCF-7-Tumoren 35,9 % D/g und bei denen mit HepG2-Tumoren 54,4 % D/g. Diese Bindung wird durch i.v.-Injektion von Azetazolamid vermindert. Dadurch wird die Aufnahme in den ES-reichen Organen (Uterus, Ovar, Pankreas und Leber) erhöht. Beim MCF-7-Tumor ist dies nicht der Fall. Eine ES-Bestimmung aus den homogenisierten Tumoren zeigt, dass sie eine sehr geringe Enzymaktivität (0,05 pmol/mg Protein/min) haben, die noch deutlich unter der Aktivität der homogenisierten MCF-7-Zellen liegt (Abb. 4-3). Das Target/Nontarget-Verhältnis wird durch das Tumor/Muskel-Verhältnis ausgedrückt. Es beträgt 1,39 beim FaDu-Tumor, 2,88 beim MCF-7-Tumor und 7,87 beim HepG2-Tumor entsprechend Tabelle 4-16 (jeweils Kontrolltiere).

Wird Azetazolamid und FESDS gemeinsam mit dem Tracer appliziert, so kann nicht die bei der *In-vitro*-Autoradiographie des Hirnes (Abb. 4-13) gezeigte zusätzliche Reduzierung der Bindung erzielt werden. *In vivo* wird die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS durch eine Applikation von 5 mg/kg FESDS im Vergleich zu Azetazolamid + Tracer sogar weiter erhöht; die Aufnahme im Darm wird 2,3-fach reduziert. Offensichtlich überlagern sich *in vivo* Bindung und Transport.

Im Blut der Nacktmäuse sind mit der eingesetzten analytischen Methode keine Metabolite von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS nachweisbar (Abb. 4-17). Damit unterscheidet sich dieses Ergebnis von dem der Ratten (4.3.6).

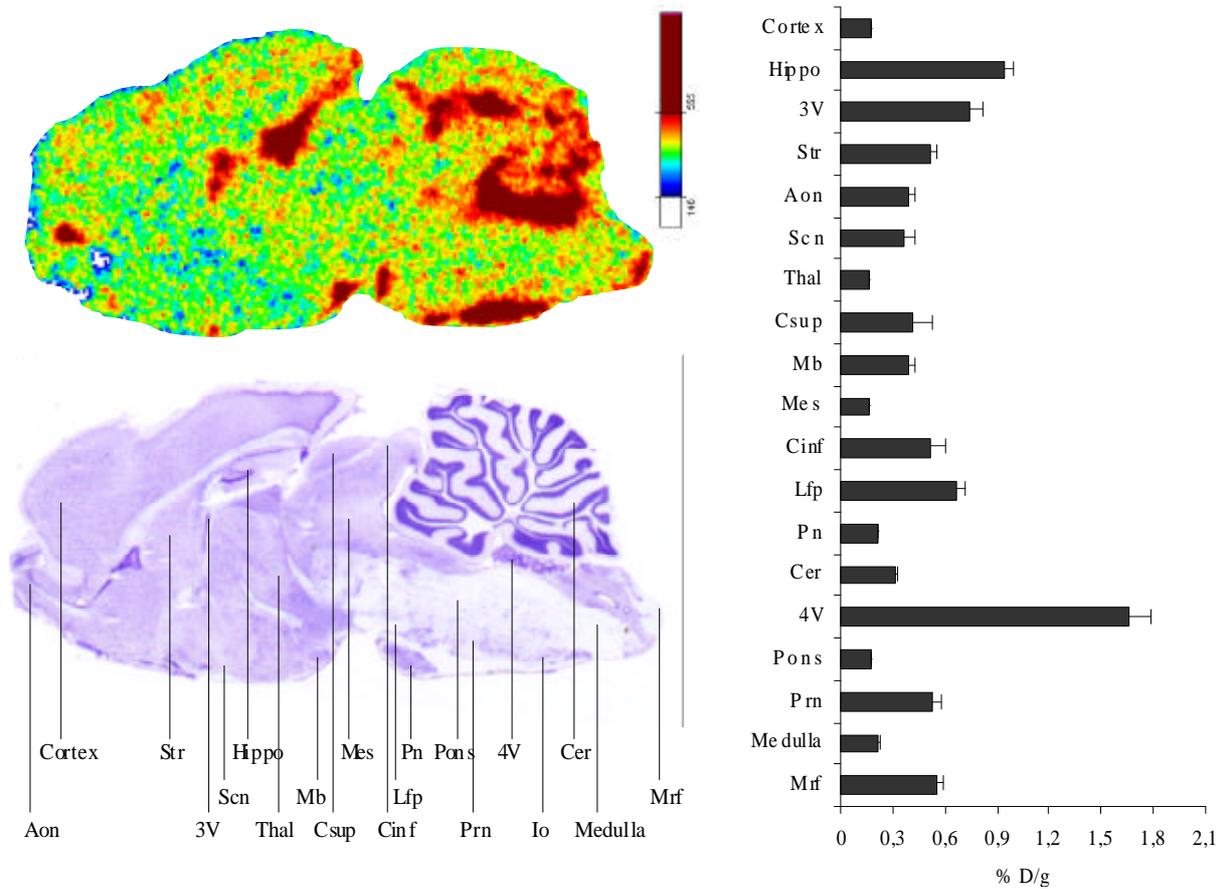


**Abb. 4-17:** HPLC-Chromatogramm der Aktivität von gefällttem Plasma einer MCF-7-tumortragenden Nacktmaus 60 min nach Injektion von 2,8 MBq  $[^{18}\text{F}]$ FESDS. Die Proben wurden auf die HPLC-Säule Zobrax Eclipse XDB- $\text{C}_{18}$  (Größe 4,6 mm · 75 mm, Porengröße 5  $\mu\text{m}$ ) aufgetragen; der Elutionsgradient war 0–3 min: 5 % Acetonitril, 3–12 min: 100 % Acetonitril, 12–15 min: 20 % Acetonitril.

#### 4.3.8 *Ex-vivo*-Autoradiographie nach intravenöser Injektion von $[^{18}\text{F}]$ FESDS

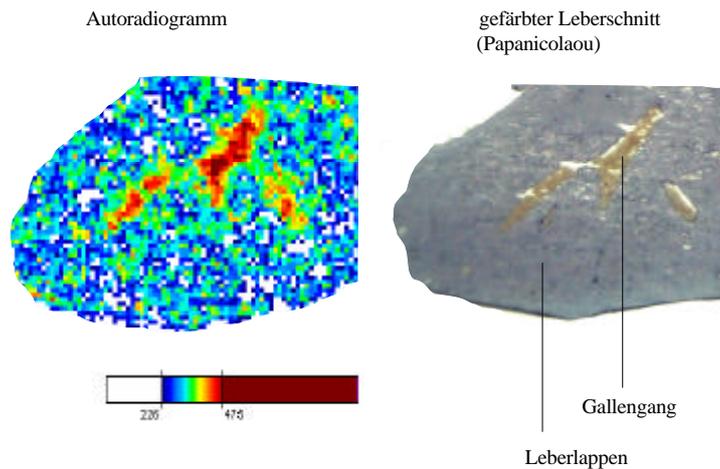
Bei Hirn und Leber der Ratte sowie bei den Tumoren der Nacktmäuse wurde eine *Ex-vivo*-Autoradiographie durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Bioverteilung, bei der die Radioaktivität im gesamten Organ gemessen wird, besteht darin, dass die Feinverteilung des Radiotracers im Organ gezeigt werden kann.

Das *Ex-vivo*-Autoradiogramm in Abb. 4-18 zeigt, dass im Rattenhirn die Anreicherung von  $[^{18}\text{F}]$ FESDS am höchsten im Choroid-Plexus des 3. und 4. Ventrikel sowie im Hippocampus ist. Die Werte sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt, sie betragen für den Choroid-Plexus des 3. und 4. Ventrikel 0,74 % D/g bzw. 1,66 % D/g und für den Hippocampus 0,95 % D/g. Eine sehr viel geringere Anreicherung tritt in Thalamus, Mesencephalon, Cortex und Pons auf (0,16–0,18 % D/g).



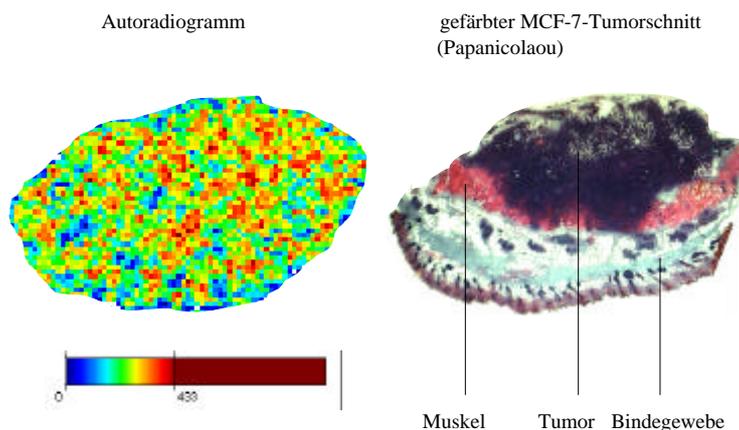
**Abb. 4-18:** Aufnahme von  $[^{18}\text{F}]$ FESDS im Gehirn einer Wistar-Ratte 60 min nach i.v.-Applikation von 5,3 MBq. Links ist das *Ex-vivo*-Autoradiogramm mit dem gefärbten Schnitt (Nissl) dargestellt und rechts die Aufnahme in % der injizierten Dosis/g. Die untersuchten Regionen sind beschriftet und wurden wie folgt abgekürzt:

Hippo – Hippocampus, 3V – 3. Ventrikel, Str – Striatum, Aon - Nucleus olfactorius anterior, Scn – Nucleus suprachiasmaticus, Thal – Thalamus, Csup – Colliculus superior, Mb - Mammilarkörper, Mes – Mesencephalon, Cinf - Colliculus inferior, Lfp - longitudinaler fasciculärer Pons, Pn – Nucleus pontis, Cer – Cerebellum, 4V – 4. Ventrikel, Prn – Nucleus reticularis pontis, Mrf - dorsales medulläres Reticularfeld.



**Abb. 4-19:** *Ex-vivo*-Autoradiogramm (links) und Papanicolaou-Färbung (rechts) der Rattenleber. Dem Tier wurden 5 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS sowie 5mg/kg Quercetin zur Hemmung der Estronsulfatase i.v. appliziert. Die Leber wurde nach 60 min entnommen. Es tritt eine erhöhte Radioaktivitäts-Anreicherung in den Gallengängen auf, die Tracerbindung an die Estronsulfatase im umliegenden Lebergewebe ist durch Quercetin gehemmt.

Anhand der *Ex-vivo*-Autoradiographie der Rattenleber konnte festgestellt werden, dass in den Gallengängen im Vergleich zum Leberlappen eine starke Aktivitätsanreicherung auftritt (Abb. 4-19). Das trifft sowohl bei der Kontrolle als auch bei Naringin- und Quercetin-Hemmung zu. Es ist anzunehmen, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in der Leber metabolisiert wird und dass diese Metabolite mit der Gallenflüssigkeit abtransportiert werden.

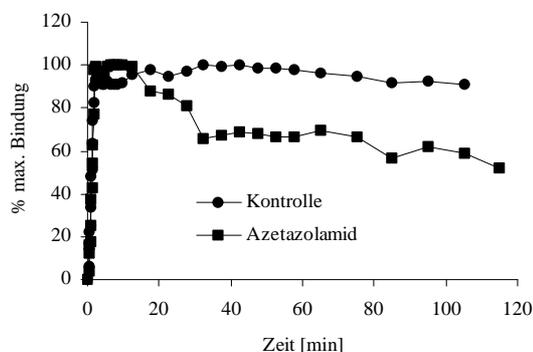


**Abb. 4-20:** *Ex-vivo*-Autoradiogramm (links) und Papanicolaou-Färbung (rechts) eines MCF-7-Tumors. Der Nacktmaus wurde 2,8 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS i.v. appliziert, das Tier wurde nach 60 min getötet, der Tumor entnommen und geschnitten. Das Autoradiogramm zeigt eine homogene Verteilung der Aktivität. Der histologische Schnitt des MCF-7-Tumors lässt jedoch muskuläre und bindegewebige Anteile erkennen, die nicht zum eigentlichen Tumorgewebe gehören. Diese Bestandteile sind nicht in die Berechnung eingegangen.

In Abb. 4-20 wird gezeigt, dass der herausgeschnittene MCF-7-„Tumor“ zu einem hohen Anteil aus Binde- und Muskelgewebe besteht. Das ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese Tumoren sehr langsam auf den Mäusen anwuchsen. Bei den FaDu- und HepG2-Tumoren wurden aufgrund ihres schnellen Wachstums keine so starke Vermischungen mit anderen Geweben festgestellt. Die Tumoren sind bedingt durch die Transplantation keine homogenen Gewebe. Es ist möglich, durch *Ex-vivo*-Autoradiographie Muskel- und Bindegewebsanteile, die nicht zum Tumor gehören, abzutrennen. Deshalb stellt die *Ex-vivo*-Autoradiographie eine wichtige Ergänzung zur *In-vivo*-Bioverteilung dar.

#### 4.3.9 Positronen-Emissions-Tomographie an der Ratte und am Schwein

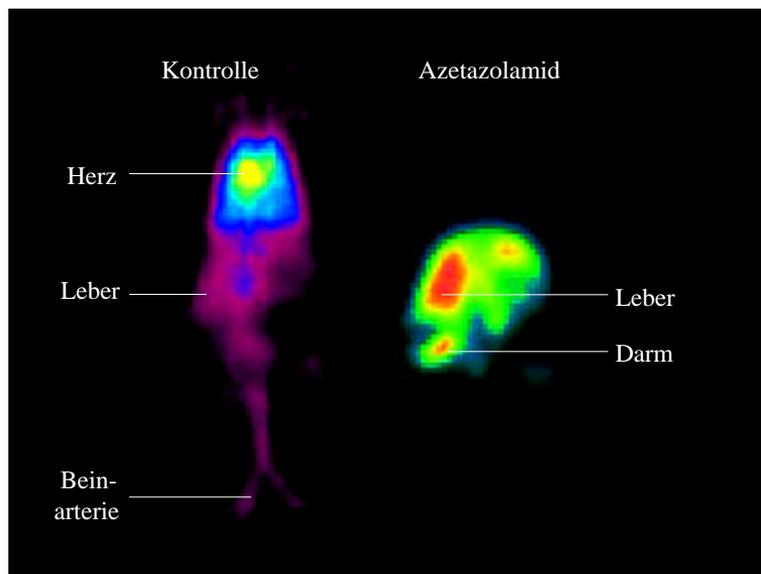
Der finale Schritt der Evaluierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS als PET-Tracer bestand in der Aufnahme von PET-Bildern von Ratte und Schwein. Der Vorteil zu den Bioverteilungs-Experimenten besteht darin, dass man durch die PET Informationen über die dynamische Verteilung des Tracers gewinnen kann. Es wurden 2 Ratten untersucht: die erste erhielt den Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, die zweite erhielt zusätzlich Azetazolamid zur Hemmung der Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Blut bzw. an die Carboanhydrase.



**Abb. 4-21:** Zeitverlauf der Aktivitäts-Konzentration von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Herz von 2 weiblichen, 6 Wochen alten Wistar-Ratten während einer dynamischen PET-Aufnahme (Messfenster über 120 min). Durch die i.v.-Injektion von 5 mg/kg Azetazolamid wurde im Vergleich zur Kontrolle die Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS an die Carboanhydrase der Erythrocyten weitgehend unterdrückt.

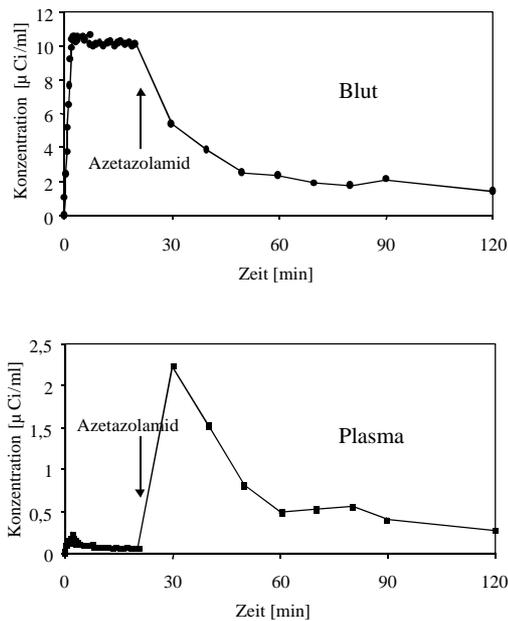
Abb. 4-21 zeigt, dass beim Kontrolltier, dem ausschließlich [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS injiziert wurde, die maximale Bindung der Radioaktivität im Blut nach 120 min noch immer 91 % beträgt. Eine zusätzliche Gabe von Azetazolamid ließ die Bindung des Radiotracers im Blut abnehmen; nach 120 min beträgt die Radioaktivität im Blut 52 % der maximalen Bindung. Im übrigen wurde nach 60 min bei einer i.v.-Injektion von 5 mg/kg Azetazolamid 0,59 %D/g der Radio-

aktivität im Blut gemessen (Tabelle 4-15). In Abb. 4-22 (links) ist zu erkennen, dass sich der Tracer beim Kontrolltier vorwiegend im Blut anreichert. Das Herz ist sehr gut zu erkennen, aber auch die großen Blutgefäße der Beine. Wird Azetazolamid mit dem Tracer koinjiziert, so wird die Leber und der Darm aufgrund der hepatobiliären Ausscheidung sehr deutlich sichtbar (rechts).



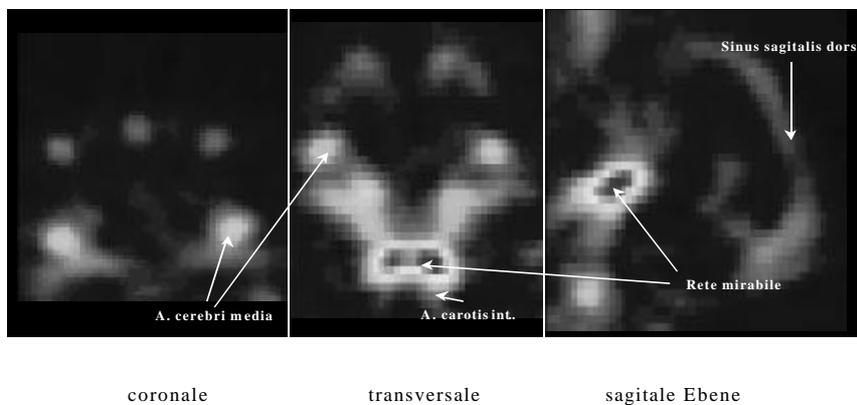
**Abb. 4-22:** PET-Aufnahme von 2 weiblichen, 6 Wochen alten Wistar-Ratten 60 min nach i.v.-Injektion von 5 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS (links) und 5 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS mit 5 mg/kg Azetazolamid (rechts).

Die Kinetik der Blutbindung wurde auch an 6 Wochen alten Ferkeln untersucht, wobei über Plasma und zelluläre Bestandteile getrennte Aussagen gemacht werden können. In Abb. 4-23 ist die Konzentration von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Blut und Plasma zu sehen. Der Tracer wird sehr schnell vom zellulären Kompartiment des Blutes aufgenommen, und von dort nach Azetazolamid-Gabe (5 mg/kg) zu einem großen Anteil (> 80 %) wieder freigesetzt. Dies bewirkt eine 35%ige Erhöhung der Radioaktivität im Plasma. Es stellt sich kein Gleichgewicht zwischen Erythrocyten und Plasma ein. Die Konzentration im Blut ist 2-fach höher als die im Plasma.



**Abb. 4-23:** Zeitverlauf der Radioaktivitäts-Konzentration von  $[^{18}\text{F}]\text{FESDS}$  im Blut (oben) und Plasma (unten) eines 6 Wochen alten Ferkels nach i.v.-Applikation von 490 MBq des Radiotracers. 24 min nach Tracer-Injektion erfolgte die i.v.-Applikation des CA-Hemmers Azetazolamid (5mg/kg).

Man kann im PET-Bild nur die großen Blutgefäße des Hirnes erkennen (Abb. 4-24). Durch eine Injektion von Azetazolamid zur Hemmung der CA-Bindung wird kein Informationsgewinn erhalten, d.h. es konnte keine Hirnregion mit hoher ES-Expression sichtbar gemacht werden.



**Abb. 4-24:** PET-Aufnahme eines Ferkel-Hirnes in 3 verschiedenen Schnittebenen nach Gabe von  $[^{18}\text{F}]\text{FESDS}$  und Azetazolamid wie in Abb. 4-23 beschrieben. Das Summenbild einer dynamischen PET-Untersuchung ist über die Zeit dargestellt. Es sind lediglich die großen Blutgefäße der Gehirnes zu erkennen. Abkürzungen: Arteria (A.), interna (int.), dorsalis (dors.)

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

[<sup>18</sup>F]FESDS wurde als potentieller PET-Tracer zur Darstellung der Estronsulfatase in Tumoren entwickelt. Zur Bewertung von [<sup>18</sup>F]FESDS war es nötig, herauszufinden, in welchen Organen dieses Enzym exprimiert wird. Es konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass die mRNA der ES in allen Rattenorganen und Hirnregionen (4.1.1) vorhanden ist. Sie ist auch in den humanen Tumorzellen HepG2 (Hepatom), MCF-7 und T-47D (beide Mammakarzinom) exprimiert, aber nicht in den FaDu-Zellen (Plattenepithelkarzinom). In Homogenaten von den Organen, Hirnregionen und Zellen wurden die Enzymaktivitäten durch die Messung der Hydrolyse von [<sup>3</sup>H]Estronsulfat bestimmt. Die höchsten ES-Aktivitäten wurden in Ovar, Uterus, Nebenniere und Fett sowie in der männlichen Hypophyse, Hippocampus und Corpus callosum des Hirnes sowie in den T-47D-Zellen gemessen.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse machte es Sinn, den Tracer *in vivo* zu prüfen. In ersten Experimenten der Bioverteilung von [<sup>18</sup>F]FESDS in der Wistar-Ratte stellte sich heraus, dass der Tracer für PET-Untersuchungen vermutlich ungeeignet ist; ca. 10 % der injizierten Dosis von [<sup>18</sup>F]FESDS wird im Blut gebunden. Es könnte sich bei dieser Bindung um eine Bindung an Carboanhydrase (CA) handeln, da sie in den Erythrocyten in hoher Konzentration vorkommt. Außerdem sind die stärksten CA-Hemmstoffe Sulfonamide, und FESDS ist eine Verbindung mit 2 Sulfonamidgruppen.

So bestand die Hoffnung, durch Hemmung der CA die Bindung des Tracers an die Estronsulfatase zu fördern. Dazu wurden in einem *In-vitro*-Assay mit gereinigten Enzymen verschiedene Hemmstoffe geprüft. Azetazolamid ist der stärkste CA-Inhibitor, die Substanz ist unter dem Namen Diamox<sup>®</sup> ein zugelassenes Therapeutikum. Azetazolamid hat keinen hemmenden Einfluß auf die Estronsulfatase. Durch *In-vitro*-Autoradiographie, Inkubationen an humanen Tumorzellen und Tierversuchen mit Wistar-Ratten wurde die Eignung von Azetazolamid als CA-Hemmer bestätigt. Auf dieser Grundlage konnte autoradiographisch die Bindung von FESDS an die Estronsulfatase bei ausgewählten Organen der Ratte berechnet werden. Zusätzlich wurde die Aufnahme durch humane Tumorzellen bestimmt.

Einen wichtigen Schritt hinsichtlich der Prüfung des Target/Nontarget-Verhältnisses machte die Untersuchung der Tracerverteilung in tumortragenden Nacktmäusen aus. Die Tumor/Muskel-Verhältnisse betragen 1,39 beim FaDu-Tumor, 2,88 beim MCF-7-Tumor und 7,87 beim HepG2-Tumor. Die beste Aufnahme des Tracers tritt somit im HepG2-Tumor auf, ob-

wohl die Zellen an sich eine eher geringe Enzymaktivität aufweisen. Dagegen haben FaDu-Zellen keine ES-Aktivität. Im Homogenat der MCF-7-Tumore wurde nur eine sehr geringe Enzymaktivität gemessen, was mit der geringen Traceraufnahme des Tumors korreliert.

Der letzte Schritt der Prüfung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS bestand in der Aufnahme von dynamischen PET-Bildern von Ratte und Ferkel. Es wurde gezeigt, dass durch Azetazolamid die Radioaktivität im Blut sehr schnell abnimmt, wodurch das Ausscheidungsorgan Leber dargestellt wird. Im Hirn des Ferkels konnten nur die großen Blutgefäße dargestellt werden.

## 5 Diskussion

Die Darstellung von Tumoren unter Einsatz von der Positronen-Emissions-Tomographie und dem Glucose-Derivat 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-Glucose (FDG) hat in der nuklearmedizinischen Diagnostik einen hohen Stellenwert (Conti *et al.*, 1996). Mit FDG können eine Vielzahl von somatischen Tumoren diagnostiziert werden, wie z.B. Lungen-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinome (Bar-Shalom *et al.*, 2000). Die Anwendung von FDG für die Tumordiagnostik hat jedoch Grenzen, da Spezifität und Sensitivität von FDG für einige Tumorarten, wie z.B. Mammakarzinom, maligne Melanome und Ovarkarzinom, zu gering ist. Des Weiteren ist die FDG-Aufnahme von Faktoren wie der mitotischen Aktivität und Wachstumsrate, der Infiltration mit Entzündungszellen nach erfolgreicher Therapie sowie der Clusterung des Tumors mit Normalzellen bzw. prämaligen Zellen abhängig (Pauwels *et al.*, 1998). Aus diesem Grund werden Tracer entwickelt, die es gestatten sollen, selektiv tumorspezifische physiologische Prozesse durch radioaktiv markierte Aminosäuren, Peptide und Steroide darzustellen (Hustinx und Alavi, 1999; Varagnolo *et al.*, 2000).

Ein neuartiger Ansatz für einen PET-Tracer ist durch die Verwendung des Steroides 16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat (FESDS), das ein starker Inhibitor des Enzyms Estronsulfatase ist (Kasch *et al.*, 1998), gegeben. Die Expression der Estronsulfatase ist in Brustkrebsgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe signifikant erhöht (Santen *et al.*, 1986). Außerdem wird die Estronsulfatase sowohl von Estradiolrezeptor-positiven als auch –negativen Tumoren exprimiert (Santner *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1994). <sup>18</sup>F-markiertes FESDS wurde deshalb von Römer *et al.* (2000) als Radiotracer-Kandidat zur Darstellung dieses Enzyms in Mammakarzinomen vorgeschlagen. Die Synthese der Substanz wurde soweit optimiert, dass in einer Zeit von 90 min bis zu 10 GBq [<sup>18</sup>F]FESDS mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 440 GBq/ $\mu$ mol hergestellt werden konnten (Römer *et al.*, 2001). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Eignung von 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat für die Positronen-Emissions-Tomographie untersuchen. Dabei werden die in der Einleitung aufgeführten Kriterien der Radiotracerbewertung von Eckelman und Gibson (1993) herangezogen.

## 5.1 Vorkommen der Estronsulfatase

Ein wichtiger Schritt für die Evaluierung eines PET-Tracers ist die Wahl eines geeigneten Targets. Für onkologische Fragestellungen wird das Enzym Estronsulfatase als geeignet erachtet; es soll mit dem neuartigen Tracer  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat dargestellt werden. Im Vorfeld ist es nötig, das Vorkommen der Estronsulfatase in Organen und Zellen nachzuweisen.

### 5.1.1 Vorkommen der Estronsulfatase in verschiedenen Organen und Tumorzellen

Die Estronsulfatase (ES; EC 3.1.6.2) ist ein Enzym, das in den meisten Wirbeltieren vorkommt; sie wurde jedoch auch in Mikroorganismen wie *Aspergillus oryzae* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie in der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) nachgewiesen (Daniel, 1985). Organe mit ES-Expression sind z.B. Plazenta, Leber, Niere, Hirn und Milz. Das Enzym der Säugetiere ist in der Zelle vorwiegend an Membranen gebunden und kommt hauptsächlich in Mikrosomen, aber auch in Mitochondrien und im Zellkern vor.

#### Expression der Estronsulfatase

Zum Nachweis der mRNA des Enzyms Estronsulfatase in Rattenorganen und Tumorzellen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Anhand der bekannten Sequenz der cDNA, einer zur mRNA komplementären DNA, von Estronsulfatase der Ratte (Li *et al.*, 1996) wurde mit der Software Oligo ein passendes Primerpaar ausgewählt. Das Primerpaar für die mRNA der humanen ES ist bereits aus einer Arbeit von Pasqualini *et al.* (1994) bekannt.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Organen der Ratte (Herz, Muskel, Lunge, Darm, Pankreas, Milz, Niere, Nebenniere, Leber, Ovar, Uterus, Fett) wurden PCR-Transkripte einer Länge von 347 bp identifiziert. Das bedeutet, dass die Estronsulfatase in diesen Geweben exprimiert ist. Die ES wird auch bei den humanen Tumorzellen HepG2 (Hepatozelluläres Karzinom), MCF-7 (Mammakarzinom) und T-47D (Mammakarzinom, pleurale Effusion) exprimiert, nicht jedoch bei den FaDu-Zellen (Plattenepithelkarzinom, Pharynx).

Die Ergebnisse werden durch Angaben anderer Autoren bestätigt. Grompe *et al.* (1992) wies die RNA von ES in der Leber von Maus und Mensch sowie in humaner Niere, Intestinum, Herz, Muskel und Hirn nach. Compagnone *et al.* (1997) konnte durch *In-situ*-Hybridisierung

die mRNA der ES in Leber, Milz, Hirn und Intestinum der embryonalen Maus nachweisen. Das Vorkommen der cDNA der ES wurde von Li *et al.* (1996) in Rattenleber und -niere nachgewiesen. In den humanen Brustkrebszellen MCF-7 und T-47D-Zellen ist mRNA der ES enthalten (Pasqualini *et al.*, 1994; Newman *et al.*, 2000). Es gibt keine Arbeiten, die ein Vorkommen von mRNA der ES in den HepG2- und FaDu-Zellen bestätigen. Die ES kommt aber in der gesunden humanen Leber vor (Huang *et al.*, 1997).

#### Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität in Rattenorganen

Da die mRNA der Estronsulfatase in allen untersuchten Rattenorganen vorhanden ist, wurde die Enzymaktivität quantitativ bestimmt. Diese Bestimmung ist insofern wichtig, da Aussagen getroffen werden müssen, welches Target/Nontarget-Verhältnis zu erwarten ist. Die Bestimmung der ES-Aktivität erfolgte nach einem Assay von Reed und Ohno (1976), mit dem der Umsatz von [<sup>3</sup>H]Estronsulfat bei 37°C gemessen wird. Die Organe Uterus, Ovar und Nebenniere haben sehr hohe ES-Aktivitäten (349, 417 bzw. 211 pmol/mg Protein/min), aber auch das Fettgewebe weist mit 281 pmol/mg Protein/min einen sehr hohen Substratumsatz auf. Organe mit geringer ES-Aktivität sind z.B. Niere und Milz (22 und 36 pmol/mg Protein/min).

Tabelle 5-1: Enzymaktivitäten der Estronsulfatase [pmol/mg Protein/min] in Organen von weiblichen Versuchstieren und der Frau, Literaturangaben und eigene Daten.

Organ	Maus	Ratte	Rhesusaffe	Mensch	Eigene Daten
Herz	1,33		$0,05 \cdot 10^{-3}$	63,3	51,1
Lunge	1,67		$0,35 \cdot 10^{-3}$	431,7	93,6
Leber	0,83	800	$0,34 \cdot 10^{-3}$	265,0	92,8
Intestinum	0,67		$0,30 \cdot 10^{-3}$	226,7	63,1
Milz	0,50	567	$0,76 \cdot 10^{-3}$	276,7	35,6
Pankreas	0,92			243,3	48,1
Nebenniere	3,42		$4,42 \cdot 10^{-3}$	193,3	211,4
Niere	0,50	4917	$0,59 \cdot 10^{-3}$	273,3	21,9
Ovar	2,71	1283	$0,24 \cdot 10^{-3}$		349,1
Uterus	0,75	700	$0,47 \cdot 10^{-3}$	336,7	416,5
Fett	1,08		$0,07 \cdot 10^{-3}$		281,0

Literatur: Milewich *et al.* (1984; Maus; Angabe in pmol/mg Gewebe/min), Zuckerman und Hagerman (1969; Ratte), Martel *et al.* (1994; Rhesusaffe), Munroe und Chang (1987; Mensch)

Die eigenen Daten bzgl. der ES-Aktivität in Rattenorganen korrelieren sehr gut ( $r = 0,91$ ) mit den von Milewich *et al.* (1984) an Mäusen bestimmten ES-Aktivitäten. Ovar und Uterus wur-

den in diese Korrelation nicht einbezogen. Der Grund dafür ist, dass die Mäuse von Milewich bereits 5 Monate alt und damit geschlechtsreif waren; die für die vorliegende Arbeit verwendeten Tiere waren lediglich 6 Wochen alt und noch nicht geschlechtsreif. Der Autor setzte ebenso eine Substratkonzentration (15  $\mu\text{M}$ ) im Bereich des  $K_m$ -Wertes der ES und Präparationen des gesamten Gewebes ein. Er zeigte außerdem, dass unter Verwendung einer geringeren Substratkonzentration (0,19  $\mu\text{M}$ ) wesentlich niedrigere Enzymaktivitäten gemessen werden (Ovar: 0,02 pmol/mg/min bei 0,19  $\mu\text{M}$  E<sub>1</sub>S gegenüber 2,5 pmol/mg/min bei 15  $\mu\text{M}$  E<sub>1</sub>S).

In Tabelle 5-1 ist zu sehen, dass Zuckerman und Hagerman (1969) für die Niere eine außergewöhnlich hohe ES-Aktivität (4917 pmol/mg Protein/min) ermittelten. Die eigenen Daten weisen für dieses Organ mit 22 pmol/mg Protein/min den geringsten Substratumsatz aus. Der Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Autoren mit einer Estronsulfat-Konzentration arbeiteten, die mutmaßlich weit oberhalb des  $K_m$ -Wertes und damit im Sättigungsbereich des Enzyms (150  $\mu\text{M}$ ) liegt. Des weiteren verwendeten sie das durch Zentrifugation (600 g) entstandene Pellet; die Ratten waren bereits 12–24 Wochen alt.

Martel *et al.* (1994) wies die Estronsulfatase in 25 Organen des Rhesusaffen nach, nicht jedoch in dessen Speicheldrüsen. Die Tiere waren zwischen 7 und 11 Jahre alt und die Enzymbestimmung wurde mit einer Substratkonzentration (10 nM), die etwa 1000-fach unter dem  $K_m$ -Wert liegt, durchgeführt. Die höchste ES-Aktivität ermittelte der Autor mit 4,42 fmol/mg Protein/min in der weiblichen Nebenniere des Rhesusaffen, was der 10-fachen Enzymaktivität der männlichen Nebenniere entspricht. Es wurde keine Korrelation der ES-Aktivitäten zwischen weiblichen Rhesusaffen und denen der Ratte gefunden, was möglicherweise auf die Alters- und Speziesunterschiede zurückzuführen ist.

Auch die von Munroe und Chang (1987) berechneten ES-Aktivitäten von Zentrifugat-Überständen (105.000 g) humaner Organproben korrelieren nicht mit den eigenen Daten, da eine zu hohe Substratkonzentration (100  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurde. Der Autor zeigte in den Organen von Frauen im Gegensatz zu denen von Männern eine leicht erhöhte ES-Aktivität, die in Herzmuskel, Gonaden und Niere signifikant höher ist. Für die übrigen Organe besteht keine Signifikanz.

Aus dem Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität in den Organen läßt sich ableiten, dass es wichtig ist, die Substratkonzentration im  $K_m$ -Bereich

des Enzyms zu wählen und Homogenate des Gewebes zu verwenden. Die eigenen Daten korrelieren mit den Ergebnissen von Milewich *et al.* (1984), was auf die Zuverlässigkeit der eigenen eingesetzten Methode schließen lässt.

Die Expression und hohe Enzymaktivität der ES im Fettgewebe ist im übrigen für die Brustkrebstherapie bzw. -prävention von Bedeutung; ein hoher Anteil von Körperfett gilt als Risikofaktor. Das Fettgewebe hat aufgrund seiner hohen ES-Aktivität ein großes Potential, Estrogene zu produzieren. Gelingt es, durch Bewegung und Ernährungsumstellung den Körperfett-Anteil zu reduzieren, so würden weniger tumorwachstums-fördernde Estrogene produziert. Dies ist um so wichtiger, da auch die Aromatase, die Androstendiol zu Estradiol umsetzt, im Fettgewebe vorkommt (Cohen, 2001). Somit würde man durch Reduktion des Körperfetts den Anteil zweier Enzyme, die Estrogene freisetzen und das Tumorwachstum fördern, vermindern.

#### Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität in humanen Tumorzellen

In den T-47D-Zellen (Metastase des Mammakarzinoms) wurde mit 5,1 pmol/mg Protein/min die höchste Enzymaktivität gemessen, die 2,4-fach höher ist als die der MCF-7-Zellen (Mammakarzinom). In Tabelle 5-2 ist zu sehen, dass Pasqualini *et al.* (1994) ebenso in den Homogenaten von T-47D-Zellen höhere ES-Aktivitäten als in den MCF-7-Zellen bestimmten. Diese Enzymaktivitäten sind jedoch viel höher als die eigenen Daten. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen verschiedene Nährmedien erhielten. Die Zellen, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, wuchsen in RPMI-Nährmedium wie es von der DSMZ in Heidelberg vorgeschlagen wurde, die von Pasqualini in MEM-Nährmedium. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass das RPMI-Medium ein mit Aktivkohle gestripptes Serum und 5 nM Estradiol enthielt, um zu gewährleisten, dass eine physiologische Estradiol-Konzentration vorliegt. Das MEM-Medium von Pasqualini enthielt dagegen ungestripptes Serum ohne Estradiolzusatz. Es ist möglich, dass die verschiedenen Medienbestandteile die Aktivität der ES in unterschiedlichem Maße stimulierten.

Pasqualini *et al.* (1996) konnten bei konfluenten im Gegensatz zu homogenisierten hormonunabhängigen Zellen fast keinen Umsatz des Substrates Estronsulfat und damit keine Estronsulfatase-Aktivität messen. Die ES-Aktivität der hormonunabhängigen Zellen MDA-MB-231 wird erst nach Homogenisierung messbar. In dieser Arbeit sollte jedoch ein Tumormodell auf Nacktmäusen etabliert werden, das eine Assoziation intakter Zellen darstellt. Dafür wären die

hormonunabhängigen Zellen mit ihrer geringen ES-Aktivität nicht geeignet. Daher wurden die hormonabhängigen Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und T-47D gewählt. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung dieser beiden Zelllinien liegt darin, dass die Zellen unterschiedliche ES-Aktivitäten aufweisen. Die MCF-7-Zellen wurden von einem Primärtumor und die T-47D-Zellen von einer Metastase isoliert.

Tabelle 5-2: Aktivitäten der Estronsulfatase in humanen Zellen, Literaturangaben und eigene Daten.

Zelllinie	Herkunft	Enzymaktivität [pmol/mg Protein/min]	Autor
MCF-7	Mammakarzinom, hormonabhängig, Primärtumor	19 pmol/mg/min	Evans <i>et al.</i> (1993)
		140	James <i>et al.</i> (2001)
		87	Pasqualini <i>et al.</i> (1994)
		2,1	eigene Daten
T-47D	Mammakarzinom, hormonabhängig, Metastase	80 pmol/mg/min	Evans <i>et al.</i> (1993)
		878	Pasqualini <i>et al.</i> (1994)
		5,1	eigene Daten
MDA-MB-231	Mammakarzinom, hormonunabhängig	27 pmol/mg/min	Evans <i>et al.</i> (1993)
		322	Pasqualini <i>et al.</i> (1994)
MDA-MB-436	Mammakarzinom, hormonunabhängig	140	Pasqualini <i>et al.</i> (1994)
ZR-75-1	Mammakarzinom, hormonabhängig	56 pmol/mg/min	Evans <i>et al.</i> (1993)
HBL 100	Brustzellen	10 pmol/mg/min	Evans <i>et al.</i> (1993)

Nach den von Evans *et al.* (1993) veröffentlichten Daten haben Tumorzellen eine 2–8-fach höhere ES-Aktivität im Vergleich zur Nicht-Tumor-Zelllinie HBL 100. Dies entspricht den Angaben von Pasqualini *et al.* (1997) und Utsumi *et al.* (2000), die eine signifikant höhere ES-Expression in malignem im Gegensatz zu nichtmalignem Brustgewebe bestimmten.

Die Enzymaktivitäten der in dieser Arbeit verwendeten Zellen weisen im Vergleich zu denen der Rattenorgane eine sehr geringe Enzymaktivität auf. Das deutet darauf hin, dass *in vivo* das Target/Nontarget-Verhältnis zwischen Tumor und gesundem Gewebe zu gering und dadurch der Tumor nicht darstellbar sein wird. Es bestand jedoch die Hoffnung, dass die Enzymaktivität *in vivo* höher ist und dass damit das Target/Nontarget-Verhältnis verbessert würde. Die ES-Aktivität wird z.B. durch Interleukin-6 und Tumor-Nekrosis-Faktor erhöht (Purohit *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 2000). Auch bestehen im Tumor Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen wie z.B. Epithelzellen, Stromazellen, Makrophagen und Lymphocyten (Dickson, 1990; Valverius *et al.*, 1990). Die Blutgefäße, die von dem Tumor neu angelegt werden, bilden

zusätzliche Wachstumsfaktoren (Weidner, 1998; Folberg *et al.*, 1993). Wenn diese Faktoren *in vivo* vorliegen, könnte der Tumor eine höhere ES-Aktivität als das *In-vitro*-Zellmodell haben. Es ist somit zu erwarten, dass die Tumorzellen, wenn sie Mäusen implantiert sind, während ihres Heranwachsens zu einem soliden Tumor auf verschiedene Weise stimuliert werden und eine höhere ES-Aktivität aufweisen. Die von Santner *et al.* (1984) ermittelten ES-Aktivitäten in Proben von humanem Brustkrebsgewebe, die zwischen 13 pmol/mg Protein/min und 2083 pmol/mg Protein/min (Median: 61,5 pmol/mg Protein/min) liegen, deuten darauf hin, dass dies möglich ist. Auch Evans *et al.* (1994) bestimmten hohe Enzymaktivitäten in Brustkrebsgewebe: 0–399 pmol/mg/min (Median: 41 pmol/mg/min). Die ES-Aktivitäten bezogen auf mg Protein können etwa 10-fach höher angesetzt werden, da erfahrungsgemäß das Feuchtgewicht von Geweben zu ca. 10 % aus Protein besteht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Enzym Estronsulfatase in allen untersuchten Rattenorganen sowie in den humanen Tumorzellen MCF-7, T-47D und HepG2 nachgewiesen wurde. Die höchsten ES-Aktivitäten wurden in Ovar, Uterus und Fett gemessen. Wenn es gelingt, ein Tumormodell zu etablieren, bei dem die ES ähnliche Enzymaktivitäten aufweist wie in humanen Tumorproben, dann könnte das Target/Nontarget-Verhältnis für eine Darstellung des Tumors mit der PET ausreichen.

### 5.1.2 Vorkommen der Estronsulfatase im Hirn

Metastasen des Mammakarzinoms können auch in das Hirn absiedeln (Riede und Sterry, 1995). Um die Metastasen (Target) dort aufzufinden, ist es wichtig zu wissen, wie stark die Estronsulfatase im Hirn (Nontarget) exprimiert ist.

Einleitend seien einige Bemerkungen zur Rolle der ES im Hirn gemacht. Sie ist daran beteiligt, dass Neurosteroiden unabhängig von den Gonaden und der Nebenniere durch Biosynthese im Hirn *de novo* hergestellt werden können (Baulieu, 1997). Neurosteroiden haben im Gegensatz zu den Steroiden des Körpers keine vorrangig transkriptionale Aktivität. Sie modulieren die Neurotransmission durch spezifische, positiv allosterische Interaktion mit der Steroid-Erkennungsseite am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Ionen-Kanal-Komplex und inhibieren spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Ströme sowie N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorfunktionen (Gasior *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die ES eine regulatorische Rolle bei der Hirnentwicklung spielt (Purinton *et al.*, 1999) und im adulten Hirn den Aktivitätsmodus von Neurosteroiden

reguliert (Le Roy *et al.*, 1999). Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), ein Substrat der ES, steigert die cholinerge Neurotransmission im Hippocampus und fördert Gedächtnisleistungen (Rhodes *et al.*, 1996; Flood *et al.*, 1992). Die ES regelt im embryonalen Hirn während der Neocortex-Organisation das Verhältnis zwischen DHEA und DHEAS und kontrolliert damit bei den cortex-thalamischen Nervenfasern das Wachstum der Axone gegenüber dem der Dendriten (Compagnone und Mellon, 1998).

Daten von präklinischen und klinischen Studien weisen auf die potentielle Wirksamkeit von neuroaktiven Steroiden bei der Therapie von Epilepsie, Angst, Schlaflosigkeit, Migräne und Drogenabhängigkeit hin. Bei Epilepsie wurde bisher durch Medikamente weder eine adäquate Kontrolle über die epileptischen Anfälle noch eine Prävention vor der Entwicklung progressiver epileptischer Veränderungen im Menschen erreicht (McNamara *et al.*, 1999; Shinnar und Berg, 1996). Auch für Angst gibt es kein pharmakologisches Management. Der Erforschung der Expression und Aktivität der ES im Hirn, die an der Bereitstellung von Steroidhormonen beteiligt ist, hat daher neben den onkologischen Fragestellungen eine große Bedeutung.

#### Expression der Estronsulfatase im Rattenhirn

Der Nachweis des Vorkommens von Estronsulfatase im Rattenhirn erfolgte mit RT-PCR, wie bereits an den übrigen Rattenorganen und Tumorzellen durchgeführt. Die mRNA der Estronsulfatase konnte in allen untersuchten Hirnregionen nachgewiesen werden: Cortex, Cerebellum, Colliculi inferiores, Colliculi superiores, Mesencephalon, Thalamus, Striatum, Hippocampus, Corpus callosum, Pons, Hypophyse. Das stimmt mit den Ergebnissen von Compagnone *et al.* (1997) überein, die mRNA der ES im embryonalen Maushirn (Cortex, Nachhirn, Thalamus) sowie im adulten Rattenhirn (Cortex, Thalamus, Nachhirn, Cerebellum) nachwiesen.

#### Bestimmung der Estronsulfatase-Aktivität im Rattenhirn

Für eine Erkennung von Metastasen des Mammakarzinoms im Gehirn ist die Kenntnis über das zu erwartende Target/Nontarget-Verhältnis wichtig. Von allen Hirnregionen, in denen die mRNA der ES nachgewiesen wurde, erfolgte eine Bestimmung der Enzymaktivität. Die männliche Hypophyse hat mit 2670 pmol/mg Protein/min eine besonders hohe ES-Aktivität, die 13,6-fach höher als die der weiblichen Hypophyse ist. Des Weiteren wurden in Hippocampus, Corpus callosum und Mesencephalon hohe ES-Aktivitäten (311–372 pmol/mg Protein/min) ermittelt.

Die in dieser Arbeit gemessene außerordentlich hohe Enzymaktivität in der männlichen Hypophyse wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Nelson *et al.* (1983) fand für 6 Wochen alte Mäuse, dass es im Hirn keine Geschlechtsunterschiede für die ES-Aktivität gibt. Lakshmi und Balasubramanian (1981) zeigten, dass die ES-Aktivität der männlichen Hypophyse des Primaten *Macaca radiata* 4-fach höher ist als die der weiblichen Hypophyse. Von Hobkirk *et al.* (1987) wurde für Ratte und Meerschwein kein signifikanter Unterschied zwischen den ES-Aktivitäten der männlichen und weiblichen Hypophyse gemessen. Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Autor mit dem bei 750 g zentrifugiertem Pellet arbeitete, in der vorliegenden Arbeit wurde Organhomogenat eingesetzt. Die ES ist vorrangig in Mikrosomen enthalten, die nach Zentrifugation eher im Überstand und weniger im Pellet enthalten sind (MacIndoe, 1988; Park *et al.*, 1997). Außerdem sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere 6 Wochen und die von Hobkirk 1-4 Wochen alt. Der Autor zeigte, dass die ES-Aktivität des Hirnes mit dem Alter steigt.

Für die übrigen Hirnregionen stimmen die ermittelten Enzymaktivitäten gut mit denen anderer Studien überein. Die von Iwamori *et al.* (1976) ermittelte ES-Aktivität im Hirn von 4 Wochen alten Ratten beträgt 247 pmol/mg Protein/min, der  $K_m$ -Wert beträgt 32  $\mu$ M. Die von Perumal und Robins (1973) publizierten Werte des Humanhirnes (6,7–231 pmol/mg Protein/min) liegen im Bereich derer des Rattenhirnes, wobei die regionale Differenz sehr groß ist. Das Verhältnis Hippocampus/Cerebellum beträgt für den Menschen 2 und für die Ratte 10; das Verhältnis Thalamus/Hippocampus beträgt 2 für den Menschen und 0,4 für die Ratte. Eto *et al.* (1974) fanden bezüglich der ES-Aktivität zwischen der weißen und der grauen Substanz des humanen Hirnes keine signifikanten Unterschiede. Die eigenen Daten zeigen für das Corpus callosum (weiße Substanz) eine 7,4-fach höhere ES-Aktivität als im Cortex (graue Substanz) auf.

Grundsätzlich scheint die ES-Aktivität im hinteren Teil des Hirnes, der auch Mittelhirn, Thalamus und Cerebellum einschließt, höher zu sein als im vorderem Hirnteil (Kishimoto und Sostek, 1972; Perumal und Robins, 1973; Lakshmi und Balasubramanian, 1981; Kawano und Aikawa, 1987). Interessanterweise stimmt diese Verteilung mit dem Vorkommen von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), einem wichtigen Substrat der ES, überein (Corpechot *et al.*, 1981). Kawano und Aikawa (1987) untersuchten die Verteilung der ES nicht nur biochemisch, sondern auch histochemisch und fanden eine gute Übereinstimmung beider Methoden.

Compagnone *et al.* (1997) nutzten die *In-situ*-Hybridisierung und ermittelten eine Verteilung, die eng mit dem übereinstimmt, was mit dem biochemischen Assay gemessen wurde.

Schlußfolgernd für diesen Abschnitt ist festzustellen, dass die mRNA des Enzyms Estronsulfatase in allen untersuchten Hirnregionen der Ratte vorkommt. Hohe Enzymaktivitäten wurden in Hypophyse, Hippocampus, Corpus callosum und Mesencephalon bestimmt. Prinzipiell erscheint es möglich, durch die Darstellung der ES mit [<sup>18</sup>F]FESDS Brustkrebs-Metastasen im Hirn nachzuweisen.

## 5.2 FESDS - ein Inhibitor der Estronsulfatase

Die Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS sollte *in vivo* auf ihre Hemmbarkeit durch FESDS geprüft werden. Dieser Nachweis ist grundsätzlich nur möglich, wenn sich die Inhibition bereits *in vitro* zeigen läßt. Daher wurde geprüft, ob und wie stark FESDS die Estronsulfatase sowohl in Zell- als auch in Organhomogenaten hemmt.

Verschiedene Hemmstoffe der Estronsulfatase sind aus der Literatur bekannt, wobei die wichtigsten in Tabelle 5-3 aufgeführt sind. Die Substanzen wurden von den Autoren in Hinblick auf eine onkogene Therapie bzw. als Kontrazeptivum entwickelt. Estron-3-O-sulfamat (EMATE) war der erste starke irreversible Hemmer der Estronsulfatase. Es folgten nicht-steroidale Verbindungen, die keine estrogenen Wirkungen haben (Purohit *et al.*, 2000 und 2001; Malini *et al.*, 2000). Eine andere Herangehensweise bei der Suche nach geeigneten ES-Inhibitoren war die Synthese steroidaler Estradiol-Analoga. Dabei ist 16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat (FESDS) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 25 nM der stärkste der von Kasch *et al.* (1999) synthetisierten Inhibitoren der ES. Die Verbindung ist nicht toxisch und wirkt nicht estrogen; die Hemmung der ES ist reversibel. Toxizität und Estrogenität sind im übrigen unerheblich, wenn man die Substanz als PET-Tracer anwenden möchte. Bei PET-Untersuchungen werden in der Regel so geringe Stoffmengen eingesetzt, dass deren Konzentrationen im Blut im picomolaren Bereich liegen und pharmakologische Wirkungen ausgeschlossen werden können.

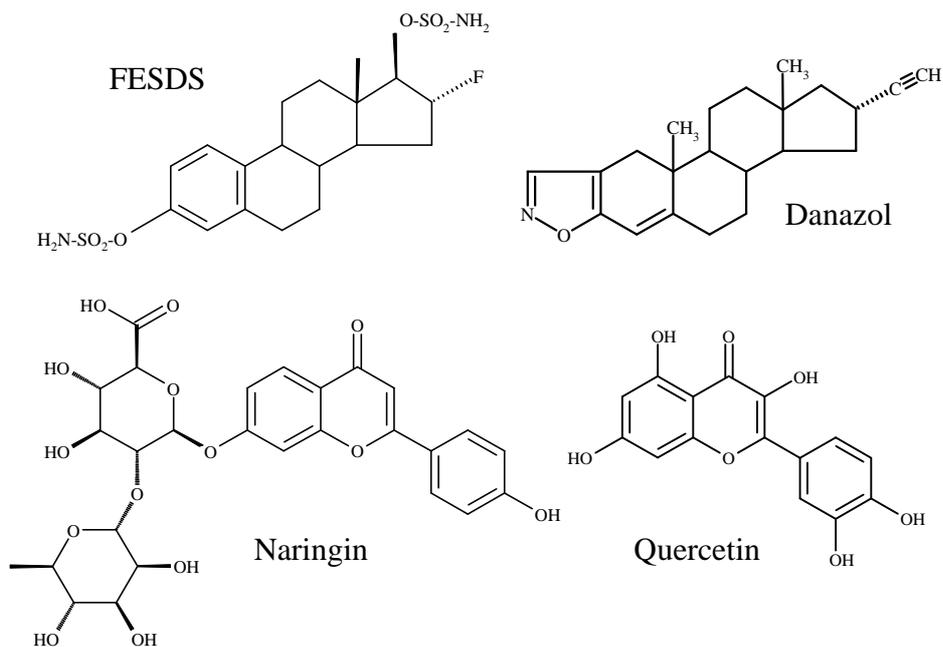
Von Chu *et al.* (1999) wurde sulfamatiertes Tamoxifen synthetisiert, das eine schwach hemmende Wirkung auf die Estronsulfatase hat. Tamoxifen<sup>®</sup> selbst hemmt die ES nicht (Evans *et al.*, 1991), es ist vorrangig ein Antagonist des Estradiolrezeptors.

Tabelle 5-3: Estronsulfatase-Inhibitoren, die von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt wurden.

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]	Literatur
Estron-3-O-sulfamat (EMATE)	80	Reed <i>et al.</i> (1994)
Androstendiol-3-Sulfat	2000	Reed <i>et al.</i> (1994)
Coumarin-7-O-Sulfamat	78 % Inh. bei 10 µM	Woo <i>et al.</i> (1996)
4-Methylcoumarin-7-O-sulfamat (COUMATE)	380	Woo <i>et al.</i> (1996)
665 COUMATE	200	Purohit <i>et al.</i> (2001)
666 COUMATE	70	Purohit <i>et al.</i> (2001)
667 COUMATE	8	Purohit <i>et al.</i> (2000), Woo <i>et al.</i> (2000)
6610COUMATE	1	Malini <i>et al.</i> (2000)
3,4-Dimethylcoumarin-3-O-Sulfamat	30	Woo <i>et al.</i> (1998)
Estron-3-Methylthiophosphonat	14600	Duncan <i>et al.</i> (1993)
DHEA-3-O-Methylphosphonat	4500	Purohit <i>et al.</i> (1994)
Pregnenolon-3-O-Methylphosphonat	1400	Purohit <i>et al.</i> (1994)
Fluorestradiol-3-Monosulfamat (FESMS)	80	Kasch <i>et al.</i> (1999)
Fluorestradiol-17-Monosulfamat	2500	Kasch <i>et al.</i> (1999)
Fluorestradiol-3,17-Disulfamat (FESDS)	25	Kasch <i>et al.</i> (1999)
Bromestradiol-3,17-Disulfamat	20	Kasch <i>et al.</i> (1999)
4-Hydroxytamoxifensulfamat	35900	Chu <i>et al.</i> (1999)
Quercetin	< 10000	Huang <i>et al.</i> (1997)
Naringenin	70 % Inh. bei 100 µM	Huang <i>et al.</i> (1997)
Danazol	46 % Inh. bei 10 µM	Yamamoto <i>et al.</i> (1993)

Es gibt auch Naturstoffe, die das Enzym Estronsulfatase hemmen: Quercetin und Naringenin (Huang *et al.*, 1997). Quercetin (5,7,3',4'-Hydroxyflavanol) und Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon) sind Flavonoide und kommen in Pflanzen vor, besonders in Gemüse und Obst (Hertog *et al.*, 1996). Quercetin ist in 56 % der von Sawin und Bathe-Smith (1962) untersuchten Blätter höherer Pflanzen enthalten. Die Flavonoide hemmen neben der ES auch die Aromatase (Kellis und Vickery, 1984; Wang *et al.*, 1994).

Danazol ist ein synthetisches Derivat des Testosteron und der erste ES-Inhibitor, der zur Behandlung von Endometrium-Karzinomen eingesetzt wurde (Jasonni *et al.*, 1986). Es blockiert signifikant die Umwandlung von [<sup>3</sup>H]Estronsulfat zu Estradiol in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien, ist aber nur ein schwacher ES-Inhibitor (Nguyen *et al.*, 1993). Danazol hemmt jedoch zusätzlich die Aromatase (Urabe *et al.*, 1989). Das ist für therapeutische Ansätze sehr gut geeignet, da gleichzeitig die für die Hormonsynthese wichtigen Enzyme ES und Aromatase blockiert werden.



**Abb. 5-1:** Strukturformeln der eingesetzten Estronsulfatase-Inhibitoren

Von den bekannten ES-Inhibitoren wurden 4 verfügbare Substanzen ausgewählt: FESDS, Naringin, Quercetin und Danazol (Abb. 5-1). Anstatt des von Huang *et al.* (1997) vorgeschlagenen Naringenin wurde Naringin (Naringenin-7-Rhamnosidoglucoosid) verwendet, da auch die Flavon-Glycoside enzyminhibitorisch wirken (Teuscher und Lindequist, 1994). Die Hemmung der Estronsulfatase durch die eingesetzten Inhibitoren (10  $\mu$ M) wurde an Homogenaten von Rattenorganen und -hirnregionen untersucht. Die stärkste Hemmung ist entsprechend den in Tabelle 5-3 aufgeführten  $IC_{50}$ -Werten durch FESDS zu verzeichnen. FESDS hemmt die Estronsulfatase am stärksten in Pankreas und Leber (99 % bzw. 84 %) sowie im Cerebellum und Pons (52 % bzw. 51 %).

Die Inhibition der ES in den Organhomogenaten durch Naringin ist sehr gering, die durch Quercetin ist zumindest in der Niere signifikant. Dies stimmt mit den von Huang *et al.* (1997) publizierten Daten überein; der Autor ermittelte ebenso durch Quercetin eine stärkere ES-Hemmung. Im Cerebellum erfolgt eine 14%ige Inhibition durch Naringin und eine 38%ige Inhibition durch Quercetin. Bemerkenswert ist beim Darm die vergleichsweise starke ES-Inhibition durch die Flavonoide (Quercetin 18 %), die größer als die durch FESDS (6 %) ist. Es wäre möglich, dass die ES der im Darm enthaltenen Bakterien (Van Eldere *et al.*, 1988) besonders empfindlich auf die Flavonoide reagiert. Aber von Huijghebeart *et al.* (1984) wird berichtet, dass in dem hier verwendeten Darmabschnitt (oberer Dünndarm) die mikrobielle

ES-Aktivität marginal ist. Eher ist ein zusätzlicher Mechanismus in Betracht zu ziehen, der für die Inhibition eine Rolle spielt. Dies könnte eine Methylierung durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) sein, da die Catecholstruktur des Quercetin ein sehr guter Akzeptor von Methylgruppen ist (Zhu *et al.*, 1994). Somit könnten die Flavonoide mit der COMT methyliert und damit für die ES-Hemmung aktiviert werden (Boulton *et al.*, 1999). Die Aktivitäten der COMT sind in den Organen der Ratte unterschiedlich hoch. Karhunen *et al.* (1994) fanden mit immunhistochemischer Färbung eine besonders hohe COMT-Expression in Leber und Niere, Hypophyse, cerebralen Ventrikeln und Choroidplexus des Hirnes sowie im Darm. Möglicherweise ist die COMT des Darmes der Schlüssel zur starken Hemmung durch die Flavonoide. Für Naringin ist es außerdem notwendig, dass die glycosidische Bindung gespalten wird, da erst dann eine Aktivierung der Substanz erfolgt (Teuscher und Lindequist, 1994).

Auch die Prüfung der Affinitätskonstante des Substrates der Estronsulfatase ist für eine umfassende Charakterisierung von [<sup>18</sup>F]FESDS als potentiellen PET-Tracer notwendig. Dazu wurde das Organ mit der höchsten Enzymaktivität herangezogen: die männliche Rattenhypophyse. Der IC<sub>50</sub>-Wert der Hemmung durch Estronsulfat beträgt 29 µM. Vaccaro *et al.* (1987) ermittelte für Estronsulfat an Mikrosomen humaner Plazenta eine Inhibitionskonstante von 40 µM. Diese Übereinstimmung trotz der unterschiedlichen Proben (Homogenat bzw. Mikrosomen) und des Speziesunterschiedes (Ratten bzw. Mensch) ist sehr gut. Das wird als Hinweis auf die Zuverlässigkeit der mit dem ES-Assay durchgeführten Bestimmungen gewertet.

Danazol ist im Vergleich zu Naringin und Quercetin in den Homogenaten humaner Tumorzellen der stärkste ES-Inhibitor; die IC<sub>50</sub>-Werte betragen an den MCF-7-, T-47D und HepG2-Zellen um 75 µM. Die Hemmung mit 10 µM Danazol beträgt 46 % bei den MCF-7-Zellen und 27 % bei den T-47D-Zellen, was sehr gut mit Literaturdaten übereinstimmt. Nguyen *et al.* (1993) ermittelte, dass 10 µM Danazol die ES bei den MCF-7-Zellen zu 38 % hemmt und bei den T-47D-Zellen zu 27 %.

Für die Flavonoid-Inhibitoren Naringin und Quercetin wurden ebenfalls IC<sub>50</sub>-Werte an den Zellhomogenaten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die IC<sub>50</sub>-Werte von Quercetin bei allen 3 Zelllinien jeweils niedriger als die von Naringin sind. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der Organhomogenate überein, bei denen auch Quercetin stärker als Naringin hemmt. Der für Quercetin an Homogenaten der HepG2-Zellen ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert von 28 µM entspricht in der Größenordnung dem von Huang *et al.* (1997) publiziertem Wert. Übereinstimmend mit

den Ergebnissen von Huang *et al.* (1997) ist die Quercetin-Hemmung der Estronsulfatase in MCF-7-Zellen im Vergleich zu der in Leber bzw. HepG2-Zellen gering.

Die IC<sub>50</sub>-Werte für Naringin und Quercetin schwanken jeweils sehr stark bei den verschiedenen Zelllinien. Das könnte auf eine unterschiedliche COMT-Aktivität bzw. die unterschiedliche Spaltung der glycosidischen Bindung des Naringin zurückzuführen sein. Boulton *et al.* (1999) zeigte für die HepG2-Zellen eine O-Methylierung des Quercetin durch die COMT auf, wobei Isorhamnetin gebildet wird. Die Expression von COMT in HepG2-Zellen wird von Bertocci *et al.* (1991) bestätigt. Bergman-Jungstrom und Wingren (2001) beschrieben die Expression von COMT in Mammakarzinomen. Interessanterweise kann Quercetin, welches zu 2-5 % der Nahrung zugesetzt wird, bei Ratten tatsächlich die Entstehung von Brustkrebs unterbinden (Verma *et al.*, 1988). Das wird auf eine Inhibition der Zellproliferation zurückgeführt (Avila *et al.*, 1994). Somit hemmt Quercetin die ES, damit die Freisetzung von Estron bzw. Estradiol und damit wiederum die Aktivierung der Gentranskription und Zellproliferation.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass FESDS unter den 4 geprüften Verbindungen Naringin, Quercetin, Danazol, FESDS der stärkste Hemmer der Estronsulfatase ist. Die Flavonoide Naringin und Quercetin inhibieren die ES nur schwach, wobei die Wirkung von Naringin geringer als die von Quercetin ist. Auch das Substrat der ES, Estronsulfat, hemmt in hohen Konzentrationen die Enzymaktivität. Demzufolge ist für *In-vivo*-Versuche zu erwarten, dass FESDS die Tracerbindung am stärksten hemmt.

### 5.3 [<sup>18</sup>F]FESDS – ein Radiotracer zur Darstellung der Estronsulfatase

In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, ob der Radiotracer [<sup>18</sup>F]FESDS die Estronsulfatase spezifisch bindet. Die mit dem Enzym-Assay erhaltenen Daten korrelieren sehr gut mit Literaturangaben, wodurch die Zuverlässigkeit dieser Messungen bestätigt wird. Für den Radiotracer [<sup>18</sup>F]FESDS sollte geprüft werden, ob er das Vorliegen der Estronsulfatase nachweisen kann. Es wurden Methoden der *In-vitro*-Autoradiographie, Zellinkubation sowie *In-vivo*-Bioverteilung an Ratten durchgeführt. Durch den Einsatz von ES-Inhibitoren wurde die Spezifität der Tracerbindung geprüft.

#### *In-vitro*-Autoradiographie

Am Rattenhirn wurde durch *In-vitro*-Autoradiographie gezeigt, dass die [<sup>18</sup>F]FESDS-Bindung mit FESDS hemmbar ist. Diese Hemmung beträgt bei Einsatz von 10 µM FESDS 46-84 %. Auch an FaDu-Tumorschnitten, die keine ES exprimieren, konnte die [<sup>18</sup>F]FESDS-Bindung signifikant mit FESDS gehemmt werden. Wurden die ES-Inhibitoren Naringin und Quercetin eingesetzt, so war weder an Hirn- noch an Leber- und Nierenschnitten eine Hemmung der Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass [<sup>18</sup>F]FESDS nicht spezifisch an die ES bindet.

#### Zellinkubation

Konfluente humane Tumorzellen nehmen den Tracer [<sup>18</sup>F]FESDS auf. Diese Aufnahme wurde mit Estronsulfat und FESDS gehemmt. Die Ergebnisse zeigen, dass FESDS mit IC<sub>50</sub>-Werten um 0,1 µM der stärkere Inhibitor der Traceraufnahme ist; Estronsulfat hemmt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,9 µM. MacIndoe *et al.* (1988) publizierte einen K<sub>i</sub>-Wert von 11 µM für Estronsulfat an MCF-7-Zell-Homogenaten, der in der gleichen Größenordnung wie der hier ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert liegt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Traceraufnahme der MCF-7-Zellen eine Bindung an die Estronsulfatase darstellt. Es ist jedoch ebenso möglich, dass Transportprozesse am Zustandekommen der IC<sub>50</sub>-Werte beteiligt sind. Die K<sub>m</sub>-Werte einiger bekannter Transporter für Estronsulfat betragen 2,3 µM (Kusuhara *et al.*, 1999) bzw. 1,0 µM (Cha *et al.*, 2000). Bei FESDS ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass Transportprozesse eine größere Rolle spielen, da der IC<sub>50</sub>-Wert von FESDS an humaner Estronsulfatase (25 nM; Kasch *et al.*, 1999) 4-fach geringer als der an konfluenten Zellen ermittelte Wert ist.

Die Versuche an den konfluenten Tumorzellen lassen erste Vermutungen über das Verhalten des Tracers *in vivo* zu. Es ist zu erwarten, dass [<sup>18</sup>F]FESDS nicht unbedingt in den Organen

mit hoher ES-Aktivität besonders stark angereichert wird, sondern unter Umständen in Organen mit geringer Enzymaktivität aber geeigneten Transportern.

#### In-vivo-Bioverteilung an Ratten

Die Bioverteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wurde an Wistar-Ratten untersucht. Ziel war die Prüfung des Tracers auf seine Eignung für die Positronen-Emissions-Tomographie. Außerdem wurde die Tracerbindung *in vivo* mit FESDS gehemmt. In einer ersten Versuchsreihe sollte die Bioverteilung in Wistar-Ratten bei einer Überlebenszeit von 5 und 60 min untersucht werden. Der Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wurde zu einem sehr hohen Anteil im Blut gebunden (15,95 % D/g bei 5 min p.i.). Das ist ein Nachteil für PET-Untersuchungen, da eine derart hohe Nontarget-Bindung den Nachweis des Tumors mit der PET nicht erlaubt. 60 min p.i. ist die Radioaktivität im Blut und in den meisten Organen im Vergleich zu 5 min Überleben bis zu 45 % geringer, d.h. es erfolgte eine Clearance des Tracers. Hidalgo Aragonés *et al.* (1996) publizierten, dass Estron-3-O-Sulfamat (EMATE) bei i.v.-Applikation eine biphasische Clearance aufweist, wobei die initiale Halbwertszeit 30 min und die zweite Halbwertszeit 4,5 h beträgt. Die Ergebnisse der dynamischen Aktivitätsverteilung von Ratte und Schwein (Abb. 4-21 und 4-23) zeigen keine Hinweise für eine biphasische Clearance von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS.

In ES-reichen Organen wie Leber, Ovar, Uterus und Fett wurde 60 min p.i. 25-93 % mehr Radioaktivität als 5 min p.i. nachgewiesen, der Tracer wurde also in diesen Organen angereichert. Von Jacquemin *et al.* (1994) wird berichtet, dass die Rattenleber organische Anionentransporter (oatp) aufweist, die [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS transportieren könnten. In der Leber sammelte sich die Aktivität besonders in den Gallengängen an, was mit *Ex-vivo*-Autoradiographie gezeigt wurde (Abb. 4-19). Es könnte sich dabei um Metabolite von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS handeln. In der Gallenflüssigkeit isolierter perfundierter Rattenleber wurden von Roy *et al.* (1987) Glucuronide, Sulfoglucuronide, Sulfate und polare Metabolite von Estron nachgewiesen. Eigene Daten der Metaboliten-Analytik von Plasma und Urin der Ratten zeigen einen Metaboliten von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS. Dessen Identität wurde nicht geprüft, es könnte sich aber möglicherweise um einen der von Roy in der Gallenflüssigkeit nachgewiesenen Verbindungen handeln.

Anhand der *Ex-vivo*-Autoradiographie des Hirnes konnte die *In-situ*-Verteilung des Tracers dokumentiert werden. Diese Methode ermöglicht eine Verfeinerung der Bioverteilungs-Daten, da kleinere Hirnregionen erfaßt werden können. [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS reichert sich vorwiegend im Choroidplexus des 3. und 4. Ventrikels an (Abb. 4-18), was vermutlich auf die hohe

Radioaktivitätskonzentration im Blut zurückzuführen ist. Obwohl sich die höchste Aktivität in stark durchbluteten Hirnregionen anreicherte, wurde sie dennoch nennenswert in ES-reichen Regionen wie Hippocampus und Mesencephalon gebunden. Die Ergebnisse korrelieren mit den in Kapitel 4.1.3 gemessenen ES-Aktivitäten ( $r = 0,67$ ). Damit ist ein wichtiges Kriterium für einen potentiellen PET-Tracer, die *In-vitro*- / *In-vivo*-Korrelation, erfüllt.

Von Kawano und Aikawa (1987) wurden die höchsten Enzymaktivitäten in den zirkumventrikularen Organen wie Epiphyse, Hypophyse, Choroidplexus und medianer Eminenz gemessen. Purinton *et al.* (1999) fand die höchste Enzymaktivität im Hippocampus des fetalen Schafhirnes. Es wird vermutet, dass die Lokalisation von der Estronsulfatase den endokrinen Zentren Hypothalamus, Hypophyse, Keimdrüsen entspricht. Für die Anreicherung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Choroidplexus ist allerdings noch ein weiterer Mechanismus in Betracht zu ziehen. Asaba *et al.* (2000) beschreibt eine Organische Anionentransporter (oatp2) - vermittelte Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]DHEAS über die Blut-Hirn-Schranke in das Rattenhirn ( $K_m = 32,6 \mu\text{M}$ ). Das Vorkommen des Oatp 2 im Choroidplexus des Rattenhirnes wird von Noé *et al.* (1997) bestätigt. Es wäre denkbar, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS ebenso wie [ $^3\text{H}$ ]DHEAS über den oatp2 in das Hirn transportiert wird.

Die *In-vivo*-Hemmung der Tracerbindung wurde mit FESDS untersucht, um Aussagen zur Spezifität der [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS-Bindung machen zu können. Dabei sollte die Hemmung durch FESDS mit der durch die Flavonoide Naringin und Quercetin verglichen werden. Durch Einsatz von 5 mg/kg FESDS ließ sich die Blutbindung um 35 % reduzieren, die Flavonoide erhöhten sie. Weiterhin hemmt FESDS die Traceraufnahme in Hirn, Leber und Milz, erhöht sie aber in Ovar, Uterus und Fett. Diese Ergebnisse erscheinen widersprüchlich, da alle Organe ES exprimieren und die Enzymaktivität durch FESDS gehemmt werden müsste. Wie bereits die Ergebnisse der *In-vitro*-Autoradiographie vermuten lassen, scheint [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS nicht spezifisch an die Estronsulfatase zu binden.

Die ES-Inhibitoren Naringin und Quercetin inhibieren die Tracerbindung in Leber und Milz, erhöhen sie andererseits in Ovar und Uterus, den Organen mit der höchsten ES-Aktivität. Wie bereits für die *In-vitro*-Daten unter 5.2 diskutiert, spielt hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit auch *in vivo* die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) eine Rolle. Sie kann Naringin und Quercetin methylieren und dadurch könnte die inhibitorische Aktivität der Verbindungen aktiviert werden. Die COMT ist in den Organen unterschiedlich stark exprimiert (Karhunen *et al.*,

1994). So ist es möglich, dass Ovar und Uterus keine COMT haben. Inoue und Creveling (1991) schreiben, dass die COMT-Aktivität im Uterus bei nichtschwangeren Ratten sehr gering ist. Die Leber und Niere wiederum haben hohe COMT-Aktivitäten (Rivett *et al.*, 1983; Vieira-Coelho und Soares-da-Silva, 1996). Des weiteren wird eine hohe COMT-Expression in der Niere sowie im Darm, Pankreas, Hypophyse, Nebenniere und Choroidplexus beschrieben (Karhunen *et al.*, 1994). Erst das O-methylierte Quercetin bzw. Naringin kann die ES hemmen, nicht das Flavonoid selbst.

Es stellte sich heraus, dass [<sup>18</sup>F]FESDS besonders stark im Darm angereichert wird. Von Sim *et al.* (1983) wird eine *In-vivo*-Absorption von Estronsulfat während der enterohepatischen Zirkulation durch den Darm beschrieben. Dies könnte auch für FESDS zutreffen. Außerdem kommen im Darm der Ratte diverse Steroid-3-desulfatierende Bakterien vor, die den Tracer binden könnten. Solche Bakterien sind z.B. *Clostridium* und *Lactobacillus* (Van Eldere *et al.*, 1988). Nach Huijghebeart *et al.* (1984) spielen die Bakterien im distalen Darmbereich bei der Hydrolyse von Steroidsulfaten eine nennenswerte Rolle.

Die *In-vivo*-Versuche können in der Weise zusammengefaßt werden, dass die Anreicherung von [<sup>18</sup>F]FESDS mit 10 % D/g im Nontarget Blut gegenüber 0,6 % D/g im Target Uterus sehr hoch ist. Diese hohe Blutbindung sowie die Struktur von [<sup>18</sup>F]FESDS deuten darauf hin, dass die Carboanhydrase (CA) ein zusätzliches Target des Tracers ist. Der ursprüngliche Ansatzpunkt war der, mit [<sup>18</sup>F]FESDS die Estronsulfatase spezifisch darzustellen. Daher stellt diese mögliche zusätzliche Bindung an die CA ein Problem dar. Es könnte jedoch die Möglichkeit bestehen, die CA selektiv zu hemmen, um dadurch die ES besser darzustellen.

#### 5.4 Die Carboanhydrase - ein zusätzliches diagnostisches Target

Die Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS wurde *in vitro* an verschiedenen Organschnitten geprüft, um davon Aussagen über die mögliche Verteilung *in vivo* ableiten zu können. FESDS hemmt an Gefrierschnitten von Rattenhirn, -niere, -leber und humanen FaDu-Tumoren die Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS sehr stark. Betrachtet man die Hemmung am Hirn genauer, fällt auf, dass besonders die Bindung an die weiße Substanz durch FESDS reduziert wird. Die ES-Inhibitoren Naringin und Quercetin reduzieren die [<sup>18</sup>F]FESDS-Bindung nicht. Es konnte jedoch im ES-Assay gezeigt werden, dass die Enzymaktivität in den Hirnregionen durch diese Substanzen

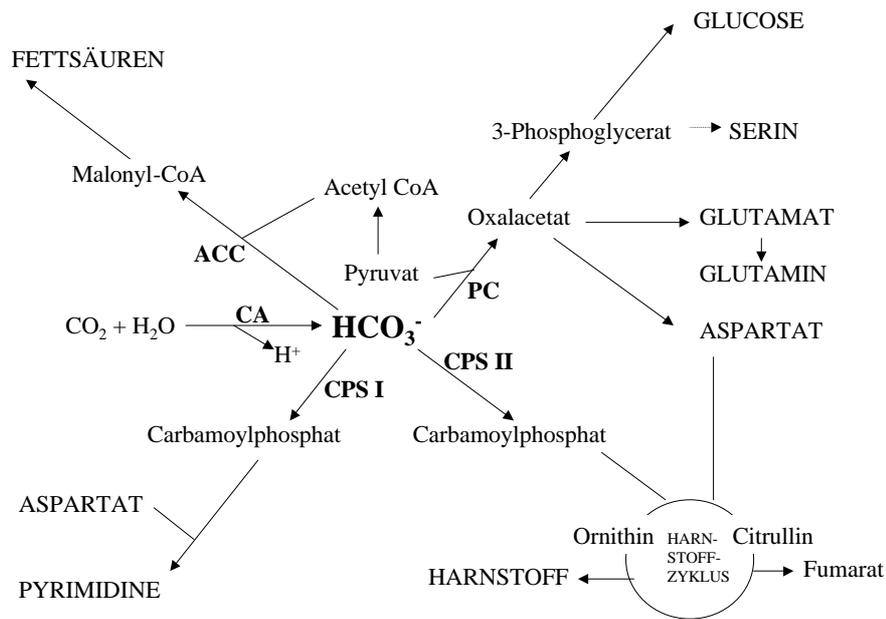
hemmbar ist. Es ist außerdem verwunderlich, dass am FaDu-Tumor eine Hemmung durch FESDS auftritt, obwohl dieser Tumor keine ES exprimiert.

Daher wird angenommen, dass ein anderes Target als die Estronsulfatase [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS bindet. Matsumoto *et al.* (1989) beschreiben die Bindung von Sulfonamiden an Erythrocyten und deren Komponenten, wobei Carboanhydrase eine hohe Affinität zu den Sulfonamiden aufweist. FESDS besitzt zwei Sulfonamidgruppen und bindet daher mit hoher Wahrscheinlichkeit an die CA.

#### 5.4.1 Physiologische Bedeutung der Carboanhydrase

Die Carboanhydrase (Carbonat-Hydrolase, EC 4.2.1.1) ist ein ubiquitäres Enzym, das 1933 erstmals von Meldrum und Roughton entdeckt wurde. Das Enzym hat Zink als Zentralatom und katalysiert die reversible Hydratation von Kohlendioxid:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . Das ursprüngliche CA-Gen ist wahrscheinlich vor 1,5 Billionen Jahren entstanden. In der Evolution bildeten sich 3 CA-Familien heraus:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CA (Hewett-Emmett und Tashian, 1996). Sie sind nicht miteinander verwandt, es treten keine Sequenzhomologien auf. Die einzelnen Isozyme haben so generelle physiologische Funktionen wie Ionen-, Gas- und Flüssigkeitstransport, Kalzifikation, Fotosynthese, Respiration, Erhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichtes. Sie sind aber auch in Prozesse wie z.B. der Bildung von Magensaft, Speichel, cerebral-spinaler Flüssigkeit, Wasserdruck und der Synthese von Glucose, Harnstoff und Lipiden beteiligt (Tashian *et al.*, 1990).

In Abb. 5-2 ist zu sehen, dass viele Enzyme mehr oder weniger stark von der Aktivität der CA abhängig sind, da sie  $\text{CO}_2$  oder  $\text{HCO}_3^-$  als Substrat benötigen bzw. als Reaktionsprodukt bilden (Chegwidden *et al.*, 2000). Biosynthetische Prozesse, die einen Carboxylierungs-Schritt mit Bikarbonat als Substrat enthalten, sind Gluconeogenese und die Synthese verschiedener Aminosäuren (Pyruvat-Carboxylase), Lipogenese (Pyruvat-Carboxylase, Acetyl-CoA-Carboxylase), Harnstoffbildung (Carbamoylphosphat-Synthetase I) und Pyrimidin-Synthese (Carbamoylphosphat-Synthetase II). Es handelt sich dabei um Biotin-abhängige Carboxylasen, die  $\text{HCO}_3^-$  mit Pyruvat oder Acetyl-CoA als Substrat binden, wobei  $\text{CO}_2$  entsteht. Auch die Carbamoylphosphat-Synthetase I und II binden  $\text{HCO}_3^-$  neben den Substraten Ammonium bzw. Glutamin unter Bildung von Carbamylphosphat.



**Abb. 5-2:** Carboxylierungs-Reaktionen in Biosyntheseprozessen, die Bikarbonat als Substrat nutzen. Es wird angenommen, dass die CA an der Produktion aller Moleküle beteiligt ist, die in der obigen Darstellung mit Großbuchstaben geschrieben sind. Diese Prozesse finden in Leber, Niere und Fettgewebe statt (Quelle: Chegwidden *et al.*, 2000).

Abkürzungen: CA – Carboanhydrase, ACC – Acetyl-CoA-Carboxylase, PC – Pyruvat-Carboxylase, CPS I – Carbamoylphosphat-Synthetase I, CPS II – Carbamoylphosphat-Synthetase II.

Es sind bisher 14 Isozyme der CA bekannt (Hewett-Emmett, 2000), die stark in ihrer Kinetik, ihrer Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen, ihrem subzellularem und gewebespezifischem Vorkommen variieren (Sly und Hu, 1995; Türeci *et al.*, 1998; Opavsky *et al.*, 1996). Von den meisten CA-Isozymen ist die subzelluläre Lokalisation bekannt:

- 4 CA-Isozyme sind cytosolisch (CA I, II, III und VII)
- CA V ist mitochondrial
- CA IV und V sind membrangebunden
- CA VI wird sekretiert
- CA IX und XII sind Transmembran-Proteine

Die Carboanhydrase ist wie auch die Estronsulfatase ein ubiquitäres Enzym. Von den 14 bekannten CA-Isozymen werden einige im folgenden kurz beschrieben. Das wahrscheinlich wichtigste Isozym ist die CA II. Sie wird traditionell aus roten Blutkörperchen isoliert (Gehalt: 2 mg CA II/g Hämoglobin), aber sie wurde auch geklont und in *E. coli* überexprimiert (Forsman *et al.*, 1988). Die CA II ist in fast allen Organen und Geweben verbreitet (Sly und

Hu, 1995) und hat eine außerordentlich hohe Enzymaktivität. Die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) für die  $CO_2$ -Hydratation beträgt  $1 \cdot 10^6 s^{-1}$  (Khalifah, 1971). Für die CA II ist ein Defizienz-Syndrom beschrieben, das mit Osteopetrose, renaler tubulärer Azidose und cerebraler Kalzifikation (Sly und Hu, 1995) einhergeht. Das deutet auf die Wichtigkeit der CA II besonders in Knochen, Niere und Hirn hin.

Die CA I ist mit 12 mg/g Hämoglobin das häufigste Nichthämoglobin-Protein der Erythrocyten bei Vertebraten (Carter und Auton, 1975). Das Isozym wurde auch in anderen Geweben wie z.B. dem Darm gefunden, hat jedoch nicht die weite Verbreitung der CA II (Sly und Hu, 1995). Seine Aktivität ist geringer als die von CA II; die Wechselzahl für die  $CO_2$ -Hydratation beträgt  $2 \cdot 10^5 s^{-1}$  (Khalifah, 1971). Außer einer Ersatzfunktion der CA I bei Fehlen von CA II sind keine weiteren Funktionen beschrieben. Die CA I - Defizienz ist mit keinen klinischen Symptomen assoziiert (Kendall und Tashian, 1977).

Die CA III ist ein Isozym mit vergleichsweise geringer Enzymaktivität von  $8 \cdot 10^3 s^{-1}$  (Jewell *et al.*, 1991). Sie ist viel unempfindlicher gegen Sulfonamid-Inhibition als die anderen Isozyme. Das Hauptvorkommen sind die roten Muskelfasern. In denen ist die CA III das Hauptprotein und an der erleichterten Diffusion von  $CO_2$  in die Gewebekapillaren beteiligt (Riley *et al.*, 1982). Des weiteren haben Adipocyten eine hohe Konzentration dieses Isozymes (Spicer *et al.*, 1990).

Die CA IV ist membrangebunden und kommt auf der Plasmaseite von Kapillar-Endothelzellen der Lunge und verschiedener anderer Organe sowie auf Epithelzellen wie z.B. den apikalen Bürstensaum-Membranen der Niere vor (Sly und Hu, 1995). Sie ist mit der Membran durch Glycosylphosphatidylinositol verbunden.

CA V ist in der Matrix der Mitochondrien verschiedener Gewebe lokalisiert (Nagao *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass die CA V an der Harnstoffbildung und Gluconeogenese beteiligt ist indem sie Bikarbonat für die Carbamoylphosphat-Synthetase I bzw. für die Pyruvat-Carboxylase bereitstellt (Dodgson und Forster, 1986a und 1986b). Es wird weiterhin vermutet, dass die CA V eine Rolle bei der Lipogenese spielt (Lynch *et al.*, 1995).

Die Isozyme CA VI und CA VII werden von den Speicheldrüsen sekretiert; sie können aus humanem Speichel isoliert werden (Murakami und Sly, 1987). Man nimmt an, dass die

CA VI an der pH-Regulation des Speichels und die CA VII an der Sekretion des Bikarbonats des Speichels beteiligt ist (Kivelä *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 1991).

Die CA IX wurde ursprünglich als tumorassoziiertes Molekül identifiziert, sie kommt nicht im korrespondierenden gesunden Gewebe vor (Pastorek *et al.*, 1994). Gesundes humanes Herz, Lunge, Niere, Prostata, Blut, Hirn, Plazenta und Muskel enthalten keine CA IX (Nishimori *et al.*, 1999).

#### 5.4.2 Expression der Carboanhydrase

Die für die Charakterisierung eines Radiopharmakons geforderte Lokalisierung des Targets wurde bisher nur teilweise mit der Untersuchung der Expression und Aktivität der Estronsulfatase erfüllt. Es ist ebenso wichtig, das zweite Target von [<sup>18</sup>F]FESDS, die Carboanhydrase, in den Organen und Tumorzellen nachzuweisen. Dabei erfolgte eine Beschränkung auf zwei der 14 möglichen Isozyme, die CA I und CA II, da zu erwarten ist, dass FESDS bevorzugt an diese Isozyme bindet. Die RT-PCR (Tabelle 4-5) zeigte eine mRNA-Expression von CA I in allen untersuchten Rattenorganen mit Ausnahme der Nebenniere und des Ovar. Im Rattenhirn sowie in den Tumorzellen MCF-7, T-47D, HepG2, FaDu wurde keine mRNA der CA I nachgewiesen (Tabelle 4-5, Abb. 4-8). In dieser Tabelle und Abbildung ist weiterhin zu erkennen, dass die mRNA von CA II in allen Rattenorganen und -hirnregionen sowie den MCF-7- und FaDu-Zellen vorkommt, aber nicht in den T-47D- und HepG2-Zellen.

Literaturangaben bestätigen, dass die CA II in vielen Organen und Geweben der Säuger, wie z.B. in Leber, Niere, Pankreas, Uterus, Knochen und im Hirn, vorkommt (Tashian, 1992). Von Christie und Thomson (2000) wird das Vorkommen der CA II im oberen und mittleren humanen Ösophagus beschrieben. Das geht möglicherweise mit der Expression der in dieser Arbeit gefundenen mRNA der CA II bei den FaDu-Zellen einher, die dem Hypopharynx, einem eng benachbarten Gewebe des Ösophagus, entstammen. McGowan *et al.* (1997) fanden mit dem Northern Blot, dass die mRNA der CA II vorzugsweise in Rattenniere und -hirn exprimiert ist, die in Leber und Herz nachgewiesenen Mengen waren vergleichsweise gering. Die CA I kommt in den roten Blutkörperchen aller Vertebraten vor, aber nicht bei der Familie der Katzen (Carter und Auton, 1975). Das Isozym wurde auch in anderen Geweben wie z.B. dem Darm und Fettgewebe der Ratte nachgewiesen (Tashian, 1992). Auch die neutrophilen Leukocyten des humanen Blutes exprimieren die CA I (Campbell *et al.*, 1994); an ihnen

wurde im übrigen die Funktionsfähigkeit der Primer für die RT-PCR geprüft. Die CA I hat nicht die weite Verbreitung der CA II (Sly und Hu, 1995), es konnte keine Arbeit gefunden werden, die ein Vorkommen der CA I im Hirn beschreibt.

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die CA I in allen untersuchten Rattenorganen mit Ausnahme von Nebenniere, Ovar und Hirn vorkommt. Die CA II wurde in allen Rattenorganen und Hirnregionen sowie den MCF-7- und FaDu-Zellen nachgewiesen.

#### 5.4.3 FESDS - ein Inhibitor der CA

Die mögliche Hemmung der CA durch FESDS ist für die vorliegenden Untersuchungen aus verschiedenen Gründen von Interesse. Einerseits liefert die Bindung an die CA ein Problem für die selektive Darstellung der ES. Andererseits erlaubt diese Tatsache möglicherweise die Darstellung der CA-Verteilung selbst. Für jeden dieser Fälle ist es erforderlich, die Stärke der CA-Hemmung durch FESDS im Vergleich zu etablierten CA-Inhibitoren zu beurteilen. Wie oben beschrieben, wurde FESDS in seiner Hemmwirkung an reinen CA-Isozymen nur von dem Sulfonamid Azetazolamid übertroffen.

Als CA-Hemmer sind z.B.  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , Fluoracetat, Imidazol, Methanol sowie diverse Sulfonamide bekannt (Lindskog, 1997). Anionen hemmen die CA schwächer als Sulfonamide; die Inhibitions-Konstanten ( $K_i$ -Werte) der Anionen betragen zwischen 200 und 0,02 mM, die der Sulfonamide zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 1 nM. Die Wechselwirkung des Enzyms mit den sulfonamidischen Inhibitoren ist ein zweistufiger Prozess (King und Burgen, 1976):

- (a) hydrophobe Assoziation
- (b) pH-abhängige Koordination von R-SO<sub>2</sub>NH- mit dem Metall

Bei anorganischen Anionen findet die Interaktion (a) nicht statt; das erklärt die schwächere Affinität gegenüber den aromatischen Sulfonamiden. Der aromatische Ring der Sulfonamide bindet dabei in eine hydrophobe Tasche des Proteins (Fridborg *et al.*, 1967).

Die Art der durch Anionen bzw. Sulfonamide ausgelösten Enzymhemmung ist abhängig vom Substrat. Ist CO<sub>2</sub> das Substrat, so sind Anionen nicht-kompetitive Inhibitoren des Enzyms (Verpoorte *et al.*, 1967). Ist Bikarbonat das Substrat, so hemmen Anionen die CA kompetitiv

(Maren und Couto, 1979). Bei den Sulfonamiden wird die CO<sub>2</sub>-Hydratation durch die CA II kompetitiv gehemmt (Kernohan, 1966; Lindskog und Thorslund, 1968). An humaner CA I wurde eine nicht-kompetitive Hemmung bisher nicht beschrieben (Maren und Sanyal, 1983), was auf einen anderen Hemm-Mechanismus als bei der CA II schließen lässt. Die Isozyme sind gegen Sulfonamide verschieden empfindlich (Sly und Hu, 1995):

- CA II und V sind am sensitivsten
- CA I, IV und VI sind etwas sensitiv
- CA III ist nicht sensitiv
- Über die Empfindlichkeit der übrigen Isozyme ist wenig bekannt

Die Inhibition von Carboanhydrase durch aromatische und heterocyclische Sulfonamide wird schon seit über 45 Jahren klinisch angewandt. Die Sulfonamide werden bei Glaukom bzw. „Grünem Star“ zur Reduktion des intraokulären Drucks sowie zur Diurese eingesetzt (Hildebrandt, 1998). Sulfonamide sind auch antibakteriell wirksam, da sie die Folsäure-Synthetase u.a. Enzyme hemmen. Die wichtigsten der bekannten sulfonamidischen CA-Inhibitoren sind in Tabelle 5-4 aufgeführt.

Tabelle 5-4: Ausgewählte Carboanhydrase-Inhibitoren mit Sulfonamidstruktur, Literaturangaben und eigene Daten.

Hemmstoff	CA I IC <sub>50</sub> [nM]	CA II IC <sub>50</sub> [nM]	Spezies	Literatur
Azetazolamid	200	10	Mensch	Maren und Sanyal (1983)
		7	Hund	Maren (1992)
	219	30	Mensch	eigene Daten
Ethoxazolamid	2	2	Mensch	Maren und Sanyal (1983)
	9	3,4	Mensch	Conroy und Maren (1995)
		0,7	Hund	Maren (1992)
	655	27	Mensch	eigene Daten
Benzolamid	17,9	9,5	Mensch	Conroy und Maren (1995)
		0,9	Hund	Maren (1992)
Hydrochlorothiazid		2350	Hund	Maren (1992)
	15200	7654	Mensch	eigene Daten
Furosemid		80	Hund	Maren (1992)
	631	1061	Mensch	eigene Daten
L-662,583		0,7	Mensch	Sugrue <i>et al.</i> (1990)
MK-927		13	Mensch	Sugrue <i>et al.</i> (1990)
Dorzolamid	50.000	9	Mensch	Renzi <i>et al.</i> (2000)

Anmerkung: Maren (1992) verwendete Hundeblood ohne einzelne Isozyme zu isolieren. Da CA I und CA II die wichtigsten Isozyme im Blut sind, wurden die IC<sub>50</sub>-Werte in dieser Tabelle beiden Isozymen zugeordnet.

Die in der vorliegenden Arbeit mit dem CA-Assay ermittelten  $IC_{50}$ -Werte von Azetazolamid (219 nM für HCA I und 30 nM für HCA II) sind mit den von Maren und Sanyal (1983) publizierten Werten (0°C,  $CO_2$ -Hydratation) vergleichbar. Es wurde bestätigt, dass die HCA II gegenüber allen getesteten Sulfonamiden empfindlicher ist als die HCA I, was bereits von Sly und Hu (1995) nachgewiesen wurde. Meyerson und Nesta (1991) bestimmten einen  $K_d$ -Wert von 54 nM für Azetazolamid an gereinigter RCA II. Dieser Wert ist kleiner als der hier ermittelte (100 nM), wobei in der vorliegenden Arbeit die Esterase-Aktivität gemessen wurde und die genannten Autoren einen Assay verwendeten, bei dem die Zeit bis zum Eintreten einer pH-Änderung, also die direkte CA-Wirkung, gemessen wird.

Die von Maren (1992) an Erythrocyten des Hundes bei 25°C bestimmten  $IC_{50}$ -Werte sind bedeutend niedriger als die in der vorliegenden Arbeit bei 37°C gemessenen. Das überrascht insofern nicht, als bekannt ist, dass die Affinität der Isozyme invers mit der Reaktionstemperatur korreliert ist (Conroy und Maren, 1995).

Benzolamid ist aufgrund seiner Molekülstruktur mit einem Aminobenzolring ein noch stärkerer CA-Inhibitor als das heterocyclische Azetazolamid. Zwischen dem Aminobenzolring von Benzolamid und den Aminosäure-Resten Phe131 sowie Leu198 der CA treten sehr starke aromatische und hydrophobe Interaktionen auf (Vidgren *et al.*, 1993). Die Permeabilität von Benzolamid ist jedoch gering, was für die Experimente dieser Arbeit ungeeignet ist.

Hydrochlorothiazid hat von allen geprüften Inhibitoren die geringste inhibitorische Wirkung auf die CA, was durchaus den Ergebnissen von Maren (1992) entspricht. Im übrigen hemmt Hydrochlorothiazid primär die CA der Blutgefäße, was einen Anstieg des pH-Wertes und eine Stimulierung Kalzium-aktivierter Kalium-Kanäle bewirkt, die letztlich zur Gefäßrelaxation führt (Pickkers *et al.*, 1999).

Maren und Sanyal (1983) publizierten für HCA I und HCA II mit Ethoxazolamid gleiche  $IC_{50}$ -Werte (jeweils 2 nM) bei 0°C und  $CO_2$ -Hydratation. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch deutliche Unterschiede in der Affinität von Ethoxazolamid für beide Isozyme. Nach Chegwidan *et al.* (2000) ist Ethoxazolamid sehr gut fettlöslich, was eine schlechte Verfügbarkeit der Substanz bei 0°C im Gegensatz zu dem wasserlöslichen Azetazolamid bedingt. So ist es möglich, dass bei den Temperaturen von 0°C und 37°C verschiedene Affinitäten von Ethoxazolamid zu den Isozymen auftreten. Für das wasserlösliche Azetazolamid stimmten die  $IC_{50}$ -Werte jedoch gut mit denen von Maren und Sanyal (1983) überein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Azetazolamid vermutlich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der stärkste Inhibitor der Carboanhydrase ist. Wichtig ist auch, dass die Verbindung ein zugelassenes Medikament ist und daher dem Patienten verabreicht werden darf.

#### 5.4.4 [<sup>18</sup>F]FESDS - ein Radiotracer zur Darstellung der Carboanhydrase

Nachdem festgestellt worden war, dass FESDS eine sehr starke Affinität zur CA aufweist, wurde geprüft, inwieweit [<sup>18</sup>F]FESDS *in vitro* an CA bindet. Da im Blut bzw. den Erythrocyten sehr viel Carboanhydrase enthalten ist, wurde daran zuerst die Bindung des Tracers [<sup>18</sup>F]FESDS untersucht. Bereits nach 10 min ist eine 100%ige Bindung des Tracers an die zellulären Bestandteile des Blutes zu verzeichnen; diese Bindung blieb über den Untersuchungszeitraum von 30 min konstant. Somit bindet der Tracer sehr gut an Blutzellen, wobei es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Bindung an die CA der Erythrocyten handelt.

Mit einer *In-vitro*-Autoradiographie am Rattenhirn sollten durch Einsatz von CA-Hemmern Aussagen zur Selektivität der Tracerbindung getroffen werden, d.h. es sollte nachgewiesen werden, dass [<sup>18</sup>F]FESDS an die CA bindet. Wenn sich die Tracerbindung durch Azetazolamid oder andere Inhibitoren der CA hemmen lässt, kann man davon ausgehen, dass [<sup>18</sup>F]FESDS spezifisch an die CA bindet. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen Azetazolamid, Benzolamid und FESDS die Tracerbindung unterschiedlich stark inhibieren. Azetazolamid hemmt die [<sup>18</sup>F]FESDS-Bindung mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 2,8 nM (Corpus callosum) und 5,0 nM (Cortex) am stärksten. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Benzolamid für den Cortex sind ca. 4-fach höher und die von FESDS ca. 27-fach höher als die von Azetazolamid. Alle 3 eingesetzten CA-Inhibitoren (Azetazolamid, FESDS, Benzolamid) zeigen eine sehr gute Korrelation bezüglich ihrer regionalen Wirksamkeit. Es ist deutlich zu erkennen, dass Hirnregionen mit hohem Anteil an weißer Substanz geringere IC<sub>50</sub>-Werte aufweisen. Das spricht für eine spezifische Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS an die CA II, die im Hirn besonders in der weißen Substanz vorkommt.

In den nachfolgenden Versuchen wird Azetazolamid zur Hemmung der Carboanhydrase eingesetzt. Für seine Eignung sprechen 4 Gründe:

- Azetazolamid ist sowohl beim CA-Assay mit reinen Enzymen als auch bei der *In-vitro*-Autoradiographie des Hirnes der stärkste der getesteten CA-Inhibitoren
- Azetazolamid ist ein zugelassenes Medikament (Diamox<sup>®</sup>)
- Azetazolamid ist umgekehrt kein Inhibitor der Estronsulfatase (eigene Befunde)
- Die CA-Hemmung durch Azetazolamid ist reversibel (Wistrand und Lindequist, 1991)

Es wird angenommen, dass nur bei vorliegender CA-Hemmung [<sup>18</sup>F]FESDS zur spezifischen Darstellung der Estronsulfatase geeignet ist. Da an Tumorzellen sowie an Schnitten verschiedener Rattenorgane die *In-vitro*-Bindung des Tracers [<sup>18</sup>F]FESDS untersucht werden sollte, musste die minimale Azetazolamid-Konzentration ermittelt werden, die das Enzym CA an den Schnitten bzw. Zellen vollständig hemmt. Die ermittelten Konzentrationen betragen zwischen 10<sup>-6</sup> M (Hirn) und 10<sup>-4</sup> M (z. B. Uterus, Tumorzellen). Maren und Sanyal (1983) berichten, dass das Myelin des Hirnes ca. 10-fach empfindlicher auf Azetazolamid reagiert als die Nieren-Mitochondrien, was mit den hier bestimmten IC<sub>50</sub>-Werten gut übereinstimmt.

Für das Rattenhirn wurden die Bindungsdaten von [<sup>18</sup>F]FESDS an die CA bestimmt. Die B<sub>max</sub>-Werte betragen zwischen 6,24 pmol/mg Protein und 14,6 pmol/mg Protein (Striatum und Cerebellum). Die Dissoziationskonstanten (K<sub>d</sub>-Werte), die bzgl. der Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS am Cortex, Striatum, Hippocampus und Cerebellum berechnet wurden, sind 3-4-fach höher als in den übrigen Regionen. Das kann auf die unterschiedliche Verteilung der CA-Isozyme in den Hirnregionen zurückzuführen sein. Von 14 bekannten Isozymen kommen die CA II-V und XIV im Nervengewebe vor (Parkkila, 2000; Parkkila *et al.*, 2001; Ghandour *et al.*, 2000). Die CA II ist am weitesten im Hirn verbreitet, die CA III kommt im Choroidplexus und in Mikrogliazellen vor. Die membranassoziierte CA IV in den Kapillar-Endothelzellen gilt als Marker der Blut-Hirn-Schranke (Ghandour *et al.*, 1992). Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der CA-Isozyme auf Sulfonamide (Sly und Hu, 1995) ist zu vermuten, dass im Rattenhirn lediglich die CA II [<sup>18</sup>F]FESDS stark binden konnte.

In den meisten Studien wurde die CA-Verteilung des Hirnes immunhistochemisch nachgewiesen. Diese Experimente zeigen eine starke Färbung im Hirnstamm und in der cerebellaren weißen Substanz (Kumpulainen und Nyström, 1981; Kumpulainen und Korhonen, 1982), die den mit [<sup>18</sup>F]FESDS erhaltenen Bildern ähnelt. Zur Quantifizierung haben Ghandour und Mit-

arbeiter (1980a und 1980b) membrangebundene und lösliche CA von Homogenaten des Cerebellums extrahiert und mit einem Radioimmunoassay bestimmt. Es wurden 10 µg CA II pro Cerebellum gewonnen, das entspricht 20 pmol CA II/mg Protein und liegt im Bereich des hier gemessenen Wertes von 14,6 pmol/mg Protein. Meyerson und Nesta (1991) haben [<sup>3</sup>H]Azetazolamid zur CA-Messung in Neuronen und Oligodendrocyten des Vorderhirnes verwendet. Die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]Azetazolamid beträgt an Neuronen 2 pmol/mg Protein und an Oligodendrocyten 6 pmol/mg Protein. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Bindung von FESDS an die CA des Rattenhirnes zwischen 6,9 pmol/mg Protein und 14,6 pmol/mg Protein berechnet.

#### In-vivo-Einsatz von Azetazolamid

Es wurde untersucht, ob durch eine Hemmung der CA mit Azetazolamid die Estronsulfatase mit [<sup>18</sup>F]FESDS besser dargestellt werden kann. Dazu wurden Azetazolamid bzw. Ethoxazolamid (zum Vergleich) in einer Konzentration von 5 mg/kg Wistar-Ratten i.v. appliziert. Beide CA-Inhibitoren konnten die Blutbindung sehr wirkungsvoll auf unter 1 % D/g reduzieren, wobei Ethoxazolamid eine etwas stärkere Wirkung hatte. Diese *In-vivo*-Daten korrelieren mit den *In-vitro*-Daten (4.2.3), bei denen Ethoxazolamid die humane CA II etwas stärker hemmt als Azetazolamid. Das wird auch durch Literaturdaten belegt (Maren und Sanyal, 1983; Maren, 1992).

Ethoxazolamid reduziert *in vivo* allerdings nicht nur die Tracerbindung in den Organen mit CA-Expression, sondern auch in den ES-reichen Organen. Dies ist für eine spezifische Darstellung des Enzyms ES ungeeignet. Dagegen konnte durch den Einsatz von Azetazolamid die [<sup>18</sup>F]FESDS-Aufnahme in Organen mit hoher ES-Aktivität wie Fett, Ovar und Uterus, aber auch die im Pankreas erhöht werden. So wurde die Darstellung von Organen mit hoher ES-Aktivität durch den Einsatz von Azetazolamid verbessert. Die verstärkte Traceraufnahme im Pankreas bei Azetazolamid-Applikation spiegelt keine hohe ES-Aktivität wieder, stimmt aber mit dem Ergebnis der *In-vitro*-Autoradiographie (4.3.4) überein, bei der ebenso im Pankreas eine hohe Tracerbindung erfolgt. Da der Pankreas nur eine geringe ES-Aktivität (48 pmol/mg Protein/min) hat, sollte der Tracer in diesem Organ nicht so stark gebunden bzw. aufgenommen werden.

Die Wahl von Azetazolamid als geeigneten CA-Hemmer erfolgte bereits durch die *In-vitro*-Versuche, sie wurde durch die Bioverteilungsdaten bestätigt. Geht man von 5 mg/kg Azet-

azolamid aus, die in diesen Experimenten zur Hemmung der CA im Blut der Wistar-Ratten nötig sind, so müsste analog ein 70 kg schwerer Patient 350 mg Azetazolamid i.v. appliziert bekommen. Es liegen bereits klinische Erfahrungen mit der i.v.-Gabe von 10 mg/kg Azetazolamid vor, die zeigen, dass die Dosis für den Patienten keine schwerwiegenden Komplikationen hervorruft (Scheuermann *et al.*, 2000). Daher dürfte es medizinisch gesehen keine Kontraindikation für die Verabreichung einer Dosis von 5 mg/kg Azetazolamid (Diamox<sup>®</sup>) geben.

## 5.5 Selektive Darstellung der Estronsulfatase durch Hemmung der Carboanhydrase

Der Tracer [<sup>18</sup>F]FESDS wurde in Hinblick auf die Darstellung der Estronsulfatase mit PET entwickelt. Es geht dabei vorrangig um die Diagnose von Mammakarzinomen, die eine erhöhte Expression der ES aufweisen (Pasqualini *et al.*, 1997; Utsumi *et al.*, 2000). In diesem Kapitel wird diskutiert, ob eine Darstellung der Estronsulfatase bei vorliegender Carboanhydrase-Hemmung möglich ist.

### 5.5.1 *In-vitro*-Experimente

Um die Bindung des Tracers [<sup>18</sup>F]FESDS bewerten zu können, ist die Bestimmung der Affinitätskonstante von FESDS nötig. Diese Affinität wurde *in vitro* an unterschiedlichen Gewebeschnitten (Hirn, Organe, Tumoren) und Tumorzellen untersucht. Dabei sollte ermittelt werden, ob die Tracerbindung an das Enzym-Target Estronsulfatase spezifisch ist und ob eine Darstellung von Mammakarzinomen mit [<sup>18</sup>F]FESDS gelingen kann. Auf Grundlage der selektiven Hemmung der CA wurden für das Hirn und Organe der Ratte, MCF-7-Tumor und Tumorzellen die Bindung von FESDS an die ES bestimmt.

#### Bindung von FESDS im Hirn

FESDS bindet an die Estronsulfatase in Strukturen des Rattenhirnes mit 0,29 pmol/mg Protein am geringsten im Pons und mit 11,54 pmol/mg Protein am stärksten im Striatum. Die Affinität von FESDS, ausgedrückt durch die IC<sub>50</sub>-Werte, liegt bei den beiden Hirnregionen zwischen 43 nM und 1537 nM. Da [<sup>18</sup>F]FESDS zu ca. 90 % an die CA des Hirnes bindet und zur Bestimmung der ES nur noch ein sehr kleines Signal verbleibt, schwanken die K<sub>d</sub>-Werte sehr und haben einen relativ hohen Fehler. Die Werte konnten durch wiederholte Experimente nicht verbessert werden. Die Daten zur Verteilung der Estronsulfatase im Hirn wurde bereits

in Kapitel 4.1.2 ausführlich diskutiert. Trotz der mitunter hohen Standardabweichungen der errechneten Werte wurde die regionale Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) berechnet, da bisher kein entsprechender Wert für die Estronsulfatase publiziert wurde. Die  $k_{\text{cat}}$ -Werte betragen zwischen  $0,1 \text{ s}^{-1}$  (Cerebellum, Cortex) und  $1,0 \text{ s}^{-1}$  (Pons, Colliculi). Für eine bakterielle Kurzketten-Alkylsulfatase wurde von Matts *et al.* (1994) ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $6,9 \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Brooks *et al.* (1991) gibt für die Arylsulfatase B humaner Fibroblasten einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $1,5 \text{ s}^{-1}$  an.

Für das Schweinehirn wurde die Hemmung der ES-Bindung durch FESDS untersucht. Die Hemmung durch  $10 \mu\text{M}$  FESDS ist mit Werten zwischen 4 % (Corpus callosum) und 47 % (Thalamus) beim Schweinehirn höher als beim Rattenhirn. Die am Kontrollschnitt des Schweines gebundene Radioaktivität korreliert invers mit der des Rattenhirnes ( $r = 0,92$ ).

#### Bindung von FESDS in weiteren Organen

Für die übrigen Organe wurden  $B_{\text{max}}$ -Werte in Höhe von 85, 108 bzw. 36 pmol/mg Protein an Ovar, Uterus und Leber berechnet. Diese Werte stimmen in ihren relativen Verhältnissen gut mit denen des Enzym-Assays überein, wobei die Leber ca. ein Drittel der ES-Aktivität von Ovar bzw. Uterus aufweist. Die regionalen Wechselzahlen ( $k_{\text{cat}}$ ) der 3 Organe betragen zwischen  $0,04 \text{ s}^{-1}$  und  $0,07 \text{ s}^{-1}$ . Die  $k_{\text{cat}}$ -Werte für Milz, Pankreas und Niere sind ca. 10-fach geringer als die der anderen 3 Organe.

Der  $K_d$ -Werte von FESDS betragen zwischen 28 nM am Uterus und 273 nM an der Leber. Die Affinität von FESDS am Rattenuterus entspricht der von Kasch *et al.* (1999) an Plazentamikrosomen gemessenen Affinität von 25 nM. Das bedeutet, dass die *In-vitro*-Autoradiographie zuverlässige Ergebnisse liefert und dass die Hemmung der CA mit Azetazolamid *in vitro* zur spezifischen Darstellung der ES geeignet ist.

Zum Vergleich wurde ein weiterer ES-Inhibitor, Danazol, herangezogen. Es wurde für den Uterus ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $34 \mu\text{M}$  berechnet, der höher als der von FESDS ist. Carlström *et al.* (1984) ermittelte eine 53%ige Hemmung der ES mit  $14 \mu\text{M}$  Danazol an humanen Brustkrebs-Homogenaten und Yamamoto *et al.* (1993) mit  $10 \mu\text{M}$  Danazol eine 46%ige Hemmung am Myometrium. Trotz unterschiedlicher Proben und Spezies stimmen diese Werte gut überein. Für Milz und Pankreas wurde bei 1 nM bis  $20 \mu\text{M}$  Danazol keine Hemmung der Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS gemessen. Die ES-Aktivitäten von Pankreas und Milz sind 8-fach bzw. 12-fach geringer als die des Uterus ( $417 \text{ pmol/mg Protein/min}$ ). Es ist daher möglich, dass aufgrund

der geringen Enzymaktivität von Milz und Pankreas keine Hemmung mit Danazol erfolgt. Es ist auch möglich, dass der hohe Blutanteil trotz Hemmung der CA mit Azetazolamid die Bindung von Danazol in diesen Organen stört.

#### Bindung von FESDS im MCF-7-Tumor

Mit einer *In-vitro*-Autoradiographie wurde gezeigt, dass die Estronsulfatase der MCF-7-Tumoren für FESDS eine sehr geringe Affinität ( $K_d = 778 \text{ nM}$ ) und wenige Bindungsstellen ( $B_{\max} = 7,25 \text{ pmol/mg Protein}$ ) hat. Auch beim *In-vitro*-Assay wurde ein sehr geringer Substratumsatz gemessen, der  $k_{\text{cat}}$ -Wert beträgt  $0,0001 \text{ s}^{-1}$ . Es handelt sich bei diesen MCF-7-Tumoren um die Tumoren, die den im Tierexperiment (4.3.7) verwendeten Nacktmäusen entnommen wurden. Auch die entsprechenden Bioverteilungs-Daten erbringen keine Hinweise dafür, dass diese Tumoren eine hohe ES-Aktivität aufweisen würden. Die Ursachen der geringen Enzymaktivität werden im folgenden Abschnitt (5.5.2) aufgezeigt.

#### Bindung von FESDS in humanen Tumorzellen

Im Gegensatz zu den Gewebeschnitten liegen bei konfluenten Zellkulturen intakte Zellen vor, d.h. Transportprozesse durch Membranen spielen eine wichtige Rolle. Gewebeschnitte sind dagegen so beschaffen, dass der Membrantransport eine untergeordnete Rolle spielt; es erfolgt vielmehr die direkte Bindung an die intrazellulären Strukturen. Will man prüfen, ob *in vivo* eine Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in die Tumoren zu erwarten ist, so muss im Vorfeld die Traceraufnahme an konfluenten intakten Zellen untersucht werden. Die ES-Inhibitoren Quercetin und Danazol wurden in einer Konzentration von  $100 \text{ }\mu\text{M}$  zur Prüfung der Spezifität der Tracerbindung in den Zellen eingesetzt. Analog zum Enzym-Assay war auch hier Danazol bei den T-47D-Zellen und Quercetin bei den HepG2-Zellen der stärkste Hemmer.

Die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wird durch Quercetin bei allen 4 Zelllinien mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten um  $50 \text{ }\mu\text{M}$  gehemmt. Für FESDS ist die Inhibition nicht einheitlich; der  $\text{IC}_{50}$ -Wert beträgt zwischen  $63 \text{ nM}$  (FaDu-Zellen) und  $34 \text{ }\mu\text{M}$  (MCF-7-Zellen). Die maximale Aufnahme von FESDS in die Tumorzellen wird durch  $B_{\max}$ -Werte zwischen  $22,8 \text{ pmol/mg Protein}$  (FaDu-Zellen) und  $31,1 \text{ pmol/mg Protein}$  (HepG2-Zellen) beschrieben. Dabei ist die Aufnahme des Tracers [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in der Zelle in erster Linie eine Frage des Transportes in die Zelle hinein bzw. wieder heraus und weniger eine Frage der spezifischen Bindung an die ES. In einer Arbeit von Schröder *et al.* (1998) wird für die Rattenleber ein Na-Gallensalz-Transporter beschrieben, der einen  $K_m$ -Wert von  $27 \text{ }\mu\text{M}$  für Estronsulfat hat. Eckhardt *et al.* (1999) ver-

öffentlich für den hepatischen organischen Anionentransporter (oatp1) einen  $K_m$ -Wert von 11  $\mu\text{M}$  für Estronsulfat und 5  $\mu\text{M}$  für DHEAS. Die  $K_m$ -Werte der Transporter lassen den Schluss zu, dass FESDS bei den MCF-7-Zellen auf diese Weise aufgenommen werden könnte. Diese Transporter spielen bei den übrigen Zellen unter den gewählten experimentellen Bedingungen scheinbar keine Rolle, da deren  $\text{IC}_{50}$ -Werte für FESDS nicht im  $K_m$ -Bereich der Transporter liegen. Azetazolamid scheint einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Traceraufnahme zu haben. Ohne den Einsatz dieser Substanz wurden für die MCF-7- und HepG2-Zellen  $\text{IC}_{50}$ -Werte um 100 nM für FESDS gemessen (Tabelle 4-4).

Die humanen Tumorzellen wurden zum Vergleich mit dem Flavonoid Quercetin zur Inhibition der ES inkubiert. Diese  $\text{IC}_{50}$ -Werte betragen relativ einheitlich zwischen 34 und 67  $\mu\text{M}$ , wobei die geringste Hemmung bei den FaDu-Zellen nachgewiesen wurde. Das ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die fehlende Estronsulfatase zurückzuführen. Da die ES bei diesen Zellen nicht vorkommt, ist die Expression des Enzyms COMT, das Quercetin O-methyliert und so für eine Hemmung der ES aktiviert, bedeutungslos. Es sei jedoch angemerkt, dass keine Arbeit gefunden wurde, die ein Vorkommen von COMT bei FaDu-Zellen beschreibt.

Schlussfolgernd aus den *In-vitro*-Experimenten ist festzustellen, dass FESDS spezifisch an die Estronsulfatase bindet. Die Affinität von FESDS beträgt im Rattenuterus 28 nM. Es ist zu erwarten, dass der Tracer ebenso wie von den Tumorzellen auch von Tumoren aufgenommen wird.

### 5.5.2 *In-vivo*-Experimente

Die Untersuchung der Bioverteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS ist ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung des Tracers auf seine Eignung für die Positronen-Emissions-Tomographie. Ein besonderes Augenmerk gilt der Prüfung, ob bei Hemmung der Carboanhydrase die Estronsulfatase *in vivo* darstellbar ist. In Abschnitt 5.5.1 wurde gezeigt, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS *in vitro* sehr gut an die Estronsulfatase bei vorliegender CA-Hemmung binden kann. Ob und wie gut das *in vivo* gelingen könnte, sollte durch die Untersuchung der Tracerverteilung an Tieren gezeigt werden. Die *In-vivo*-Bioverteilung wurde an tumortragenden Nacktmäusen sowie an Wistar-Ratten und Ferkeln untersucht. An den tumortragenden Nacktmäusen wurde bestimmt, wie gut das Target/Nontarget-Verhältnis, d.h. das Verhältnis zwischen Tumor und Muskel, ist.

Zum Schluß wurde die Positronen-Emissions-Tomographie an Ratten und Ferkeln durchgeführt, um die dynamische Tracerverteilung zu untersuchen.

An tumortragenden Nacktmäusen wurde die Traceranreicherung sowohl in den Organen als auch in den transplantierten Tumoren untersucht. Generell korreliert die Bioverteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in Mäusen sehr gut mit derjenigen in Ratten ( $r = 0,91$ ). Die Tracerbindung im Blut ist mit 39 % D/g bei den tumortragenden Nacktmäusen fast 4-fach höher als die der Ratten. Dabei schwanken die Werte bei den Tieren mit unterschiedlichen Tumoren stark: 26 % D/g bei den Mäusen mit FaDu-Tumoren, 36 % D/g bei denen mit MCF-7-Tumoren und 54,4 % D/g bei denen mit HepG2-Tumoren. Es ist möglich, dass die implantierten Tumorzellen die Bildung unterschiedlicher Blutproteine initiierten. Diese Proteine könnten [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS verschieden stark binden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die, dass die Tiere trotz ihres schwachen Immunsystems Leukocyten zur Abwehr der Tumoren bildeten. Diese peripheren Blut-Leukocyten enthalten Estronsulfatase (Miyakawa *et al.*, 1994) und könnten so den Tracer binden.

Entsprechend den  $B_{\max}$ -Werten, die bei *In-vitro*-Inkubation humaner Tumorzellen (4.3.2) bestimmt wurden, wies [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im FaDu-Tumor eine sehr geringe (0,77 % D/g) und im HepG2-Tumor eine deutlich höhere Bindung auf (4,35 % D/g). Der FaDu-Tumor exprimiert keine Estronsulfatase, die Anreicherung der Radioaktivität ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Bindung an die CA II oder andere CA-Isozyme zurückzuführen. Die Enzymaktivität der ES in den MCF-7-Tumoren ist sehr gering, was durch den enzymatischen Assay bestätigt wurde; die Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) ist mit  $0,0001 \text{ s}^{-1}$  600-fach niedriger als die vom Ovar.

Aufgrund der höheren ES-Aktivität und der höheren Tracer-Akkumulation in den MCF-7-Zellen im Vergleich zu den FaDu-Zellen wurde eine stärkere Tracerbindung für den MCF-7-Tumor erwartet. Es ist möglich, dass die Substitution der Tiere mit Estradiol nicht den gewünschten Erfolg brachte. Eine Estradiol-Substitution ist aber, bedingt durch die Hormonabhängigkeit der Tumoren, essentiell. Es wurden mehrere Versuche gestartet, Tiere mit MCF-7- und T-47D-Tumoren zu gewinnen, wobei das Wachstum von MCF-7-Tumoren nur in diesem einen Fall gelang. Leider konnten keine Tumoren von T-47D-Zellen, den Zellen mit der höchsten Aktivität an Estronsulfatase, gewonnen werden. Möglicherweise reichte die Hormongabe für ein gutes Tumorwachstum nicht aus, obwohl nach Literaturangaben gearbeitet wurde. Es wäre weiterhin denkbar, dass die implantierten Tumorzellen die Blutgefäß-Neubil-

dung (Angiogenese) nicht genügend stimulierten und dass so der Tumor nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurde. Das Wachstum der FaDu- und HepG2-Tumoren auf Nacktmäusen war problemlos, da diese keine Estradiol-Substitution benötigten.

Aufgrund des langsamen Wachstums der MCF-7-Tumoren bestanden diese deutlich aus Fremdanteilen wie Muskel- und Bindegewebe (Abb. 4-20). [<sup>18</sup>F]FESDS wurde jedoch in allen Geweben gleichermaßen angereichert. Bereits von Kubota *et al.* (1992) wurde beschrieben, dass im Tumor weitere Nicht-Tumor-Bestandteile (Entzündungszellen) vorkommen und dass diese den Radiotracer (FDG) ebenso gut aufnehmen.

Das Target/Nontarget-Verhältnis kann durch das Tumor/Muskel-Verhältnis ausgedrückt werden. Es beträgt 1,39 für die FaDu-Tumoren, 2,88 für die MCF-7-Tumoren und 7,87 für die HepG2-Tumoren. Insbesondere bei den HepG2-Tumoren sollte dieses Verhältnis für eine Bildgebung mit PET ausreichen. Es ist jedoch zu bemerken, dass dieser Tumor im Gegensatz zu allen sonst bearbeiteten Tumoren (auch HT-29 und WiDr, beides Colonkarzinome) sehr gut mit Blutgefäßen versorgt war. Bei den anderen Tumoren wurde jeweils nur eine äußere Randschicht durchblutet. Die hohe Aktivitätsanreicherung im HepG2-Tumor ist also möglicherweise nur auf die gute Durchblutung zurückzuführen und weniger auf eine starke Expression von Estronsulfatase. Der Versuch wurde ohne Applikation von Azetazolamid durchgeführt, da die HepG2-Zellen weder CA I noch CA II exprimieren. In gesunder humaner Leber wären die Isozyme CA IV-VI zu erwarten (Sly und Hu, 1995), ihre Expression in den HepG2-Zellen wurde jedoch nicht beschrieben.

Ebenso wie bei den Wistar-Ratten erfolgte auch bei den tumortragenden Nacktmäusen durch Hemmung mit Azetazolamid eine verstärkte Aktivitätsanreicherung in den ES-reichen Organen Leber, Ovar, Uterus und Fett. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass aufgrund der CA-Hemmung mehr [<sup>18</sup>F]FESDS für die ES-Bindungsstellen zur Verfügung stand. In Organen mit hohem Blutanteil wie Lunge, Herz, Niere und Milz ging die Radioaktivität entsprechend stark zurück. Die Tracerbindung wurde durch zusätzliche Gabe von FESDS in allen Organen erhöht, in der Leber sogar auf 27 % D/g. Entsprechend den Ergebnissen der Zellinkubation und *In-vitro*-Autoradiographie (4.3.2–4.3.4) wurde erwartet, dass durch die Hemmung der ES mit FESDS die Bindung in den ES-reichen Organen reduziert würde. Stattdessen war in allen Organen eine stärkere Aktivitätsanreicherung im Vergleich zu derjenigen bei alleiniger Gabe von Azetazolamid zu verzeichnen. Das kann nur dadurch erklärt werden,

dass bei i.v.-Injektion von Azetazolamid + FESDS 2,3-fach weniger Radioaktivität im Darm angereichert wurde, und daher der Tracer für die Bindung in den übrigen Organen zur Verfügung stand. Dieser Ansatz bringt keine Verbesserung des Target/Nontarget-Verhältnisses (MCF-7-Tumor: 1,25). Die *In-vivo*-Ergebnisse korrelieren nicht mit den *In-vitro*-Daten, bei denen mit Azetazolamid die Tracerbindung reduziert und mit Azetazolamid + FESDS nochmals verringert wird.

Die Kenntnis über die Metaboliten des Tracers hat eine große Bedeutung, da Aussagen getroffen werden müssen, ob tatsächlich der Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS oder eventuell Metaboliten an das Target binden. Treten Metaboliten von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS auf, so ist zu erwarten, dass Hemmexperimente nicht zum gewünschten Erfolg führen. Die HPLC sowie die Dünnschicht-Chromatographie von Plasma und Urin der Ratte zeigen einen Metaboliten, dessen Identität aber nicht näher untersucht wurde. Möglicherweise handelt es sich um ein Glucuronid, da Estrogene glucuronidiert über den Urin ausgeschieden werden (Hildebrandt, 1998). Es kann sich nicht um Fluorid handeln, da dies vor Erstellung des Chromatogramms abgetrennt wurde. Auch die Daten zur Radioaktivitäts-Anreicherung im Skelett deuten darauf hin, dass es sich nicht um Fluorid handeln kann, da sonst die Aktivität im Femur der Wistar-Ratten 60 min p.i. höher als 5 min p.i. sein müsste. Hidalgo Aragonés *et al.* (1996) stellten nach i.v.-Gabe von Estron-3-O-Sulfamat (EMATE) ebenfalls Metabolite bei den Ratten fest. Im Plasma tumortragender Nacktmäuse wurden in der vorliegenden Arbeit keine Metabolite von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS gefunden. Die Unterschiede in der Bildung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS-Metaboliten könnten durch die verschiedenen HPLC-Systeme (3.3.6.5) begründet werden. Die HPLC-Analytik wurde bei den Ratten mit dem Elutionsmittel Ethanol und bei den Mäusen mit Acetonitril durchgeführt. Es ist außerdem möglich, dass Ratte und Maus unterschiedliche Plasmaproteine haben, die den Tracer verschieden stark binden. Aufgrund der Fällung des Plasmas wurden diese Proteine zusammen mit dem gebundenen Tracer abgetrennt und standen der Analytik nicht zur Verfügung. Da aber die Metabolisierung des Tracers im Blut vergleichsweise gering ist, spricht diese Tatsache nicht gegen eine Eignung der Substanz für die PET. Möglicherweise ist die geringe Affinität von FESDS zur Estronsulfatase die Ursache dafür, dass die Experimente nicht den gewünschten Erfolg zeigten.

Zum Schluß wurde die dynamische Tracerverteilung durch Positronen-Emissions-Tomographie an Wistar-Ratten und Schweinen untersucht. Dabei sollte die Kinetik des Tracers [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS im Blut und die mögliche Verdrängung durch den CA-Hemmer studiert werden.

An den Ratten und Ferkeln konnte eine gute und schnelle Verdrängung der Radioaktivität im Blut durch Azetazolamid gezeigt werden. Eine i.v.-Applikation von 5 mg/kg Azetazolamid reduzierte die Radioaktivität im Blut der Ratte sehr stark, wobei die Radioaktivität in der Leber und im Darm erhöht wurde. Das ist jedoch weniger auf die Expression von Estronsulfatase in diesem Organ, sondern vielmehr auf die hepatobiliäre Ausscheidung des Tracers zurückzuführen. Dadurch erscheint die Auffindung von Tumoren im unteren Bauchraum schwierig.

Durch die Erstellung einer Blutbindungskurve für [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS am Schwein wurde bestätigt, dass der Tracer fast vollständig vom zellulären Kompartiment (Erythrocyten) gebunden wurde. Es war jedoch möglich, [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS durch Azetazolamid (5 mg/kg) aus dem Blut zu verdrängen und ins Plasma zu bringen.

PET-Bilder vom Hirn der Ferkel ließen lediglich die großen Blutgefäße, aber keine Hirnregionen mit hoher ES-Expression erkennen. Wie auch durch die *Ex-vivo*-Autoradiographie beim Rattenhirn (Abb. 4-18) gezeigt wurde, reichert sich [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS verstärkt in den Blutgefäßen des Hirnes an. Selbst mit Azetazolamid-Applikation war der Tracer nur in den großen Blutgefäßen Arteria cerebri media, Arteria carotis interna sowie dem Sinus sagitalis dorsalis und Rete mirabile gebunden. Die erfolgreiche *In-vitro*-Trennung von Estronsulfatase und Carboanhydrase gelang *in vivo* leider nicht. Damit wird die letzte und wichtigste Forderung für die Eignung eines PET-Tracers nach einer Korrelation zwischen Vorkommen des Targets und Bioverteilung nicht erfüllt.

#### 5.6 Zusammenfassende Betrachtung zur Eignung von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS als PET-Tracer

Der neuartige Radiotracer  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat bindet sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an verschiedenen Zellen und Gewebe. [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS hat dabei zwei Targets: die Estronsulfatase und die Carboanhydrase. Da der Tracer an die Carboanhydrase bindet, stellt er *in vivo* vorzugsweise die Blutverteilung im Körper dar. [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS bindet zu stark im Blut (10 % D/g) und zu gering an Ovar oder Uterus (0,5 % D/g). Die spezifische Darstellung von dem Target Estronsulfatase durch [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS ist nicht gegeben. Das bedeutet, es besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS in einem Gewebe ohne Expression von Estronsulfatase nicht bindet.

*In vitro*, wenn die CA mit Azetazolamid an Organschnitten und konfluenten Tumorzellen gehemmt wird, kann die Estronsulfatase dargestellt werden, es gelingt jedoch nicht *in vivo*. Eine Applikation von Azetazolamid führt *in vivo* dazu, dass sich der Tracer vorzugsweise in Darm und Leber anreichert, da er über diese Organe ausgeschieden wird. Eine Hemmung der CA mit Azetazolamid reduziert zwar die falsch hohe Blutbindung, läßt aber neben Organen mit hoher ES-Aktivität auch Organe mit geringer ES-Aktivität (Pankreas) falsch hoch erscheinen.

Die Ursachen dafür, dass die ES *in vivo* nicht nachgewiesen werden kann, sind vermutlich die vergleichsweise hohen Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) von mindestens 28 nM (Uterus) sowie die starke hepatobiliäre Ausscheidung des Tracers. Dadurch ist die Anwendbarkeit von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS zur Diagnostik von Brustkrebs mit PET limitiert. Das im Tierversuch an tumortragenden Nacktmäusen erhaltene Target/Nontarget-Verhältnis fiel mit 2,88 für den MCF-7-Tumor (Mammakarzinom, Primärtumor) zu gering aus. Mit den HepG2-Tumoren (Hepatom) wurde das sehr gute Target/Nontarget-Verhältnis von 7,87 erhalten, was wahrscheinlich eine Bildgebung mit der PET erlaubt. Es ist aber lediglich auf die besonders gute Durchblutung von dem Tumor zurückzuführen und weniger auf eine hohe ES-Expression.

Es müsste ein Tumormodell mit hoher Estronsulfatase-Aktivität gefunden werden. Dies könnte durch den Einsatz anderer Zellen gelingen. Dazu müsste jedoch ein Screening von allen verfügbaren Mammakarzinom-Zelllinien bezüglich deren ES-Aktivität durchgeführt werden. Die Erhöhung der ES-Expression im transplantierten Tumor kann möglicherweise aber auch durch eine Implantation der Tumorzellen zusammen mit extrazellulärer Matrix (ECM) erfolgen. Es ist bekannt, dass Differenzierungsprozesse in epithelialen Zellen maßgeblich durch die ECM beeinflusst werden (Petersen *et al.*, 1998). Vollmer *et al.* (1995) zeigte an den Endometrium-Krebszellen RUCA-I, dass diese bei Kultivierung auf ECM im Gegensatz zur Kultivierung auf Plastikoberfläche hormon-induzierte Gene exprimieren. Die funktionelle Differenzierung der Zellen kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass sich die Zellen dreidimensional anordnen. Auf diese Weise wäre es evtl. möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und T-47D eine höhere ES-Expression erreichen. Aus verschiedenen Gründen war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, diesen Ansatz zu prüfen.

Ein wichtiges Kriterium für die Charakterisierung eines potentiellen PET-Tracers ist die Affinität der unmarkierten Substanz. Diese ist mit  $K_d$ -Werten zwischen 28 nM bei Uterus bzw. 1500 nM bei Striatum möglicherweise zu gering. In Tabelle 5-5 sind die Affinitäten von

einigen PET-Tracern aufgeführt. Es ist zu sehen, dass die meisten  $K_d$ -Werte im subnanomolaren Bereich (z.B. 0,13 nM für [ $^{18}\text{F}$ ]Altanserin; Biver *et al.*, 1997) und damit deutlich unter den hier ermittelten Werten liegen. Da der Metabolismus des Tracers eher gering ist, ist es wahrscheinlicher, dass das Nichtfunktionieren der Darstellung des Enzyms Estronsulfatase mit der PET auf eine zu geringe Affinität der Verbindung FESDS zurückzuführen ist.

Tabelle 5-5: Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) einiger PET-Tracer

Tracer	Target	$K_d$ [nM]	Autor
[ $^{18}\text{F}$ ]Altanserin	Serotonin-Rezeptor (5-HT <sub>2</sub> )	0,13	Biver <i>et al.</i> (1997)
[ $^{11}\text{C}$ ](+)-McN5652	Serotonin-Transporter	0,72	Brust <i>et al.</i> (2000)
6-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-3-(2(S)-Azetidinylmethoxy)-Pyridin (6-[ $^{18}\text{F}$ ]FA)	Nicotinischer Acetylcholin-Rezeptor	0,028	Horti <i>et al.</i> (2000)
[ $^{11}\text{C}$ ]Flumazenil	Benzodiazepin-Rezeptor	12,0	Lassen <i>et al.</i> (1995)
[ $^{11}\text{C}$ ]Methylquinuclidinylbenzylat (MQNB)	Myokardialer muscarinischer Rezeptor	0,002	Delforge <i>et al.</i> (1993)

Prinzipiell bestände die Möglichkeit, die Darstellbarkeit der Carboanhydrase mit [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS durch die PET zu nutzen, da Erkrankungen mit pathologischer Veränderung der Expression der CA bekannt sind (Nishimori *et al.*, 1999). Am aussichtsreichsten wäre es natürlich, wenn Krankheiten mit signifikanter Über- oder Unterexpression der sulfonamidsensitiven CA-Isozyme (II und V) gefunden würden. Z.B. ist bei einigen Formen von Hirntumoren die Expression von CA II erhöht (Parkkila *et al.*, 1995). Bei Patienten mit Hirnschlag ist die CA II - Konzentration im cerebrospinalen Fluid erhöht, was auf Membranschäden zurückgeführt wird (Parkkila, 2000). Es wird angenommen, daß die CA I und CA II an der Pathogenese von humanen Autoimmunkrankheiten beteiligt sind. Das sind z.B. Systemischer Lupus Erythematosus, Sjögrens's Syndrom, Autoimmun-Cholangitis und Idiopathische Chronische Pankreatitis. Bei Cervix-Krebs des Uterus ist die CA IX – Expression hochreguliert, bei Nierenzellkarzinom die der CA XII. Mori *et al.* (1993) berichten wiederum von einem Fehlen der CA I bei colorectalem Krebs. Nógrádi (1998) ist allerdings der Meinung, dass die CAs I–VII keine sinnvollen Marker zum Tumor-Imaging sind, lediglich das Isozym CA IX könnte mit der Tumorgenese assoziiert sein. Die CA IX scheint auch gegenüber den Sulfonamiden eine gewisse Affinität aufzuweisen (Supuran *et al.*, 2001; Supuran und Scozzafava, 2000) und würde damit ein Target für den Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS darstellen. Zukünftigen Experimenten ist es vorbehalten, zu prüfen, ob dem so ist.

## 6 Zusammenfassung

In den westlichen Industrieländern ist Brustkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen. Bei der Diagnose von Brustkrebs ist für bestimmte Fragestellungen die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine wichtige Ergänzung zur Mammographie und Sonographie. Die derzeit eingesetzten PET-Tracer 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-Glucose (FDG) und 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluor-17 $\beta$ -estradiol (FES) können Mammakarzinome bzw. deren Metastasen nicht mit 100%iger Sicherheit nachweisen. Aus diesem Grund wurde eine [<sup>18</sup>F]-markierte Verbindung entwickelt, die möglicherweise die diagnostische Sicherheit bei Brustkrebs erhöhen kann: [<sup>18</sup>F]16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat ([<sup>18</sup>F]FESDS). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob [<sup>18</sup>F]FESDS für die Positronen-Emissions-Tomographie eignet ist. Dabei wurden Kriterien, die von Eckelman und Gibson (1993) aufgestellt wurden, in die Prüfung einbezogen.

Die Herangehensweise war folgende: es wurde ein diagnostisch relevantes Protein gewählt, dass in jedem Brustkrebsgewebe vorkommt. Dieses Protein musste in malignem Brustgewebe signifikant höher exprimiert sein als in gesundem Gewebe. Beide Bedingungen werden von der Estronsulfatase erfüllt. Für die Entwicklung eines Tracers besteht die Möglichkeit der radioaktiven Markierung eines Inhibitors: 16 $\alpha$ -Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat (FESDS).

Das Vorkommen des Enzyms Estronsulfatase wurde in allen untersuchten Organen und Hirnregionen der Wistar-Ratte sowie in den Tumorzellen MCF-7, T-47D und HepG2 nachgewiesen. Die Enzymaktivität der Estronsulfatase beträgt zwischen 0,82 pmol/mg Protein/min (HepG2-Zellen) und 2670 pmol/mg Protein/min (männliche Hypophyse).

Für die Affinitätskonstante des Enzym-Substrates Estronsulfat wurde 29  $\mu$ M ermittelt. Die Enzymaktivität der Estronsulfatase konnte in Organ- und Zellhomogenaten mit den Inhibitoren Quercetin, Naringin und FESDS signifikant gehemmt werden, wobei durch FESDS die stärkste Hemmung erzielt wurde.

Der neuartige Tracer [<sup>18</sup>F]FESDS bindet *in vitro* an Strukturen des Rattenhirnes. Die Bindung lässt sich durch FESDS, aber nicht durch Naringin und Quercetin hemmen. Das deutet darauf hin, dass die Bindung von [<sup>18</sup>F]FESDS an die Estronsulfatase nicht spezifisch ist.

Untersuchungen an Wistar-Ratten zeigten, dass 60 min nach i.v.-Injektion von [<sup>18</sup>F]FESDS 10 % der injizierten Radioaktivität pro Gramm (D/g) im Blut, aber nur 0,5 % D/g in Ovar und Uterus angereichert wurden. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da Blut im Gegensatz zu Ovar und Uterus eine sehr geringe Estronsulfatase-Aktivität hat. Somit wird die Radioaktivität im Blut zu hoch und in den ES-exprimierenden Organen Ovar und Uterus zu niedrig angereichert. Die hohe Blutbindung ist nachteilig für einen PET-Tracer, da so Gewebe bzw. Tumoren mit hoher Estronsulfatase-Expression nicht deutlich abgegrenzt werden können.

[<sup>18</sup>F]FESDS bindet offensichtlich an Bestandteile des Blutes, wobei es sich dabei nicht um die Estronsulfatase handeln kann. Es wird aufgrund der Molekülstruktur (2 Sulfonamidgruppen) vermutet, dass [<sup>18</sup>F]FESDS an Carboanhydrase, die in Erythrocyten enthalten ist, bindet. Dies konnte durch Hemmexperimente mit sulfonamidischen Carboanhydrase-Hemmern belegt werden. Dabei ist die Inhibition der Carboanhydrase durch FESDS etwas geringer als die von Azetazolamid.

Es wurde versucht, durch eine äquivalente Konzentration an Azetazolamid sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Carboanhydrase zu hemmen. Dadurch sollte das eigentliche Ziel erreicht werden, mit [<sup>18</sup>F]FESDS die Estronsulfatase nachzuweisen. Die benötigte Azetazolamid-Konzentration beträgt *in vitro* zwischen 10<sup>-6</sup> M und 10<sup>-4</sup> M an Organschnitten der Ratte und in humanen Tumorzellen. *In vivo* wurde eine Dosis von 5 mg/kg eingesetzt. Diese Dosis ist für den Menschen unbedenklich, da von Scheuermann *et al.* (2000) berichtet wird, dass bei einer Applikation von 10 mg/kg Azetazolamid (Diamox<sup>®</sup>) keine Beeinträchtigung der pulmonaren Atmung erfolgt.

Durch selektive Hemmung der Carboanhydrase konnte *in vitro* mit [<sup>18</sup>F]FESDS die Affinitätskonstante von FESDS an die Estronsulfatase bestimmt werden. Sie beträgt 28 nM am Rattenuterus und stimmt mit dem an humanen Plazenta-Mikrosomen ermittelten Wert überein.

Die *In-vitro*-Autoradiographie des Rattenhirnes zeigt, dass die Affinität von [<sup>18</sup>F]FESDS zur Estronsulfatase ca. 10-fach geringer als die zur Carboanhydrase ist, d.h. der Tracer bindet bevorzugt an die Carboanhydrase.

*In vivo* ist es nicht gelungen, mit [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS die Estronsulfatase bei vorliegender Carboanhydrase-Hemmung besser darzustellen. Leber (4,1 % D/g) und Darm reichern die Radioaktivität besonders stark an, was auf die hepatobiliäre Ausscheidung des Tracers zurückzuführen ist. Organe mit hoher Estronsulfatase-Aktivität enthalten dagegen nur wenig Radioaktivität (Uterus 0,9 % D/g). Bei Vorliegen einer Carboanhydrase-Inhibition kann durch die zusätzliche Gabe von FESDS die Tracerbindung *in vivo* nicht vermindert werden, sie wird sogar erhöht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch den gemeinsamen Einsatz von Azetazolamid und FESDS der Tracer 2,3-fach weniger in den Darm ausgeschieden wird und so für die Bindung in ES-reichen Organen zur Verfügung steht. Damit ergibt sich keine Korrelation zwischen den Daten *in vitro* und *in vivo*.

[ $^{18}\text{F}$ ]FESDS wird in der Wistar-Ratte in geringem Maße metabolisiert. Es handelt sich dabei um ein Produkt, das im Blut und Urin vorkommt; im Urin macht es 64,5 % der Gesamtradioaktivität aus. Bei Nacktmäusen treten unter den gewählten analytischen Bedingungen keine Metaboliten im Blut auf.

Das Tumor/Muskel-Verhältnis von tumortragenden Nacktmäusen beträgt 1,39 beim FaDu-Tumor und 7,87 beim HepG2-Tumor, wobei der FaDu-Tumor keine ES exprimiert und daher als Negativkontrolle gilt. Das sehr gute Tumor/Muskel-Verhältnis des HepG2-Tumors ist auf die gute Durchblutung dieses Tumors zurückzuführen. Für den MCF-7-Tumor wäre eine noch höhere Traceranreicherung als beim HepG2-Tumor zu erwarten, was aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse führen zu dem Schluß, dass eine Darstellung der Estronsulfatase mit der PET weder mit dem Radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS allein noch bei Koinjektion von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS mit Azetazolamid (zur CA-Hemmung) möglich ist.

Es besteht lediglich die Chance, den Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS für die Darstellung von Carboanhydrase IX, einem Tumormarker, zu nutzen. Dies war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und bleibt zukünftigen Experimenten vorbehalten.

## ANHANG

**I. Literaturverzeichnis**

Armstrong K, Eisen A, Weber B (2000): Assessing the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 564-571.

Aronica SM, Katzenellenbogen BS (1993): Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol. Endocrinol.* 7, 743-52.

Asaba H, Hosoya K, Takanaga H, Ohtsuki S, Tamura E, Takizawa T, Terasaki T (2000): Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J. Neurochem.* 75, 1907-1916.

Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V (1994): Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res.* 54, 2424-2428.

Bar-Shalom R, Valdivia AY, Blafox MD (2000): PET imaging in oncology. *Sem. Nucl. Med.* 3, 150-185.

Baulieu EE (1997): Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog. Hor. Res.* 52, 1-32

Baxter LR (1990): Brain imaging as a tool in establishing a theory of brain pathology in obsessive compulsive disorder. *J. Clin. Psychiatry* 51, Suppl: 22-5; discussion 26.

Bergner EA, Shapiro LJ (1981): Increased cholesterol sulfate in plasma and red blood cell membranes of steroid sulfatase deficient patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 221-3.

Bergner EA, Shapiro LJ (1988): Metabolism of <sup>3</sup>H-dehydroepiandrosterone sulfate by subjects with steroid sulphatase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 11, 403-415.

Bertocci B, Miggiano V, Prada MD, Dembic Z, Lahm H-W, Malherbe P (1991): Human catechol-O-methyltransferase: Cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1416-1420.

Bergman-Jungstrom M, Wingren S (2001): Catechol-O-Methyltransferase (COMT) gene polymorphism and breast cancer risk in young women. *Br. J. Cancer* 85, 859-862.

Biver F, Lotstra F, Monclus M, Dethy S, Damhaut P, Wikler D, Luxen A, Goldman S (1997): *In vivo* binding of [<sup>18</sup>F]altanserin to rat brain 5HT2 receptors: a film and electronic autoradiographic study. *Nucl. Med. Biol.* 24: 357-360.

Boulton DW, Walle UK, Walle T (1999): Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 353-359.

- Brooks DA, McCourt PA, Gibson GJ, Ashton LJ, Shutter M, Hopwood JJ (1991): Analysis of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase protein and kinetics in mucopolysaccharidosis type VI patients. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 710-719.
- Brust P, Kretzschmar M, Zessin J, Bergmann R, Friedrich A, Füchtner F, Hinz R, Steinbach J (2000): Characterization of [<sup>11</sup>C](+)McN5652 in various animal species: implications for tracer development. *Jahresbericht FWB, FZR-312*, 173-177.
- Burck H-C (Ed.): *Histologische Technik*. Stuttgart: Thieme, 1988.
- Campbell AR, Andress DL, Swenson ER (1994): Identification and characterization of human neutrophil carbonic anhydrase. *J. Leukocyte Biol.* 55, 343-348.
- Carlström K, Döberl A, Pousette Å, Rannevik G, Wilking N (1984): Inhibition of steroid sulfatase activity by danazol. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 123, 107-111.
- Carter ND, Auton J (1975): Characterization of carbonic anhydrases from tissues of the cat. *Biochim. Biophys. Acta* 410, 220-228.
- Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (2000): Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J. Biol. Chem.* 275: 4507-4512.
- Chegwidden WR, Dodgson SJ, Spencer IM: The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. In: Chegwidden WR, Carter ND, Edwards YH (Ed.): *The Carbonic anhydrases: New Horizons*. Basel: Birkhäuser, 2000.
- Cheng Y-C, Prusoff WH (1973): Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharm.* 22, 3099-3108.
- Christie KN, Thomson C (2000): The distribution of carbonic anhydrase II in human, pig and rat oesophageal epithelium. *Histochem. J.* 32, 753-757.
- Chu GH, Peters A, Selcer KW, Li PK (1999): Synthesis and sulfatase inhibitory activities of (E)- and (Z)-4-hydroxytamoxifen sulfamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 141-144.
- Cohen PG (2001): Aromatase, adiposity, ageing and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and ageing connection. *Med. Hypotheses* 56, 702-708.
- Compagnone NA, Salido E, Shapiro LJ, Mellon SH (1997): Expression of steroid sulfatase during embryogenesis. *Endocrinology* 138, 4768-4773.
- Compagnone NA, Mellon SH (1998): Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4678-4683.
- Conroy CW, Maren TH (1995): The effect of temperature on the binding of sulphonamides to carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and IV. *Mol. Pharmacol.* 48, 486-491.

- Conti PS, Lilien DL, Hawley K, Keppler J, Grafton ST, Bading JR (1996): PET and [<sup>18</sup>F]-FDG in oncology: a clinical update. *Nucl. Med. Biol.* 23, 717-735.
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE (1981): Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4704-4707.
- Daniel WL (1985): Arylsulfatase C and the steroid sulfatases. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 12, 189-228.
- Dehdashti F, McGuire AH, VanBrocklin HF, Siegel BA, Andriole DP, Griffeth LK, Pomper MG, Katzenellenbogen JA, Welch MJ (1991): Assessment of 21-[<sup>18</sup>F]fluoro-16 alpha-ethyl-19-norprogesterone as a positron-emitting radiopharmaceutical for the detection of progesterin receptors in human breast carcinomas. *J. Nucl. Med.* 32, 1346-1347.
- Delforge J, Le Guludec D, Syrota A, Bendriem B, Crouzel C, Slama M, Merlet P (1993): Quantification of myocardial muscarinic receptors with PET in humans. *J. Nucl. Med.* 34, 981-991.
- Dickson RB (1990): Stimulatory and inhibitory growth factors and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 795-803.
- Dodgson SJ, Forster RE (1986a): Inhibition of CA V decreases glucose synthesis from pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 198-204.
- Dodgson SJ, Forster RE (1986b): Carbonic anhydrase: inhibition results in decreased urea production by hepatocytes. *J. Appl. Physiol.* 60, 646-652.
- Duncan L, Purohit A, Howarth NM, Potter BV, Reed MJ (1993): Inhibition of estrone sulfatase activity by estrone-3-methylthiophosphonate: a potential therapeutic agent in breast cancer. *Cancer Res.* 53, 298-303.
- Eckelman WC, Gibson RE (1993): The design of site-directed radiopharmaceuticals for use in drug discovery. In: Burns HD, Gibson R, Dannals R, Siegl P (Ed.): *Nuclear Imaging in Drug Discovery, Development, and Approval*. Basel: Birkhäuser, 1993.
- Eckhardt U, Schroeder A, Stieger B, Hochli M, Landmann L, Tynes R, Meier PJ, Hagenbuch B (1999): Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells. *Am. J. Physiol.* 276, G1037-1042.
- Enmark E, Gustafsson J-Å (1999): Oestrogen receptors – an overview. *J. Intern. Med.* 246, 133-138.
- Eto Y, Rampini S, Wiesmann U, Herschkowitz NN (1974): Enzymic studies of sulphatases in tissues of the normal human and in metachromatic leukodystrophy with multiple sulphatase deficiencies: arylsulphatases A, B and C, cerebroside sulphatase, psychosine sulphatase and steroid sulphatases. *J. Neurochem.* 23, 1161-1170.

Evans TRJ, Rowlands MG, Jarman M, Coombes RC (1991): Inhibition of estrone sulfatase enzymes in human placenta and human breast carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39, 493-499.

Evans TRJ, Rowlands MG, Luqmani YA, Chander SK, Coombes RC (1993): Detection of breast cancer-associated estrone sulfatase in breast cancer biopsies and cell lines using polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46, 195-201.

Evans TR, Rowlands MG, Law M, Coombes RC (1994): Intratumoral oestrone sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 69, 555-561.

Flood JF, Morley JE, Roberts E (1992): Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1567-1571.

Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, Hwang T, Woolson RF, Pe'er J, Gruman LM (1993): The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 100, 1389-1398.

Forsman C, Behravan G, Osterman A, Jonsson B-H (1988): Production of active human carbonic anhydrase II in *E. coli*. *Acta Chem. Scand.* B42, 314-318.

Fridborg K, Kannan K, Liljas A, Lundin J, Strandberg B, Strandberg R, Tilander B, Wiren G (1967): Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase C. 3. Molecular structure of the enzyme and of one enzyme-inhibitor complex at 5-5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 25, 505-516.

Gasior M, Carter RB, Witkin JM (1999): Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *TiPS* 20, 107-112.

Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G, Gombos G, Filippi D, Limozin N, Dalmaso D, Laurent G (1980): Immunochemical and immunohistochemical study of carbonic anhydrase II in adult rat cerebellum: a marker for oligodendrocytes. *Neurosci.* 5, 559-571.

Ghandour M.S, Vincendon G, Gombos G, Limozin N, Filippi D, Dalmaso C, Laurent G (1980): Carbonic anhydrase and oligodendroglia in developing rat cerebellum: a biochemical and immunohistological study. *Dev. Biol.* 77, 73-83.

Ghandour MS, Langley OK, Zhu XL, Waheed A, Sly WS (1992): Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 6823-6827.

Ghandour MS, Parkkila AK, Parkkila S, Waheed A, Sly WS (2000): Mitochondrial carbonic anhydrase in the nervous system: expression in neuronal and glial cells. *J. Neurochem.* 75, 2212-2220.

Grompe M, Pieretti M, Caskey CT, Ballabio A (1992): The sulfatase gene family: cross-species PCR cloning using the MOPAC technique. *Genomics* 12, 755-760.

Hamann U (2000): Hereditary breast cancer: high risk genes, genetic testing and clinical implications. *Clin. Lab.* 46, 447-461.

Henderson BE, Ross R, Bernstein L (1988): Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.* 48, 246-253.

Henry RP, Swenson ER (2000): The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Resp. Physiol.* 121, 1-12.

Hertog MGL, Hollman PCH (1996): Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur. J. Clin. Nutrition* 50, 63-71.

Hewett-Emmett D, Tashian RE (1996): Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 50-77.

Hewett-Emmett D: Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: Chegwiddden WR, Carter ND, Edwards YH (Ed.): *The Carbonic anhydrases: New Horizons*. Basel: Birkhäuser, 2000.

Hidalgo Aragonés MI, Purohit A, Parish D, Sahm UG, Pouton CW, Potter BVL, Reed MJ (1996): Pharmacokinetics of oestrone-3-O-sulphamate. *J. Steroid Biochem.* 58, 611-617.

Hildebrandt H (Ed.): *Psyhyrembel. Klinisches Wörterbuch*. Berlin: de Gruyter, 1998.

Hobkirk R, Fletcher JM, Choi HY (1987): Estrone sulfate sulfohydrolase in the developing brain and pituitary of rat, mouse and guinea pig. *J. Steroid Biochem.* 26, 413-416.

Horti AG, Chefer SI, Mukhin AG, Koren AO, Gundisch D, Links JM, Kurian V, Dannals RF, London ED (2000): 6-<sup>[18F]</sup>fluoro-A-85380, a novel radioligand for *in vivo* imaging of central nicotinic acetylcholine receptors. *Life Sci.* 67, 463-469.

Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS (1997): Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin and other flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63, 9-15.

Huijghebraert SM, Sim SM, Back DJ, Eyssen HJ (1984): Distribution of estrone sulfatase activity in the intestine of germfree and conventional rats. *J. Steroid Biochem.* 20, 1175-79.

Hustinx R, Alavi A (1999): SPECT and PET imaging of brain tumors. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 9, 751-766.

Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA (1993): Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol. Endocrinol.* 7, 992-998.

Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP (1999): Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4686-4691.

Inoue K, Creveling CR (1991): Induction of catechol-O-methyltransferase in the luminal epithelium of rat uterus by progesterone. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 823-828.

Israel N, Saez S (1978): Relation between steroid receptor content and the response to hormone addition in isolated human breast cancer cells in short-term culture. *Cancer Res.* 38, 4314-4317.

Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y (1976): Steroid sulfatase in brain: comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurochem.* 27, 1389-1395.

James MR, Skaar TC, Lee RY, MacPherson A, Zwiebel JA, Ahluwalia BS, Ampy F, Clarke R (2001): Constitutive expression of the steroid sulfatase gene supports the growth of MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 142, 1497-1505.

Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994): Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 133-137.

James MR, Skaar TC, Lee RY, MacPherson A, Zwiebel JA, Ahluwalia BS, Ampy F, Clarke R (2001): Constitutive expression of the steroid sulfatase gene supports the growth of MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinol.* 142, 1497-1505.

Jasonni VM, Naldi S, La Marca L, Bulletti C, Ciotti P, Vignudelli A, Flamigni C (1986): Preliminary report on post-menopausal endometrial hyperplasia treatment with Danazol: histological and endocrinological aspects. *Cancer Det. Prev.* 9, 331-335.

Jewell DA, Tu C, Paranawithana SR, Tanhauser SM, LoGrasso PV, Laipis PJ, Silverman DN (1991): Enhancement of the catalytic properties of human carbonic anhydrase III by site-directed mutagenesis. *Biochem.* 30, 1484-1490.

Jochelson M (2001): Breast cancer imaging: the future. *Semin. Oncol.* 28, 221-228.

Kaptain S, Tan LK, Chen B (2001): Her-2/neu and breast cancer. *Diagn. Mol. Pathol.* 10, 139-152.

Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Julkunen I, Panula P (1994): Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1079-1090.

Kasch H, Schumann W, Römer J, Steinbach J (1998): Method for the production of gonade steroid sulfamates and their use as sulfatase inhibitors. Patent WO 9842729, 01.10.1998.

Kasch H, Römer J, Steinbach J (1999): *In vitro* selection of sulphatase inhibitors for tumour diagnosis with PET and for tumour therapy. *Jahresbericht FWB, FZR-283*, 54-57.

Katzenellenbogen JA, Welch MJ, Dehdashti F (1997): The development of estrogen and progestin radiopharmaceuticals for imaging breast cancer. *Anticancer Res.* 17, 1573-1576.

Kawano J-i, Aikawa E (1987): Regional distribution of arylsulfatase C and estrone-sulfate sulfatase activities in rat brain and hypophys. *Brain Res.* 409, 391-394.

Kellis JT, Vickery LE (1984): Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavonoids. *Sci.* 225, 1032-1034.

- Kendall AG, Tashian RE (1977): Erythrocyte carbonic anhydrase I: inherited deficiency in humans. *Sci.* 197, 471-472.
- Kernohan JC (1966): A method for studying the kinetics of the inhibition of carbonic anhydrase by sulphonamides. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 405-412.
- Khalifah RG (1971): The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* 246, 2561-2573.
- Khalkhali I, Vargas HI (2001): The role of nuclear medicine in breast cancer detection. *Radiol. Clin. North Am.* 39, 1053-1068.
- King RW, Burgen AS (1976): Kinetic aspects of structure-activity relations: the binding of sulphonamides by carbonic anhydrase. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 193, 107-125.
- Kishimoto Y, Sostek R (1972): Activity of sterol-sulphate sulphohydrolase in rat brain: characterization, localization, and change with age. *J. Neurochem.* 19, 123-130.
- Kivelä J, Parkkila S, Parkkila A-K, Leinonen J, Rajaniemi H (1999): Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *J. Physiol.* 520, 315-320.
- Krishnan V, Heath H, Bryant HU (2001): Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Vitamins Horm.* 60, 123-147.
- Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T (1992): Intramural distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose *in vivo*: high accumulation in macrophages and granulation tissue studies by microautoradiography. *J. Nucl. Med.* 33, 1972-1980.
- Kumpulainen T, Nystrom SH (1981): Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzyme C in human brain. *Brain Res.* 220, 220-225.
- Kumpulainen T, Korhonen LK (1982): Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzyme C in the central and peripheral nervous system of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 283-292.
- Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (1999): Molecular cloning and characterization of a new multispecific organ anion transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* 274, 13675-13680.
- Lakshmi S, Balasubramanian AS (1981): The distribution of estrone sulphatase, dehydroepiandrosterone sulphatase, and arylsulphatase C in the primate (*Macaca radiata*) brain and pituitary. *J. Neurochem.* 37, 358-362.
- Lassen NA, Bartenstein PA, Lammertsma AA, Prevett MC, Turton DR, Luthra SK, Osman S, Bloomfield PM, Jones T, Patsalos PN, *et al.* (1995): Benzodiazepine receptor quantification *in vivo* in humans using [<sup>11</sup>C]flumazenil and PET: application of the steady-state principle. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 152-165.
- Le Roy I, Mortaud S, Tordjman S, Donsez-Darcel E, Carlier M, Degrelle H, Roubertoux PL (1999): Genetic correlation between steroid sulfatase concentration and initiation of attack behavior in mice. *Behav. Genet.* 29, 131-136.

- Li XM, Salido EC, Gong Y, Kitada K, Serikawa T, Yen PH, Shapiro LJ (1996): Cloning of the rat steroid sulfatase gene (Sts), a non-pseudoautosomal X-linked gene that undergoes X inactivation. *Mamm. Genome* 7, 420-424.
- Lindskog S, Thorslund A (1968): On the interaction of bovine cobalt carbonic anhydrase with sulfonamides. *Eur. J. Biochem.* 3, 453-60.
- Lindskog S (1997): Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 74, 1-20.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Lynch CJ, Fox H, Hazen SA, Stanley BA, Dodgson S, LaNoue KF (1995): Role of hepatic carbonic anhydrase in *de novo* lipogenesis. *Biochem. J.* 310, 197-202.
- MacIndoe JH (1988): The hydrolysis of estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate by MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinol.* 123, 1281-1287.
- Malini B, Purohit A, Ganeshapillai D, Woo LW, Potter BV, Reed MJ (2000): Inhibition of steroid sulphatase activity by tricyclic coumarin sulphamates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 253-258.
- Maren TH, Couto EO (1979): The nature of anion inhibition of human red cell carbonic anhydrases. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 501-510.
- Maren TH, Sanyal G (1983): The activity of sulfonamides and anions against the carbonic anhydrases of animals, plants, and bacteria. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 439-459.
- Maren TH (1992): Direct measurement of the rate constants of sulphonamides with carbonic anhydrase. *Mol. Pharmacol.* 41, 419-426.
- Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F (1994): Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD), 17 $\beta$ -HSD 5 $\alpha$ -reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol. Cell Endocrinol.* 104, 103-111.
- Matsumoto K, Miyazaki H, Fuji T, Hashimoto M (1989): Binding of sulfonamides to erythrocytes and their components. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 37, 1913-1915.
- Matts PJ, White GF, Payne WJ (1994): Purification and characterization of the short-chain alkylsulphatase of coryneform B1a. *Biochem. J.* 304, 937-943.
- McGowan MH, Neubauer JA, Stolle CA (1997): Characterization of the rat carbonic anhydrase II gene structure: sequence analysis of the 5'-flanking region and 3'UTR. *Gene* 186, 181-8.
- McLeskey SW, Zhang L, El-Ashry D, Trock BJ, Lopez CA, Kharbanda S, Tobias CA, Lorant LA, Hannum RS, Dickson RB, Kern FG (1998): Tamoxifen-resistant fibroblast growth factor-transfected MCF-7 cells are cross-resistant *in vivo* to the antiestrogen ICI 182,780 and two aromatase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 4, 697-711.

- McNamara JO (1999): Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399, A15-22.
- Meldrum NU, Roughton FJW (1933): Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol. (Lond.)* 80, 113-142.
- Meyerson LR, Nesta D (1991): [<sup>3</sup>H]Azetazolamide binding to carbonic anhydrase in normal and transformed cells. *Biochem. Pharmacol.* 41, 995-1000.
- Milewich L, Garcia RL, Gerrity LW (1984): Steroid sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase activities in mouse tissues. *J. Steroid Biochem.* 21, 529-538.
- Mintun MA, Welch MJ, Siegel BA, Mathias CJ, Brodack JW, McGuire AH, Katzenellenbogen JA (1988): Breast cancer: PET imaging of estrogen receptors. *Radiology* 169, 45-48.
- Miyakawa I, Kawano Y, Taniyama K, Mori N (1994): Steroid sulfatase activity in human leukocytes. *Gynecol. Obstet. Invest.* 38, 191-193.
- Montgomery JC, Venta PJ, Eddy RL, Fukushima YS, Shows TB, Tashian RE (1991): Characterization of the human gene for a newly discovered carbonic anhydrase CA VII and its localization to chromosome 16. *Genomics* 11, 835-848.
- Mori M, Staniunas RJ, Barnard GF, Jessup JM, Steele GD, Chen LB (1993): The significance of carbonic anhydrase expression in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 105, 820-826.
- Moriyasu M, Ito A, Omura T (1982): Purification and properties of arylsulfatase C from rat liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 92, 1189-1195.
- Munroe DG, Chang PL (1987): Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase. *Am. J. Hum. Genet.* 40, 102-114.
- Murakami H, Sly WS (1987): Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 262, 1382-1388.
- Nagao Y, Platero JS, Waheed A, Sly WS (1994): Mitochondrial carbonic anhydrase (isozyme V) in mouse and rat: cDNA cloning, expression, subcellular localization, processing, and tissue distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10330-10334.
- Nelson K, Keinanen BM, Daniel WL (1983): Murine arylsulfatase C: Evidence for two isozymes. *Experientia* 39, 740-742.
- Newman SP, Purohit A, Ghilchik MW, Potter BV, Reed MJ (2000): Regulation of steroid sulfatase expression and activity in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 259-264.
- Nguyen BL, Ferme I, Chetrite G, Pasqualini JR (1993): Action of danazol of the conversion of estrone sulfate to estradiol and on the sulfatase activity in the MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 human mammary cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 17-23.
- Nishimori I, Fujikawa-Adachi K, Onishi S, Hollingsworth MA (1999): Carbonic anhydrase in human pancreas: hypotheses for the pathophysiological roles of CA isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 880, 5-16.

Noé B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1997): Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10346-10350.

Nógrádi A (1998) : The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am. J. Pathol.* 153, 1-4.

Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, Kettmann R, Pastorek J (1996): Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 33, 480-487.

Osborne CK (1998): Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 339, 1609-1618.

Park I-H, Han B-K, Jo D-H (1997): Distribution and characterization of neurosteroid sulfatase form the bovine brain. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 62, 315-320.

Parkkila A-K, Herva R, Parkkila S, Rajaniemi H (1995): Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isozyme II in brain tumours. *Histochem. J.* 27, 974-982.

Parkkila S: An overview of the distribution and function of carbonic anhydrase in mammals. In: Chegwiddden WR, Carter ND, Edwards YH (Ed.): *The Carbonic anhydrases: New Horizons*. Basel: Birkhäuser, 2000.

Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H, Shah GN, Grubb JH, Waheed A, Sly WS (2001): Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1918-1923.

Pasqualini JR, Maloche C, Maroni M, Chetrite G (1994): Effect of the progestagen promegestone (R-5020) on mRNA of the oestrone sulphatase in the MCF-7 human mammary cancer cells. *Cancer Res.* 14, 1589-1594.

Pasqualini JR, Chetrite G, Nguyen BL, Maloche C, Delalonde L, Talbi M, Feinstein MC, Blacker C, Botella J, Paris J (1995): Estrone sulfate-sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: a hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 407-412.

Pasqualini JR, Chetrite G, Le Nestour E (1996): Control and expression of oestrone sulphatase activities in human breast cancer. *J. Endocrinol.* 150, S99-105.

Pasqualini JR (1997): Role, control and expression of estrone sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities in human breast cancer. *Zentralbl. Gynakol.* 119, 48-53.

Pasqualini JR, Cortes-Prieto J, Chetrite G, Talab M, Ruiz A (1997): Concentrations of estrone, estradiol and their sulfates, and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. *Int. J. Cancer* 70, 639-643.

Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R, Zat'ovicova M, Liao S, Portetelle D, Stanbridge EJ, *et al.* (1994): Cloning and characterization of MN, a

human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 9, 2877-2888.

Pauwels EKJ, Ribeiro MJ, Stoot JHMB, McCready VR, Bourguignon M, Mazière B (1998): FDG accumulation and tumor biology. *Nucl. Med. Biol.* 25, 317-322.

Paxinos G, Watson C (Ed.): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1986.

Pepping J (2000): DHEA: dehydroepiandrosterone. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 57, 2048-2056.

Perumal AS, Robins E (1973): Regional and subcellular distribution of aryl- and steroid sulfatases in brain. *Brain Res.* 59, 349-358.

Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Weaver VM, Bissell MJ (1998): Differentiation and cancer in the mammary gland: shedding light on an old dichotomy. *Adv. Cancer Res.* 75, 135-161.

Pickkers P, Garcha RS, Schachter M, Smits P, Hughes AD (1999): Inhibition of carbonic anhydrase accounts for the direct vascular effects of hydrochlorothiazide. *Hypertension* 33, 1043-1048.

Purinton SC, Newman H, Castro MI, Wood CE (1999): Ontogeny of estrogen sulfatase activity in ovine fetal hypothalamus, hippocampus, and brain stem. *Am. J. Physiol.* 276, R1647-1652.

Purohit A, Dauvois S, Parker MG, Potter BVL, Williams GJ, Reed MJ (1994): The hydrolysis of oestrone sulphate and dehydroepiandrosterone sulphate by human steroid sulphatase expressed in transfected COS-1 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50, 101-104.

Purohit A, Wang DY, Ghilchik MW, Reed MJ (1996): Regulation of aromatase and sulphatase in breast tumour cells. *J. Endocrinol.* 150, S65-71.

Purohit A, Woo LW, Potter BV, Reed MJ (2000): *In vivo* inhibition of estrone sulfatase activity and growth of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by 667 COUMATE. *Cancer Res.* 60, 3394-3396.

Purohit A, Woo LW, Barrow D, Hejaz HA, Nicholson RI, Potter BV, Reed MJ (2001): Non-steroidal and steroidal sulfamates: new drugs for cancer therapy. *Mol. Cell Endocrinol.* 171, 129-135.

Quigley ME, Martin PL, Burnier AM, Brooks P (1987): Estrogen therapy arrests bone loss in elderly women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 1516-1523.

Reed KC, Ohno S (1976): Kinetic properties of human placental aromatase. Application of an assay measuring  $^3\text{H}_2\text{O}$  release from  $1\beta,2\beta\text{-}^3\text{H}$ -androgens. *J. Biol. Chem.* 251, 1625-1631.

Reed MJ, Lai LC, Owen AM, Singh A, Coldham NG, Purohit A, Ghilchik MW, Shaikh NA, James VH (1990): Effect of treatment with 4-hydroxyandrostenedione on the peripheral conversion of androstenedione to estrone and *in vitro* tumor aromatase activity in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer Res.* 50, 193-196.

Reed MJ, Purohit A, Howarth NM, Potter BVL (1994): Steroid sulphatase inhibitors: a new endocrine therapy. *Drugs of the Future* 19, 637-680.

Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Potter BVL (1996): The development of steroid sulphatase inhibitors. *Endocr. Rel. Cancer* 3, 9-23.

Renzi G, Scozzafava A, Supuran CT (2000): Carbonic anhydrase inhibitors: topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 673-676.

Reske SN, Bares R, Bull U, Guhlmann A, Moser E, Wannemacher MF (1996): Clinical value of positron emission tomography (PET) in oncologic questions: results of an interdisciplinary consensus conference. *Schirmherrschaft der Deutschen Gesellschaft for Nuklearmedizin. Nuklearmedizin* 35, 42-52.

Rhodes ME, Li PK, Flood JF, Johnson DA (1996): Enhancement of hippocampal acetylcholine release by the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate: an *in vivo* microdialysis study. *Brain Res.* 733, 284-286.

Riede U-N, Sterry W: Hautorgan. In: Riede U-N, Schaefer H-E (Ed.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme, 1995.

Riley DA, Ellis S, Bain J (1982): Carbonic anhydrase activity in skeletal muscle fibre types, axons, spindles, and capillaries of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 1275-1288.

Rivett AJ, Francis A, Roth JA (1983): Localization of membrane-bound catechol-O-methyltransferase. *J. Neurochem.* 40, 1494-1496.

Roodi N, Bailey L, Kao W, Verrier C, Yee C, Dupont W, Parl F (1995): Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 87, 446-451.

Römer J, Füchtner F, Steinbach J, Johannsen B (1999): Automated production of  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ Fluoroestradiol for breast cancer imaging. *Nucl. Med. Biol.* 26, 473-479.

Römer J, Füchtner F, Steinbach J (2000): Synthesis of  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ Fluoroestradiol-3,17 $\beta$ -disulphamate. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 43, 425-436.

Römer J, Füchtner F, Steinbach J, Kasch H (2001): Automated synthesis of  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ Fluoroestradiol-3,17 $\beta$ -disulphamat. *Appl. Rad. Isot.* 55, 631-639.

Roy AB, Curtis CG, Powell GM (1987): The metabolism of oestrone and some other steroids in isolated perfused rat and guinea pig livers. *Xenobiotica* 17, 1299-1313.

Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB (1972) : Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J. Clin. Invest.* 51, 1020-1033.

Ruokonen A, Oikarinen A, Vihko R (1986): Regulation of serum testosterone in men with steroid sulfatase deficiency: response to human chorionic gonadotropin. *J. Steroid Biochem.* 25, 113-119.

Sakamoto G, Sugano H (1991): Pathology of breast cancer: present and prospect in Japan. *Breast Cancer Res. Treat.* 18, S81-S83.

Santen RJ (1986): Determinants of tissue oestradiol levels in human breast cancer. *Cancer Surv.* 5, 597-616.

Santner SJ, Feil PD, Santen RJ (1984): In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance vs. the aromatase pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 29-33.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Ed.): *Molecular Cloning. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sawin T, Bathe-Smith EC (1962). *Comp. Biochem.* 3, 755.

Scheuermann BW, Kowalchuk JM, Paterson DH, Cunningham DA (2000): Carbonic anhydrase inhibition delays plasma lactate appearance with no effect on ventilatory threshold. *J. Appl. Physiol.* 88, 713-721.

Schirrmeister H, Kuhn T, Guhlmann A, Santjohanser C, Horster T, Nussle K, Koretz K, Glatting G, Rieber A, Kreienberg R, Buck AC, Reske SN (2001): Fluorine-18 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose PET in the preoperative staging of breast cancer: comparison with the standard staging procedures. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 351-358.

Schneider PG, Jackisch C, Brandt B (1994): Endocrine management of breast cancer. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.* 39, 115-127.

Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B (1998): Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am. J. Physiol.* 274, G370-G375.

Shapiro LJ, Weiss R, Webster D, France JT (1978a): X-linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency. *Lancet* 1, 70-72.

Shapiro LJ, Weiss R, Buxman MM, Vidgoff J, Dimond RL, Roller JA, Wells RS (1978b): Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. *Lancet* 7, 756-757.

Shinnar S, Berg AT (1999): Does antiepileptic drug therapy prevent the development of "chronic" epilepsy? *Epilepsia* 37, 701-8.

Sim SM, Huijghebaert S, Back DJ, Eyssen HJ (1983): Gastrointestinal absorption of estrone sulfate in germfree and conventional rats. *J. Steroid Biochem.* 18, 499-503.

Sly WS, Hu PY (1995): Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 375-401.

Smith LL, Brown K, Carthew P, Lim CK, Martin EA, Styles J, White IN (2000): Chemoprevention of breast cancer by tamoxifen: risks and opportunities. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 571-94.

Spicer SS, Ge ZH, Tashian RE, Hazen-Martin DJ, Schulte BA (1990): Comparative distribution of carbonic anhydrase III and II in rodent tissues. *Am. J. Anat.* 187, 55-64.  
Statistisches Bundesamt, Pressestelle, Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden.

Sugrue MF, Gautheron P, Mallorga P, Nolan TE, Graham SL, Schwam H, Shepard KL, Smith RL (1990) : L-662,583 is a topically effective ocular hypotensive carbonic anhydrase inhibitor in experimental animals. *Br. J. Pharmacol.* 99, 59-64.

Supuran CT, Scozzafava A (2000): Carbonic anhydrase inhibitors: aromatic sulfonamides and disulfonamides act as efficient tumor growth inhibitors. *J. Enzyme Inhib.* 15, 597-610.

Supuran CT, Briganti F, Tilli S, Chegwiddden WR, Scozzafava A (2001): Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg. Med. Chem.* 9, 703-714.

Tashian RE, Venta PJ, Nicewander PH, Hewett-Emmett D: Evolution, structure, and expression of the carbonic anhydrase multigene family. In: *Isozymes: structure, function, and use in Biology and Medicine.* Wiley-Liss, 1990.

Tashian RE (1992): Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. *Adv. Genet.* 30, 321-56.

Teuscher E, Lindequist U (Ed.): *Biogene Gifte.* Stuttgart: Fischer, 1994.

Türeci O, Sahin U, Vollmar E, Siemer S, Gottert E, Seitz G, Parkkila AK, Shah GN, Grubb JH, Pfreundschuh M, Sly WS (1998): Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7608-7613.

Urabe M, Yamamoto T, Kitawaki J, Honjo H, Okada H (1989): Estrogen biosynthesis in human uterine adenomyosis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 121, 259-264.

Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Maruta M, Maeda K, Harada N (2000): Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 73, 141-145.

Vaccaro AM, Salvioli R, Muscillo M, Renola L (1987): Purification and properties of aryl-sulfatase C from human placenta. *Enzyme* 37, 115-126.

Valverius EM, Ciardiello F, Heldin NE, Blondel B, Merlo G, Smith G, Stampfer MR, Lippman ME, Dickson RB, Salomon DS (1990): Stromal influences on transformation of human mammary epithelial cells overexpressing c-myc and SV40T. *J. Cell Physiol.* 145, 207-16.

Van Eldere J, Robben J, De Pauw G, Merckx R, Eyssen H (1988): Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2112-2117.

Varagnolo L, Stokkel MP, Mazzi U, Pauwels EK (2000): <sup>18</sup>F-labeled radiopharmaceuticals for PET in oncology, excluding FDG. *Nucl. Med. Biol.* 27, 103-112.

Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA (1988): Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and N-nitrosomethyl urea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48, 5754-5758.

- Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT (1967): Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *J. Biol. Chem.* 242, 4221-4229.
- Vidgren J, Svensson A, Liljas A (1993): Refined structure of the aminobenzamide complex of human carbonic anhydrase II at 1.9 Å and sulphonamide modelling of bovine carbonic anhydrase III. *Int. J. Biol. Macromol.* 15, 97-100.
- Vieira-Coelho MA, Soares-da-Silva P (1996): Ontogenic aspects of liver and kidney catechol-O-methyltransferase sensitivity to tolcapone. *Br. J. Pharmacol.* 117, 516-520.
- Vollmer G, Ellerbrake N, Hopert A-C, Knauthe R, Wünsche W, Knuppen R (1995): Extracellular matrix induces hormone responsiveness and differentiation in RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Bio.* 52, 259-269.
- Wang C, Makela T, Hase T, Adlercreutz H, Lurzer MS (1994): Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50, 205-212.
- Warburg O (1925): Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin. Wochenschrift* 12, 534-536.
- Weidner N (1998): Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J. Pathol.* 184, 119-122.
- Williams ML, Elias PM (1981): Stratum corneum lipids in disorders of cornification: increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive x-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* 68, 1404-1410.
- Wistrand PJ, Lindquist A (1991): Design of carbonic anhydrase inhibitors and the relationship between the pharmacodynamics and pharmacokinetics of acetazolamide. In: Botrè F, Gros G, Storey BT (Ed.): *Carbonic Anhydrase*. Weinheim: VCH, 1991.
- Woo LW, Lightowler M, Purohit A, Reed MJ, Potter BVL (1996): Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates. *J. Med. Chem.* 39, 1349-1351.
- Woo LWL, Howarth NM, Purohit A, Hejaz HAM, Reed MJ, Potter BVL (1998): Steroidal and nonsteroidal sulfamates as potent inhibitors of steroid sulfatase. *J. Med. Chem.* 41, 1068-1083.
- Woo LL, Purohit A, Malini B, Reed MJ, Potter BV (2000): Potent active site-directed inhibition of steroid sulphatase by tricyclic coumarin-based sulphamates. *Chem. Biol.* 7, 773-791.
- Yamamoto T, Noguchi T, Tamura T, Kitawaki J, Okada H (1993): Evidence for estrogen synthesis in adenomyotic tissues. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 734-738.
- Zhu BT, Ezell EL, Liehr JG (1994): Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J. Biol. Chem.* 269, 292-299.
- Zuckerman NG, Hagerman DD (1969): The hydrolysis of estrone sulfate by rat kidney microsomal sulfatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 135, 410-415.

**II. Abkürzungsverzeichnis**

3V	3. Ventrikel
4V	4. Ventrikel
Ampli Taq	DNA-Polymerase von <i>Thermophilus aquaticus</i>
Aon	Anterior olfactory Nucleus
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
B <sub>max</sub>	Zahl der maximalen Bindungsstellen
CA	Carboanhydrase
Cer	Cerebellum
Cinf	Colliculus inferior
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
cpm	counts per minute
Csup	Colliculus superior
CTP	Cytosintriphosphat
d	desoxy
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpm	desintegrations per minute
dsRNA-DNA	Doppelstrang aus RNA und DNA
dT	desoxy-Thymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>1</sub> S	Estronsulfat
E <sub>2</sub>	Estradiol

---

ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykolbis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
ES	Estronsulfatase
FBS	Fetales Bovines Serum
FDG	2-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-desoxy-D-Glucose
FES	16 $\alpha$ -[ <sup>18</sup> F]Fluor-17 $\beta$ -estradiol (FES)
FESDS	16 $\alpha$ - Fluorestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamat
FESMS	16 $\alpha$ - Fluorestradiol-3-monosulfamat
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCA I, II	Humane Carboanhydrase I, II
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hippo	Hippocampus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HWZ	Halbwertszeit
IC <sub>50</sub>	Inhibitor-Konzentration, bei der 50 % der spezifischen Bindung des Liganden gehemmt ist
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaar
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl (turnover number)
K <sub>d</sub>	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	Inhibitor-Dissoziationskonstante
Lfp	longitudinaler fasciculärer Pons
Mb	Mammilarkörper
MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
Mes	Mesencephalon
Mrf	dorsales medulläres Reticularfeld
mRNA	Messenger-RNA
n.d.	not determined
oatp	Organischer Anionentransporter
OD	optische Dichte

---

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p.i.	post injectionem
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS <sup>-</sup>	PBS ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PBS <sup>+</sup>	PBS mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pn	Pons-Nucleus
Prn	Pons-Reticularnucleus
PSL	Photostimulierte Lumineszenz
RCA II	Rinder-Carboanhydrase II
RNA	Ribonucleinsäure
ROI	Region of Interest
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium, das von Moore <i>et al.</i> am <b>Rosewell Park Memorial Institute</b> entwickelt wurde
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit Reverser Transkription
Scn	suprachiasmatischer Nucleus
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
ssDNA	einsträngige DNA
Str	Striatum
TAE	TRIS-Azetat
Thal	Thalamus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit
VT	Volumenteil
W-A U	Wilbur-Anderson Unit (eine W-A Unit reduziert den pH-Wert eines 0,02 M TRIZMA-Puffers von 8,3 auf 6,3 pro min bei 0°C)

## PUBLIKATIONEN

**Rodig H**, Brust P, Römer J, Kasch H, Bergmann R, Füchtner F, Steinbach J, Johannsen B (2001): Mapping of Carbonic Anhydrase and Estrone Sulfatase in Rat Brain using  $16\alpha$ - $[^{18}\text{F}]$ Fluoroestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamate ( $[^{18}\text{F}]$ FESDS). J. Cereb. Blood Flow Metab. 21, S552.

**Rodig H**, Brust P, Römer J, Kasch H, Bergmann R, Füchtner F, Steinbach J, Johannsen B: Distribution of Estrone Sulfatase in Rat Brain determined by *in vitro* Autoradiography with  $16\alpha$ - $[^{18}\text{F}]$ Fluoroestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamate. Appl. Rad. Isot. (angenommen).

Bergmann R, Scheunemann M, Heichert C, Mäding P, Wittrisch H, Kretzschmar M, **Rodig H**, Tourwé D, Itebeke K, Chavatte K, Zips D, Reubi JC, Johannsen B: Biodistribution and catabolism of  $^{18}\text{F}$ -labeled neurotensin(8-13) analogs. Nucl. Med. Biol. (eingereicht).

Bergmann R, Scheunemann M, Mäding P, **Rodig H**, Kretzschmar M, Chavatte K, Tourwé D, Zips D, Brust P, Johannsen B (2000): New  $^{18}\text{F}$ -labelled neurotensin(8-13) analogs for positron emission tomography (PET): Pharmacological and biochemical characterization. Nucl. Med. Comm. 21, 565-566.

Bergmann R, Wittrisch H, Heichert C, Kretzschmar M, **Rodig H**, Mäding P, Steinbach J, Reubi J-C, Johannsen B (2001):  $^{18}\text{F}$ -markierte Neurotensinderivate zur Tumordarstellung: Bioverteilung, -kinetik und Katabolismus. Nukl.med. 40, A22.

Brust P, **Rodig H**, Römer J, Kasch H, Bergmann R, Füchtner F, Zips D, Baumann M, Steinbach J, Johannsen B: Distribution of  $16\alpha$ - $[^{18}\text{F}]$ Fluoroestradiol-3,17 $\beta$ -disulfamate in Rats, tumour-bearing Mice and Piglets. Appl. Rad. Isot. (angenommen).

Richter T, Steiner G, Abu-Id MH, Salzer R, Bergmann R, **Rodig H**, Johannsen B. Identification of tumor tissue by FTIR spectroscopy in combination with Positron Emission Tomography. Vib. Spec. (angenommen).

Steiner G, Richter T, Salzer R, Bergmann R, **Rodig H**, Johannsen B (2000): Identification of cancer cells by a combination of FTIR spectroscopy and PET. Proc. SPIE 3920, 93-98.

Steiner G, Kano A, Richter T, Bergmann R, **Rodig H**, Kobelke J, Johannsen B, Salzer R (2002): Probing brain cancer by fiber optic FTIR Spectroscopy. Proc. SPIE (angenommen)

## DANKSAGUNG

Ich danke allen, die an der Erstellung meiner Promotion mitgewirkt haben, insbesondere:

Prof. Bernd Johannsen	Vergabe des Themas, fachliche Betreuung
Dr. Peter Brust	fachliche Betreuung, PET-Untersuchung am Ferkel
Dr. Ralf Bergmann	praktische Anleitung, PET-Untersuchung an Ratten
Prof. Jörg Steinbach	Ermöglichung der vielen Synthesen von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS
Dr. Johannes Römer	Synthese von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS
Dr. Frank Füchtner	Synthese von [ $^{18}\text{F}$ ]FESDS, Metabolitenanalytik
Dr. Helmut Kasch	Synthese des FESDS
Dr. Rosemarie Syhre	Ermöglichung der Tierversuche
Regina Herrlich	Durchführung der Tierversuche
Klinik für Strahlentherapie	Bereitstellung der Tumormäuse
Prof. Günther Vollmer	Übernahme des Gutachtens
Dr. Holm Wittrisch	Metabolitenanalytik
Marion Kretschmar	Anleitung in der Autoradiographie
Anne Friedrich	Anleitung in der PCR
Juliane Groß, Anita Müller	Durchführung des CA-Assays

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Bioanorganische und Radiopharmazeutische Chemie, insbesondere der Abteilung Radiopharmakologie, für die gute Zusammenarbeit. Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund für ihre Unterstützung.

## **Erklärung**

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde im Zeitraum von Januar 1999 bis Dezember 2001 am Institut für Bioanorganische und Radiopharmazeutische Chemie im Forschungszentrum Rossendorf e.V. unter Betreuung von Prof. Dr. Bernd Johannsen und Dr. Peter Brust angefertigt.

Dresden, 24. Januar 2002

## **Versicherung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, 24. Januar 2002

HSSS AdminTools (c) 2001, last visited: Mon Jun 24 14:35:45 GMT+02:00 2002