

**Untersuchungen zur Optimierung der biologischen Aktivität  
von antitumoralen Platin(II)-Wirkstoffen mittels Einbindung  
in polynukleare Komplexe sowie in makromolekulare Träger**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Timo Kapp  
aus Flensburg**

**November 2005**



1. Gutachter: Prof. Dr. R. Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Schönenberger

Disputation am 25.01.2006



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom August 2001 bis Oktober 2005 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Gust.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Überlassung und die Freiheit bei der Bearbeitung des interessanten, vielfältigen Themas, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die zahlreichen Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen zu präsentieren,

Dr. S. Fuchs für die großzügige Überlassung diverser Dendrimere, die vielen fruchtbaren Diskussionen und Anregungen,

Dr. S. Müller für die Bereitstellung der PEGilierten Dendrimere,

Frau A. Dullin für die Bereitstellung diverser Platinwirkstoffe und die Bereitschaft, sich auf neue Projekte einzulassen,

Herrn Prof. Dr. M. Schäfer (Institut für Pharmakologie, CBF, Charité-Universitätsmedizin Berlin) für die intensive Betreuung am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop,

Herrn Dr. H. Otto (Institut für Chemie/Biochemie der Freien Universität Berlin) für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und die Aufnahme erster Bilder,

Herrn Dr. P. Francke (Institut für Chemie/Biochemie der Freien Universität Berlin) für die Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren,

Frau Univ. Doz. Dr. B. Kircher (Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Innsbruck) für die Messung der Zytotoxizität der Dendrimere an Leukämiezellen und die Untersuchungen zur Induktion der Apoptose,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre, insbesondere Herrn Dr. I. Ott für die reibungslose Zusammenarbeit auf engstem Raum, Frau M. Baacke für diverse Synthesen und Zelltests, Frau M. Käfert und Herrn S. Reuß für die Mitarbeit während ihrer Ausbildungszeit und Frau S. Müller für Durchführung diverser Untersuchungen im Rahmen ihres Praktischen Jahres,

meinen Eltern und Schwiegereltern für die Unterstützung während Studium und Promotion, insbesondere für die Übernahme der Betreuung meines Sohnes während diverser Praktika und Tagungsreisen,

meiner Frau für die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Zeit, das geduldige Korrekturlesen und die ungeheure Toleranz gegenüber meinen Arbeitszeiten,

und bei meinem Sohn und meiner Tochter für die Zerstreuung und die Bereitschaft, mich hin und wieder in den Dienst ziehen zu lassen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Herausforderung Krebs.....	1
1.2 Platinverbindungen als Zytostatika.....	2
1.2.1 Substitutionsreaktionen und Reaktionskinetik von Cisplatin.....	2
1.2.2 Einsatz von Cisplatin.....	4
1.2.3 Wirkmechanismus und Pharmakodynamik von Cisplatin.....	5
1.2.4 Strukturelle Weiterentwicklungen an Neutralliganden und Abgangsgruppen.....	7
1.2.5 Entwicklung polynuklearer Platin-Alkylamin-Komplexe zur Änderung der Pharmakologie.....	9
1.2.6 Entwicklung von estrogenen Platinkomplexen .....	13
1.2.7 Weiterentwicklungen von Platinkomplexen mit Ethylendiamin-Neutralliganden...	14
1.3 Makromolekulare Therapie.....	15
1.3.1 Grundlagen.....	15
1.3.2 Dendrimere als makromolekulare Träger.....	18
1.4. Anwendung der Kapillarelektrophorese in der Analytik von Dendrimeren und Platinverbindungen.....	21
<b>2 Problemstellung.....</b>	<b>25</b>
<b>3 Methodenoptimierung für die biologische Testung von Platinverbindungen .....</b>	<b>27</b>
3.1 Erstellung einer AAS-Methode zur Bestimmung von Platin aus biologischen Matrices.....	27
3.1.1 Erstellung des Temperaturprogrammes.....	28
3.1.2 Einfluss der eingesetzten Mineralsäure auf die Signalintensität.....	30
3.1.3 Einfluss von oberflächenaktiven Substanzen.....	32

3.1.4 Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	33
3.2 Proteinbindung an das humane Serumalbumin (HSA).....	34
3.2.1 Angewandte Methoden.....	34
3.2.1.1 Ultrafiltration zur Abtrennung des Proteins.....	35
3.2.1.2 Präzipitation des Proteins mit Trichloressigsäure (TCA).....	35
3.2.1.3 Präzipitation des Proteins mit Ethanol.....	35
3.2.1.4 Trennung von gebundener und ungebundener Platinspezies mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC).....	36
3.2.2 Vergleich der erhaltenen Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Proteinbindung.....	37
3.2.2.1 Bestimmung der Wiederfindung der Platinverbindungen aus der HSA-Lösung...37	
3.2.2.2 Restproteingehalte in den Messlösungen.....	38
3.2.2.3 Kinetik der Abnahme der ungebundenen Platinkomplexe.....	39
3.2.3 Zusammenfassung des Methodenvergleichs zur Bestimmung der Proteinbindung.	42
3.3 Optimierung der Zellaufnahmebestimmung.....	43
3.3.1 Wahl des Mediums zur Zellaufnahme.....	44
3.3.2 Optimierung der Zellernte nach der Inkubation.....	45
3.3.3 Standardisierung der Zellaufnahme.....	48
3.4 Bestimmung des Platingehalts in den Kernen.....	49
3.5 Bestimmung des Bindungsvermögen von Platinverbindungen an DNA.....	51
3.5.1 Quantitative Bindung von Platinverbindungen an isolierter DNA.....	51
3.5.2 Schmelzpunktänderung der DNA durch Substanzeinwirkung.....	53
3.5.3 Bindung von Platinverbindungen an die zelluläre DNA von MCF-7-Zellen.....	56
3.5.3.1 Optimierung der Verdauungsbedingungen zur Entfernung von RNA und Proteinen.....	56

3.5.3.2 Quantifizierung der extrahierten DNA.....	58
3.5.3.3 Reinheitsprüfung der extrahierten DNA.....	59
<b>4 Untersuchungen an mononuklearen Platinverbindungen.....</b>	<b>61</b>
4.1 Untersuchte [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexe.....	61
4.1.1 Proteinbindung von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen.....	62
4.1.2 Untersuchungen zur Umsetzung von Aquasulfatokomplexen mit Chlorid und DMF.....	64
4.1.3 Zytotoxizität und Zellaufnahme von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen.....	67
4.2 Untersuchungen zu [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen.....	70
4.2.1 Zytotoxizität und Zellaufnahme von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen.....	72
4.2.2 Proteinbindung von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen.....	76
4.2.3 Gehalte in den Zellkernen und DNA-Bindung von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen.....	78
<b>5 Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Platin-Alkylamin-Komplexen....</b>	<b>81</b>
5.1 Strukturen.....	81
5.2 Stabilität von Alkylamin-Platin-Komplexen in physiologischem Puffern.....	83
5.3 Bindungsverhalten an humanem Serumalbumin (HSA).....	88
5.4 Zytotoxizität an der MCF-7-Zelllinie.....	92
5.5 Untersuchungen zur Zellaufnahme von polynuklearen Platinverbindungen.....	94
5.5.1. Untersuchungen zum Mechanismus der Zellaufnahme.....	95
5.5.1.1 Abhängigkeit der intrazellulären Platinkonzentration von der Substanzkonzentration im Medium.....	95
5.5.1.2 Abhängigkeit der Zellaufnahme vom Kupferionenstoffwechsel.....	97

5.5.1.3 Abhängigkeit der Zellaufnahme von dem Transportsystem für organische Kationen.....	98
5.5.1.4 Versuche zur Inhibition der endozytosevermittelten Zellaufnahme.....	100
5.5.2 Kinetiken für die Akkumulation der Alkylamin-Platin-Verbindungen in MCF-7-Zellen.....	104
5.5.2.1 Mononukleare Verbindungen.....	104
5.5.2.2 Polynukleare Verbindungen.....	105
5.6 Platingehalte in den Zellkernen von MCF-7 Zellen.....	107
5.7 Bindung an die zelluläre DNA.....	109
<b>6 Untersuchungen zu pharmakologischen Eigenschaften von Dendrimeren.....</b>	<b>115</b>
6.1 Stabilität von Dendrimeren gegenüber enzymatischer und nicht enzymatischer Hydrolyse.....	116
6.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Dendrimeren in Zellkultur.....	125
6.2.1 Zytotoxizität von Dendrimeren an adhärenen Zelllinien.....	125
6.2.1.1 Zytotoxizität an MCF-7-Zellen.....	126
6.2.1.1.1 Zytotoxizität der Dendrimere des Basissatzes.....	126
6.2.1.1.1.1 Zytotoxizität der Basisdendrimere des „Fuchs Typs“.....	126
6.2.1.1.1.2 Zytotoxizität der Polypropylenimin-Dendrimere.....	127
6.2.1.1.2 Zytotoxizität der oberflächenfunktionalisierten Dendrimere.....	128
6.2.1.1.2.1 Oberflächenmodifikation mit Aminosäuren.....	128
6.2.1.1.2.2 Oberflächenmodifikation mit dem Dansylmarker.....	132
6.2.1.1.3 Zytotoxizität von PEGilierten Dendrimeren.....	134
6.2.1.2 Zytotoxizität an MDA-MB-231-Zellen.....	136
6.2.2 Untersuchungen an humanen Leukämiezelllinien.....	137
6.2.3 Untersuchungen zum Toxizitätsmechanismus.....	139

6.2.3.1 Veränderung der Zellmorphologie unter Dendrimereinwirkung.....	139
6.2.3.2 Untersuchung auf Apoptose.....	141
6.2.4 Vergleich mit Literaturwerten.....	146
6.3 Fluoreszenzcharakterisierung und Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Dendrimeren.....	147
6.3.1 Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften dansylierter Dendrimere in biologischen Medien.....	149
6.3.2 Bestimmung der Löslichkeit der dansylierten Dendrimere.....	155
6.3.3 Qualitative Bestimmung der Zellaufnahme über die Fluoreszenzmikroskopie.....	157
6.3.4 Quantitative Bestimmung der Zellaufnahme über die Fluorimetrie.....	161
6.3.4.1 Methodenoptimierung zur Bestimmung der Zellaufnahme dansylmarkierter Dendrimere.....	161
6.3.4.2 Zellaufnahmekinetiken der dansylmarkierten Verbindungen.....	162
6.4 Zellaufnahme von nicht markierten Dendrimeren.....	166
6.4.1 Direkte Bestimmung nach Festphasenextraktion.....	166
6.4.2 Bestimmung der Zellaufnahme nach Derivatisierung mit Fluorescamin.....	171
6.4.3 Nachweis von Dendrimeren im Zelllysate über MALDI-TOF.....	174
<b>7 Untersuchungen zu Platin-Dendrimer-Konjugaten.....</b>	<b>179</b>
7.1 Zytotoxizität der Platin-Dendrimer-Konjugate an MCF-7-Zellen.....	180
7.2 Zellaufnahme in MCF-7-Zellen.....	182
7.3 Platingehalt in den Zellkernen und in der zellulären DNA.....	185
7.4 Proteinbindung.....	188
7.5 Einfluss der Platinierung der Dendrimere auf die Fluoreszenz der Dansylgruppe....	191
7.6 Vergleich der Zellaufnahme (fluorimetrisch bzw. mittels AAS bestimmt) von dansylmarkierten Platin-Dendrimer-Konjugaten.....	193

<b>8 Materialien und Methoden.....</b>	<b>197</b>
8.1 Geräte.....	197
8.2 Lösungen und Reagenzien.....	197
8.3 Methoden.....	199
8.3.1 Atomabsorptionsspektroskopische Untersuchungen.....	199
8.3.1.1 Platinbestimmung.....	199
8.3.1.2 Kupferbestimmung.....	199
8.3.2 Kapillarelektrophoretische Systeme.....	200
8.3.3 Zellproteinbestimmung nach Bradford.....	201
8.3.4 Proteinbindung.....	201
8.3.4.1 Ultrafiltration.....	202
8.3.4.2 Ethanolische Präzipitation.....	202
8.3.4.3 Trichloressigsäure Fällung.....	203
8.3.4.4 Größenausschlusschromatographie.....	203
8.3.5 Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	203
8.3.5.1 MCF-7-Zellen.....	203
8.3.5.2 MDA-MB-231-Zellen.....	204
8.3.5.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	204
8.3.6 Chemosensitivitätstest.....	204
8.3.7 Zellaufnahmebestimmung.....	206
8.3.7.1 Zellaufnahme von Platinverbindungen.....	206
8.3.7.2 Untersuchungen zur Hemmbarkeit der Zellaufnahme von Platinverbindungen.....	208
8.3.7.2.1 Zusammenhang mit der Kupferhomöostase.....	208

8.3.7.2.2 Hemmung der organischen Kationentransporter.....	208
8.3.7.2.3 Hemmung der Endozytose.....	208
8.3.7.3 Zellaufnahme von dansylmarkierten Verbindungen.....	209
8.3.7.4 Zellaufnahme von nicht markierten Dendrimeren.....	210
8.3.7.5 Derivatisierung mit Fluorescamin.....	211
8.3.8 Bestimmung der Kernaufnahme.....	212
8.3.9 Bestimmung der DNA-Bindung.....	213
8.3.9.1 Bestimmung der Bindung an Lachsspermien-DNA.....	213
8.3.9.2 Schmelzpunktbestimmung von der DNA nach Substanzeinwirkung.....	214
8.3.9.3 Quantitative Bestimmung des an zelluläre DNA gebundenen Platins.....	215
8.3.10 Mikroskopische Untersuchungen.....	217
8.3.10.1 Untersuchungen zur Zellmorphologie.....	217
8.3.10.2 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation.....	217
8.3.11 Untersuchungen zur hydrolytischen Stabilität von Dendrimeren.....	219
8.3.11.1 pH-Wert-Stabilität.....	219
8.3.11.2 Stabilität gegenüber Proteasen.....	219
8.3.11.3 Inkubation mit Zytosol von MCF-7-Zellen.....	220
8.3.11.4 Aktivitätskontrolle der Enzyme.....	220
8.3.12 Fluoreszenzcharakterisierung.....	221
8.3.12 Kapillarelektrophoretische Reaktivitätsuntersuchungen zu Platinverbindungen .....	221
8.3.12.1 Umsetzung der DMSO-Komplexe zu den Chlorokomplexen.....	221
8.3.12.2 Untersuchungen zur Umsetzung von Diaquakomplexen.....	222
<b>9 Zusammenfassung.....</b>	<b>223</b>

**10 Abstract.....227**

**11 Literatur.....231**

## Häufig verwendete Abkürzungen

- AAS: Atomabsorptionsspektroskopie
- AG: Anreicherungsgrad
- BSA: bovines Serumalbumin
- DAD: Dioden-Array-Detektor
- DMF: Dimethylformamid
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- DNA: Desoxyribonukleinsäure
- EIPA: N-Ethyl-isopropyl-amilorid
- EMEM: Nährmedium zur Kultur der MCF-7-Zellen (engl. Eagle's minimum essential medium)
- EOF: elektroosmotischer Fluss
- EPR-Effekt: erhöhter Penetrations- und Rückhalte-Effekt
- FCS: fetales Kälberserum
- HPMA: N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide
- HPLC: Hochdruckflüssigkeitschromatographie
- HSA: humanes Serumalbumin
- IC<sub>50</sub>: halbmaximale Wirkkonzentration
- kD: kiloDalton
- m-β-CD: Methyl-β-Cyclodextrin
- MEKC: mizellare elektrokinetische Chromatographie
- NMR: Kernresonanzspektroskopie
- PAMAM: Polyamidoamin
- PEI: Polyethylenimin
- PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung
- PEG: Polyethylenglykol
- PNS: postnukleärer Überstand
- PPI: Polypropylenimin
- OATP: organisches Anionentransportpolypeptid
- OCT: organischer Kationentransporter

- SEC: Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography)
- SPE: Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction)
- ssDNA: Einzelstrang DNA (engl. single strand DNA)
- TCA: Trichloressigsäure
- TEA: Tetraethylammoniumchlorid
- vs.: “versus” (im Gegensatz zu)