

Biochemische Untersuchungen zum
Wirkungsmechanismus antitumoraktiver
Cobalt-Alkin-Komplexe

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

Ingo Ott
aus Salzburg

September, 2004

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
- Disputation am 22.09.2004

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Oktober 2000 bis Juni 2004 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Überlassung des interessanten, vielfältigen Themas, die große Freiheit bei der Bearbeitung, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und das ausgezeichnete Arbeitsklima,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, die mir durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft eine wertvolle Unterstützung waren,

meiner Cousine Univ. Doz. Dr. B. Kircher von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Innsbruck für die Unterstützung bei den Experimenten an Lymphom- und Leukämie-Zellen und für die Messung der Apoptose,

Dr. M. Fürst und Prof. Dr. K. Rück-Braun vom Institut für Chemie Fachgruppe Organische Chemie der Technischen Universität Berlin für die Bereitstellung der Indolderivate,

Prof. Dr. R. Dembinski vom 'Department of Chemistry' der Oakland Universität in Rochester (Michigan, USA) für die Bereitstellung der Nucleosid-derivate,

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Spektren sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	9
1	Metallkomplexe in der Medizin	11
1.1	Metallkomplexe als Cytostatika	12
1.2	Metallkomplexe als Diagnostika	16
1.3	Metallkomplexe als antiparasitäre, antivirale und antibakterielle Wirkstoffe	17
2	Cobalt-Alkin-Komplexe	19
2.1	Nicholas-Reaktion	19
2.2	Pauson-Khand-Reaktion	20
2.3	Elektrochemie der Cobalt-Alkin-Komplexe	21
2.4	Cytotoxizität der Cobalt-Alkin-Komplexe	21
2.5	Cobalt-Alkin-Komplexe als Diagnostika	23
3	Cytostatika / Wirkungsmechanismen	25
3.1	Cytostatika	25
3.2	NSAR als neue Wirkstoffklasse in der Tumorthherapie	26
4	Problemstellung / Zielsetzung	29
II	Synthese / Analytik	31
5	Synthesen	33
5.1	Synthese der Alkinliganden	34
5.2	Synthese der Cobalt-Alkin-Komplexe	35
6	Analytik	37
6.1	Infrarotspektroskopie	37
6.2	Massenspektroskopie	38
6.3	NMR-Spektroskopie	38

6.4	Hochdruckflüssigchromatographie	40
6.5	Atomabsorptionsspektroskopie	40
III Physikochemische und biochemische Untersuchungen		47
7	Lipophilie ($\log k_w$-Wert)	49
7.1	Bestimmung des $\log k_w$ -Wertes	49
7.2	Ergebnisse	50
7.3	Zusammenfassung	52
8	Stabilitätsuntersuchungen	53
8.1	UV-Vis Voruntersuchungen	53
8.2	Ergebnisse	55
8.3	Zusammenfassung	57
9	Untersuchung der Proteinbindung	59
10	DNS-Bindung	63
10.1	Bestimmung der DNS-Bindung	64
10.2	Ergebnisse	65
10.3	Zusammenfassung	66
11	Hemmung von Cyclooxygenasen	67
11.1	Mechanismus der Enzymhemmung und Enzymkatalyse	69
11.2	Bestimmung der COX-Hemmung	71
11.3	Ergebnisse der COX-Inhibitortests	72
11.4	Zusammenfassung	74
12	Reaktion mit Thiolen	75
IV Untersuchungen an humanen Zelllinien		79
13	Brustkrebszellen	81
13.1	Cytotoxizität (IC_{50} -Wert)	81
13.1.1	Cytotoxizität von Co-ASS sowie etablierter Cytostatika	82
13.1.2	Cytotoxizität von Derivaten von Co-ASS	83
13.1.3	Cytotoxizität weiterer Cobalt-Alkin-Komplexe	85
13.1.4	Zusammenfassung	89

13.2	Zellaufnahmestudien	90
13.2.1	Wirkstofftransport durch Zellmembranen	90
13.2.2	Quantifizierung der Zellaufnahme	90
13.2.3	Konzentrationsabhängigkeit der Zellaufnahme	91
13.2.4	Zellaufnahme der Cobalt-Alkin-Komplexe	92
13.2.5	Korrelation der Zellaufnahme mit IC_{50} - und $\log k_w$ -Werten	94
13.2.6	Zusammenfassung	96
13.3	Aufnahme in die Zellkerne	97
13.3.1	Isolierung von Nuclei aus Tumorzellen	97
13.3.2	Ergebnisse	98
13.3.3	Zusammenfassung	98
13.4	Glutathionreduktaseaktivität	99
13.4.1	NADPH-Redoxsystem und Glutathionreduktase	99
13.4.2	Durchführung	100
13.4.3	Ergebnisse	101
13.5	Apoptose	103
13.5.1	Durchführung	103
13.5.2	Zusammenfassung	105
14	Lymphom- und Leukämiezellen	107
14.1	Cobalt-Alkin-Komplexe und Leukämie	107
14.2	Cytotoxizitätsuntersuchungen	108
14.3	Zellaufnahme bei Leukämien	109
14.4	Zusammenfassung	110
15	Kolonkarzinomzellen	111
15.1	Vorversuche	111
15.2	Ergebnisse	115
15.3	Zusammenfassung	117
V	Materialien / Methoden	119
16	Materialien	121
16.1	Geräte	121
16.2	Lösungen und Reagenzien	122

17 Methoden	123
17.1 Proteinbestimmung	123
17.2 Synthesen	125
17.2.1 Alkinliganden	125
17.2.2 Cobalt-Alkin-Komplexe	127
17.3 AAS-Methode	131
17.4 Lipophilie ($\log k_w$ -Wert)	132
17.5 Stabilitätsuntersuchungen	132
17.6 Untersuchung der Proteinbindung	134
17.6.1 Ethanolpräzipitation	134
17.6.2 Größenausschlußchromatographie	134
17.7 Untersuchung der DNS-Bindung	135
17.8 Hemmung von Cyclooxygenasen	137
17.9 Reaktion mit Thiolen	138
17.10 Cytotoxizität (IC_{50} -Wert)	139
17.11 Zellaufnahmebestimmung	142
17.12 Isolierung und Analytik von Nuclei	144
17.13 Glutathionreduktaseaktivität	146
17.14 Apoptoseuntersuchungen	148
17.15 Leukämie und Lymphomzellkulturen	149
VI Zusammenfassende Diskussion	151
VII Anhang	161
A Verschiedenes	163
A.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	163
A.2 Übersicht - Strukturen	166
A.3 Daten zu Abschnitt 7	167
A.4 Daten zu Abschnitt 13.4	168
A.5 Daten zu Abschnitt 14	169
A.6 häufig verwendete Abkürzungen	170
B Zusammenfassung	171
C English Abstract	173
D Lebenslauf / Publikationsliste	175