

## Teil IV

# Untersuchungen an humanen Zelllinien



# Kapitel 13

## Brustkrebszellen

Mit einer Häufigkeit von 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen ist das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Die Häufigkeit ist in den westlichen Industrieländern etwa 5 mal so hoch wie in Asien und Südamerika. Die Therapie erfolgt operativ, sowie durch Strahlen- und Chemotherapie. Die meist verwendeten Cytostatika sind das Alkylierungsmittel Cyclophosphamid, die Antimetabolite Methotrexat und 5-Fluorouracil (sogenanntes CMF-Behandlungsschema) sowie das Antiestrogen Tamoxifen. [119]

### 13.1 Cytotoxizität (IC<sub>50</sub>-Wert)

Zur Quantifizierung der Wirksamkeit der Substanzen wird der IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt. Der IC<sub>50</sub>-Wert (engl.: 'inhibitory concentration') entspricht derjenigen Wirkstoffkonzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50% hervorgerufen wird. Dazu werden die Zellen mit 0.1-50 μM Substanz enthaltenden Medium 72 (MDA-MB-231) bzw. 96 Stunden (MCF-7) im Brutschrank inkubiert. Bezüglich der Auswahl der jeweils geeigneten Inkubationsdauer wurde auf Daten aus der Literatur [42, 43] zurückgegriffen, bzw. für strukturell stark unterschiedliche Verbindungen exemplarisch bei verschiedenen Inkubationszeiten getestet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die Zellbiomasse durch Kristallviolett färbung bestimmt. Das prozentuelle Verhältnis zu einem Kontrollwert wird gegen den Logarithmus der Substanzkonzentration in einem Diagramm aufgetragen und eine sigmoide Kurve mit Hilfe der Boltzmann-Funktion (Software: Origin 7.0) ermittelt. Die Substanzkonzentration, die die Zellbiomasse auf 50% des Kontrollwertes herabsetzt, wird an dieser Kurve abgelesen. (siehe Abbildung 13.1) Bezüglich einer detaillierten Versuchsdurchführung sei auf das Versuchsprotokoll im Abschnitt 17.10 verwiesen.

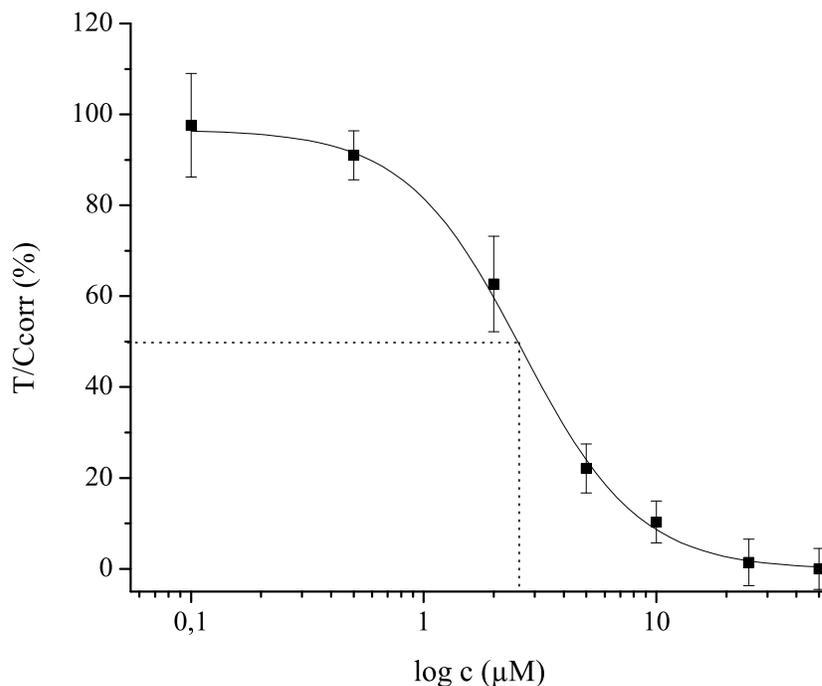


Abbildung 13.1: Sigmoider Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurve und IC<sub>50</sub>-Wertbestimmung am Beispiel von Co-Ind-1 an MCF-7 Zellen (MW(± Stabw.), n=6)

### 13.1.1 Cytotoxizität von Co-ASS sowie etablierter Cytostatika

Abbildung 13.2 zeigt die Dosis-Wirkungskurve von Co-ASS sowie seinen Synthesevorstufen an der MCF-7-Zelllinie. Bei Co-ASS setzt die Substanzwirkung schon bei sehr geringen Konzentrationen ( $<1.0\mu\text{M}$ ) ein, während Dicobaltoctacarbonyl ohne Alkinligand nicht aktiv ist. Der unkomplexierte Alkinligand (Prop-ASS) führt über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ebenso zu keiner Beeinflussung des Zellwachstums. Tabelle 13.1 zeigt die berechneten IC<sub>50</sub>-Werte im Vergleich zu bereits etablierten Cytostatika. Cisplatin und Melphalan wirken durch kovalente Bindung und Schädigung der DNS. Der Antimetabolit 5-Fluorouracil und das Antiestrogen Tamoxifen wurden als Beispiele für in der derzeitigen Brustkrebstherapie eingesetzte Verbindungen gewählt [119].

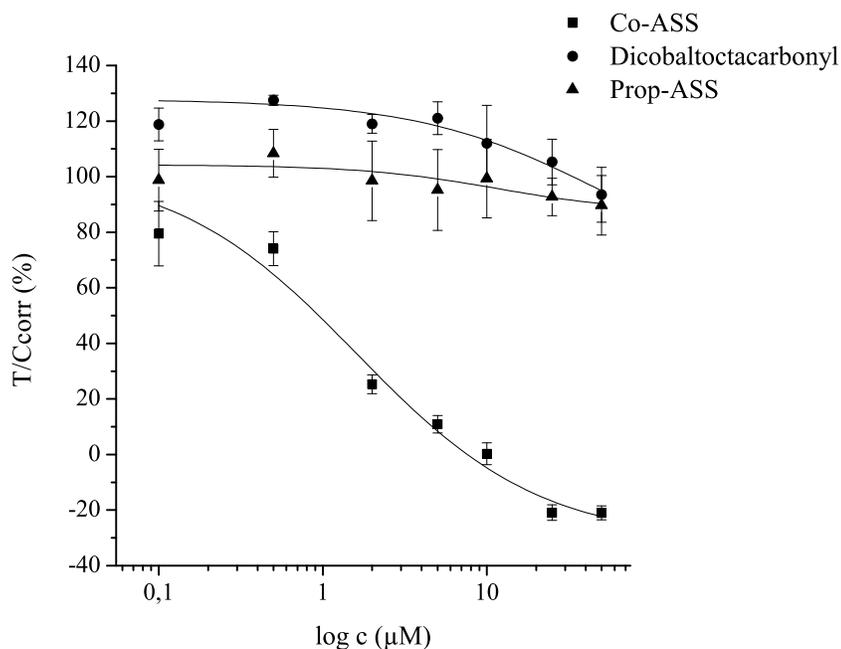


Abbildung 13.2: Dosis-Wirkungskurven von Co-ASS und Synthesestufen an MCF-7 Zellen (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

Die  $IC_{50}$  -Werte der etablierten Cytostatika liegen im Bereich von 2-10 $\mu$ M. Die Selektivität von Tamoxifen für MCF-7 lässt sich durch deren höheren Estrogenrezeptorgehalt erklären. Co-ASS ist mit einem  $IC_{50}$  unter 2.0 $\mu$ M somit etwas wirksamer als diese Referenzsubstanzen.

### 13.1.2 Cytotoxizität von Derivaten von Co-ASS

Tabelle 13.2 zeigt die  $IC_{50}$  -Werte mehrerer zu Co-ASS strukturell verwandter Komplexe, sowie des Diphenylacetylenderivates Co-Diph (als strukturell nicht verwandte 'Negativkontrolle'). Die Verbindungen sind in Abschnitt A.2 abgebildet. Die strukturellen Variationen wurden hinsichtlich folgender Gesichtspunkte vorgenommen:

- Testung potentieller Hydrolysemetaboliten von Co-ASS: Co-Sal, Co-Prop

Substanz	MCF-7	MDA-MB-231
Co-ASS	1.4 ( $\pm 0.3$ )	1.9 ( $\pm 0.3$ )
Prop-ASS	>200	>200
Dicobalt	>50	-
Cisplatin	2.0 ( $\pm 0.3$ )	4.0 ( $\pm 1.5$ )
Melphalan	5.7 ( $\pm 1.5$ )	3.9 ( $\pm 0.3$ )
Tamoxifen	2.3 ( $\pm 0.4$ )	10.6 ( $\pm 0.3$ )
5-Fluorouracil	4.8 ( $\pm 0.6$ )	9.6 ( $\pm 0.3$ )

Tabelle 13.1: IC<sub>50</sub> -Werte ( $\mu$ M; MW( $\pm$  Stabw.), n=12)

- Ersetzen durch -H bzw. Verschieben der 2-Acetoxyfunktion: Co-Benz, Co-3-Acetbenz
- Ersetzen der 2-Acetoxydonorfunktion durch einen Akzeptorsubstituenten (-F): Co-2F-Benz
- Ersetzen der Esterfunktion durch eine vermutlich metabolisch stabilere Amidfunktion: Co-ASSAM
- Phtalimidderivat: Eine strukturell stark verwandte Verbindung wurde schon als wirksam erkannt [41].

Substanz	MCF-7	MDA-MB-231
Co-SAL	3.9 ( $\pm 0.2$ )	4.4 ( $\pm 1.7$ )
Co-Prop	7.0 ( $\pm 2.0$ )	>50
Co-Benz	5.4 ( $\pm 0.4$ )	11.4 ( $\pm 0.9$ )
Co-3-Acetbenz	9.1 ( $\pm 1.3$ )	10.3 ( $\pm 0.5$ )
Co-2F-Benz	7.1 ( $\pm 0.9$ )	9.6 ( $\pm 0.7$ )
Co-ASSAM	8.8 ( $\pm 1.0$ )	9.1 ( $\pm 1.0$ )
Co-Phtal	22.2 ( $\pm 0.4$ )	>50
Co-Diph	>50	>50

Tabelle 13.2: IC<sub>50</sub> -Werte ( $\mu$ M; MW( $\pm$  Stabw.), n=12)

Wie aus Tabelle 13.2 ersichtlich, bewirkte jedwede strukturelle Variation von Co-ASS eine Aktivitätsminderung. Die meisten Komplexe zeigen IC<sub>50</sub> unter 10 $\mu$ M und liegen somit im Bereich der bereits etablierten Cytostatika (siehe Tabelle 13.1). Die 'Negativkontrolle' Co-Diph war an beiden Zellkulturen wirkungslos. Dies weist darauf hin, dass Cobalt-Alkin-Komplexe nicht

generell toxisch sind und ein spezifischer Wirkungsmechanismus vorliegen sollte.

### 13.1.3 Cytotoxizität weiterer Cobalt-Alkin-Komplexe

Um weitere Informationen über die Strukturwirkungsbeziehungen von Cobalt-Alkin-Komplexen zu erhalten bzw. um noch wirksamere Verbindungen zu finden, wurden strukturell von der Leitverbindung Co-ASS abweichende Verbindungen getestet. Diese können im wesentlichen in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Indolderivate
- Nucleosidderivate

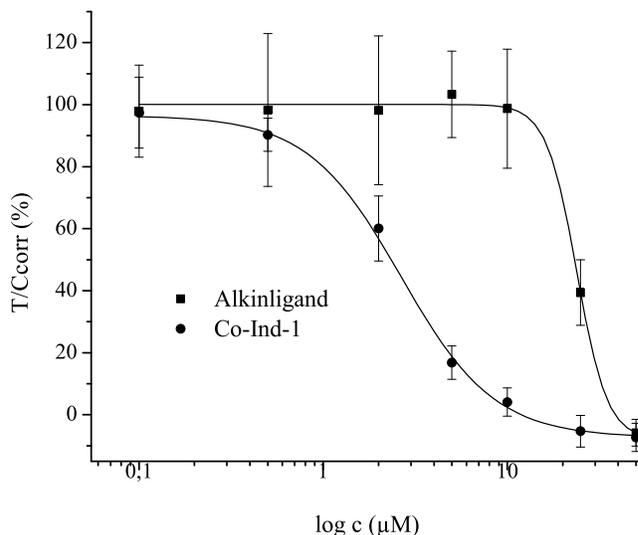


Abbildung 13.3: Dosis-Wirkungskurve für Co-Ind-1 und den zugehörigen Alkinliganden an MCF-7 Zellen (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

#### Indolderivate

Die zur Testung herangezogenen Indolderivate Co-Ind-1 bis Co-Ind-4 (siehe Abbildung 13.4) tragen die Cobalt-Alkin-Gruppe an einer am Indol-Stickstoff

gebundenen Seitenkette, die entweder aus einem But-2-ynyl- oder einem Prop-2-ynyloxycarbonyl-Rest besteht. Weiterhin unterscheiden sie sich in der Seitenkette an Position 3 des Indolringes, die entweder einen Benzyl- oder tert.-Butylester trägt (entspricht BOC bzw. tert-Butyl in der Schutzgruppenchemie). Die Verbindungen Co-Ind-1 bis Co-Ind-4 wurden von Prof. Dr. Rück-Braun (Technische Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Das Indometacinderivat Co-Indo (siehe Abbildung 13.4) wurde aufgrund des Zusammenhanges zwischen Cyclooxygenasehemmung und Antitumoraktivität (siehe Abschnitt 3.2 und 11) synthetisiert und getestet. Soweit verfügbar wurden auch die jeweils zugehörigen Alkin-Liganden untersucht. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob die cytotoxischen Eigenschaften auf die Komplexierung mit Dicobaltoctacarbonyl zurückgeführt werden können oder ob die Liganden per se aktiv sind. (siehe Tabelle 13.3)

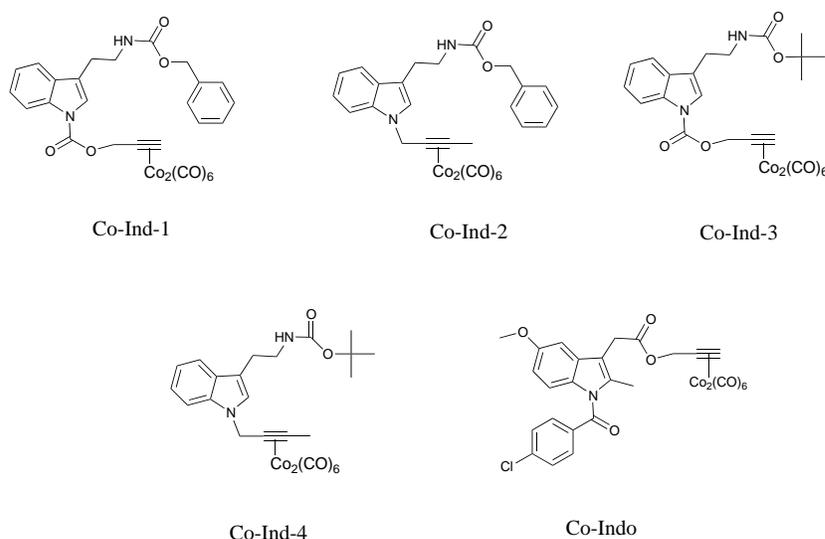


Abbildung 13.4: Indolderivate

Bei den Komplexen Co-Ind-1 bis Co-Ind-4 sind die Verbindungen mit einem Proton an einem der beiden Enden der Dreifachbindung (Co-Ind-1 und Co-Ind-3) aktiver als die Verbindungen bei denen dieser Wasserstoff durch eine Methylgruppe (Co-Ind-2 und Co-Ind-4) ausgetauscht ist. Dieser Sachverhalt konnte auch schon bei einem entsprechendem Derivat von Co-ASS festgestellt werden (siehe Abschnitt 2.4 und [42]). Der Benzylrest in der Seitenkette ist der tert.-Butylgruppierung vorzuziehen. Die Alkinliganden zeigten auch Aktivität, die aber - mit Ausnahme des Alkinliganden von Co-Ind-2 an MDA-MB-231- schwächer war als die des jeweiligen Komple-

Substanz	MCF-7	MDA-MB-231
	(Komplex / Alkinligand)	(Komplex / Alkinligand)
Co-Ind-1	1.9 ( $\pm 0.5$ ) / 20.4 ( $\pm 2.1$ )	1.7 ( $\pm 0.1$ ) / 9.0 ( $\pm 0.7$ )
Co-Ind-2	8.0( $\pm 0.1$ ) / 18.6 ( $\pm 0.8$ )	10.8( $\pm 0.6$ ) / 5.8 ( $\pm 0.2$ )
Co-Ind-3	5.3 ( $\pm 0.4$ ) /-	8.8 ( $\pm 0.6$ ) /-
Co-Ind-4	13.6 ( $\pm 0.3$ ) /-	15.2( $\pm 2.4$ ) /-
Co-Indo	6.9( $\pm 0.5$ ) /-	>50 /-

Tabelle 13.3: IC<sub>50</sub> -Werte ( $\mu$ M; MW( $\pm$  Stabw.), n=12)

xes. Die aktivste Verbindung in dieser Reihe Co-Ind-1 erreicht nahezu die Wirksamkeit der Leitstruktur Co-ASS (siehe Abbildung 13.3). Das Indometacinderivat Co-Indo ist mit einem IC<sub>50</sub> von 6.9 $\mu$ M nur an MCF-7 wirksam und an MDA-MB-231 überraschenderweise unwirksam.

### Nucleosidderivate

Substanz	MCF-7	MDA-MB-231
	(Komplex/Alkinligand)	(Komplex/Alkinligand)
RD-12	1.4 ( $\pm 0.3$ ) / 0.3 ( $\pm 0.1$ )	21.7 ( $\pm 1.3$ ) / 4.4 ( $\pm 0.4$ )
RD-15	6.8 ( $\pm 1.0$ ) / 9.5 ( $\pm 1.4$ )	10.6( $\pm 0.6$ ) / >50
RD-14	12.6 ( $\pm 1.4$ ) / > 50	36.9 ( $\pm 1.3$ ) / > 50
RD-2	13.3 ( $\pm 0.2$ ) / 0.9 ( $\pm 0.2$ )	22.4 ( $\pm 0.6$ ) / >50
RD-13	19.5 ( $\pm 3.5$ ) / >50	29.1 ( $\pm 3.6$ ) / >50
RD-16	32.2 ( $\pm 4.0$ ) >50	47.3 ( $\pm 3.3$ ) / >50
5-Fluorouracil	4.8 ( $\pm 0.6$ )	9.6 ( $\pm 0.3$ )

Tabelle 13.4: IC<sub>50</sub> -Werte ( $\mu$ M; MW( $\pm$  Stabw.), n=12)

Unphysiologische Strukturanaloga von Purin- oder Pyrimidinbasen werden in der Tumorthherapie als Antimetabolite eingesetzt. Ihre Wirkung beruht auf Hemmung der DNS- und RNS- Biosynthese als auch auf der Vermittlung falscher Informationen nach Einbau in die DNS. Die zur Untersuchung herangezogenen Cobalt-Alkin-Derivate wurden von Prof. Roman Dembinski (Oakland University) zur Verfügung gestellt. Bezüglich einer Beschreibung der Synthese sei auf die Literatur verwiesen [120, 121]. Die Verbindungen stellen Nucleosidderivate der Pyrimidinbase Uracil dar, die an Position 5 der Base verschiedenste Substituenten tragen. Generell kann festgestellt werden, dass MCF-7-Zellen sensitiver gegenüber diesen Nucleosidderivaten sind als

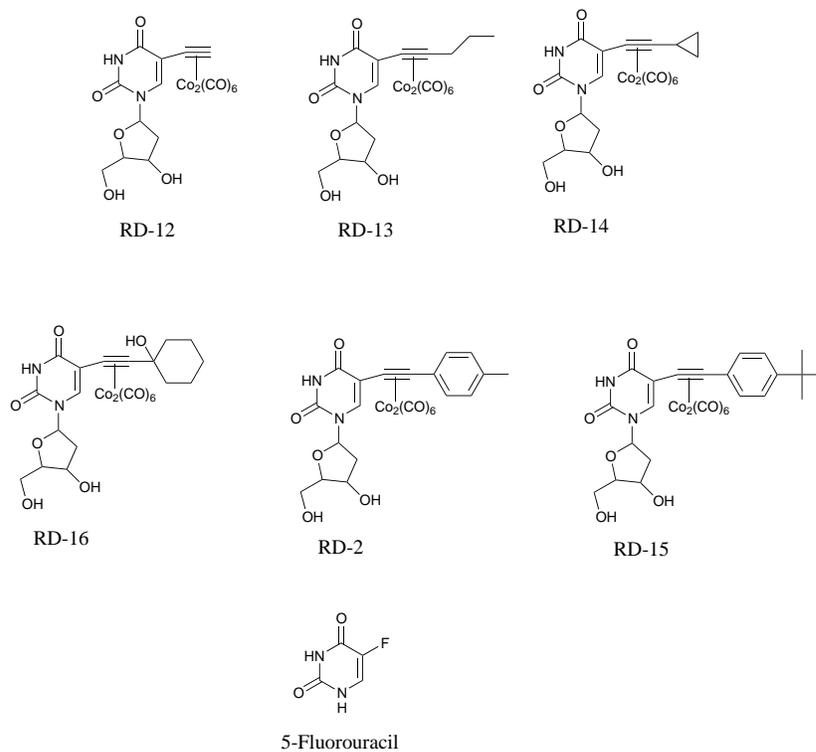


Abbildung 13.5: Nucleosidderivate

MDA-MB-231-Zellen (siehe Tabelle 13.4). Oftmals weisen aber auch die unkomplexierten Alkinliganden beträchtliche Aktivität auf. Der wirksamste der untersuchten Komplexe ist zugleich der strukturell einfachste: RD-12 ( $\text{IC}_{50} = 1.4\mu\text{M}$  an MCF-7). Allerdings ist hier der zugehörige Alkinligand noch wirksamer ( $\text{IC}_{50} = 0.3\mu\text{M}$  an MCF-7) als der Komplex. Die Verbindung trägt an Position 5 der Base eine Ethingruppe. Es besteht somit durch die Einführung eines lipophilen Restes an Position 5 nahe Verwandtschaft zum Cytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU; Fluorsubstituent an Position 5, kein Zucker, siehe Abbildung 13.5), welches allerdings schwächer wirksam ist als der Alkinligand von RD-12. Die übrigen Verbindungen sind schwächer wirksam als 5-FU. Aufgrund der stark unterschiedlichen Substituenten sind genauere Struktur-Wirkungs-Untersuchungen nicht möglich. Die Substitution des Ethinprotons wirkt sich wie bei den Benzoesäurederivaten negativ aus [42, 43].

### 13.1.4 Zusammenfassung

Die Leitverbindung Co-ASS zeigt mit  $IC_{50}$  -Werten unter  $2.0\mu M$  stärkere antiproliferative Wirksamkeit als etablierte Cytostatika (Cisplatin, 5-Fluorouracil etc.). Variationen an dieser Leitstruktur führten allesamt zu weniger aktiven Substanzen. Auf der Suche nach strukturell stärker abweichenden Komplexen wurden Indolderivate und Nucleosidderivate untersucht. Bei den Indolderivaten wurde mit Co-Ind-1 eine Verbindung gefunden, die annähernd so aktiv ist wie die Leitverbindung Co-ASS. Unter den Nucleosiden finden sich ebenfalls sehr potente Substanzen. Oftmals sind aber bei diesen die freien Alkinliganden noch stärker wirksam als die Komplexe.

## 13.2 Zellaufnahmestudien

### 13.2.1 Wirkstofftransport durch Zellmembranen

Die Zellmembran stellt eine Barriere für die Aufnahme von Wirkstoffen dar. Somit ist das Permeationsvermögen ein wesentlicher Faktor für die Wirksamkeit von Arzneistoffen. Kleine, ungeladene, Moleküle wie Harnstoff oder Wasser können die Zellmembran ungehindert passieren ('freie Diffusion'). Bei größeren Molekülen spielt die Polarität eine wesentliche Rolle. Polare Stoffe wie z.B. Zucker werden nur schwer in die Zellen aufgenommen, während unpolare Stoffe (z.B. Benzol) die Membran leichter zu durchdringen vermögen. Zur Aufnahme von Stoffen aus dem Extrazellulärmedium besitzen Zellen zudem spezielle Transporter und Kanäle. Generell unterscheidet man zwischen passivem Transport (entlang eines Konzentrationsgefälles, 'freiwillig' ablaufender Prozeß) und aktivem Transport (entgegen einem Konzentrationsgefälle, engerieverbrauchender Prozeß). [85]

### 13.2.2 Quantifizierung der Zellaufnahme

Die Bestimmung der Zellaufnahme von Substanzen ist in der Regel nur mit analytischen Verfahren mit sehr niedriger Nachweisgrenze sinnvoll möglich. Neben z.B. Messung der Radioaktivität (siehe [122]) oder Fluoreszenz ist die Atomabsorptionsspektroskopie dafür bestens geeignet.

Zellaufnahmestudien sollten zeigen, ob die unterschiedliche cytotoxische Aktivität der Cobalt-Komplexe Folge einer unterschiedlichen Zellanreicherung und somit unterschiedlicher intrazellulärer Wirkstoffkonzentrationen ist. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit den Komplexen über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert, nach definierten Zeitpunkten lysiert und mittels Graphitrohr-AAS auf ihren Cobaltgehalt untersucht. Als Bezugswert dient der zelluläre Proteingehalt (ermittelt nach der Bradford-Methode). Die in den Zellen wiedergefundene Konzentration wird somit als pmol Substanz pro  $\mu\text{g}$  Protein ermittelt. Daraus kann unter Berücksichtigung des mittleren Zelldurchmessers und des mittleren Proteingehaltes die intrazelluläre Konzentration in  $\mu\text{M}$  geschätzt werden [5, 123]. Bezieht man diese intrazelluläre Konzentration auf die im Extrazellulärmedium vorhandene Wirkstoffkonzentration erhält man den Anreicherungsgrad. Ein detailliertes Versuchsprotokoll befindet sich in Abschnitt 17.11.

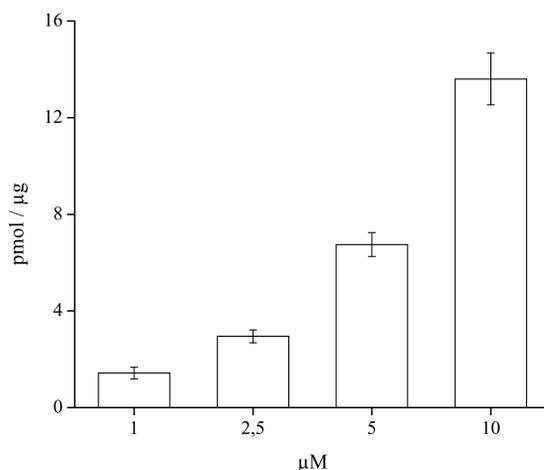


Abbildung 13.6: Konzentrationsabhängige Zellaufnahme von Co-ASS in MCF-7 nach 6 Stunden Inkubation (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

### 13.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der Zellaufnahme

Abbildung 13.6 zeigt die Aufnahme von verschiedenen Konzentrationen (1.0-10.0  $\mu$ M) von Co-ASS in MCF-7 Zellen nach Inkubation über 6 Stunden. Die Korrelation der Konzentration von Co-ASS mit der in den Zellen wiedergefundenen Menge ist mit  $r^2 > 0.999$  sehr gut. Somit wird ersichtlich, dass die Wirkstoffaufnahme in dem für die cytotoxische bzw. antiproliferative Wirkung interessanten Bereich (1.0-10.0  $\mu$ M) nicht gesättigt wird. Die in den Zellen gefundenen Substanzmengen sind als sehr hoch einzustufen. Für die höchste untersuchte Konzentration von 10.0  $\mu$ M z.B. kann eine intrazelluläre Konzentration von 1537  $\mu$ M geschätzt werden. Dies entspricht im Vergleich zu den 10.0  $\mu$ M im Kulturmedium einem Anreicherungsgrad von 153.7. Der mittlere Anreicherungsgrad der Daten aus Abbildung 13.6 beträgt 150.3 ( $\pm 12.0$ ). Cisplatin hingegen wird in den Zellen mit Anreicherungsgraden unter 6 viel schwächer angereichert [5, 123]. Auch im Vergleich mit anderen Cobalt-Komplexen ist die Anreicherung der untersuchten Cobalt-Alkin-Komplexe als äusserst hoch anzusehen. So erreichten Cobalt-Salenkomplexe maximal 25-fache Anreicherung gegenüber dem Extrazellulärmedium [20]. Das Fehlen eines Sättigungsbereiches, sowie der direkte Zusammenhang zwischen Konzentration und Zellaufnahme legen den Schluß nahe, dass Co-ASS

zumindest teilweise durch passive Diffusion in die Zellen gelangt. Von Cisplatin, welches vergleichbar gute Korrelation zwischen eingesetzter Konzentration und Zellaufnahme zeigt, ist bekannt, dass es großteils - aber nicht allein - durch passive Diffusion in die Zellen gelangt. Vermutet wird das Vorliegen von zusätzlichen aktiven Transportmechanismen (Kanäle, Transportproteine). [123]-[125]

Bei Cisplatin-resistenten Sarkomzellen der Maus etwa wurde eine erniedrigte Platinanhäufung in den Zellen festgestellt und mit der erhöhten Expression des Transportkanalproteins P-Glykoprotein in Zusammenhang gebracht. Der Effekt konnte durch den P-Glykoprotein-Inhibitor Verapamil wieder aufgehoben werden [126].

### 13.2.4 Zellaufnahme der Cobalt-Alkin-Komplexe

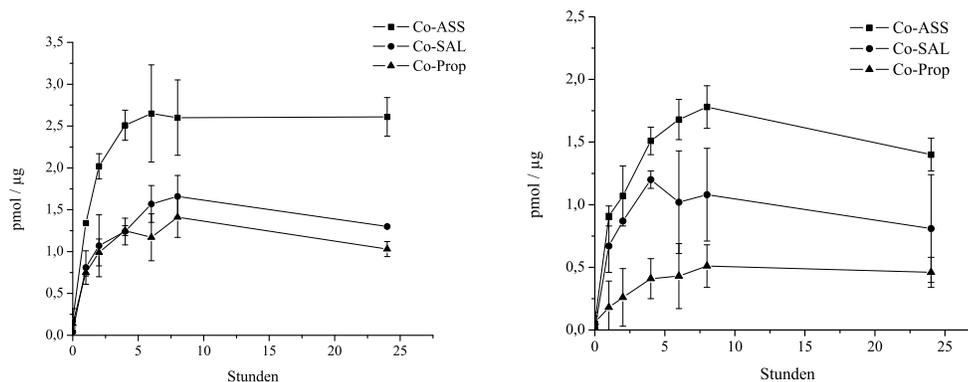


Abbildung 13.7: Zellaufnahme von Co-ASS, Co-SAL und Co-Prop in (links) MCF-7 und (rechts) MDA-MB-231 (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

Die weiteren Versuche wurden mit  $2.0\mu\text{M}$  des jeweiligen Komplexes über 24 Stunden durchgeführt. Abbildung 13.7 zeigt die Aufnahme von Co-ASS, sowie seinen beiden potentiellen Hydrolysemetaboliten Co-SAL und Co-Prop in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Die Komplexe erreichen sehr schnell (innerhalb von 4-8 Stunden) ihre höchsten intrazellulären Konzentrationen, welche dann über 24 Stunden konstant bleiben bzw. teilweise wieder etwas abnehmen. Co-ASS wird weitaus stärker in die Zellen aufgenommen als seine potentiellen Abbauprodukte Co-SAL und Co-Prop. Generell ist festzustellen, dass die Zellaufnahme in MCF-7-Zellen höhere Werte erreicht als in MDA-MB-231-Zellen. Co-ASS wird nach 24 Stunden Inkubation in einer

Konzentration von 2.61 pmol/ $\mu\text{g}$  bei MCF-7 und 1.40 pmol/ $\mu\text{g}$  bei MDA-MB-231 wiedergefunden. Dies entspricht 295 $\mu\text{M}$  bei MCF-7 und 152 $\mu\text{M}$  bei MDA-MB-231. Folglich ist Co-ASS nach 24 Stunden 148-fach (MCF-7) bzw. 76-fach (MDA-MB-231) gegenüber dem Extrazellulärmedium angereichert. Interessanterweise wird unkomplexiertes Dicobaltoctacarbonyl nicht in vergleichbarem Ausmaß in den Zellen gefunden (Maximalwert: 0.15 ( $\pm$  0.04) pmol/ $\mu\text{g}$  nach 24 Stunden bei MCF-7). Ebenso wird Cobaltnitrat mit ionischem Cobaltzentralatom ( $\text{Co}^{2+}$ ) in MCF-7 nur zu 0.04 ( $\pm$ 0.02) pmol/ $\mu\text{g}$  (24 Stunden bei MCF-7) aufgenommen. Folglich kann geschlußfolgert werden, dass die Komplexierung an die Alkinliganden für die beobachteten hohen Zellaufnahmen unbedingt notwendig ist. Der Alkinligand fungiert sozusagen als Träger für die Dicobalt-Teilstruktur.

Die Zellaufnahmeversuche weiterer Derivate von Co-ASS (Co-Benz, Co-3-Acetbenz, Co-2F-Benz, Strukturen siehe Abschnitt A.2) sowie des strukturell nicht nahestehenden Komplexes Co-Diph sind in Abbildung 13.8 dargestellt. Diese Verbindungen werden ähnlich schnell wie Co-ASS, Co-SAL und Co-

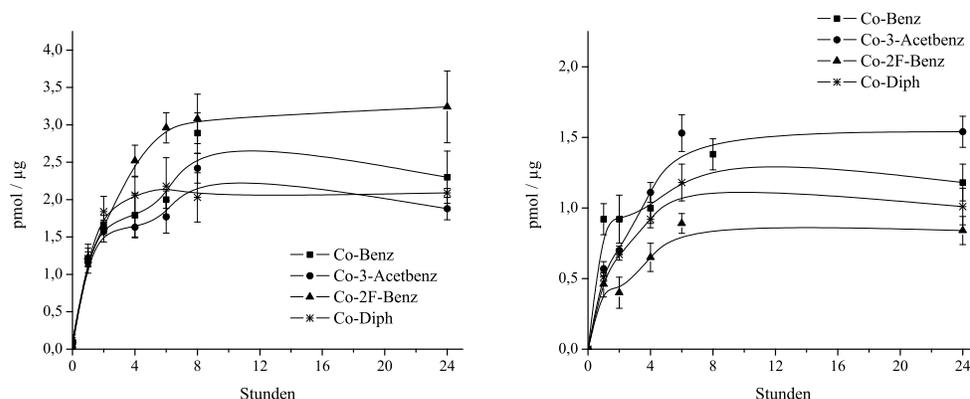


Abbildung 13.8: Zellaufnahme von Co-Benz, Co-3-Acetbenz, Co-2-F-Benz in (links) MCF-7 und in (rechts) MDA-MB-231 (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

Prop in den Zellen angereichert. Die Werte nach 24 Stunden reichen von 1.88 bis 3.24 pmol/ $\mu\text{g}$  bei MCF-7 und von 0.84 bis 1.54 pmol/ $\mu\text{g}$  bei MDA-MB-231 und liegen somit im Bereich von Co-ASS (2.61pmol/ $\mu\text{g}$  bei MCF-7 und 1.40 pmol/ $\mu\text{g}$  bei MDA-MB-231). Wider Erwarten wurde Co-Diph, welches die lipophilste der untersuchten Verbindungen darstellt (siehe Abschnitt 7), nicht in höheren Konzentrationen in den Zellen wiedergefunden.

Drei Indolderivate (Co-Ind-1, Co-Ind-2 und Co-Ind-3, Strukturen siehe Ab-

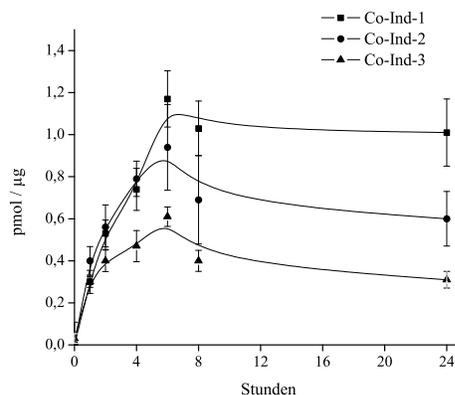


Abbildung 13.9: Zellaufnahme der Indolderivate in MDA-MB-231 (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

bildung 13.5) wurden exemplarisch an MDA-MB-231 untersucht (siehe Abbildung 13.9). Die wirksamste der Verbindungen, Co-Ind-1 ( $IC_{50}$  (MDA-MB-231)= $1.7\mu M$ , siehe Abschnitt 13.1), erreicht die höchsten intrazellulären Konzentrationen ( $1.01\text{ pmol}/\mu g$  nach 24 Stunden).

Die Kurvenverläufe aller Verbindungen scheinen nach demselben Muster abzulaufen: Die Komplexe werden rasch (innerhalb weniger Stunden) in die Zellen aufgenommen und erreichen nach ca 4-8 Stunden ein Aufnahmeplateau, welches über 24 Stunden erhalten bleibt bzw. leicht abnimmt. Die Höhe des Plateaus ist von der Struktur des jeweiligen Alkinliganden abhängig. Dieser Verlauf der Zellaufnahmen steht in gutem Einklang mit diesbezüglichen Versuchen an Platinverbindungen [123, 127].

### 13.2.5 Korrelation der Zellaufnahme mit $IC_{50}$ - und $\log k_w$ -Werten

Korrelationsuntersuchungen sollten zeigen, ob das Ausmaß der Aufnahme in die Zellen im Zusammenhang mit der zellwachstumshemmenden Aktivität der Substanzen steht oder direkt von der Lipophilie der Substanzen abhängt. Zu diesem Zweck wurden die Daten aus den Cytotoxizitätsuntersuchungen ( $IC_{50}$ -Wert) bzw. den Lipophilieuntersuchungen ( $\log k_w$ -Wert) in Diagrammen zusammen mit den intrazellulären Konzentrationen (24 Stunden-Werte) aufgetragen. Wie aus Abbildung 13.10 ersichtlich, ist ein mathematischer

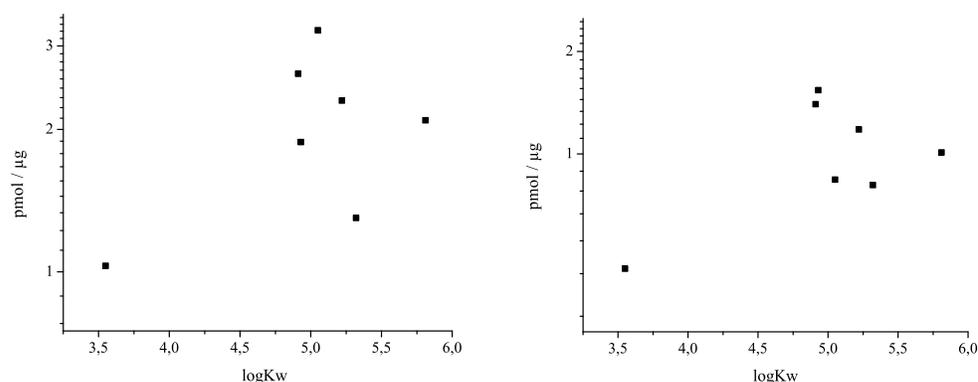


Abbildung 13.10: Zusammenhang zwischen Zellaufnahme ( $\text{pmol}/\mu\text{g}$ ) und Lipophilie ( $\log k_w$ ) bei MCF-7 (links) und bei MDA-MB-231 Zellen (rechts)

Zusammenhang zwischen Lipophilie und in die Zellen aufgenommener Substanzmenge nicht zu finden. Die lipophilste der untersuchten Verbindungen Co-Diph ( $\log k_w=5.81$ ) erreicht keineswegs die höchste intrazelluläre Konzentration. Die polarste Verbindung Co-Prop hingegen wird bei beiden Zellkulturen am wenigsten aufgenommen. Das Fehlen des direkten (linearen) Zusammenhanges zwischen Lipophilie und Zellaufnahme für die Gesamtheit der Verbindungen zeigt, dass Cobalt-Alkin-Komplexe vermutlich nicht durch passive Diffusion allein in die Zellen gelangen. Für Cisplatin und andere Platinderivate (z.B. Carboplatin) existieren ebenfalls keine linearen Beziehungen zwischen Lipophilie und Zellkonzentration, die Kurven scheinen aber einer Exponentialgleichung zu folgen [123].

Für die Zellaufnahmerate von Gold-Phosphin-Komplexen wurden parabelartige Zusammenhänge mit den  $\log k_w$ -Werten gefunden [84].

Die Korrelation von intrazellulärer Konzentration und Substanzwirkung (siehe Abbildung 13.11) liefert bei MCF-7 ebenso keinen erkennbaren Zusammenhang. Im Gegensatz dazu verlaufen die Datenpunkte bei MDA-MB-231 bei Co-ASS und seinen Derivaten annähernd entlang einer Parabel. Die drei untersuchten Indolderivate hingegen liegen mit guter Korrelation entlang einer Geraden. In diesem Fall scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Aktivität und Ausmaß der Zellaufnahme zu bestehen. Dies ist bei Co-ASS und seinen Derivaten nicht der Fall, da aufgrund des paraboloiden Kurvenverlaufs eine Erhöhung der Zellaufnahme nicht zwingendermaßen eine Senkung des  $\text{IC}_{50}$  hervorruft.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit diesbezüglichen Versuchen an Cis-

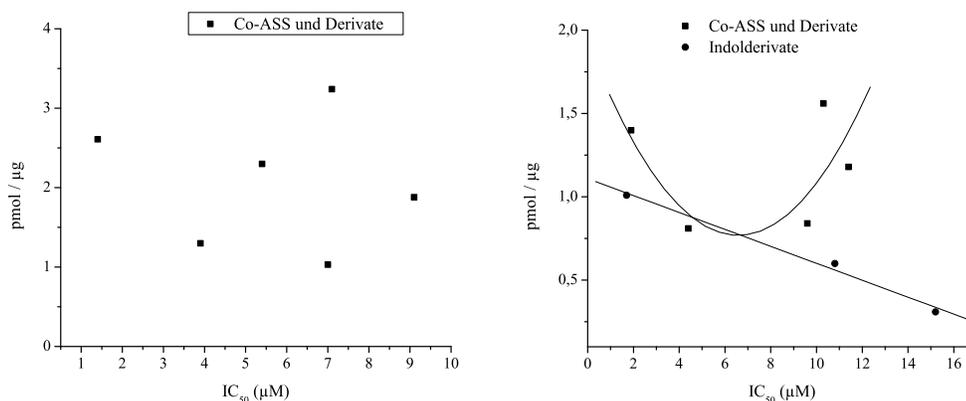


Abbildung 13.11: Zusammenhang zwischen Zellaufnahme ( $\text{pmol}/\mu\text{g}$ ) und Cytotoxizität ( $\text{IC}_{50}$ ) bei MCF-7 (links) und bei MDA-MB-231 Zellen (rechts)

platin und anderen Platinverbindungen, wo ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen  $\text{IC}_{50}$  und Platinaufnahme gefunden werden konnte [123]. Bei zweikernigen Platinkomplexen hingegen scheint ein exponentieller Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und intrazellulärer Platinkonzentration gegeben zu sein [128]. Bei Gold-Phosphin-Komplexen wurde eine lineare Korrelation der Zellaufnahmerate zur Substanzaktivität gefunden [84].

Der in Kapitel 7 beschriebene gauß-artige Zusammenhang zwischen Lipophilie und  $\text{IC}_{50}$  an MCF-7 spiegelt sich somit keineswegs in den Ergebnissen der Zellaufnahmestudien wieder. Die Resultate unterstreichen einmal mehr das Postulat, dass für Co-ASS und seine Derivate ein spezifischer von der Ligandstruktur stark abhängiger Wirkmechanismus vorliegt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen wie erläutert nur sehr begrenzt Rückschlüsse auf Beeinflussung der Wirksamkeit durch unterschiedliche physikochemische Substanzeigenschaften zu.

### 13.2.6 Zusammenfassung

Cobalt-Alkin-Komplexe werden äusserst stark in den Zellen aufgenommen. Die Leitverbindung Co-ASS wird bis zu 150-fach gegenüber dem Extrazellulärmedium angereichert. Die Alkinliganden der Komplexe fungieren als Träger. Die intrazelluläre Konzentration der Komplexe steht nicht direkt in Zusammenhang mit der Lipophilie oder der Cytotoxizität der Verbindungen.

## 13.3 Aufnahme in die Zellkerne

Eukaryotische Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben. Innerhalb der Zelle befindet sich das Cytoplasma, das wiederum die Organellen (Zellkern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum usw.) enthält. Die größte Organelle ist der im Lichtmikroskop (Durchmesser ca. 10  $\mu\text{m}$ ) sichtbare Zellkern (=Nucleus). Seine Aufgaben sind die Speicherung, Replikation und Expression der genetischen Information. Der Zellkern enthält fast die gesamte DNS der Zelle (etwa 1% ist mitochondriale DNS). Wie in Abschnitt 10.1 und 13.2 beschrieben zeigen die Cobalt-Alkin-Komplexe starkes DNS-Bindungsvermögen und hohe intrazelluläre Konzentrationen. Um erste Einblicke zu erhalten, ob Interaktionen mit der DNS tatsächlich auch in den Zellen stattfinden könnten, sollten die Zellkerne (Nuclei) isoliert und auf ihren Cobalt-Gehalt untersucht werden.

### 13.3.1 Isolierung von Nuclei aus Tumorzellen

Generell unterscheidet man bei der Isolierung von Nuclei zwischen nicht-wässrigen und wässrigen Methoden. Die nicht-wässrigen Methoden haben den Nachteil, dass die Zellkerne durch die Verwendung organischer Lösungsmittel denaturiert werden und für nachfolgende Untersuchungen schlechter geeignet sind. Bei den wässrigen Methoden unterscheidet man wiederum zwischen isotonen, hypertonen und hypotonen Methoden. Letztere haben den Vorteil, dass die Kerne vorgequollen werden und so Reste des Cytoplasmas weniger stark an der Kernmembran festhängen. Somit können bei diesem Verfahren sehr reine Zellkerne erhalten werden.[129]

Zur Isolierung der Zellkerne aus MCF-7 und MDA-MB-231 wurde auf eine von Muramatsu et al. beschriebene, leicht modifizierte, Methode zurückgegriffen [130]. Dabei werden die Zellen durch einen 'hypotonen Schock' (RS-Puffer / Eisbad) vorgequollen, mit Detergentien (Natriumdesoxycholat, Nididet P40) versetzt und durch Behandlung mit einer Spritzenadel aufgebrochen. Die Rohnuclei werden durch Zentrifugation abgetrennt und schließlich durch eine einfache Dichtgradientenzentrifugation gereinigt. Die so isolierten Nuclei werden in EDTA-Lösung wiederaufgenommen und mit einer Sonotrode zerstört. Da die Lösungen direkt nach Sonotroden-Aufschluß auf den Cobalt-Gehalt untersucht wurden, konnte auf den Zusatz stabilisierender Reagenzien (Triton,  $\text{HNO}_3$ ) verzichtet werden. Zur Ermittlung der Kernbiomasse wird der Proteingehalt nach der Bradford-Methode (siehe Abschnitt 17.1) ermittelt. Die Berechnung erfolgt als pmol Komplex pro  $\mu\text{g}$  Kernprotein bzw. als prozentueller Anteil der im Kern aufgefundenen Substanzmenge relativ zur Menge in einem Aliquot mit noch intakten Zellen. Jedes Expe-

riment wird mit den aus drei 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen nach 24 Stunden Inkubation erhaltenen Nuclei durchgeführt. Das Endergebnis resultiert aus dem Mittelwert von 2-3 unabhängigen Experimenten. Eine detaillierte Methodenbeschreibung findet sich im Abschnitt 17.12.

### 13.3.2 Ergebnisse

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse:

	Co-ASS	Co-SAL	Co-Benz	Co-Prop	Co-Diph
MCF-7	0.12(±0.03) 0.8%	0.11(±0.01) 1.0%	0.11(±0.05) 0.9%	0.15(±0.02) 1.4%	0.14(±0.02) 3.4%
MDA-MB-231	0.22(±0.13) 5.0%	0.14(±0.05) 1.7%	0.14(±0.05) 1.9%	0.15(±0.05) 2.0%	0.14(±0.12) 7.4%

Tabelle 13.5: Aufnahme von Cobalt-Alkin Komplexen in die Nuclei als pmol Substanz/ $\mu$ g Protein bzw. prozentueller Anteil an der Zellaufnahme (MW(± Stabw.), n=6)

Bei den MCF-7 Zellen wurden Werte im Bereich um 0.11 bis 0.15 pmol/ $\mu$ g gefunden. Dies entspricht 0.8-3.4% der gesamten in den Zellen gefundenen Menge an dem jeweiligen Komplex. Bei MDA-MB-231 Zellen wurden meist etwas höhere Werte bis zu 0.22 pmol /  $\mu$ g gefunden bzw. bis zu 7.4%. Die untersuchten Komplexe weisen starke Unterschiede in der Struktur der Alkinliganden als auch in ihrer biologischen Aktivität auf (siehe Abschnitt 13.1), werden jedoch somit in fast identischen Mengen in die Zellkerne aufgenommen. Der an beiden Zellkulturen unwirksame Komplex Co-Diph etwa zeigt das selbe Verhalten wie die anderen unterschiedlich stark wirksamen Verbindungen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die zellwachstumshemmende Wirkung nicht oder nur zum Teil auf Ereignissen das Genom betreffend basiert.

### 13.3.3 Zusammenfassung

Die in den Zellkernen gefundenen Konzentrationen betragen nur wenige Prozent der gesamten in die Zellen aufgenommenen Substanzmenge. Ein Wirkungsmechanismus auf genomischer Ebene kann somit ausgeschlossen werden.

## 13.4 Glutathionreduktaseaktivität

Perquin und Mitarbeiter zeigten, dass Tumore der Brust in der Lage sind ihren Redoxstatus und ihre Entgiftungskapazität zu erhöhen. Dies geschieht zum Großteil über Hochregulierung des Glutathionstoffwechsels [111]. Wie in Abschnitt 12 beschrieben kann Glutathion durch die Cobalt-Alkin-Komplexe von seiner reduzierten (GSH) in seine oxidierte Form (GSSG) überführt werden. Die hier beschriebenen Experimente sollten zeigen, ob Cobalt-Alkin-Komplexe in Zellkulturexperimenten in der Lage sind, dieses empfindliche Redoxsystem zu beeinflussen. Dazu wurde die Fähigkeit von Zelllysaten zugesetztes NADPH und GSSG zu verstoffwechseln untersucht. NADPH ist Substrat für die Glutathionreduktase, ein wichtiges Schlüsselenzym im Glutathionstoffwechsel. Der Einfluß von Metallkomplexen auf zelluläre Redoxsysteme, vor allem auf die zur Glutathionreduktase verwandte Thioredoxinreduktase, wird als Wirkungsmechanismus für Antitumoreffekte und die Wirksamkeit gegen Protozoen gesehen. Platin und Goldkomplexe, wie Auranofin (siehe Abbildung 1.1), zeigten deutliche Enzymhemmwirkung. [131]-[133]

### 13.4.1 NADPH-Redoxsystem und Glutathionreduktase

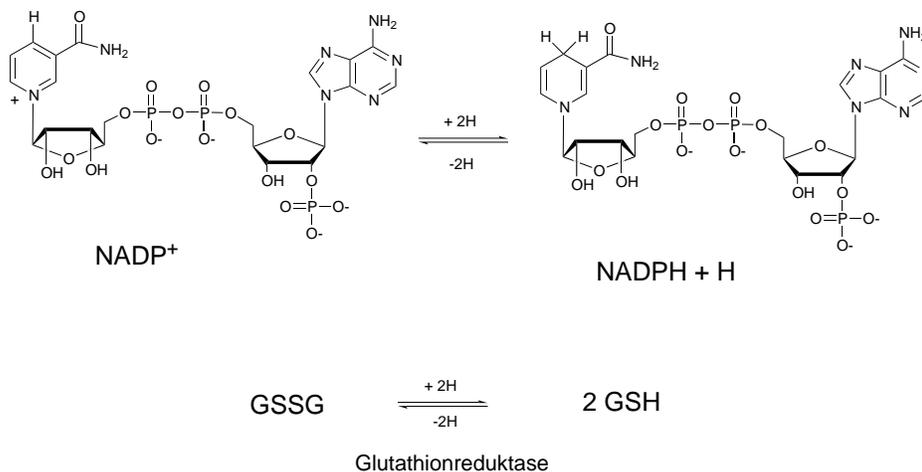


Abbildung 13.12: NADPH-Redoxsystem und Glutathionreduktase

Nicotinamadeninucleotid (NAD) und Nicotinamadeninucleotidphosphat (NADP) sind Coenzyme wasserstoffübertragender Enzyme. Nicotinamid und Adenin sind über jeweils eine Riboseeinheit und eine Diphos-

phatbrücke verbunden (siehe Abbildung 13.12). Die Coenzymfunktion besteht in einer reversiblen Aufnahme oder Abgabe von Wasserstoff am Pyridinring. Dabei entsteht entweder die oxidierte Form ( $\text{NADP}^+$ , Abbildung 13.12) oder reduzierte Form ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , Abbildung 13.12). Die reduzierte Form weist ein zusätzliches breites Absorptionsmaximum im Bereich von 290-380nm auf, worauf das UV-Meßprinzip beruht [86]. Die Glutathionreduktase katalysiert die Reduktion von oxidiertem zu reduziertem Glutathion unter Verbrauch von NADPH.

### 13.4.2 Durchführung

Die Bestimmung des NADPH-Verbrauchs wurde an MCF-Zelllysaten in Anlehnung an die Literatur bestimmt [132, 133]. Dazu wurden die Zellen in 24-Lochplatten angezüchtet und dann für 6 Stunden mit  $8.0\mu\text{M}$  Substanz inkubiert. Die Inkubationszeit wurde mit 6 Stunden festgelegt, da die Zellaufnahme zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum erreicht (siehe Abschnitt 13.2). Die Konzentration von  $8.0\mu\text{M}$  wurde gewählt, da damit hohe intrazelluläre Konzentrationen gewährleistet sind (siehe Abschnitt 13.2). Zu Vergleichszwecken wurden einzelne Substanzen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und in geringeren Konzentrationen untersucht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen isoliert und mittels Sonotrode lysiert. Direkt anschließend wurden die Zellsuspensionen mit den Substraten der Glutathionreduktase, oxidiertem Glutathion (GSSG) und NADPH, versetzt. Die Fähigkeit der Lyrate das zugesetzte NADPH zu verstoffwechseln wurde durch Messung der Abnahme der Absorption bei 340nm bestimmt. Da NADPH unter den Versuchsbedingungen nur begrenzt gegen nicht-glutathionreduktasevermittelte Oxidation stabil ist, wurde die Oxidation einer Vergleichslösung beobachtet. Abbildung 13.13 zeigt die Stabilität einer NADPH-Lösung sowie den NADPH-Verbrauch einer Kontrolllösung. Die Lösung zur Messung der Stabilität wurde nur mit GSSG versetzt, die Kontrolllösung mit GSSG und Zelllysate. Während die Kontrolllösung NADPH relativ rasch verbraucht, ist der oxidative Abbau ohne Zelllysate vergleichsweise langsam. Der NADPH-Verbrauch kann somit auf die im Lysat enthaltenen Enzyme (Glutathionreduktase) zurückgeführt werden. Der mit der Zeit abflachende Kurvenverlauf zeigt zudem die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der NADPH-Konzentration. Die enzymatischen Messungen wurden jeweils bei mindestens 85% Stabilität der zelllysatefreien NADPH-Lösung und bei Verbrauch von etwa der Hälfte des am Start vorhandenen NADPH durch die Kontrolllösung ausgewertet. Nach Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (siehe Abschnitt 17.1) kann die Enzymaktivität als nmol umgesetztes NADPH pro Minute pro  $\mu\text{g}$  Protein berechnet und als prozentuales Verhältnis bezogen auf

die Kontrolle angegeben werden. Die Aktivität der Kontrollkulturen lag dabei bei den einzelnen Versuchen zwischen 0.62 und 2.20 nmol/(min\* $\mu$ g). Eine Übersicht über die einzelnen durchgeführten Versuche, sowie ein detailliertes Versuchsprotokoll finden sich in den Abschnitten 17.13 und A.4.

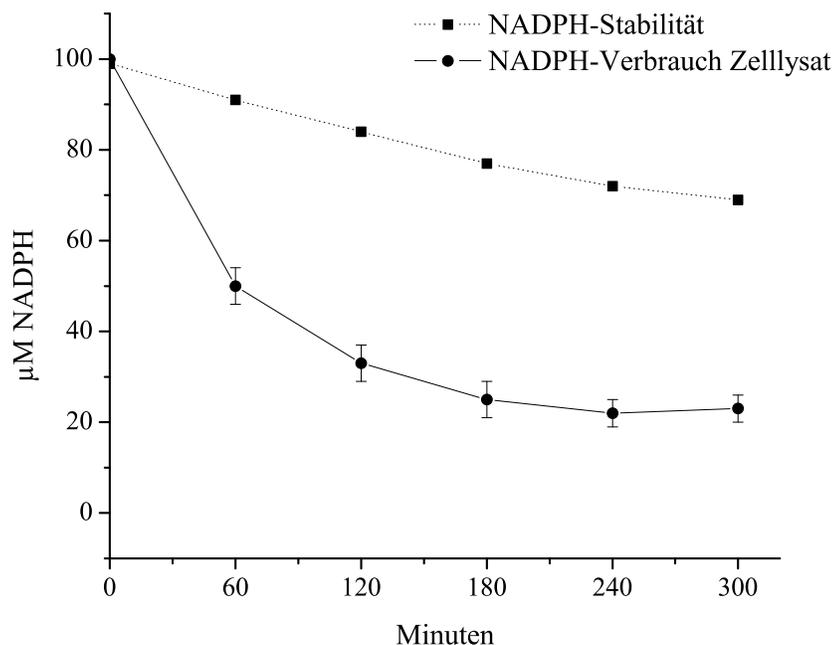


Abbildung 13.13: Enzymwirkung und Stabilität von NADPH (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

### 13.4.3 Ergebnisse

Zur Untersuchung wurden die Leitstruktur Co-ASS, sowie die Komplexe Co-SAL, Co-Prop, Co-Diph und die Ausgangsverbindungen Acetylsalicylsäure (ASS), Salicylsäure (SAL) und Acetylsalicylsäurepropargylester (Prop-ASS) herangezogen. Tabelle 13.6 zeigt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse. Die Enzymaktivität wird von keiner der untersuchten Substanzen beeinflusst. Die beobachteten Unterschiede liegen im Bereich der experimentellen Schwankungen. Bei Ausdehnung der Inkubationszeit von 6 auf 24 Stunden wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten (nicht gezeigt). Da die zur Inkubation verwendete Konzentration von 8.0 $\mu$ M ausreicht, um sehr hohe intra-

zelluläre Substanzkonzentrationen sowie starke cytotoxische Effekte zu erreichen, aber die Glutathionreduktaseaktivität nicht bemerkbar beeinflußt, kann die Hemmung dieses Enzyms als Wirkungsmechanismus praktisch ausgeschlossen werden.

Substanz	Enzymaktivität (%)
Co-ASS	93( $\pm$ 5)
Co-SAL	84 (-)
Co-Prop	105 ( $\pm$ 13)
Co-Diph	96 ( $\pm$ 10)
ASS	101 ( $\pm$ 14)
SAL	109 (-)
Prop-ASS	97 ( $\pm$ 1)

Tabelle 13.6: Beeinflußung der Glutathionreduktase-Enzymaktivität; die einzelnen Versuchsdaten finden sich in Abschnitt A.4 (MW( $\pm$  Stabw.), n=12)

## 13.5 Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man den physiologischen (oder programmierten) Zelltod, der zu einem geordneten Abbau von Zellen führt. Morphologisch ist dieses Geschehen durch Veränderungen der Zellmembran, Schrumpfen des Zellkerns, Chromatinkondensation und Fragmentierung der DNS gekennzeichnet. Die Apoptose kann von einer Reihe verschiedener Signale ausgelöst (z.B. Fas-System, Tumornekrosefaktor ) bzw. verhindert (z.B. bcl-2 Protein) werden. Der Apoptose 'gegenüber' steht die sogenannte Zellnekrose. Diese wird auf chemische oder physikalische Schädigungen zurückgeführt und ist durch ein Anschwellen und Platzen der Zellen mit nachfolgender Auslösung eines Entzündungsgeschehens beschrieben. [85]

Die beiden Begriffe Apoptose und Nekrose sollten aber trotzdem nicht getrennt betrachtet werden, sondern als zwei Extreme eines kontinuierlichen Prozesses. Dabei stellt die Nekrose den nicht mehr umkehrbaren Zustand ('no return way') des Zelltodes dar. [134]

### 13.5.1 Durchführung

Zur Untersuchung schnell eintretender erster Zeichen von Apoptose wurde der 'Annexin-V-Fluos Staining Kit' (siehe Abschnitt 17.14) verwendet. In den ersten Stufen apoptotischer Ereignisse kommt es zu Veränderungen an der Zelloberfläche. Dabei wird Phosphatidylserin (PS) von der inneren Plasmamembran an die äußere Zelloberfläche transportiert. Die Analytik des Phosphatidylserins erfolgt durch Zusatz von Annexin-V-Fluorescein und Propidiumiodid. Annexin-V ist ein calciumabhängiges phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin. Es kann deshalb zur Detektion apoptotischer Zellen verwendet werden. Da nekrotische Zellen ebenso PS an ihrer Oberfläche tragen, müssen diese durch eine weitere Methode von den apoptotischen Zellen differenziert werden. Dies geschieht durch Propidiumiodid, welches selektiv die DNS von nekrotischen, löchrigen Zellen färbt. Analytisch können die beiden Färbungen fluoreszenzspektroskopisch unterschieden werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 488nm emittiert Fluorescein bei 518 und Propidiumiodid bei 617nm. [135]

Tabelle 13.7 zeigt die mit Co-ASS erhaltenen Ergebnisse an MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Bei kurzer Inkubationszeit (3 Stunden) können keine apoptotischen Veränderungen festgestellt werden. Co-ASS wurde in für zytotoxische Wirkung relevanten Konzentrationen (5-50 $\mu$ M) eingesetzt. Die beobachteten Unterschiede liegen innerhalb der Abweichungen der einzelnen Experimente und unterscheiden sich nicht vom Blindwert. Die 11.5 (MDA-MB-231) bzw. 12.6% (MCF-7) apoptotischen Zellen des Blindwerts sind auf das

Co-ASS ( $\mu\text{M}$ )	MCF-7	MDA-MB-231
0	11.51	12.6 ( $\pm 2.9$ )
5	13.68	11.9 ( $\pm 2.6$ )
10	12.40	10.9 ( $\pm 2.5$ )
50	10.98	-

Tabelle 13.7: apoptotische Zellen (%) nach 3 Stunden Inkubation bei MCF-7 (n=1) und MDA-MB-231 (MW( $\pm$  Stabw.), n=3)

bei der Probenvorbereitung durchgeführte Trypsinisieren zurückzuführen. Zur Beschreibung apoptotischer Erscheinungen bei längerer Substanzeinwirkung (5 Tage) wurde auf den 'ssDNA Apoptosis ELISA Kit' (siehe Abschnitt 17.14) zurückgegriffen. Dieser basiert auf der selektiven Denaturierung der DNS in apoptotischen Zellen durch Formamid und Detektion der denaturierten DNS durch einen monoklonalen Antikörper gegen einzelsträngige DNS. Formamid denaturiert DNS in apoptotischen Zellen, aber nicht in nekrotischen Zellen oder in Zellen mit DNS-Strangbrüchen ohne Apoptose. Die selektive Wirkung von Formamid beruht somit nicht auf DNS-Strangbrüchen selbst sondern auf durch Apoptose hervorgerufenen Veränderungen der Chromatinstruktur (z.B. Chromatinkondensation). [136, 137]

Um die bei längerer Inkubation auftretende Veränderung der Zellbiomasse zu berücksichtigen, wurden die noch lebenden Zellen zum Zeitpunkt der Apoptosemessung mittels 'EZ4U-Kit' (Fa. Biomedica) quantifiziert und das Ausmaß der Apoptose darauf bezogen [138]. Dabei wurde das Verhältnis der Absorption aus der Apoptosemessung und der Absorptionsmessung der Zellbiomasse berechnet. Das so beim Blindwert zustande kommende Verhältnis wurde als 1 gesetzt und die Ergebnisse der substanzhaltigen Proben darauf bezogen. Tabelle 13.8 zeigt die Ergebnisse von Co-ASS nach 5 Tagen Inkubation. Ebenso wie nach kurzer Inkubationszeit können auch nach langer Inkubation keine apoptotischen Veränderungen festgestellt werden.

Co-ASS ( $\mu\text{M}$ )	Apoptose MCF-7	Apoptose MDA-MB-231
0	1	1
1	0.9	-
5	0.8	1.6( $\pm 0.3$ )
10	0.8	1.7( $\pm 0.3$ )

Tabelle 13.8: Apoptose nach 5 Tagen Inkubation bei MCF-7 (n=1) und MDA-MB-231 (MW( $\pm$  Stabw.), n=3)

### 13.5.2 Zusammenfassung

Die Leitstruktur Co-ASS zeigt weder an MCF-7 noch an MDA-MB-231 weder bei kurzer (3 Stunden) oder langer (5 Tage) Inkubation mit für zellwachstumshemmende Effekte relevanten Konzentrationen ( $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) signifikante Anzeichen von Apoptose. Dies korreliert mit literaturbekannten Ergebnissen der Ausgangsverbindung Acetylsalicylsäure, welche erst im millimolaren Konzentrationsbereich Apoptose auslöst [61].



# Kapitel 14

## Lymphom- und Leukämiezellen

### 14.1 Cobalt-Alkin-Komplexe und Leukämie

Die cytotoxische Aktivität von Cobalt-Alkin-Komplexen wurde erstmals 1987 beschrieben. Der in Abbildung 14.1 dargestellte Komplex wies an P388 lymphatischen Leukämie-Zellen der Maus einen  $IC_{50}$ -Wert von  $3.1\mu M$  auf [40]. Dieses vielversprechende Ergebnis ließ auf eine weitere Einsatzmöglichkeit für die Komplexe hoffen. Leukämie und Lymphom-Zellen stellen zudem ein interessantes Testsystem dar, da es sich hierbei nicht, wie bei den bisher untersuchten Brustkrebszellen, um adhärenente 'Monolayer' sondern um Suspensionszellkulturen handelt, die folglich andere Oberflächeneigenschaften aufweisen.

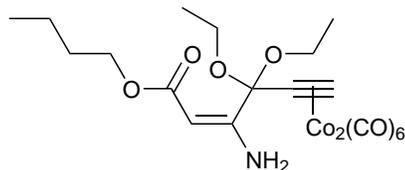


Abbildung 14.1: an P388 Zellen aktiver Komplex [40]

Zur Testung wurden drei Verbindungen mit möglichst unterschiedlichen Alkinliganden und unterschiedlicher Wirksamkeit an Brustkrebskulturen ausgewählt: Co-ASS, Co-Prop und Co-Diph (Strukturen siehe Abschnitt A.2). Somit sollte abgeklärt werden, ob eine vorhandene Wirksamkeit, wie bisher beobachtet, starke Abhängigkeit von der Struktur des Alkinliganden zeigt oder auch Auswirkung einer unspezifischen Substanzwirkung ist. Die Experimente umfassten Untersuchungen zur Cytotoxizität sowie Zellaufnahme.

Die folgenden Zellkulturen wurden in die Untersuchungen miteinbezogen:

- K-562 (Humane chronische myeloide Leukämie)
- SD-1 (Lymphoblastische Leukämie)
- U-937 (Humanes histiocytisches Lymphom)
- LAMA-84 (Humane chronische myeloide Leukämie)

## 14.2 Cytotoxizitätsuntersuchungen

Die Cytotoxizitätsexperimente wurden an insgesamt vier (LAMA-84, K-562, SD-1, U-937) Zellkulturen mit 48 bzw. 72 Stunden Einwirkungszeit der Substanzen in Konzentrationen von 0.05 bis 25  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Substanzwirkung wurde als  $\text{IC}_{50}$ -Wert berechnet. Cisplatin diente als Referenzsubstanz. Tabelle 14.1 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung findet sich in Abschnitt 17.15. Dosiswirkungskurven für Co-ASS, Co-Prop und Co-Diph sind in Abschnitt A.5 abgebildet.

	LAMA-84	K-562	SD-1	U-937
Co-ASS	16.8 / 12.1	>25 / >25	>25 / >25	>25 / >25
Co-Prop	9.9 / 10.2	>25 / >25	>25 / 18.6	>25 / >25
Co-Diph	9.0 / 7.7	>25 / >25	>25 / 7,5	>25 / >25
Cisplatin	3.5 / 1.7	2.2 / 1.3	1.0 / 0.4	2.3 / 1.6

Tabelle 14.1:  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) von Cobalt-Alkin-Komplexen an verschiedenen Lymphomen und Leukämien (48 Stunden / 72 Stunden Inkubation; MW, n=6)

Wie aus Tabelle 14.1 ersichtlich, zeigen die Komplexe nicht die bei Brustkrebskulturen beobachtete überaus starke Aktivität. In den meisten Fällen liegen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte über der höchsten untersuchten Konzentration von 25  $\mu\text{M}$ . Lediglich an der HCML-Kultur LAMA-84 und für Co-Diph und Co-Prop an SD-1 wurden gute Aktivitäten bestimmt ( $\text{IC}_{50}$  im Bereich 7.5-18.6  $\mu\text{M}$ ). Die Wirksamkeit der Referenzsubstanz Cisplatin ( $\text{IC}_{50}$  0.4-3.7  $\mu\text{M}$ ) wurde bei keiner der untersuchten Kulturen erreicht. Bei den sensitiven Zelllinien LAMA-84 und SD-1 korreliert die Wirksamkeit (CoDiph>Co-Prop>Co-ASS) nicht mit der Lipophilie der Komplexe (Co-Diph>Co-ASS>Co-Prop, siehe Abschnitt 7). Die Leitsubstanz Co-ASS zeigt überraschenderweise etwas schlechtere Wirksamkeit als die beiden anderen Komplexe.

## 14.3 Zellaufnahme bei Leukämien

Als eine Ursache für die geringere Wirksamkeit an Leukämien und Lymphomen könnte unterschiedliche Anreicherung in den Zellen in Betracht gezogen werden. Für die Quantifizierung der Zellaufnahme wurden die beiden HCML-Linien LAMA-84 und K-562 ausgewählt, da diese - wie oben beschrieben - ein unterschiedliches Sensitivitätsmuster für die Komplexe aufweisen. Da es sich um Suspensionszellkulturen handelt, konnte nicht auf das für Monolayer entwickelte Verfahren zurückgegriffen werden. Die Zellpellets wurden hier durch Zentrifugation isoliert. Eine ausführliche Arbeitsanweisung findet sich in Abschnitt 17.15.

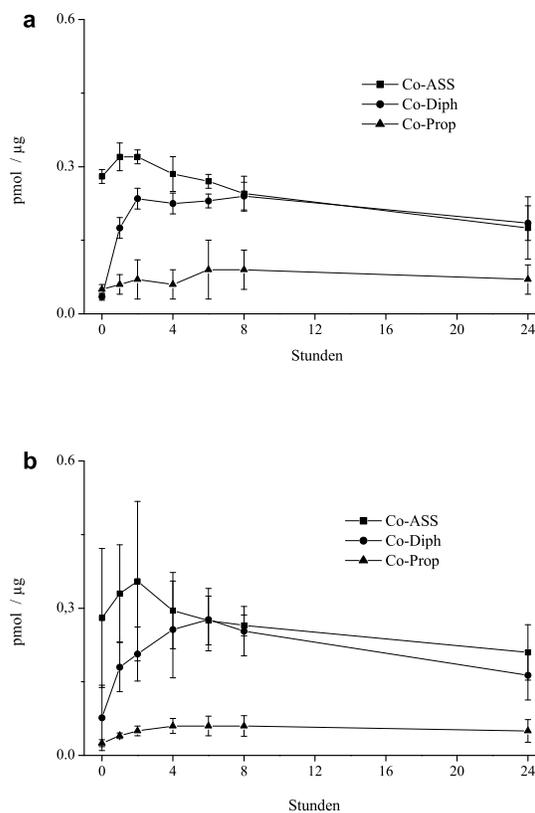


Abbildung 14.2: Zellaufnahme bei a) LAMA-84 und b) K-562 (MW( $\pm$  Stabw.), n=2)

Wie aus Abbildung 14.2a/b ersichtlich, zeigen die Komplexe bei beiden

untersuchten Zellkulturen im wesentlichen das selbe Zellaufnahmeverhalten. Die Aufnahme ist innerhalb von wenigen Stunden Inkubation abgeschlossen und in weiterer Folge stellt sich ein relativ stabiles Plateau ein bzw. kommt es zu einer leichten kontinuierlichen Abnahme der intrazellulären Substanzkonzentration. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch an Brustkrebszellen beobachtet (siehe Abschnitt 13.2). Die höchsten erreichten Werte liegen im Bereich 0.24-0.32 pmol/ $\mu$ g und liegen somit deutlich unter den an den Brustkrebskulturen beobachteten Werten. Somit kann die geringere Wirksamkeit der Komplexe hier durchaus Folge einer geringeren zellulären Substanzkonzentration sein. Das unterschiedliche Wirkprofil an LAMA-84 und K-562 hängt aber nicht mit unterschiedlichen Anreicherungsseigenschaften der Wirkstoffe zusammen. Interessanterweise wird Co-ASS im Gegensatz zu dem lipophileren Co-Diph schneller (innerhalb weniger Minuten, siehe Zeitpunkt 0 Stunden) und etwas stärker in die Zellen aufgenommen. In weiterer Folge deutet sich bei Co-ASS ein leichter Abbau der zellulären Konzentration an, während Co-Diph über einen längeren Zeitraum stabilere Werte liefert. Somit könnte einsetzender Metabolismus bzw. Ausschleusung von Co-ASS dessen etwas geringere Wirksamkeit an LAMA-84 erklären. Die cytotoxische Wirksamkeit steht aber nicht direkt in Zusammenhang mit der zellulären Konzentration, da ja auch der äusserst schwach angereicherte Komplex Co-Prop wirksam ist, bzw. bei K-562 Zellen die selben Aufnahmemuster keine antiproliferative Aktivität hervorriefen. Die Reihenfolge der Lipophilie (Co-Diph > Co-ASS > Co-Prop, siehe Abschnitt 7) korreliert nicht mit der Konzentration in den Zellen (Co-ASS > Co-Diph > Co-Prop).

## 14.4 Zusammenfassung

Cobalt-Alkin-Komplexe zeigen zellwachstumshemmende Aktivität an Leukämie- und Lymphom-Zellkulturen. Die Wirksamkeit ist schwächer ausgeprägt als bei Brustkrebskulturen, einhergehend mit einer verringerten Aufnahme der Wirkstoffe in die Lymphom- und Leukämiezellen. Eine Korrelation zwischen cytotoxischer Aktivität und Zellaufnahme kann nicht festgestellt werden.[139]

# Kapitel 15

## Kolonkarzinomzellen

Mit 30-40 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr sind kolorektale Karzinome (Kolonkarzinom und Rektumkarzinom) das zweithäufigste Karzinom beim Mann und das dritthäufigste bei der Frau. Die Therapie erfolgt primär operativ. Zur Chemotherapie werden vor allem 5-Fluorouracil und Oxaliplatin verwendet.[119]

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde die Kolonkarzinomzellkultur HT-29 herangezogen. Es handelt sich dabei um COX-2 überexprimierende Zellen [140]. Cobalt-Alkin-Komplexe sind (wie in Abschnitt 11 beschrieben) potente Hemmstoffe von Cyclooxygenasen. Folglich sollten COX-2 positive Tumorzellen besonders sensitiv gegenüber der Einwirkung der Komplexe sein. Da die HT-29 Zellkultur in der Gruppe neu etabliert wurde, wurden eingangs Vorversuche zur Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen durchgeführt.

### 15.1 Vorversuche

Zur Untersuchung der Cytotoxizität wird im allgemeinen folgende Vorgangsweise gewählt:

- Aussaat einer geringen Menge an Zellen in 96-Lochplatten
- Vorinkubation
- Substanzzugabe
- Abstoppen / Messung

Die Menge der dabei bei der Aussaat verwendeten Zellen sowie die Dauer der Vorinkubation können wesentlichen Einfluß auf das Testergebnis nehmen,

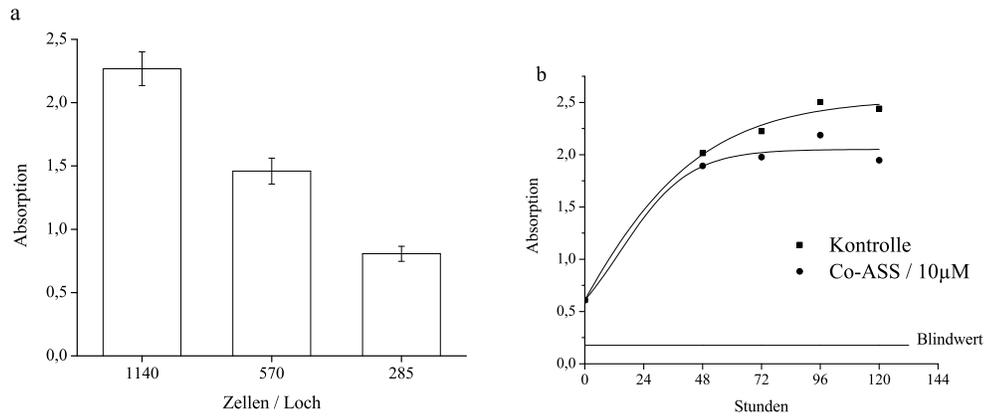


Abbildung 15.1: a.) Absorption nach 3 Tagen Inkubation (MW( $\pm$  Stabw.), n=32) b.) Wachstum nach 3 Tagen Vorinkubation mit 285 Zellen / Loch (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

zumal diese Parameter die bei der Substanzzugabe (Zeitpunkt 0) vorhandene Zellmenge bestimmen. Da die hier behandelten HT-29 Kolonkarzinomzellen in unserer Gruppe neu 'etabliert' wurden, war es nötig Vorversuche bezüglich der Aussaatmenge, Vorinkubationszeit und geeigneter Abstopzeit durchzuführen. Die Experimente wurden wie in Abschnitt 17.10 beschrieben mit den erwähnten Änderungen ausgeführt.

Abbildung 15.1a zeigt mit dem Kristallvioletttest (siehe Abschnitt 17.10) ermittelte Absorptionen von verschiedenen Aussaatmengen HT-29 Zellen nach 3 Tagen Inkubation. Die Werte sind im Vergleich mit MCF-7 und MDA-MB-231 als sehr hoch einzustufen: MCF-7 (Aussaatmenge: 1000 Zellen/Loch) bzw. MDA-MB-231 (Aussaatmenge: 500 Zellen/Loch) zeigen nach dreitägiger Inkubation Absorptionen im Bereich 0.3-0.5, bei HT-29 werden Werte über 0.8 ermittelt. Die Absorption des Lösungsmittels (Blindwert) beträgt im Vergleich ca. 0.2.

Im nächsten Schritt wurde das weitere Zellwachstum nach Aussaat einer geringen Menge an Zellen (285 Zellen pro Loch) und 3 Tagen Vorinkubation untersucht. Abbildung 15.1b zeigt die Absorptionen einer unbehandelten Kontrolle sowie von mit 10µM Co-ASS inkubierten Zellen. Der Startwert (0 Stunden, Ende der Vorinkubation) ist mit A=0.6 schon relativ hoch und das exponentielle Wachstum der Zellen ist schon innerhalb von 48 Stunden beendet. 10µM Co-ASS beeinflussen die Proliferation somit nur leicht. Der hohe Startwert und die damit verbundene sehr kurze exponentielle Wach-

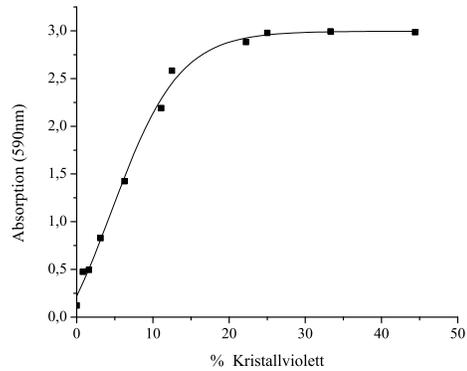
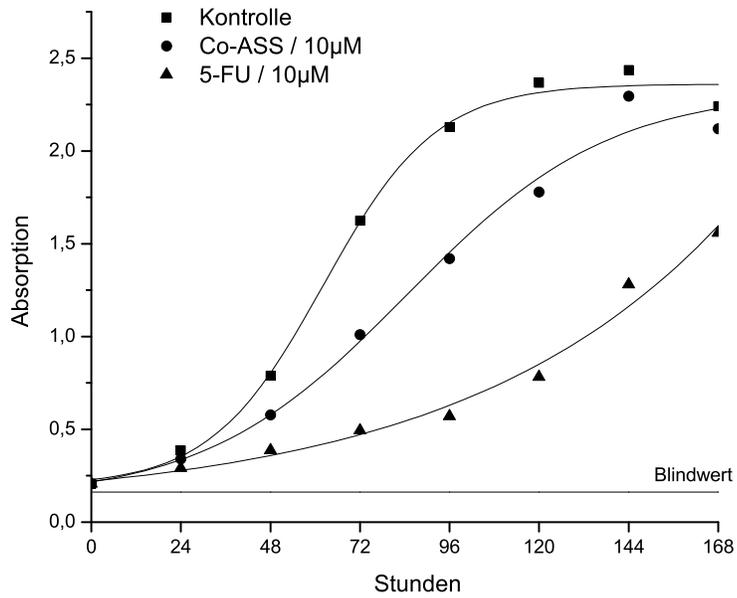


Abbildung 15.2: oben: Wachstumsverhalten von HT-29: Aussaat von 285 Zellen/Loch, 2 Tage Vorinkubation. unten: Linearität der Absorption von mit 70% EtOH verdünnter Kristallviolettlösung (MW, n=6)

tumsphase führen also nicht zu optimalen Versuchsbedingungen. Als nächster

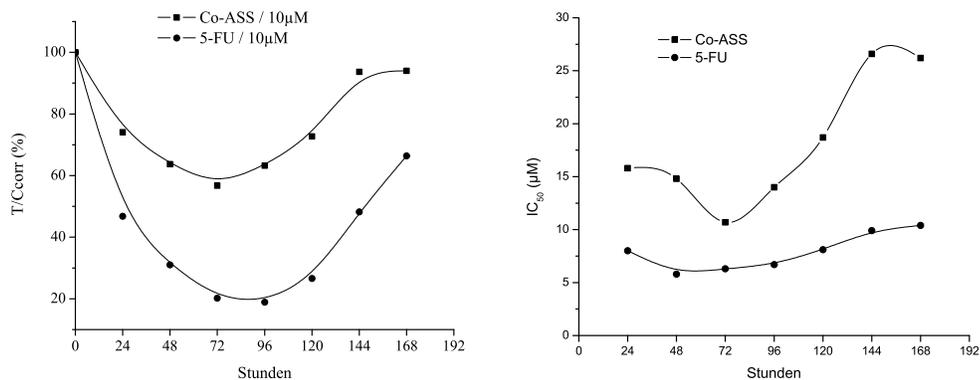


Abbildung 15.3: a) T/Ccorr(%) b) IC<sub>50</sub> (MW, n=6)

Schritt wurde die Vorinkubationszeit bei den weiteren Versuchen auf 2 Tage verkürzt. Bei diesen Experimenten liegt der Startwert (Ende Vorinkubation) mit  $A=0.21$  nur knapp über dem Lösungsmittelblindert ( $A=0.16$ ). Somit bleiben die Zellen nach Ende der Vorinkubation ca. 96 Stunden im linearen Wachstumsbereich. Danach scheint sich bei der unbehandelten Kontrolle vermutlich aufgrund von 'Platzproblemen' ein Gleichgewicht aus absterbenden und neu wachsenden Zellen einzustellen (siehe Abbildung 15.2 oben). Dabei ist anzumerken, dass die Linearität der zur Färbung verwendeten Kristallviolettlösung bis in Absorptionsbereiche von ca.  $A=2.58$  ( $r^2 = 0.9968$ ) gegeben ist (siehe Abbildung 15.2 unten). Somit liegen die Absorptionenwerte nach mehr als 96 Stunden Inkubation (120-168 Stunden) mit  $A= 2.1-2.4$  knapp unterhalb des Endes des linearen Absorptionsverlaufs, was bei der Interpretation dieser Messdaten unbedingt berücksichtigt werden sollte. Wie aus Abbildung 15.2 oben ersichtlich, können die behandelten ( $10\mu\text{M}$  Co-ASS bzw. 5-FU) Kulturen bei Inkubation über mehr als 96 Stunden nicht mehr zuverlässig mit dem Kontrollwert verglichen werden, da dieser mehr oder weniger konstant bleibt (Gleichgewichtseinstellung im Zellwachstum, Ende des linearen Messbereiches).

Abbildung 15.3 zeigt die Interpretation der Messdaten als T/Ccorr(%) von  $10\mu\text{M}$  Co-ASS bzw. 5-FU und als IC<sub>50</sub>-Wert. Während der ersten 72-96 Stunden nehmen bei Co-ASS und 5-FU sowohl T/Ccorr (%) und IC<sub>50</sub> ab, während bei längerer Inkubation (> 96 Stunden) ein Wiederansteigen zu beobachten ist. Bei der schwächer wirksamen Substanz Co-ASS nähern sich die T/Ccorr(%) -Werte wieder dem Ausgangsniveau an, der IC<sub>50</sub> steigt von  $10.7\mu\text{M}$  (72 Stunden) auf über  $26\mu\text{M}$ . Bei der stärker wirksamen Substanz

5-FU ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt. Dies ist auf die intensivere Beeinträchtigung des Zellwachstums während der ersten 96 Stunden der Substanzeinwirkung zurückzuführen. Die Wirkungsminderung bei längerer Inkubation sollte im Zusammenhang mit der verlorenen Wachstumsaktivität der Kontrollkultur bei Inkubationszeiten länger als 96 Stunden gesehen werden. Die weiteren  $IC_{50}$ -Messungen wurden deshalb mit einer Aussaatmenge von ca. 285 Zellen pro Loch, 2 Tagen Vorinkubation und Abstoppen nach 72 Stunden durchgeführt. Die detaillierten Versuchsbedingungen sind in Abschnitt 17.10 beschrieben.

## 15.2 Ergebnisse

Abbildung 15.4 zeigt exemplarisch erhaltene Dosis-Wirkungskurven, Tabelle 15.1 gibt eine Übersicht über die  $IC_{50}$ -Werte. Konnten keine  $IC_{50}$ -Werte berechnet werden, wurde der T/Ccorr(%) Wert der höchsten untersuchten Konzentration angegeben.

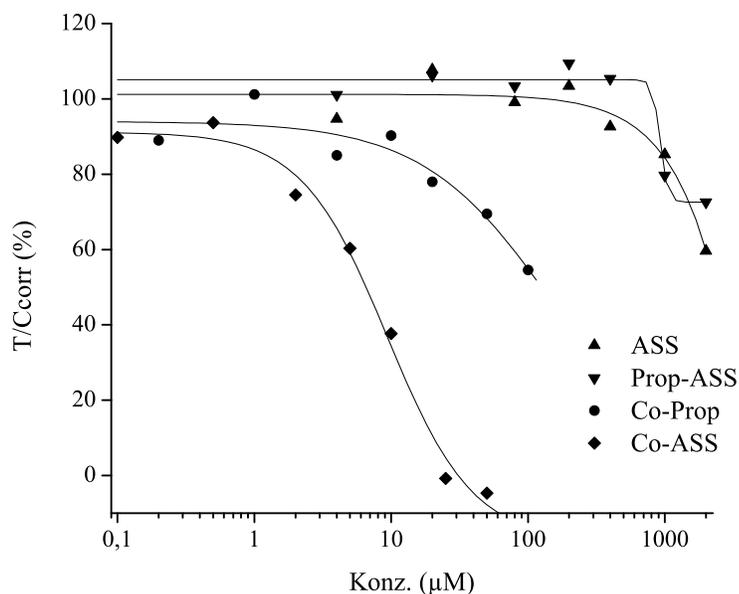


Abbildung 15.4: Dosis-Wirkungskurven an HT-29 Zellen (MW, n=6)

Bei den Ausgangsverbindungen ASS und Prop-ASS können auch in extrem hohen Konzentrationen (bis  $2000\mu\text{M}$ ) keine  $IC_{50}$  -Werte ermittelt wer-

den. Die T/Ccorr(%) betragen bei 2000 $\mu$ M 64% für ASS und 73% für Prop-ASS. Indomethacin zeigte mit IC<sub>50</sub> = 255 $\mu$ M schwache Aktivität. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten aus der Literatur (siehe Abschnitt 3.2). Bei den Cobalt-Alkin-Komplexen war wiederum die Leitsubstanz Co-ASS am aktivsten (IC<sub>50</sub> = 9.8 $\mu$ M), während alle anderen Cobalt-Komplexe äusserst schwach wirkten (IC<sub>50</sub> > 18 $\mu$ M). Die Reihenfolge der Aktivität (Co-ASS > Co-SAL > Co-Benz > Co-Indo > Co-Prop) korreliert mit der an Brustkrebszellen erhaltenen. Wie schon an MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen gezeigt, führt Veresterung von Aspirin und nachfolgende Komplexbildung an Hexacarbonyldicobalt zu einer drastischen Zunahme der antiproliferativen Potenz (siehe Abbildung 15.4). Dieses Konzept gilt analog auch bei Indomethacin und dessen Derivat Co-Indo (siehe Tabelle 15.1).

Da es sich bei der hier untersuchten Zellkultur HT-29 um eine COX-2-positive Linie handelt, sollte die Aktivität der untersuchten (COX-inhibierenden) Komplexe besonders ausgeprägt sein. Die Aktivität war jedoch bei allen untersuchten Verbindungen an den vorweg untersuchten Brustkrebszellen generell weitaus höher (z.B. Co-ASS : IC<sub>50</sub> < 2.0 $\mu$ M, siehe Abschnitt 13.1). Dies unterstreicht den von vielen Autoren angebrachten Zweifel am pharmakologischen Zusammenhang zwischen Hemmung der COX-2 und Antitumorwirkung von NSAR (siehe Abschnitt 3.2). Im Vergleich mit den etablierten Cytostatika 5-Fluorouracil (IC<sub>50</sub> = 7.3 $\mu$ M) und Cisplatin (IC<sub>50</sub> = 8.0 $\mu$ M) kann aber die bei Co-ASS erzielte Aktivität (IC<sub>50</sub> = 9.8 $\mu$ M) als sehr vielversprechend angesehen werden.

Substanz	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	T/Ccorr(%)
ASS	>2000	2000 $\mu$ M: 64% ( $\pm$ 4)
Prop-ASS	>2000	2000 $\mu$ M : 73% ( $\pm$ 1)
Indometacin	255 ( $\pm$ 7)	
Co-Prop	> 100	100 $\mu$ M: 55% ( $\pm$ 0)
Co-SAL	18.4 ( $\pm$ 4.8)	
Co-Benz	30.5 ( - )	
Co-ASS	9.8 ( $\pm$ 3.0)	
Co-Indo	> 50	50 $\mu$ M : 62% ( $\pm$ 13)
Cisplatin	8.0 (-)	
5-Fluorouracil	7.3 ( $\pm$ 1.0)	

Tabelle 15.1: IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) bzw. T/Ccorr(%) an HT-29 Zellen (MW( $\pm$  Stabw.), n=12)

## 15.3 Zusammenfassung

Cobalt-Alkin-Komplexe wurden an Cyclooxygenase-2 überexprimierenden HT-29 Kolonkarzinomzellen auf ihre zellwachstumshemmende Aktivität untersucht. Die Versuchsbedingungen für die Experimente wurden bezüglich Vorinkubation, Aussaatmenge und Abstopzeit optimiert. Die Substanzen zeigten das selbe 'Aktivitätsmuster' wie schon an Brustkrebszellen beobachtet, die  $IC_{50}$  -Werte lagen jedoch deutlich höher.

