

5 Untersuchungen zur biologischen Aktivität von mono- und polynuklearen Alkylamin-Platin-Komplexen

5.1 Strukturen

Die in diesem Kapitel getesteten Substanzen (siehe Abb. 5.1 und 5.2) wurden von Fr. Dullin synthetisiert^[78] und zur Verfügung gestellt.

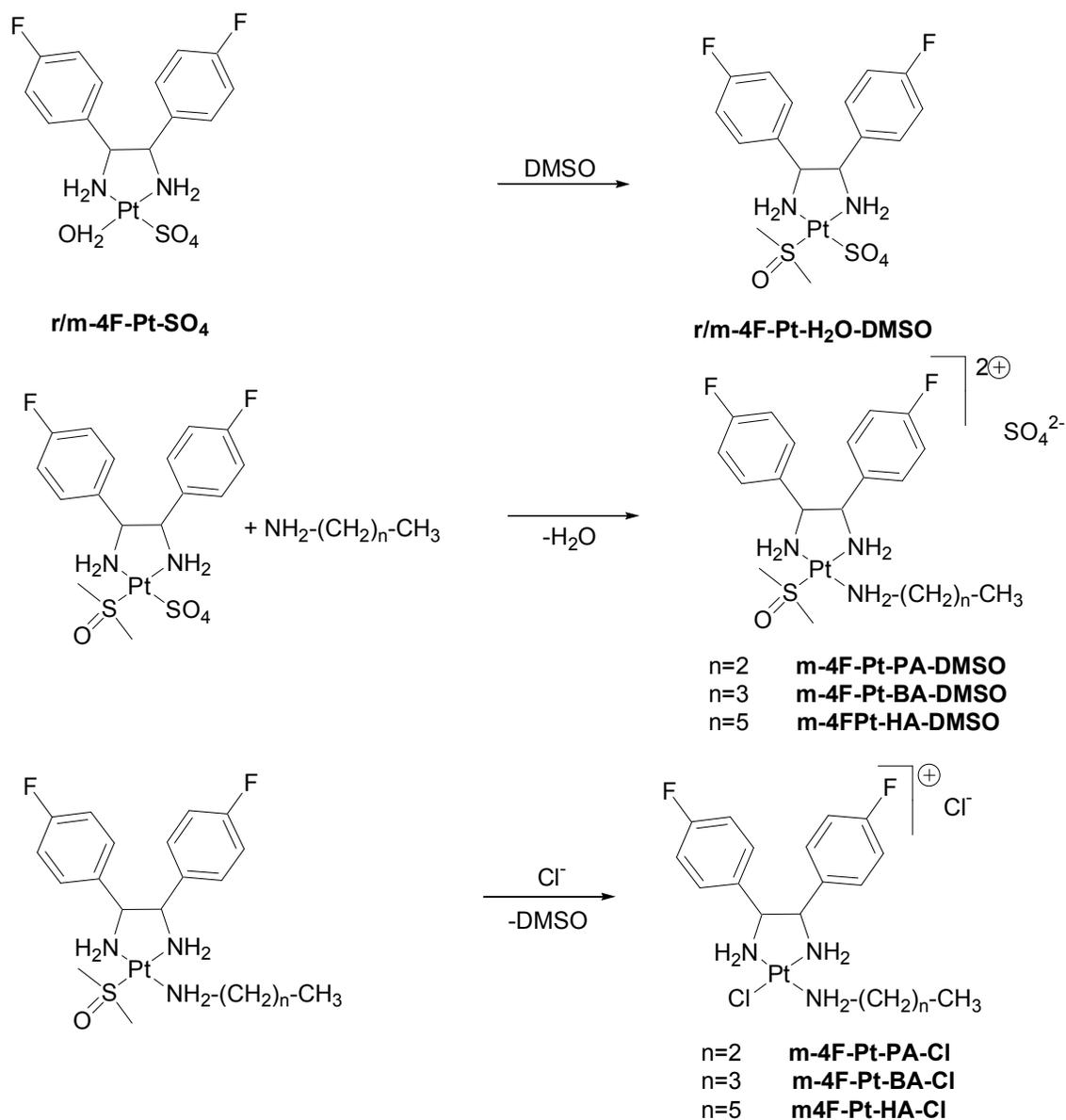


Abb. 5.1 Untersuchte mononukleare Alkylamin-Platin-Verbindungen

Untersuchungen zur biologischen Aktivität von mono- und polynuklearen Alkylamin-Platin-Komplexen

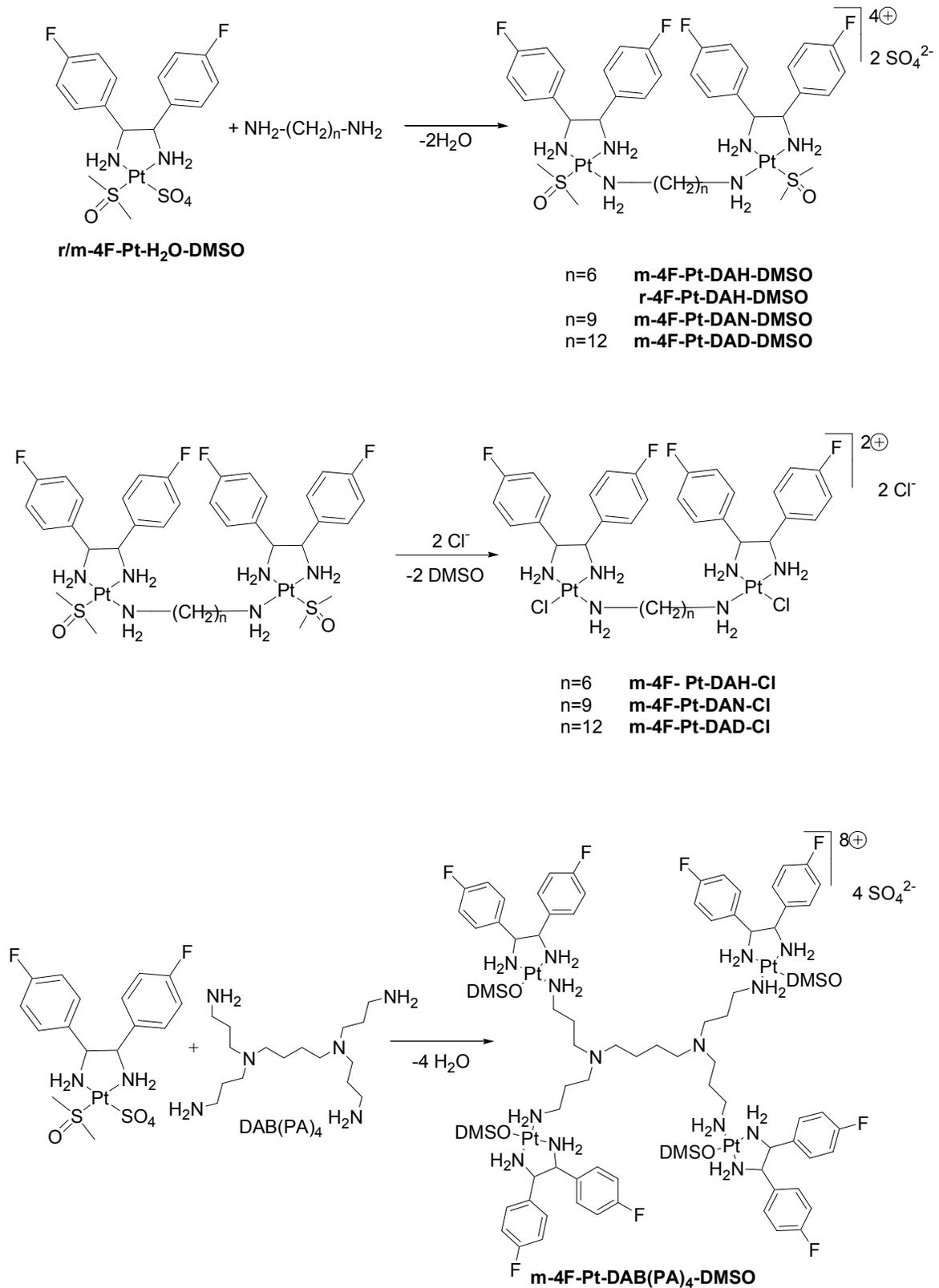


Abb. 5.2 Untersuchte polynukleare Alkylamin-Platin-Verbindungen

5.2 Stabilität von Alkylamin-Platin-Komplexen in physiologischen Puffern

Die Kenntnis der Stabilität der Komplexe in physiologischen Puffersystemen war wichtig, um die biologische Aktivität dieser Verbindungen besser verstehen zu können. Bei literaturbekannten Untersuchungen ist der starke trans Effekt des am Platin koordinierten DMSO festgestellt worden. Das elektronenreiche Schwefelatom des DMSO labilisiert in quadratisch planaren Platin-Komplexen den gegenüber (trans) koordinierten Liganden. So wird in einem dinuklearen Komplex der Brückenligand, der in trans-Stellung zu einem DMSO-Liganden steht, leicht freigesetzt.^[198] Jedoch wurde bisher kein Verlust von chelatisierenden Neutralliganden, wie z.B. von substituierten Ethylendiaminen, beobachtet.^[200,208] Bei der Inkubation von Ethylendiamin-Platin-DMSO-Chloro-Komplexen wird bei Inkubation in Wasser bzw. 0,154mM NaCl-Lösung ein sehr langsamer Austausch von DMSO gegen H₂O bzw. Cl⁻ in Abhängigkeit von der Art des Neutralliganden beobachtet. Hierbei wird beim schnellsten Austausch eine Halbwertszeit von über 73 Stunden beobachtet.^[200] Setzt man einen Ethylendiamin-Platin-DMSO-Chloro-Komplex mit Guanosin-monophosphat (GMP) um, so wird erst langsam der Chlorid-Ligand und dann relativ schnell der DMSO-Rest ausgetauscht. Hier wird eine Destabilisierung des DMSO-Restes durch sterisch anspruchsvolle zum DMSO-Liganden cis-ständige Neutralliganden vermutet.^[210] Untersuchungen zu dinuklearen Verbindungen, die einen DMSO-Liganden in cis-Stellung zum Brückenliganden trugen, sind bisher nicht publiziert worden.

Zur Untersuchung der Stabilitäten von Alkylamin-Platin-Komplexen sollte eine Auftrennung der Edukte und der Produkte erfolgen. Da es sich bei diesen Komplexen um sehr gut wasserlösliche permanente Kationen handelte, war die Kapillarelektrophorese eine sehr gut geeignete Trennmethode. Der permanent kationische Charakter der Verbindungen erlaubte den Einsatz eines Elektrophoresepuffers in einem breiten pH-Wert-Bereich. Bei Verwendung eines Boratpuffers (pH-Wert 9,6) als Trennpuffer wurden trotz kurzer Analysenzeiten sehr breite Peaks mit starken Tailing erhalten. Dies ist auf die Interaktion der Komplexe mit den deprotonierten Silanolgruppen der Kapillare zurückzuführen.^[202] Daher wurde stattdessen im Folgenden ein Phosphatpuffer (pH-Wert

2,7) als Trennpuffer verwendet, da sowohl eine gute Trennung als auch gute Peakformen erhalten wurden.

Zu Beginn wurde das Verhalten von **m-4F-Pt-HA-DMSO** in einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalz-Lösung (Dulbecco's Puffer) untersucht. Als Vergleichsstandard wurde der korrespondierende Chlorokomplex **m-4F-Pt-HA-Cl** eingesetzt. In diesem einfachen System wurde eine schnelle Reaktion des DMSO-Komplexes zum Chlorokomplex beobachtet. Nach fünf Stunden wurde kaum noch DMSO-Komplex detektiert. Die Peakfläche des DMSO-Komplexes ging dabei vollständig in die Fläche des entstehenden Produkts auf, das mit dem Chlorokomplex komigrierte.

Daraufhin wurde das System den Bedingungen der Zellakkumulationsversuche angepasst, indem der Puffer durch das komplexere EMEM-Basalmedium ersetzt wurde. Es enthält zusätzlich zum Chlorid und Phosphat auch viele verschiedene organische Moleküle wie Aminosäuren, die zur Reaktion mit Platinkomplexen befähigt sind. Wie bei der Inkubation in Dulbecco's Puffer wurde in diesem komplexen System nur ein Peak erhalten, der dem Chlorokomplex entspricht.

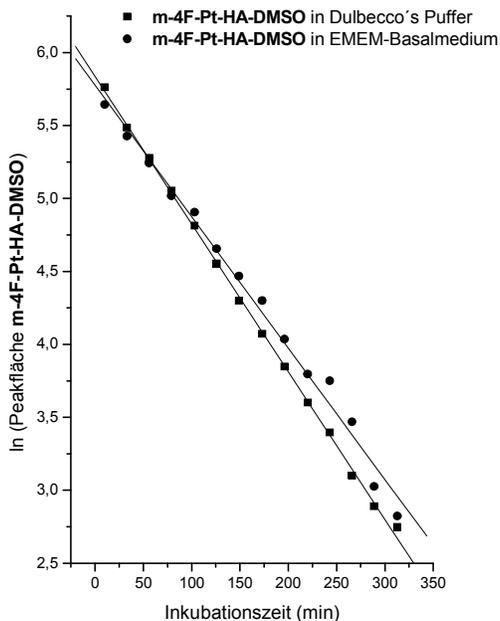


Abb. 5.3 Lineare Regression der Reaktion von **m-4F-Pt-HA-DMSO** zu **m-4F-Pt-HA-Cl**

Komplex	Reaktionskonstante für die Substitution von DMSO gegen Chlorid [min^{-1}]
m-4F-Pt-HA-DMSO in Dulbecco's Puffer	-0,0101
m-4F-Pt-HA-DMSO in EMEM-Basalmedium	-0,0090
m-4F-Pt-DAH-DMSO in Dulbecco's Puffer	-0,0264 (für erste Austauschreaktion)
r-4F-Pt-DAH-DMSO in Dulbecco's Puffer	-0,0230 (für erste Austauschreaktion)

Tab. 5.1 Geschwindigkeitskonstanten für den Austausch eines DMSO-Liganden durch Chlorid

Obwohl der Chloridüberschuß nicht sehr hoch war (in Dulbecco's Puffer ca. 143mM Cl^- zu 3,5mM Komplex entsprach 40fachen Überschuss), ließ sich überraschenderweise eine sehr gute exponentielle Anpassung des Verschwindens des DMSO-Komplexes erstellen. Die Linearisierung gemäß der Kinetik pseudo-erster Ordnung erbrachte R^2 -Werte größer als 0,99 (siehe Abb. 5.3). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Umsetzung des DMSO-Komplexes war bei der Inkubation im EMEM-Basalmedium signifikant niedriger als bei der Inkubation in Dulbecco's Puffer (-0,0101 vs. -0,0090 min^{-1}) (siehe Tab. 5.1). Dies korrelierte sehr gut mit der Chlorid-Konzentration, die beim Basalmedium ca. 89% des Dulbecco's Puffers betrug.

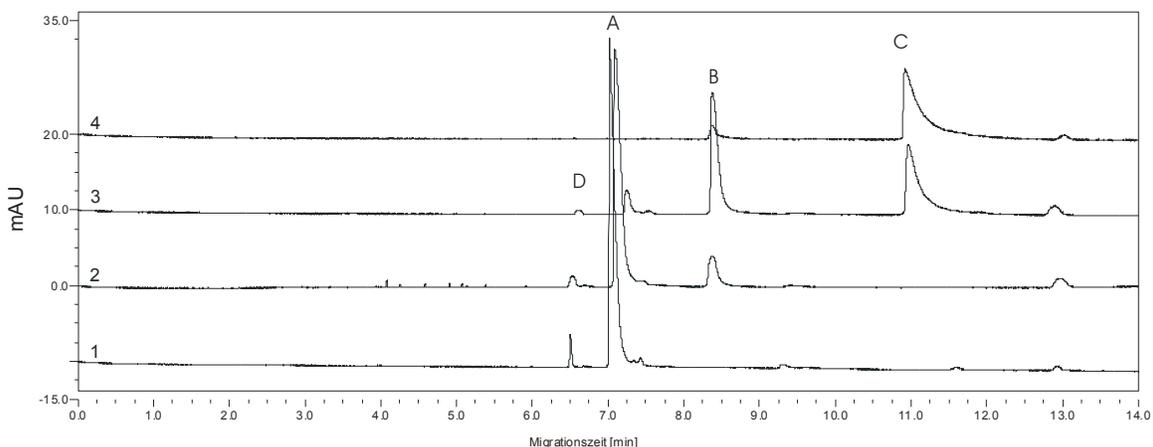


Abb. 5.4 Umsetzung von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** in Dulbecco's Puffer
 Elektropherogramm 1 **m-4F-Pt-DAH-DMSO** Standard
 2 **m-4F-Pt-DAH-DMSO** nach 12 Minuten Inkubation
 3 **m-4F-Pt-DAH-DMSO** nach einer Stunde Inkubation
 4 **m-4F-Pt-DAH-Cl** Standard

Für den dinuklearen Komplex **m-4F-Pt-DAH-DMSO** musste wegen des Vorhandenseins von zwei reaktiven Platinzentren in einem Molekül von einer komplexeren Kinetik ausgegangen werden. In den Elektropherogrammen war auch ein Zwischenprodukt (Abb. 5.4 Peak B) zu erkennen, das eine Mobilität zwischen dem Edukt (Peak A) und dem Endprodukt (Peak C) aufwies. Dieser Peak fand sich auch im Vergleichsstandard des Chlorokomplexes wieder, wie durch Komigration gezeigt wurde. Deshalb konnte man im Wässrigen auf einen teilweisen Austausch von Chlorid durch Wasser schließen. Die manchmal beobachtete zweigipfelige Peakform bei der Umsetzung ließ auf eine fast vollständige Komigration des Monoaqua-monochloro- und des Mono-DMSO-monochloro-Komplexes schließen. Daneben wurde ein weiterer Peak (Peak D) höherer Mobilität als das Edukt gefunden. Die Fläche dieses Peaks verringerte sich wie beim Edukts ebenfalls im Laufe der Inkubation. Hierbei könnte es sich daher um die einfach aquatisierte Form des DMSO-Komplexes handeln.

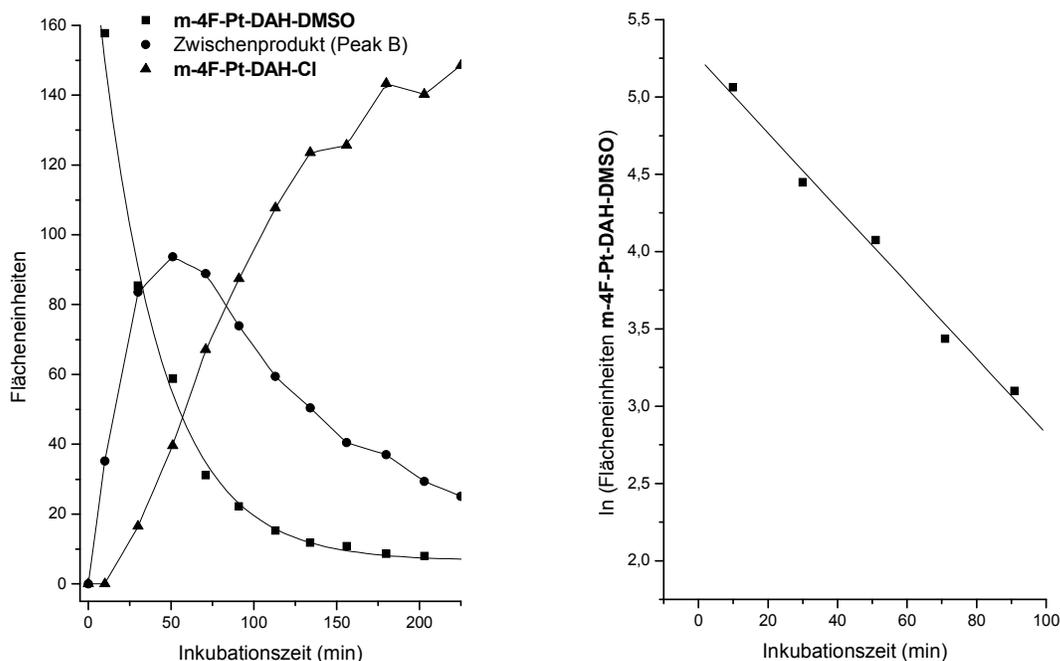


Abb. 5.5 Verlauf der Reaktion **m-4F-Pt-DAH-DMSO** zu **m-4F-Pt-DAH-Cl** in Dulbecco's Puffer (links) und Anpassung des ersten Reaktionsschrittes nach Kinetik pseudo erster Ordnung (rechts)

Die Reaktion von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** zu **m-4F-Pt-DAH-Cl** lief im Vergleich zu **m-4F-Pt-HA-DMSO** tendenziell etwas schneller ab, so dass nach vier Stunden keine Veränderung des Produktspektrums mehr zu beobachten war. Die Anpassung des ersten Reaktionsschrittes gemäß einer Kinetik pseudo-erster Ordnung (siehe Abb. 5.5) ergab eine Geschwindigkeitskonstante, die 2,6fach größer als die des Komplexes **m-4F-Pt-HA-DMSO** war (siehe Tab. 5.1). So war das Ausgangsprodukt nach 90 Minuten nicht mehr nachzuweisen. Da sich die Anzahl der Reaktionszentren verdoppelte, war nur eine Verdoppelung der Geschwindigkeitskonstanten zu erwarten. Wie es zu dieser übermäßigen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit kam, bleibt noch zu untersuchen.

Bei Inkubation in Basalmedium wurde wie beim mononuklearen Komplex lediglich eine leichte Verlangsamung der Reaktion beobachtet. Auch hier traten keine neuen Nebenprodukte auf.

Eine Inkubation mit **r-4F-Pt-DAH-DMSO** zeigte nur einen geringen Unterschied zum meso-konfigurierten Komplex bezüglich des Reaktionsverlaufes und der Reaktionsgeschwindigkeit (ca. 10% langsamer siehe Tab. 5.1)). Das deutete eine untergeordnete Rolle der Konfiguration des Neutralliganden bei dieser Reaktion an.

Aufgrund der geringen Empfindlichkeit des DAD-Detektors lässt sich die Bildung von Nebenprodukten allerdings nicht vollständig ausschließen. Neben dem Überschreiten der Nachweisgrenze bei der Detektion müssen die Nebenprodukte eine elektrophoretische Mobilität beibehalten. Diese würde bei der Reaktion mit Polyanionen oder sehr großen Molekülen komplett oder zumindest stark reduziert, so dass solche Reaktionen sich lediglich in einer Reduktion der Gesamtpeakfläche äußern. Eine dramatische Veränderung ließ sich bei diesen Versuchen nicht detektieren. Auch die klare Abhängigkeit des Verschwindens des DMSO-Komplexes von der Höhe der Chloridkonzentration sprach gegen das Auftreten einer Nebenreaktion mit relevantem Umsatz. Allerdings muss auch die Reaktion der im Medium beinhaltenen Nukleophile mit dem Chlorokomplex in Betracht gezogen werden. Da die Integration bei den stark von Tailing betroffenen Endproduktpeaks Schwierigkeiten bereitete, konnte tendenziell nur die Reduktion der Gesamtpeakfläche um 10% festgestellt werden. Das ließ sich gut mit dem

Austritt von DMSO aus dem Komplex in Einklang bringen, da DMSO eine starke Absorption unter einer Wellenlänge von 220nm zeigte.

5.3 Bindungsverhalten an humanem Serumalbumin

Verbindung	Freier Pt-Anteil nach Ultrafiltration [%]	Freier Pt-Anteil nach ethanolischer Fällung [%]	Konstante irreversible Bindung k [h^{-1}]
m-4F-Pt-PA-DMSO	52±2	72±1	n.b.
m-4F-Pt-BA-DMSO	36±1	92±4	n.b.
m-4F-Pt-HA-DMSO	15±4	101±4	n.b.
m-4F-Pt-DAH-DMSO	8,5±0,4	13±1	n.b.
r-4F-Pt-DAH-DMSO	1,6±0,1	8,7±0,3	-2,201
m-4F-Pt-DAN-DMSO	6,7±0,1	11±1	n.b.
m-4F-Pt-DAD-DMSO	0,5±0,2	16±1	n.b.
m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO	11±1	23±1	n.b.
m-4F-Pt-PA-Cl	53±3	76±1	-0,168
m-4F-Pt-BA-Cl	43±4	99±7	-0,274
m-4F-Pt-HA-Cl	17±1	71±1	-0,268
m-4F-Pt-DAH-Cl	9,4±0,7	60±3	-0,486
m-4F-Pt-DAN-Cl	1,1±0,1	35±3	-0,551
m-4F-Pt-DAD-Cl	0,4±0,1	36±1	-0,527
m-4F-Pt-DMSO-H₂O	58±2	55±2	-0,548
m-4F-Pt-Cl₂	51±6	92±5	-0,409
Cisplatin	76±4	100±6	-0,321

n.b.: nicht bestimmbar

Tab. 5.2 Proteinbindungscharakteristika der Alkylamin-Platin-Verbindungen (n=3 für Wiederfindungsversuche)

Während es zur Bindung konventioneller Platin-Verbindungen an das HSA viele Studien gibt^[157,171], war ähnliches für polynukleare Komplexe bisher noch nicht veröffentlicht worden, so dass über deren Proteinbindungsverhalten wenig bekannt war. Daher wurde, wie in Kap. 3.2 beschrieben, der wiedergefundene Anteil an betreffender Verbindung

nach Ultrafiltration und ethanolischer Fällung sowie die Reaktionskonstante der irreversiblen Bindung an HSA bestimmt (siehe Tab. 5.2).

Alle getesteten Verbindungen weisen stärkere Wechselwirkungen mit dem Serumalbumin als Cisplatin auf: In Fall der mononuklearen Alkylamin-Platinverbindungen wurde für die im Ultrafiltrat gefundene Menge beobachtet, dass eine Verlängerung der Alkylkette eine Erniedrigung bewirkte (52%(DMSO) bzw. 53%(Cl) für n=3 vs. 36%(DMSO) bzw. 43%(Cl) für n=4 vs. 15%(DMSO) bzw. 17%(Cl) für n=6). Bei der nach ethanolischer Fällung im Überstand gefundenen Menge war eine solche Korrelation nicht nachweisbar. Die Wiederfindung bewegte sich unabhängig von der Alkylkettenlänge zwischen 71 und 101%. Der Anteil, der somit reversibel über hydrophobe Wechselwirkungen gebunden war, war teilweise sehr hoch (von 20% für **m-4F-Pt-PA-DMSO** und 86% für **m-4F-Pt-HA-DMSO**). Ein gravierender Unterschied zwischen DMSO- und Chloro-Komplexen war nicht zu erkennen.

Bei den polynuklearen Verbindungen **m-4F-Pt-DAH-DMSO**, **m-4F-Pt-DAN-DMSO** und **m-4F-Pt-DAD-DMSO** wurde im Ultrafiltrat immer sehr wenig (<10%) freie Verbindung vorgefunden. Die im Ultrafiltrat gefundenen Mengen waren umso niedriger, je länger die verbrückende Alkylkette war (8,5%(DMSO) bzw. 9,4%(Cl) für n=6 vs. 6,7%(DMSO) bzw. 1,1%(Cl) für n=9 vs. 0,5%(DMSO) bzw. 0,4%(Cl) n=12). Das Dendrimerkonjugat **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** zeigte mit dem größten, strukturell abweichenden Brückenliganden die größte freie Platinmenge der polynuklearen DMSO-Komplexe im Ultrafiltrat (11%), obwohl die unterschiedliche Molekülgeometrie als auch die höhere Polarität des Dendrimers als Brückenligand eine Rolle spielen könnte.

Bei den im Überstand der ethanolischen Fällung gefundenen Platinmengen war hingegen keine Korrelation zu erkennen. Hier haben alle dinuklearen DMSO-Verbindungen eine Wiederfindung zwischen 11% (**m-4F-Pt-DAN-DMSO**) und 16% (**m-4F-Pt-DAD-DMSO**). Das Dendrimerkonjugat **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** bildete hier mit 23% freiem Platin die Ausnahme. Die geringen Unterschiede zwischen den Wiederfindungen nach Ultrafiltration und ethanolischer Präzipitation deuteten insgesamt auf einen sehr geringen reversibel hydrophob gebundenen Anteil hin. Möglicherweise lagen die größten

Anteile der Verbindungen elektrostatisch an das HSA gebunden vor. Das war sehr gut mit den Werten der Chloro-Komplexe **m-4F-Pt-DAH-Cl**, **m-4F-Pt-DAN-Cl** und **m-4F-Pt-DAD-Cl** in Einklang zu bringen, deren kationische Ladung gegenüber den DMSO-Komplexen reduziert war. So zeigte sich bei der im Ultrafiltrat gefundenen Menge kein Unterschied zwischen DMSO- und Chlorokomplexen (s.o.), während bei der ethanolischen Fällung für die Chlorokomplexe eine deutlich größere Menge (zwischen 47% für n=6 und 20% für n=12 Unterschied zwischen DMSO und Chlorokomplexen) im Überstand zu finden war.

Der Einfluss der Konfiguration des Neutralliganden wurde exemplarisch an **r-4F-DAH-DMSO** und **r-4F-DAH-DMSO** untersucht. Für **r-4F-DAH-DMSO** wurde wie bei **r-4F-Pt-Cl₂** (siehe Kap. 4.1.1) eine Reduzierung der Wiederfindung nach Ultrafiltration im Vergleich zum korrespondierenden meso-konfigurierten Komplex gefunden.

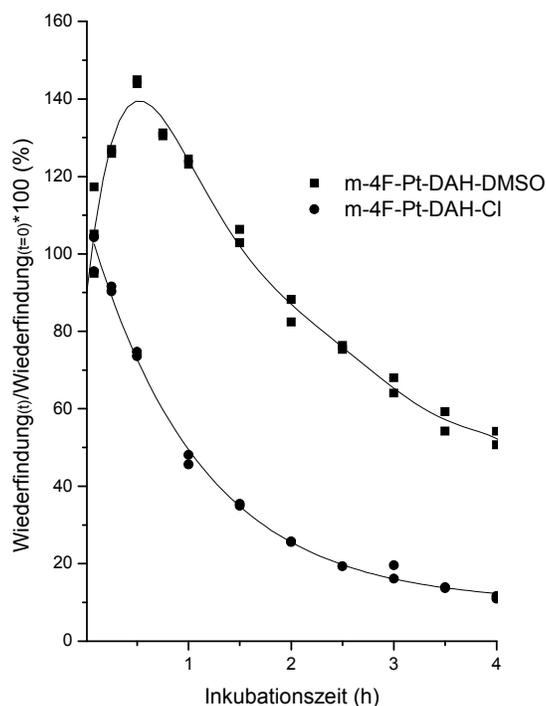


Abb. 5.6 Verlauf der Proteinbindungskinetik für die Komplexe **m-4F-Pt-DAH-DMSO** und **m-4F-Pt-DAH-Cl**

Die Geschwindigkeitskonstanten zeigten ein ungewöhnliches Bild: Während die Chlorokomplexe der Alkylamin-Platin-Komplexe eine exponentielle Abnahme an freier

Platinverbindung im zeitlichen Verlauf einer Inkubation zeigten, wiesen die DMSO-Komplexe eine Besonderheit auf (siehe Abb. 5.6). Die Konzentration an freier Verbindung nahm in den ersten 30 Minuten der Inkubation immer zu, um dann langsamer und ebenfalls exponentiell anpassbar abzufallen. Dieses war auf die schnelle Konversion des DMSO-Komplexes zu dem korrespondierenden Chlorokomplex in Dulbecco's Puffer zurückzuführen (siehe Kap. 5.2). Da dieser deutlich höhere Wiederfindungen im Überstand der ethanolischen Präzipitation aufwies, kam es zu diesem erst einmal paradox erscheinenden Kurvenverlauf. Im Falle des **r-4F-Pt-DAH-DMSO** stellte sich diese Besonderheit nicht ein. Hier wurde eine derartig schnelle irreversible Proteinbindung beobachtet, dass die Konversion in den Chlorokomplex eine untergeordnete Rolle spielte.

Die Einführung von Alkylaminliganden führte zu einer Reduktion der Reaktivität gegenüber HSA. So wurde für die Alkylamin-Platin-Komplexe ($-0,168\text{h}^{-1}$ bis $-0,274\text{h}^{-1}$) verglichen mit **m-4F-Pt-Cl₂** ($-0,409\text{h}^{-1}$) und **m-4F-Pt-H₂O-DMSO** ($-0,548\text{h}^{-1}$) eine starke Reduktion der Reaktivität beobachtet. Diese Verbindungen waren auch weniger reaktiv als Cisplatin ($-0,321\text{h}^{-1}$). Die dinuklearen Verbindungen zeigten Reaktionskonstanten, die ungefähr doppelt so groß wie die der mononuklearen Alkylamin-Platin-Komplexe waren (zwischen $-0,486$ bis $-0,551\text{h}^{-1}$). Das deutet auf eine ähnlich gute Zugänglichkeit der beiden Platinkerne für den nukleophilen Angriff wie bei den mononuklearen Verbindungen hin. Eine Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge wurde weder bei den mononuklearen noch bei den polynuklearen Verbindungen beobachtet.

Die Konfigurationsänderung an dem Neutralliganden des 4F-Pt-DAH-DMSO-Komplexes von meso zu rac führte hingegen zu einer starken Zunahme (mindestens dreifach) der Reaktionsgeschwindigkeiten für die irreversible Bindung. Dieser Effekt wurde schon bei den mononuklearen Verbindungen beobachtet. Die Koordination von DMSO an den Komplex **r-4F-Pt-H₂O-SO₄** führte ebenfalls zu einer schnelleren irreversiblen Proteinbindung als bei dem korrespondierenden meso-konfigurierten Komplex **m-4F-Pt-H₂O-SO₄** (siehe Kap. 4.1.1). Hier schien die Koordinierung von DMSO den nukleophilen Angriff des HSA an das Platinatom zu erleichtern. Dieser Effekt war bei dem racemisch konfigurierten Neutralliganden besonders stark ausgeprägt. Bemerkenswerterweise zeigte die Austauschgeschwindigkeit des DMSO's gegen Chlorid (siehe kapillarelektropho-

retische Untersuchungen Kap. 5.2) beim **r-4F-Pt-DAH-DMSO** gegenüber dem **m-4F-Pt-DAH-DMSO** keinen großen Unterschied, der auf eine übermäßige Entschirmung des Platinatoms oder eine übermäßige Destabilisierung des DMSO-Liganden schließen ließ.

5.4 Zytotoxizität an der MCF-7-Zelllinie

Alle Verbindungen wurden auf ihr antiproliferatives Verhalten an MCF-7 Brustkrebszellen im Konzentrationsbereich von 0,5-5 μ M getestet. Dabei hatten die mononuklearen Alkylamin-Platinverbindungen keinen Effekt auf das Zellwachstum.^[75] Diese Verbindungen weisen neben dem stabil gebundenen Ethylendiaminneutraliganden einen als stabil gebunden geltenden Alkylaminliganden auf, wie durch kapillarelektrophoretische Untersuchungen (siehe Kap. 5.2) gezeigt wurde. Somit bleibt den mononuklearen Platin-Verbindungen nur eine Koordinationsstelle für die Bindung an DNA. Da solche Verbindungen bisher keine Wirkung nach „Cisplatinmodus“ zeigten^[200,210], erschien dies hier ebenfalls nicht möglich.

Für die dinuklearen Substanzen wurden ebenfalls kaum antiproliferative Effekte gefunden (siehe Abb. 5.7), obwohl hier zwei Koordinationsstellen zur Ausbildung von „*interstrand crosslinks*“ zur Verfügung stehen. Für dinukleare Komplexe mit sterisch anspruchsvollen Neutraliganden waren zu Beginn der Arbeit vier Untersuchungen veröffentlicht worden. Die Substitution beider NH₃-Liganden in den Transplatineinheiten des Komplexes BBR3005 (siehe Abb. 1.6) durch Pyridin führt zu einem starken Aktivitätsverlust.^[43] Bereits die Substitution nur eines NH₃-Liganden durch Pyridin^[54], durch einen Kronenether^[211] oder einen Quinolinliganden^[212] führt zu einem abschwächenden Effekt. Werden hingegen Methyl-substituierte Pyridine eingesetzt, wird gegenüber dem unsubstituierten Pyridinliganden ein Aktivitätszuwachs beobachtet, wobei teilweise sogar niedrigere IC₅₀-Werte als für den NH₃-Liganden tragenden Ausgangskomplex BBR3005 gefunden werden.^[54,211] Daher konnte man von dem sterischen Anspruch des Neutraliganden nicht auf die zu erwartende Zytotoxizität schließen. Jüngst publizierte Ergebnisse zeigen ebenfalls den rapiden Wirkungsabfall bei Einführung eines sterisch anspruchsvollen und lipophilen Ethylendiaminneutraliganden^[211] bzw. eines Kronenethers^[212] oder Quinolins.^[213]

Interessanterweise zeigt die tetranukleare Verbindung **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** eine moderate zytotoxische Wirkung. Bei einer Konzentration von 5 μM wird das Zellwachstum nach 150h um knapp 50% gehemmt (siehe Abb. 5.7). Im Vergleich zu dem Platindendrimer-Addukt (Struktur siehe Abb. 1.8), das im Gegensatz zu der hier untersuchten Struktur Transplatineinheiten aufwies, war eine deutliche Vergrößerung der Aktivität zu beobachten. So wird für diese Substanz an der MCF-7-Zelllinie ein IC_{50} -Wert von knapp 31 μM ermittelt, wobei der Inkubationszeitraum nicht bekannt ist.^[51]

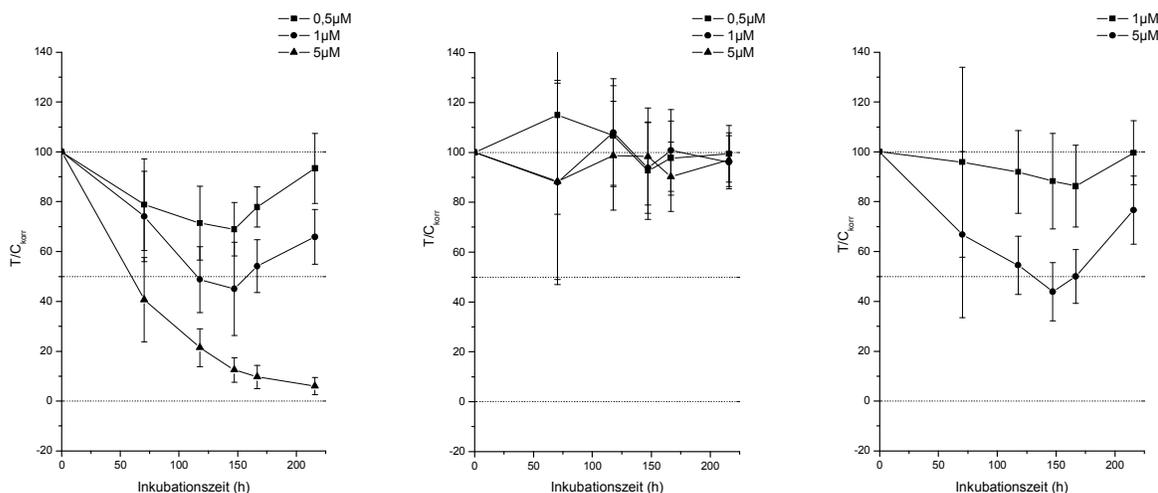


Abb. 5.7 Antiproliferativer Effekt von Cisplatin als Standard (links), **m-4F-Pt-DAH-DMSO** (Mitte) und **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** (rechts) an MCF-7 Zellen

Für die geringe Aktivität dieser Platinkomplexe kamen zwei Erklärungen in Frage. Zum einen könnte die hohe, in Kap. 5.3. diskutierte Proteinbindung die effektiv verfügbare Wirkstoffmenge so stark reduzieren, dass im untersuchten Konzentrationsbereich kein Effekt beobachtet wurde. Zum anderen könnte die Aufnahme in die Zellen gehindert sein. Um den Einfluss der Proteinbindung zu zeigen, wurde daher ein modifizierter Chemosensitivitätstest durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit der Substanz **m-4F-Pt-DAN-Cl** 6 Stunden in Medium ohne Serumzusatz inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen im substanzfreien, FCS-haltigen Medium weiterinkubiert. Mit denselben Konzentrationen wurde auch eine Dauerexposition in FCS-haltigen Medium durchgeführt. Es wurde ein deutlicher antiproliferativer Effekt (40%ige Wachstumshemmung nach 72-150h durch 10 μM) erzielt, wenn bei der Substanzexposition kein Protein im Inkubations-

medium vorhanden war. Im Gegensatz dazu führte die Dauorexposition in proteinhaltigem Medium zu keiner nennenswerten Abweichung von der Kontrollgruppe (siehe Abb. 5.8). Das verdeutlichte den starken Einfluss der Proteinbindung auf die Zytotoxizität dieser Verbindungen.

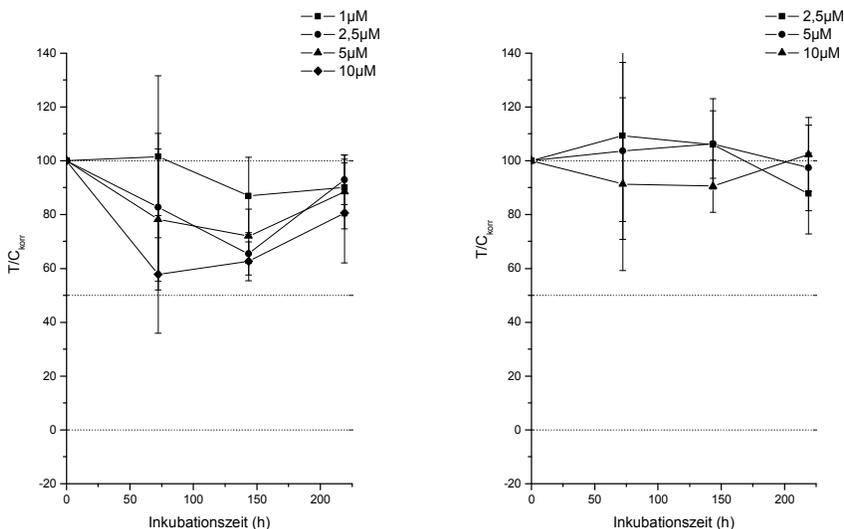


Abb. 5.8 Antiproliferativer Effekt von **m-4F-Pt-DAN-Cl** nach Kurzzeitexposition (6h) in FCS-freiem Medium und Weiterkultur in FCS-haltigem Medium (links) und Langzeitexposition in FCS-haltigem Medium (rechts) an MCF-7-Zellen

5.5 Untersuchungen zur Zellaufnahme von polynuklearen Platinverbindungen

Es wurde vermutet, dass Alkylamin-Platinverbindungen aufgrund ihrer Ladung nicht in die Zellen aufgenommen werden.^[51] Daher wurden Zellaufnahmeversuche durchgeführt. Diese sollten zum einen klären, wie die Komplexe in die Zellen aufgenommen werden. Zum anderen sollte der Einfluss der Abgangsgruppe, der Konfiguration des Ethylendiaminneutraliganden und struktureller Änderungen am Alkylaminliganden auf die Zellaufnahme untersucht werden.

5.5.1 Untersuchungen zum Mechanismus der Zellaufnahme

5.5.1.1 Abhängigkeit der intrazellulären Platinkonzentration von der Substanzkonzentration im Medium

Es wurde die Abhängigkeit der zellulären Platinkonzentration von der Substanzkonzentration im Medium untersucht. Ist der dominierende Aufnahmeweg die passive Diffusion, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Ist hingegen ein Transportmechanismus beteiligt, so tritt mit steigender Konzentration eine Sättigung des Transporters ein (siehe Abb. 5.9).

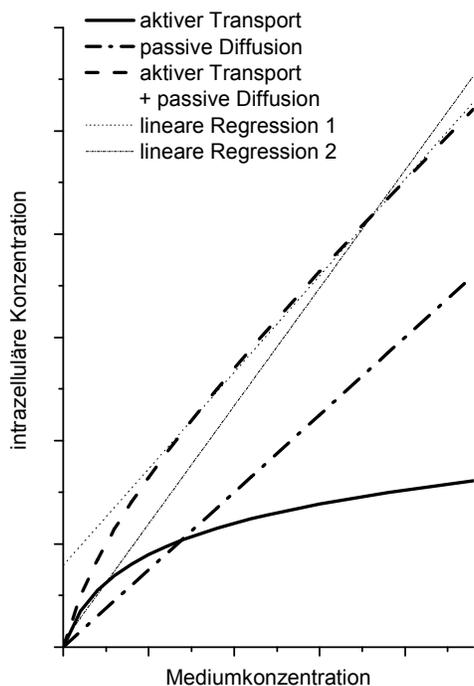


Abb. 5.9 Verschiedene Möglichkeiten der durch verschiedene Transportprozesse verursachten Abhängigkeit der intrazellulären Konzentration von der Mediumkonzentration

Ausgangspunkt war die Leitverbindung **m-4F-Pt-Cl₂**, bei der das gute Ansprechverhalten bei Tumoren des Brustgewebes eine spezifische Interaktion nahe legte.^[70,214] Durch die Koordinierung mit Alkylaminen an diesen Komplex entstehen kationisch geladene Platinkomplexe. Als typische Vertreter ihrer Stoffklassen wurden die Verbindungen **m-4F-Pt-HA-DMSO** und **m-4F-Pt-DAH-DMSO** ausgewählt.

Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde zeitgleich Zellen geerntet, die mit vier verschiedenen Konzentrationen einer Platinverbindung inkubiert worden waren. Dabei wurde die Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, d.h. sowohl in den Phasen starker intrazellulärer Konzentrationsänderung als auch in eventuell vorhandenen Gleichgewichtsphasen.

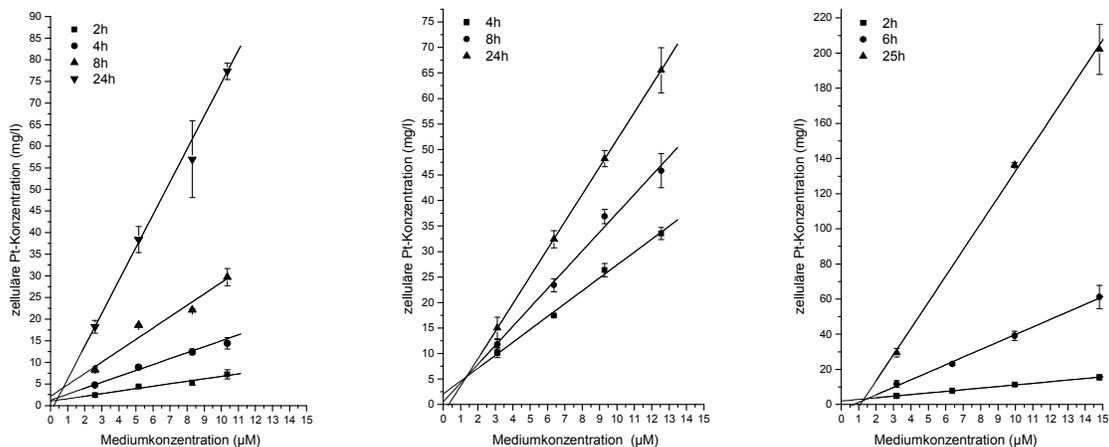


Abb. 5.10 Abhängigkeit der zellulären Platinkonzentration von der Mediumkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten bei Inkubation mit **m-4F-Pt-Cl₂** (links), **m-4F-Pt-HA-DMSO** (Mitte) und **m-4F-Pt-DAH-DMSO** (rechts)

Für alle Verbindungen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Substanzkonzentration im Außenmedium und der intrazellulären Konzentration unabhängig von der Inkubationsdauer gefunden (siehe Abb. 5.10). Die resultierenden Geraden schneiden innerhalb der Methodenungenauigkeit die Achsen nahe am Ursprung. Das ist ein Indiz für eine passive Diffusion durch die Membranen. Das durch passive Diffusion überlagerte Vorhandensein eines gesättigten Transporters generiert zwar auch einen linearen Zusammenhang, der aber nicht den Ursprung schneiden sollte (siehe Abb. 5.9 Regression 1). Aber auch das Vorhandensein eines Transporters, dessen Transportkapazität bei der Höchstkonzentration in diesen Tests von 15µM bei weitem noch nicht gesättigt war (siehe Abb. 5.9 Regression 2), konnte nicht ausgeschlossen werden.

5.5.1.2 Abhängigkeit der Zellaufnahme vom Kupferionenstoffwechsel

Für Cisplatin ist bekannt, dass die Akkumulation in Zellen in einem weiten Bereich bis deutlich über $100\mu\text{M}$ linear von der Mediumkonzentration abhängt.^[16,58] Dabei gibt es viele Indizien, die für eine passive Diffusion durch die Membran sprechen, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cisplatin Aufnahme zeigen.^[32] Allerdings wurden auch Hinweise auf eine Akkumulation von Cisplatin durch aktive Transportmechanismen gefunden. Der Nachweis der Aufnahme in die Zellen über einen Kupferionentransporter wurde zwar auch schon von verschiedenen Autoren bezweifelt,^[32,215,216] aber breite Übereinstimmung herrscht darüber, dass die Überexpression der Kupferionexporttransporter ATP7A und ATP7B zu einem erhöhten Efflux von Cisplatin aus Krebszellen führt.^[30,217] Diese Überexpressionen kristallisieren sich als ein wichtiger Faktor für die Ausbildung von Resistenz gegenüber einer Cisplatintherapie heraus. So haben Ovarialkarzinompatientinnen mit einer stark erhöhten ATP7A-Expression eine schlechte Ansprechrate auf eine Cisplatintherapie.^[31,32]

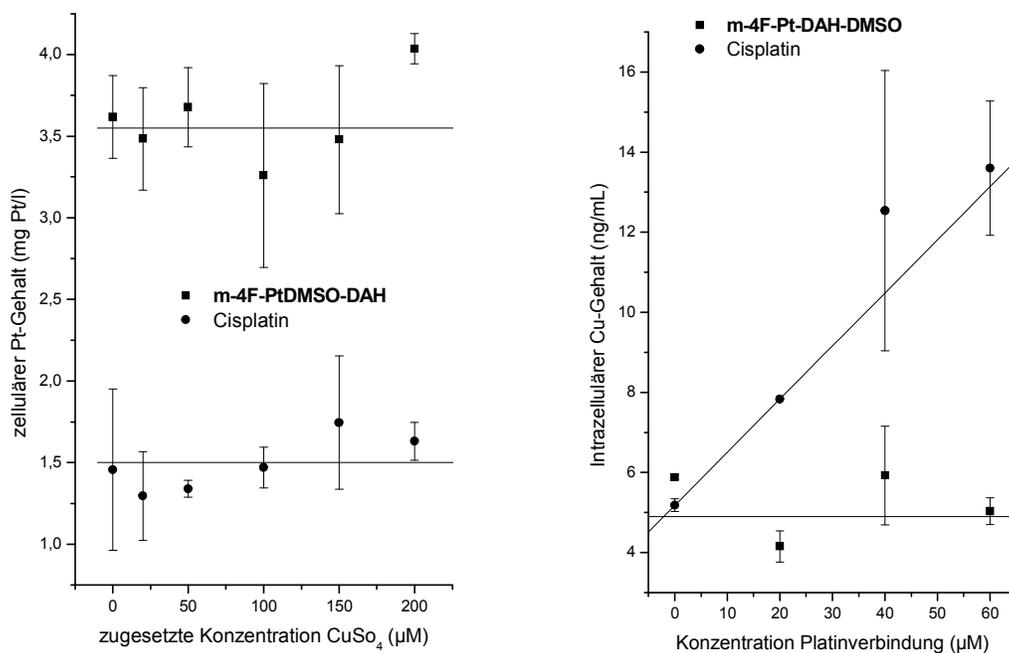


Abb. 5.11 links: Einfluss steigender Kupferkonzentrationen auf die Zellaufnahme von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** ($20\mu\text{M}$) bzw. Cisplatin ($80\mu\text{M}$) in MCF-7 Zellen ($n=3$); rechts Einfluss steigender **m-4F-Pt-DAH-DMSO**- bzw. Cisplatin-Konzentrationen auf den zellulären Gehalt von Kupfer ($200\mu\text{M}$ im Medium) in MCF-7-Zellen ($n=3$)

Im Folgenden wurde der Einfluss des Kupferstoffwechsels auf die Zellaufnahme in MCF-7-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit konstanter Substanzkonzentration (Cisplatin (80 μ M) oder **m-4F-Pt-DAH-DMSO** (20 μ M)) inkubiert und die Kupferkonzentrationen im Außenmedium variiert. Hierbei konnte bei beiden Platinverbindungen keine Reduktion der Zellaufnahme beobachtet werden (siehe Abb. 5.11 links). Ferner wurde der intrazelluläre Kupfergehalt mit variierender Substanzkonzentration (Cisplatin oder **m-4F-Pt-DAH-DMSO**) bestimmt. Eine Belegung der Kupferexporttransporter mit Platinverbindungen müsste zu einer Erhöhung des intrazellulären Kupfergehalts führen. Für Cisplatin wurde eine Erhöhung des intrazellulären Kupfergehalts gefunden, der zudem auch linear von der Mediumkonzentration des Cisplatins abhängig war. Dies ist ein Indiz für die Interaktion des Cisplatins mit den Kupferionenexporttransportern. Hingegen wurde für **m-4F-Pt-DAH-DMSO** kein Einfluss auf die zelluläre Kupferionenkonzentration beobachtet (siehe Abb. 5.11 rechts).

5.5.1.3 Abhängigkeit der Zellaufnahme von dem Transportsystem für organische Kationen

Für Cisplatin konnte an Nierenzellen zumindest eine teilweise Abhängigkeit der Zellaufnahme von den organischen Kationentransportern (OCT1 und OCT2) festgestellt werden. Für diese Zellen wird eine übermäßige Anreicherung von Cisplatin gefunden, was für die starken nephrotoxischen Effekte verantwortlich gemacht wird. So lässt sich die Aufnahme teilweise durch das Konkurrenzsubstrat Tetraethylammoniumchlorid (TEA) bzw. durch Hemmstoffe des Transporters z.B. Cimetidin vermindern.^[218-220] Für Leberzellen konnte dieser Aufnahmeweg für Cisplatin nicht bestätigt werden. Auch die Hemmung der organischen Anionentransportpolypeptide (OATP) durch Ouabain und Glycocholat resultiert in keiner Reduktion des zellulären Platingehalts.^[221]

Da die untersuchten Alkylamin-Platin-Verbindungen permanente Kationen mit stark lipophilen Molekülbereichen sind, war die Zellaufnahme über einen Transporter für organische Kationen nahe liegend. Untersuchungen dazu fehlen bisher jedoch.

Daher wurde exemplarisch **m-4F-Pt-DAH-DMSO** für die Aufnahme über verschiedene organische Ionentransporter untersucht (siehe Abb. 5.12). Die Hemmung der organischen Kationentransporter OCT1 und OCT2 mit dem Hemmstoff Cimetidin brachte keine Änderung des Gehalts der Platinverbindung in den Zellen. Die Inkubation mit dem Konkurrenzsubstrat (TEA) der OCT1 und OCT2 führte hingegen zu einer leichten, aber signifikanten Senkung (um 20%) der akkumulierten Platinmenge. Da die selektive Hemmung durch Cimetidin gegen eine Aufnahme über den Transporter sprach, musste das TEA als organisches Kation an anderer Stelle in Bindungskompetition getreten sein.

Die OATP, die auch für den Transport sterisch anspruchsvoller amphiphiler Kationen verantwortlich sind,^[222] wurde mit Ouabain und Glycocholol gehemmt. Während der Einsatz von Glycocholol eine nicht signifikante Steigerung des zellulären Platingehalts hervorrief, resultierte durch den Ouabaineinsatz eine 40%ige signifikante Reduktion der aufgenommenen Platinmenge. Diese widersprüchlichen Ergebnisse machten die Beteiligung der organischen Kationentransporter eher unwahrscheinlich.

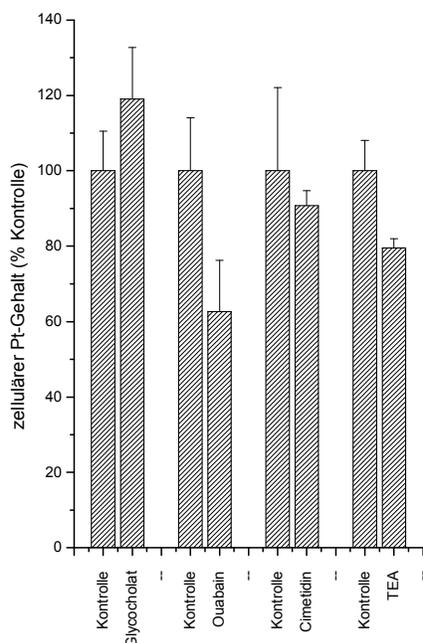


Abb. 5.12 Zellaufnahme von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** in MCF-7-Zellen unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe organischer Ionentransporter und des Konkurrenzsubstrats TEA (n=3)

Ouabain ist daneben auch ein Hemmstoff der Na^+ - K^+ -ATPase und bewirkt so einen Zusammenbruch des Natrium- und Kaliumgradienten in den Zellen. Diese Gradienten sind für viele physiologische Prozesse wichtig, was auch für die Zellaufnahme von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** der Fall sein kann.

Da kein eindeutiger aktiver Transport nachgewiesen werden konnte, wurde die Rolle der adsorptiven Endozytose für die Zellaufnahme der polynuklearen Verbindungen untersucht. Bei diesem Prozess reichern sich Stoffe durch Adsorption an der Membranoberfläche an und werden durch Endozytose aufgenommen.^[223] Die Adsorption der dinuklearen Verbindung an negativ geladene Oberflächenepitope könnte durch TEA reduziert worden sein, und deshalb wurde eine Reduktion der zellulären Platinmenge gefunden. Die Endozytose beinhaltet bei einigen Wegen auch eine Natriumabhängigkeit^[224,225], wodurch Ouabain seine Hemmwirkung entfalten könnte. Zudem ist die nicht vorhandene Absättigbarkeit der Zellaufnahme dieser Platinverbindungen besser mit endozytotischen Vorgängen als mit einem spezifischen Transporter vereinbar.

5.5.1.4 Versuche zur Inhibition der endozytosevermittelten Zellaufnahme

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche endozytotische Aufnahmewege eine Rolle für die Zellakkumulation von polynuklearen Verbindungen haben. Es sind im Großen und Ganzen drei verschiedene endozytotische Wege beschrieben. Als bedeutendster der klathrinabhängige Weg. Hier lagern sich ligandenbeladene Rezeptoren mit dem Protein Klathrin in der Membran zusammen und bilden Einstülpungen, die sogenannten „*clathrin-coated-pits*“ (zu deutsch „Klathrin bedeckte Gruben“). Diese stellen den Ausgangspunkt für die Endosomenbildung dar.^[226] Als zweiten Weg gibt es die caveolinabhängige Aufnahme. Hierbei bilden sich kurze, tubulusartige Einstülpungen, die durch eine dichte Packung aus Cholesterol und Glykosphingolipiden, sogenannten „*lipid rafts*“, gekennzeichnet sind. In diese Strukturen lagert sich u.a. das Protein Caveolin ein und bewirkt so die Endozytose.^[227] Während diese beiden Formen bei so gut wie allen Zelltypen vorkommen, ist die dritte Form, die Makropinozytose, nur für wenige Zelltypen beschrieben. Hierbei werden große Vesikel rezeptorunabhängig durch Einstülpungen der Zellmembran gebildet, die vom Zytoskelettprotein Actin hervorgerufen

werden.^[227] Diese Vorgänge werden zeitweise in den höheren Eukaryoten durch Wachstumsfaktoren oder tumorpromovierende Faktoren ausgelöst. So wird diese Form der Endozytose bei aktivierten Makrophagen, reifenden dendritischen Zellen und Tumorzellen gefunden. Bei letzteren wird die Makropinozytose auch mit der gesteigerten Beweglichkeit und der Metastasierung in Verbindung gebracht.^[223]

Als natriumabhängiger Prozess war vor allem die Makropinozytose beschrieben. Als selektive Hemmstoffe werden hier die Stoffe Amilorid und N-Ethyl-N-isopropyl-amilorid (EIPA) verwendet. Diese stellen Hemmstoffe des Na^+/H^+ -Austauschers dar. Dieser erniedrigt den pH-Wert der frühen Endosomen, indem er dem Natriumgradient entgegengesetzt Protonen in das Endosom pumpt.^[224,225,228-232]

Bei Verwendung der Hemmstoffe konnte eine starke Erniedrigung des zellulären Platingehalts bei Inkubation mit **m-4F-Pt-DAH-DMSO** von 70% für Amilorid und 40% für EIPA erhalten werden (siehe Abb. 5.13). Da die Makropinozytose abhängig von dem Actingerüst ist, sollte eine Hemmung der Actinpolymerisation oder der vorgelagerten Signalkette zu einer Verringerung der zellulären Platinkonzentration führen. Für die Hemmung der Actinpolymerisation wurde Cytochalasin D und für die Inhibition einer in der Signalkette vorgelagerten Inositol-Kinase wurde Wortmannin verwendet.^[223,225,229,231-233] Die Hemmstoffe verringerten die Zellaufnahme des Platinkomplexes um 36% (Wortmannin) bzw. 46% (Cytochalasin D) des Kontrollwertes (siehe Abb. 5.13). Das zeigte die starke Beteiligung der Makropinozytose an der Zellaufnahme dieser Verbindungsklasse.

Dieser Prozess erfolgte nach unspezifischer Adsorption an die Zellmembran. 10% der in der Kontrolle (2h Inkubation bei 37°C) gefundenen Platinmenge war sofort nach Substanzzugabe (ca. 1min) an die Zellen gebunden (Initialbindung siehe Abb. 5.13). Durch die Inkubation bei 4°C wurde die energieabhängige Aufnahme in die Zellen unterbunden. Bei diesem Versuch werden ca. 40% des Platingehalts der Kontrolle in den Zellen gefunden. Der Großteil des gefundenen Platins dürfte hierbei an der Zellmembran gebunden sein. Der an der Membran außen gebundene Anteil kann nicht durch spezifische Hemmstoffe entfernt werden, so dass auch bei starker Hemmung der

Zellaufnahme immer noch ein relativ hoher Platingehalt (>40% der Kontrolle) detektiert wurde.

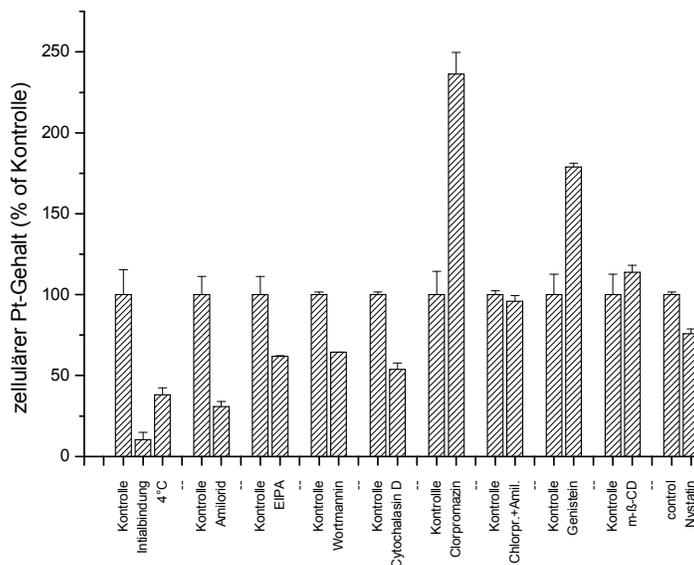


Abb. 5.13 Zellaufnahme von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** in MCF-7-Zellen unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe der Endozytose (Chlorpromazin=Chlorpr./Amilorid=Amil.) (n=6)

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die beiden anderen Endozytosewege ebenfalls involviert waren. Der klathrinabhängige Weg wurde mit Chlorpromazin gehemmt. Dieser Hemmstoff hindert das Klathrin an der Zusammenlagerung auf der Zellmembran und unterbindet so die Einschnürung der Endosomen.^[228,232-236] Durch den Einsatz von Chlorpromazin wurde keine Hemmung der Zellaufnahme von **m-4F-Pt-DAH-DMSO**, sondern eine massive Steigerung der Zellaufnahme um ca. 130% beobachtet (siehe Abb. 5.13). Offensichtlich war dieser Weg nicht der Aufnahmeweg für die polynuklearen Verbindungen. Vielmehr schien die Blockade des klathrinabhängigen Weges zu einer Induktion der Aufnahme der polynuklearen Verbindungen zu führen. Tatsächlich ist die Hochregulierung anderer Endozytosewege nach Blockade des klathrinabhängigen Weges beschrieben. Diese Hochregulation läuft innerhalb von 30 bis 60 Minuten ab, so dass diese bei den hier durchgeführten Versuchen mit einer Inkubationsdauer von zwei Stunden voll zum Tragen kommen konnte.^[237] Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine Koin-

kubation mit Chlorpromazin und Amilorid durchgeführt. Die Zugabe des Hemmstoffes der Makropinozytose war in der Lage, die von Chlorpromazin ausgelöste Steigerung der **m-4F-Pt-DAH-DMSO** Aufnahme in den Zellen rückgängig zu machen, so dass keine Steigerung des Platingehalts gegenüber der hemmstofffreien Kontrolle (92% der Kontrolle) beobachtet wurde (siehe Abb. 5.13).

Die caveolinabhängige Endozytose wurde auf zwei verschiedenen Wegen unterbunden. Zum einen kann die Entstehung der „*lipid rafts*“ unterbunden werden, indem das Cholesterol der Membran entzogen wird. Das kann durch Methyl- β -cyclodextrin (m- β -CD) und durch Nystatin erreicht werden.^[225,227,233,234,236-240] Zum anderen kann eine bei der Endosomenbildung beteiligte Tyrosinkinase durch Genistein inhibiert und damit dieser Endozytoseweg blockiert werden.^[236,241] Beim Einsatz dieser Inhibitoren wurde kein einheitlicher Trend für die Veränderung der Zellaufnahme von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** beobachtet (siehe Abb. 5.13). Während nach Inkubation mit m- β -CD keine Veränderung des zellulären Platingehalts beobachtet wurde, wurde unter Nystatin-Einwirkung eine Reduktion um 25% erhalten. Nach der Inkubation mit Genistein hingegen wurde eine Zunahme des Platingehalts um 80% erhalten. Aufgrund der Uneinheitlichkeit der Ergebnisse ließ sich eine Aufnahme über den caveolinabhängigen Weg ausschließen. Da Tyrosinkinasen und „*lipid rafts*“ auch bei anderen zellbiologischen Prozessen eine Rolle spielen, war eine Beeinträchtigung anderer Wege sehr wahrscheinlich. Für die Substanzen, die wie Nystatin Cholesterol aus den „*lipid rafts*“ entziehen, ist eine Beeinträchtigung anderer Endozytosewege schon beschrieben.^[231]

Die hier beobachteten Transportphänomene schienen auch auf andere polynukleare Komplexe übertragbar zu sein. So wird für die dinuklearen Komplexe mit Anthrachinon als Brückenliganden (Struktur siehe Abb. 1.8) eine Anreicherung in den Lysosomen gefunden. Das konnte ebenfalls als Indiz für das Durchschreiten des endosomalen Weges gewertet werden.^[60]

5.5.2 Kinetiken für die Akkumulation der Alkylamin-Platin-Verbindungen in MCF-7-Zellen

Im Folgenden sollte die Reihe der Alkylamin-Platin-Verbindungen auf ihre Zellaufnahmecharakteristika untersucht werden.

5.5.2.1 Mononukleare Verbindungen

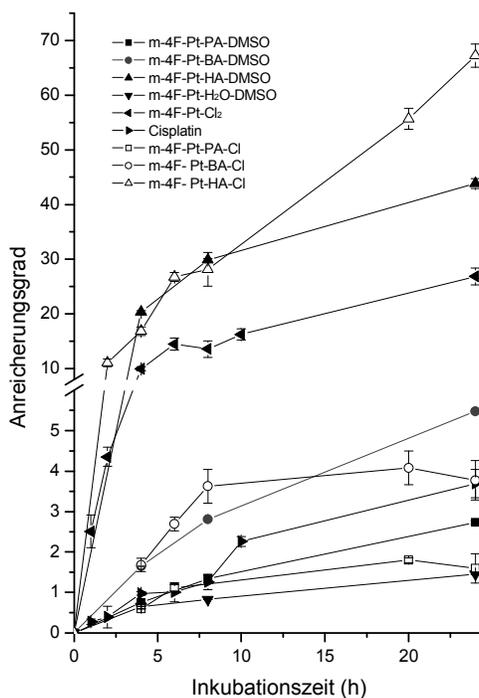


Abb. 5.14 Zellakkumulation der mononuklearen Verbindungen

Es konnte für alle Alkylamin-Platin-Komplexe eine Anreicherung gegenüber dem Inkubationsmedium beobachtet werden (siehe Abb. 5.14). Hierbei zeigte sich eine klare Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge: Während die Propylamin-Platinverbindungen (jeweils AG=2 nach 24h) kaum stärker als der DMSO-Sulfat-Komplex **m-4F-Pt-H₂O-DMSO** (AG=1,2 nach 24h) und in einem geringeren Maß wie Cisplatin (AG=3 nach 24h) akkumuliert wurden, wurden die Hexylamin-Platinverbindungen (AG=38(DMSO) bzw. 68(Cl) nach 24h) schon stärker als der ungeladene Dichlorokomplex **m-4F-Pt-Cl₂** (AG=25 nach 24h) aufgenommen. Das zeigte neben dem Einfluss der kationischen Ladung auch den großen Einfluss der Alkylkettenlänge auf die Zellaufnahme. Es wurde

dabei kaum ein Unterschied zwischen den DMSO- und den Chlorokomplexen gefunden. Die einzige Ausnahme war der Komplex **m-4F-Pt-HA-Cl**, der im Gegensatz zu dem DMSO-Komplex nach 8h nicht in den Sättigungsbereich übergang und somit nach 24h deutlich stärker angereichert war. Überraschenderweise wurde gerade für diese Verbindung in den elektrophoretischen Vorversuchen (Kap. 5.2) eine schnelle Konversion des DMSO-Komplexes zum Chlorokomplex gefunden, so dass die Erklärung des Unterschiedes in der Akkumulation zwischen DMSO- und Chlorokomplex schwer fällt.

5.5.2.2 Polynukleare Verbindungen

Bei den dinuklearen Verbindungen war die Kettenlänge für die Zellaufnahme ebenfalls die entscheidende Variable (siehe Abb. 5.15). Wurden die Hexandiamin-Platinverbindungen noch ähnlich stark wie der ungeladene Dichlorokomplex in den Zellen gefunden, so wurde eine deutliche Steigerung des Anreicherungsgrades bei der Verlängerung auf neun bzw. zwölf Kohlenstoffatome gefunden. Der tetranukleare Komplex **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** zeigte von den DMSO-Komplexen die höchste Zellakkumulation. Die Chlorokomplexe wurden ähnlich wie die korrespondierenden DMSO-Komplexe angereichert, wie es nach dem schnellen Austausch des DMSO gegen Chlorid zu erwarten war (siehe kapillarelektrophoretische Untersuchungen Kap. 5.2). Lediglich bei den Dodecanverbrückten Komplexen zeigte der Chlorokomplex ein signifikant erhöhtes Maximum nach 6 Stunden. Dann jedoch sank der intrazelluläre Gehalt wieder deutlich ab, so dass beide Komplexe nach 24 Stunden den gleichen zellulären Gehalt aufwiesen. Der Komplex **m-4F-Pt-DAD-Cl** war der einzige Komplex, der im Inkubationszeitraum eine Erniedrigung des zellulären Gehalts erfuhr.

Die Veränderung der Konfiguration am Ethylendiamin des Neutralliganden in dem 4F-Pt-DAH-DMSO-Komplex von meso zu rac führte zu keiner signifikanten Verstärkung der Zellaufnahme, wie das für die betreffenden mononuklearen Dichlorokomplexe gefunden wurde (siehe Kap. 4.1.3).

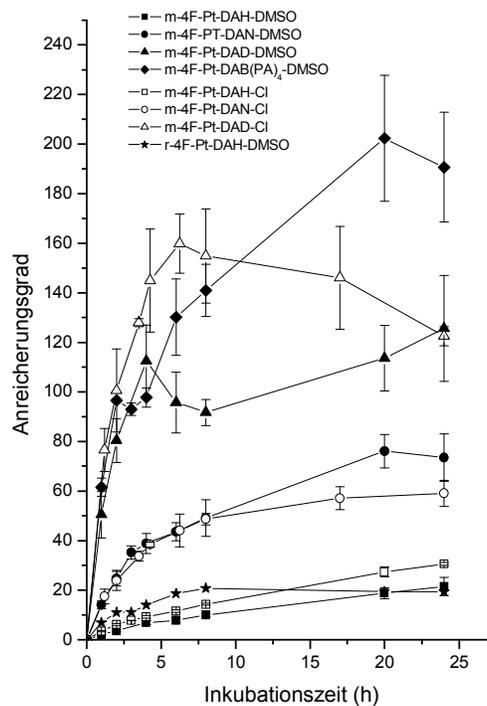


Abb. 5.15 Zellanreicherung polynuklearer Alkylamin-Platinverbindungen

Ansonsten erreichte die Akkumulation bei allen Verbindungen schnell einen hohen Wert, der sich dann nach 4-6 Stunden nur noch langsam erhöhte (Ausnahme **m-4F-Pt-DAD-Cl**).

Geht man von einer makropinozytotischen Aufnahme in die Zellen aus, kann folgendes abgeleitet werden: Erstens für die Bindung an die Zellmembran mit darauf folgender Makropinozytose war die Ladung des Komplexes essentiell. So stieg die Zellaufnahme in der Reihe der mono-, di- und tetranuklearen Verbindungen. Zweitens spielte daneben aber auch das Vorhandensein und die Größe lipophiler Molekülteile für die Interaktion mit den Membranen eine tragende Rolle.

5.6 Platingehalte in den Zellkernen von MCF-7 Zellen

Die Aufnahme in die Zelle über endozytotische Prozesse bedeutet, dass die Substanzen in Vesikeln im Zytoplasma eingeschlossen sind. So kann ein Grund für die geringe antiproliferative Aktivität sein, dass das Kernkompartiment und damit die DNA kaum oder gar nicht von den polynuklearen Verbindungen erreicht wird.

Zur Lokalisation im Nukleus waren bisher für polynukleare Verbindungen nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Die einzige dinukleare Verbindung wurde mit fluoreszierenden Anthrachinonbrückenliganden (Struktur siehe Abb. 1.8) durchgeführt. Hier kann im Gegensatz zu dem freien Brückenliganden keine Fluoreszenz im Kern detektiert werden. Allerdings wird die Anthrachinonfluoreszenz durch Interaktion mit der DNA gelöscht. So wird trotzdem an die DNA gebundenes Platin mittels AAS gefunden.^[60]

In dieser Studie wurden die Kerne aus mit Platinkomplexen inkubierten Zellen isoliert. Diese Versuche wurden wie im Kap. 3.4. beschrieben durchgeführt. In den isolierten Kernen wurde der Platingehalt bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen.

Wie bei der Zellaufnahme hing der Platingehalt im Kern von der Alkylkettenlänge des Aminliganden ab (siehe Tab. 5.3). So wurden nach der Inkubation mit den Verbindungen **m-4F-Pt-PA-DMSO** (6,17ng Pt/mg Protein) und **m-4F-Pt-BA-DMSO** (13,7ng Pt/mg Protein) Platingehalte im Kern gefunden, die sich im Bereich des Wertes von Cisplatin (10,0ng Pt/mg Protein) lagen. Die Verbindung **m-4F-Pt-HA-DMSO** (60,9ng Pt/mg Protein) erzeugte in dieser Reihe den höchsten Platingehalt im Kern, der aber nicht das Niveau des ungeladenen Dichlorokomplexes **m-4F-Pt-Cl₂** (165ng Pt/mg Protein) erreichte. Nach der Inkubation mit den dinuklearen DMSO-Komplexen wurden deutlich höhere Werte als für die Verbindung **m-4F-Pt-Cl₂** beobachtet. Dabei erhöhte sich der Gehalt mit steigender Kettenlänge der verbrückenden Alkylkette (395ng Pt/mg Protein (meso) bzw. 241ng Pt/mg Protein (rac) für n=6, 535ng Pt/mg Protein für n=9 und 1184ng Pt/mg Protein für n=12). Analog zu den Zellaufnahmen wiesen die Kerne beim Einsatz

der Verbindung **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** den höchsten Gehalt für die DMSO-Komplexe auf (5378 ng Pt/mg Protein).

Verbindung	Platingehalt im Kern [ng Pt/mg Protein]	Verbindung	Platingehalt im Kern [ng Pt/mg Protein]
m-4F-Pt-PA-DMSO	6.17±0.27	m-4F-Pt-PA-Cl	15.3±1.1
m-4F-Pt-BA-DMSO	13.7±1.67	m-4F-Pt-BA-Cl	38.3±3.1
m-4F-Pt-HA-DMSO	60.9±6.2	m-4F-Pt-HA-Cl	191.5±17
m-4F-Pt-DAH-DMSO	395±55	m-4F-Pt-DAH-Cl	852±57
r-4F-Pt-DAH-DMSO	241±26		
m-4F-Pt-DAN-DMSO	535±56	m-4F-Pt-DAN-Cl	1654±197
m-4F-Pt-DAD-DMSO	1184±166	m-4F-Pt-DAD-Cl	9924±1866
m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO	5378±661		
m-4F-Pt H₂O-DMSO	47.5±1.3	m-4F-Pt-Cl₂	165±8.3
		r-4F-Pt-Cl₂	668±62
		Cisplatin	10,0±1.1

Tab. 5.3. Kerngehalte der untersuchten Verbindungen (n=3)

Im Widerspruch zu den Ergebnissen der Zellakkumulationsversuche wurde für die korrespondierenden Chlorokomplexe durchweg deutlich höhere Platingehalte in den Kernen als für die DMSO-Komplexe beobachtet. Hierbei wurde bei der Inkubation mit der Verbindung **m-4F-Pt-DAD-Cl** (9924 ng Pt/mg Protein) sogar ein höherer Wert als für den Komplex **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** (5378 ng Pt/mg Protein) gefunden. Dieses schien im Widerspruch zu den kapillarelektrophoretischen Messungen (Kap. 5.2) zu stehen, wo eine schnelle Umwandlung der DMSO-Komplexe zu den Chlorokomplexen gefunden wurde. Allerdings konnte nach der Aufnahme in die Zellen der Austausch des DMSO durch Chlorid nur schwer erfolgen, da der Chloridgehalt in den Zellen wesentlich geringer ist (4mM intrazellulär ↔ 100mM extrazellulär). Somit ließ sich trotz ähnlicher absoluter Zellgehalte in den ersten Stunden ein großer Unterschied in der zellulären Verteilung gut erklären. Allerdings waren die Unterschiede der Kerngehalte zu stark

ausgeprägt, wenn man die Stabilität im Basalmedium bedenkt. Ein weiterer Faktor, der sich auf die Kernakkumulation auswirkt, ist das Vermögen einer dinuklearen Verbindung, den Vesikeln der endozytotischen Route zu entkommen. Wenn die Chlorokomplexe effektiver nach endozytotischer Aufnahme (siehe Kap. 5.5.1) von den Endosomen in das Zytosol übertreten können, würde sich dieses ebenfalls in einer erhöhten Kernakkumulation niederschlagen.

Der Konfigurationswechsel des Neutralliganden in dem dinuklearen Komplex von meso zu rac führte trotz ähnlicher Zellgehalte zu deutlich reduziertem Gehalt in den Zellkernen (395ng Pt/mg Protein (meso) vs. 241ng Pt/mg Protein (rac)). Dies mag mit der erhöhten Reaktivität des **r-4F-Pt-DAH-DMSO** gegenüber Proteinen zusammenhängen (siehe Kap. 5.3), so dass die Inaktivierung durch zelluläre Nukleophile wie Glutathion diesen Komplex stärker traf.

5.7 Bindung an die zelluläre DNA

Zuletzt sollte noch geklärt werden, ob die moderaten antiproliferativen Effekte der polynuklearen Verbindungen auf eine geringe Bildung von DNA-Addukten zurückzuführen waren. Denn trotz hoher Gehalte im Kern konnte die hohe Proteinbindung der Platin-komplexe in Konkurrenz zur DNA-Bindung treten. Auch konnte die Bindung an die DNA sterisch stark erschwert sein.

Die Interaktion dinuklearer Platinverbindungen mit der DNA wurde sehr intensiv untersucht. Diese Untersuchungen wurden vor allem an isolierter DNA und an strukturell definierten Oligonukleotiden mittels Schmelzpunktanalytik^[187,242] und Experimenten zur Bestimmung der „*interstrand-crosslinks*“ mittels NMR-Experimenten, alkalischer Elution und Elektrophorese durchgeführt.^[43-47,50,57,242,243] Bei diesen Experimenten wurde größtenteils auf die Leitstrukturen BBR3464 und BBR3005 Augenmerk gelegt. Trotzdem sind in Ansätzen Struktur-Wirkungs-Beziehungen vorhanden: In diesen Experimenten zeigt sich, dass zum Brückenligand cis-ständige Abgangsgruppen deutlich mehr „*interstrand-crosslinks*“ als die trans-ständigen ausbilden. Ferner steigern positive

Ladungen in dem Brückenligand die Bindung an die DNA. Dabei spielt die Kettenlänge kaum eine Rolle.

Die quantitative Bindung an die DNA in den Zellen wurde für einige wenige polynukleare Verbindungen untersucht, so dass nur wenige Struktur-Wirkungs-Beziehungen existieren.^[44,54,57,60,151,211]

Im Folgenden wurde der Platingehalt der DNA aus MCF-7-Zellen nach Substanzeinwirkung bestimmt (siehe Kap. 3.5.3). Dabei wurden große Unterschiede zwischen den untersuchten Verbindungen gefunden (siehe Tab. 5.4): Es wurden bei allen mononuklearen Komplexen Platinwerte an der DNA gefunden (zwischen 0,56 pg Pt/ μ g DNA für **m-4F-Pt-PA-DMSO** und 5,61 pg Pt/ μ g DNA für **m-4F-Pt-HA-Cl**), die maximal 32% des Wertes für Cisplatin (17,6pg Pt/ μ g DNA) ausmachten und somit teilweise im Bereich der Nachweisgrenze lagen. Auch eine Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge ließ sich nicht finden. Somit ließ sich die Unwirksamkeit dieser Verbindungen im Chemosensitivitätstest gut mit den kaum vorhandenen DNA-Addukten korrelieren.

Nach Inkubation mit den dinuklearen kationischen Verbindungen wurden deutlich höhere Platingehalte in der DNA gefunden als für Cisplatin (zwischen 19,6 pg Pt/ μ g DNA für **m-4F-Pt-DAH-DMSO** und 89,8 pg Pt/ μ g DNA für **m-4F-Pt-DAD-Cl**/Ausnahme **r-4F-Pt-DAH-DMSO** mit 3,6 pg Pt/ μ g DNA). Im ähnlichen Rahmen bewegte sich der Platingehalt nach Inkubation mit dem korrespondierenden Dichlorokomplexes **m-4F-Pt-Cl₂** (35 pg Pt/ μ g DNA). Die Chlorokomplexe bedingten auch hier einen erhöhten Platingehalt gegenüber den DMSO-Komplexen (zu bis 62% höher). Der Unterschied, wie er sich in der Kernakkumulation manifestierte (2fach bis 8fach höher), wurde damit aber an der DNA nicht gefunden. Auch die deutlich erhöhte Kernakkumulation dieser Komplexe (siehe Kap. 5.6) gegenüber den Komplexen Cisplatin und **m-4F-Pt-Cl₂** spielte kaum mehr eine Rolle. Die Abhängigkeit von der Kettenlänge des Brückenliganden blieb erhalten, auch wenn sich der Unterschied zwischen den diammonononan- und diaminododecanverbrückten Komplexen stark abgeschwächte.

Der Konfigurationswechsel des Neutralliganden in dem dinuklearen Komplex von meso zu rac führte zu einer stark reduzierten DNA-Bindung (19,6 pg Pt/ μ g DNA (meso) vs. 3,6 pg Pt/ μ g DNA(rac)). Hier dürfte die hohe Reaktivität gegenüber Proteinen eine maßgebliche Rolle spielen, so dass weniger aktive Platinspezies die DNA erreichten.

Verbindung	DNA-Bindung [pg Pt/ μ g DNA]	Verbindung	DNA-Bindung [pg Pt/ μ g DNA]
m-4F-Pt-PA-DMSO	0,56 \pm 0,12	m-4F-Pt-PA-Cl	2,39 \pm 0,43
m-4F-Pt-BA-DMSO	1,84 \pm 0,12	m-4F-Pt-BA-Cl	2,93 \pm 0,37
m-4F-Pt-HA-DMSO	1,30 \pm 0,53	m-4F-Pt-HA-Cl	5,61 \pm 0,66
m-4F-Pt-DAH-DMSO	19,6 \pm 5,0	m-4F-Pt-DAH-Cl	24,4 \pm 6,2
r-4F-Pt-DAH-DMSO	3,6 \pm 0,6		
m-4F-Pt-DAN-DMSO	48,6 \pm 8,0	m-4F-Pt-DAN-Cl	78,4 \pm 10,9
m-4F-Pt-DAD-DMSO	55,1 \pm 5,3	m-4F-Pt-DAD-Cl	89,8 \pm 1,7
m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO	12800 \pm 680		
m-4F-Pt H₂O-DMSO	4,9 \pm 1,2	m-4F-Pt-Cl₂	35,0 \pm 7,2
		r-4F-Pt-Cl₂	58,0 \pm 1
		Cisplatin	17,6 \pm 1,0

Tab. 5.4 DNA-Bindung der untersuchten Verbindungen (n=3)

Die Bedeutung des Brückenliganden wurde dabei beim Dendrimer-Platin-Addukt **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** besonders deutlich. Hier zeigte sich gegenüber den übrigen polynuklearen Komplexen eine um Größenordnungen (Faktor>100) gesteigerte DNA-Bindung, obwohl die Gehalte im Kern nicht dermaßen gesteigert (Faktor 0,5 bis 20) waren.

Obwohl für die dinuklearen Verbindungen der Gehalt von gebundenem Platin an der DNA größtenteils den der beiden aktiven Verbindungen Cisplatin und **m-4F-Pt-Cl₂** überstieg, wurde kaum ein antiproliferativer Effekt beobachtet (siehe Kap. 5.4). Das deutete daraufhin, dass die gebildeten Addukte nicht zur Auslösung toxischer Effekte in der Lage waren. Woran das liegt, bleibt noch zu klären. Eine mögliche Erklärung liefert eine Untersuchung zur qualitativen Bindung von dinuklearen Komplexen, deren

Abgangsgruppe cisständig zum Brückenliganden ist. Hier wird eine vorwiegende Bildung von „*interstrand-crosslinks*“ beobachtet, die in der Regel gut von zelleigenen Reparaturmechanismen beseitigt werden.^[44]

Einen zweiten Erklärungsansatz könnten sterische Einflüsse des m-4F-Neutralliganden für die Bindung an DNA darstellen. So fiel im Vergleich zu Cisplatin für die Platinverbindungen mit m-4F-Neutralliganden die Bindung an DNA trotz hoher Gehalte im Kernkompartiment schwach aus. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Bindung an die DNA durch den Neutralliganden erschwert wurde. In früheren Konformationsstudien für den m-4F-Liganden wurde eine erschwerte Bindung an die DNA vorhergesagt, da in jeder Konformation ein axialständiger Arylring vorliegt, der die Bindung an die DNA erschwert.^[62] Das wurde vor allem durch den Vergleich von Cisplatin und **m-4F-Pt-Cl₂** deutlich, da hier die Zellaufnahme und Gehalt im Kern um Faktor den 10 differieren. An der DNA hingegen wurde für **m-4F-Pt-Cl₂** dann nur noch der doppelte Platingehalt wie für Cisplatin gefunden.

Da die Messung des Platingehalts mittels ETAAS keine Aussage über die Bindungsart zulässt, kann über die gebundene Menge Platin an der DNA nicht über die Menge von bi- und monovalent gebundenen Komplex gefolgert werden. Denn monovalent an die DNA gebundene Platinkomplexe lösen in der Regel keine Wachstumshemmung aus.

Für den Bindungsmechanismus an die DNA musste auch die positive Ladung der Komplexe eine entscheidende Rolle spielen. Während bei den mononuklearen Komplexen trotz hoher Gehalte im Zellkern kaum eine DNA-Bindung auftrat, war diese schon deutlich stärker für die dinuklearen Komplexe. Am deutlichsten trat dieser Effekt beim dendrimerverbrückten tetranuklearen Komplex **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** auf. Dieser Komplex weist neben den positiven Ladungen an den Platinatomen bei physiologischem pH-Wert teilweise auch positive Ladungen an den zwei tertiären Aminogruppen im Dendrimerinneren auf. Der Platingehalt, der durch diese Substanz hervorgerufen wurde, war außerordentlich hoch. Dennoch war der antiproliferative Effekt doch eher moderat, wofür die oben diskutierten Gründe verantwortlich sein dürften. Auch bei Verwendung eines Kronenethers als Brückenliganden konnte eine starke Bindung an die DNA

festgestellt werden, obwohl bis zu einer Konzentration im Medium von 100 μ M kein antiproliferativer Effekt gesehen wird.^[212] Ein DNA-Targeting über starke elektrostatische Wechselwirkungen wird auch für die Verbindung BBR3464 gefunden. Bei Untersuchungen an Astrozytom- und Neuroblastomzellen wird ein 4fach höherer zellassoziierter Substanzgehalt gegenüber Cisplatin gefunden. Bei der Bindung an die DNA wird für BBR3464 allerdings ein 10fach erhöhter Wert festgestellt.^[151]

