

Biochemische Untersuchungen zum  
Wirkungsmechanismus antitumoraktiver  
Cobalt-Alkin-Komplexe

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

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

vorgelegt von

Ingo Ott  
aus Salzburg

September, 2004

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

## Danksagung

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

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

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

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

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

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

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

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



# Inhaltsverzeichnis

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

6.4	Hochdruckflüssigchromatographie . . . . .	40
6.5	Atomabsorptionsspektroskopie . . . . .	40

### **III Physikochemische und biochemische Untersuchungen 47**

#### **7 Lipophilie ( $\log k_w$ -Wert) 49**

7.1	Bestimmung des $\log k_w$ -Wertes . . . . .	49
7.2	Ergebnisse . . . . .	50
7.3	Zusammenfassung . . . . .	52

#### **8 Stabilitätsuntersuchungen 53**

8.1	UV-Vis Voruntersuchungen . . . . .	53
8.2	Ergebnisse . . . . .	55
8.3	Zusammenfassung . . . . .	57

#### **9 Untersuchung der Proteinbindung 59**

#### **10 DNS-Bindung 63**

10.1	Bestimmung der DNS-Bindung . . . . .	64
10.2	Ergebnisse . . . . .	65
10.3	Zusammenfassung . . . . .	66

#### **11 Hemmung von Cyclooxygenasen 67**

11.1	Mechanismus der Enzymhemmung und Enzymkatalyse . . . . .	69
11.2	Bestimmung der COX-Hemmung . . . . .	71
11.3	Ergebnisse der COX-Inhibitortests . . . . .	72
11.4	Zusammenfassung . . . . .	74

#### **12 Reaktion mit Thiolen 75**

### **IV Untersuchungen an humanen Zelllinien 79**

#### **13 Brustkrebszellen 81**

13.1	Cytotoxizität ( $IC_{50}$ -Wert) . . . . .	81
13.1.1	Cytotoxizität von Co-ASS sowie etablierter Cytostatika . . . . .	82
13.1.2	Cytotoxizität von Derivaten von Co-ASS . . . . .	83
13.1.3	Cytotoxizität weiterer Cobalt-Alkin-Komplexe . . . . .	85
13.1.4	Zusammenfassung . . . . .	89

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

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