

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Neue Untersuchungen zum Wirkmechanismus von lipophilen
Antitumorwirkstoffen –
Vergleich von Gallensäure-Cisplatin-Konjugate mit Gallensäure-Carboplatin-
Konjugaten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

für das Fachgebiet
Humanmedizin

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sebastian Paschke
geboren am 07. September 1984 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll
2. Prof. Dr. Dirk Vordermark
3. Prof. Dr. Rainer Schobert (Bayreuth)

03.09.2019

27.08.2020

Meinen Eltern und Großeltern

Referat:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der detaillierten Untersuchung von Verbindungen, in denen ein Cisplatin-Fragment bzw. ein Carboplatin-Fragment über einen Ester mit Gallensäure verknüpft ist (ChAPt(n)Cis und ChAPt(n)Carbo). Die *in vitro* Antitumoraktivität von Cisplatin wird an 5 Tumorzelllinien bestimmt und mit den ChAPt-Konjugaten verglichen. Es kommen eine Anzahl unterschiedlicher Methoden zur Anwendung: Sulforhodamine B (SRB) assay zur Bestimmung der Zytotoxizität; Zellzyklusanalyse, Annexin-V assay und Caspase assay an einer heptazellulären Karzinomzelllinie (HepG2) zur genaueren Untersuchung des Wirkmechanismus dieser Verbindungen.

Alle Verbindungen zeigen eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung im mikromolekularen Konzentrationsbereich, die deutlich durch Änderungen in der Molekülstruktur beeinflusst wird. Diese Struktur-Eigenschaftsänderungen werden unter Berücksichtigung der bisher mit dieser Stoffklasse gemachten Erfahrungen diskutiert.

Als Ergebnis kann zusammenfassend festgestellt werden, dass abhängig von der Spacerlänge, einige Verbindungen beachtliche antitumorale Aktivität besitzen und überraschenderweise die Verbindungen ChAPt(11)Cis und ChAPt(11)Carbo den programmierten Zelltod auf unterschiedliche Weise auslösen, was auf verschiedene Wirkmechanismen hindeuten könnte[1].

Die hohe Wirksamkeit von Cisplatin und –derivaten, welche aber mit starken Nebenwirkungen verknüpft ist, hat weltweit zu einer großen Zahl von Forschungsprojekten geführt, die das Ziel hatten, ein Cisplatin-Fragment gezielt zum Tumorgewebe zu transportieren.

Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, ob und wie das Transportfragment die Wirksamkeit des Platin-Komplexes beeinflusst.

Paschke, Sebastian: Neue Untersuchungen zum Wirkmechanismus von lipophilen Antitumorwirkstoffen – Vergleich von Gallensäure-Cisplatin-Konjugate mit Gallensäure-Carboplatin-Konjugaten, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 53 Seiten, 2019

Inhaltsverzeichnis

Referat:.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis/Tabellen.....	IV
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Zielstellung.....	6
3. Material und Methoden.....	10
3.1.2 Passagieren der Zellen.....	10
3.1.3 Einfrieren von Zellen.....	10
3.1.4 Mikroskopie.....	11
3.2 Zellbiologische Methoden.....	11
3.2.1 Sulforhodamin B-Assay.....	11
3.2.2 Zellzyklusanalyse.....	14
3.2.4 AnnexinV-Assay.....	15
3.2.5 Caspase-Assay <i>Durchführung</i> :.....	17
4. Ergebnisse.....	19
4.1 IC ₅₀ und IC ₈₀ –Werte.....	19
4.2. Zellzyklusanalysen.....	20
4.3 Apoptoseanalyse der Verbindungen.....	22
4.3.1 Annexin V – assay.....	22
4.3.2 Caspase assay.....	24
5. Diskussion.....	26

6. Zusammenfassung.....	36
7. Literaturverzeichnis.....	38
8. Thesen	48
Selbständigkeitserklärung	50
Erklärung über frühere Promotionsversuche	51
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung	52

Abbildungssverzeichnis/Tabellen

- Abbildung 1. Übersicht – Platinkomplexe - zugelassen/in klinischer Erprobung
- Abbildung 2. Publikationen pro Jahr für ausgewählter Gruppen von Chemotherapeutika [aus A Drug of Such Damned Nature]
- Abbildung 3. Beispiele für nichtsteroidale Platin-Konjugate mit und ohne Spacer
- Abbildung 4. Beispiel für ein steroidales Platin-Konjugat
- Abbildung 5. Beispiele für Gallensäure-Cisplatin-Konjugate (Bamet-R2 und Bamet-D3)
- Abbildung 6. ChAPt-Konjugat mit Cisplatin-Fragment und Spacer mit 11 –CH₂- Gruppen sowie ChAPt Carbo mit Carboplatin-Fragment und ebenfalls Spacerlänge 11.
- Abbildung 7. Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate
- Abbildung 8. Auftragungsschema des SRB-Assays
- Abbildung 9. Prozentuale Verteilung von HepG2-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlung mit Cisplatin sowie den Verbindungen 1, 4 und 5 für 24, 48 und 72 Stunden.
- Abbildung 10. Zellzyklusanalyse von HepG2-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin sowie der Verbindung 1, 4 und 5 für 24, 48 und 72 Stunden.
- Abbildung 11. Verteilung von Zellen in Prozenten auf die Populationen - frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose.
- Abbildung 12a. Graphische Darstellung der Verteilung von Zellen auf die Populationen – lebend, frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose. Verbindungen 1, 5
- Abbildung 12b. Graphische Darstellung der Verteilung von Zellen auf die Populationen – lebend, frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose. Cisplatin, 4
- Abbildung 13. Caspase assay von HepG2 Zellen.
- Abbildung 14. Betulinsäure-Cisplatin-Konjugat (links) und Gallensäure-Cisplatin-Konjugat (rechts)
- Abbildung 15. Wirkmechanismus von Cisplatin (aus Metal complexes as anticancer agents: concepts in tumor research and mechanisms of action)
- Abbildung 16. Typischen Bildes einer Zellzyklusanalyse eines Betulinsäurederivates (NVX-207) nach 24 h und 48 h, subG1 (rot)
- Abbildung 17. Vergleich der Zellzyklusuntersuchung nach Behandlung mit Betulinsäure bzw. Cisplatin
- Abbildung 18. Vergleich der Zellzyklusuntersuchung nach Behandlung mit ChAPt(11)Cis 1, Cisplatin, ChAPt(11)Carbo 5
- Abbildung 19. 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy) -undecyl) -propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II), THP-C11-Pt
- Abbildung 20. Beispiele für „Next Generation of Cisplatin-Like Platinum(II)Complexes“,
- Abbildung 21. Antikörper-Pt(II)-Konjugat

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ADP	Adenosinediphosphat
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
CO ₂	Kohlendioxid
ChAPt(n)Cis	Gallensäure-Cisplatin-konjugat (n-Zahl der Kohlenstoffatome im Spacer)
ChAPt(n)Carbo	Gallensäure-Carboplatin-konjugat (n-Zahl der Kohlenstoffatome im Spacer)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescence isothiocyanate
FBS	fetales Kälberserum
FLICA	<i>Fluorochrome labeled inhibitor of caspases</i>
G ₁ -Phase	Gap-Phase 1
G ₂ /M-Phase	Gap-Phase 2 und Mitose
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IC ₈₀	inhibitorische Konzentration mit einer Überlebensrate von 20 %
MMP	Mitochondrienmembranpermeabilisierung
MOMP	Pore in der äußeren Mitochondrienmembran
NaN ₃	Natriumtriazid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium iodide
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Sauerstoffspezies
RPM	Rotation pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
SP	Specificity protein
SRB	Sulforhodamin B
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S-Phase	Synthesephase
SRB	Sulforhodamin B
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

Auf Grund von Umwelteinflüssen, dem Rückgang lebensbedrohlicher Infektionskrankheiten und der damit steigenden Lebenserwartung, nimmt die Zahl von Tumorerkrankungen ständig zu. Laut einer weltweit erhobenen Statistik aus dem Jahre 2012 erkrankten 51% der Männer und 43% der Frauen im Laufe ihres Lebens an Krebs[2]. Die Weltgesundheitsorganisation WHO nennt in ihrem Weltkrebsbericht 2014 folgende Zahlen:

Im Jahr 2012 traten jährlich 14 Millionen neue Krebsfälle auf, für das Jahr 2030 werden jährlich 21,6 Millionen erwartet. Die Zahl der Todesfälle wird in diesem Zeitraum von 8,2 auf 13 Millionen pro Jahr ansteigen.

Der Ausgangspunkt für Krebserkrankungen sind Gendefekte. Durch unterschiedliche Einflüsse entstehen Schäden im Erbgut, die nicht mehr repariert werden können. Ausgehend von diesen Gendefekten erfolgt die Transformation von normalen zu malignen Zellen und führt damit zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Zwei Gruppen von Genen spielen bei dem Prozess der Krebsentstehung eine besondere Rolle – Proto-Onkogene und Tumorsuppressor-Gene. Proto-Onkogene sind Gene, deren Produkte den Zellzyklus aktivieren bzw. die Zellteilung einleiten. Tumorsuppressor-Gene sind Gene, deren Produkte die unkontrollierte Teilung von Zellen verhindern, d.h. den Zellzyklus kontrollieren und gegebenenfalls Apoptose einleiten[3-5]. Durch Mutationen entwickeln sich aus den Proto-Onkogenen die Onkogene deren Expressionsprodukte eine ständige Aktivierung der Zellteilung bewirken. Defekte in Tumorsuppressor-Genen führen dazu, dass die Kontrollfunktion nicht mehr wahrgenommen werden kann. Ein Beispiel dafür ist das Gen p53, welches in der Hälfte aller Tumore mutiert ist und seine Wächterfunktion nicht mehr ausüben kann.

Hanahan und Weinberg[6;7] haben Tumore und ihre Eigenschaften umfassend beschrieben. Tumore haben die Fähigkeit:

- Apoptose zu umgehen,
- Resistenzmechanismen zu entwickeln,
- zur Tumorangiogenese,
- sie sind von externen Wachstumssignalen unabhängig,

- verfügen über eine geringe Sensitivität gegenüber proliferationshemmenden Signalen,
- sind fähig zur Invasion und Metastasierung.

Mittlerweile gibt es in der Krebstherapie über 50 Medikamente, die in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus eingreifen und so die Zellteilung hemmen. Die wesentlichen Gruppen sind:

- Alkylanzien (z.B.: Cisplatin, Carboplatin sowie Oxaliplatin und Cyclophosphamid) reagieren mit den Bestandteilen der DNA, so dass diese vernetzt werden oder brechen. Eine Verdopplung der Erbinformation und nachfolgende Zellteilung ist dann nicht mehr möglich.
- Antimetabolite (z.B.: 5-Fluorouracil, Gemcitabin und Capecitabin, Trifluridin) bewirken die Blockade lebenswichtiger Enzyme der Krebszelle, indem sie Stoffwechselbausteine dieser Zellen ersetzen bzw. verdrängen.
- Topoisomerase-Hemmer (z.B. Etoposid, Topotecan, Irinotecan) blockieren die Enzyme, die die DNA aufbrechen und so die räumliche Anordnung von geschlossenen DNA-Molekülen verändern. Das Überführen der superhelikalen DNA in entspannte DNA durch die Topoisomerasen, ist jedoch die Voraussetzung für die Transkription und damit die Zellteilung.
- Anthrazykline (z.B.: Doxorubicin, Epirubicin, Daunorubicin) sind in der Lage mit der DNA zu interkalieren und so eine Verdopplung der Erbinformation zu verhindern. Des Weiteren blockieren sie die Topoisomerase II und bilden freie Radikale (führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen) und verhindern so die Proliferation der Zellen.
- Kinase-Hemmer (z.B.: Wirkstoffe Afatinib, Alectinib, Axitinib, Sunitinib) binden und hemmen Protein- und Lipidkinasen in ihrer Funktion, so dass Wachstumsreize nicht weitergeleitet werden, der Tumor wird zerstört oder nicht mehr ausreichend versorgt.
- Mitose-Hemmer (z.B.: Vinblastin, Paclitaxel) werden auch als Spindelgifte bezeichnet, sie wirken an den Mikrotubuli und halten auf diese Weise die Zellteilung an.

Metallkomplexe spielen auf dem Gebiet der Antitumor-Wirkstoffforschung seit langem eine große Rolle. Platinkomplexe zählen zur Gruppe der Alkylanzien und gehören in der klinischen

Onkologie immer noch zu den sehr häufig eingesetzten Zytostatika und es werden ständig neue Verbindungen dieses Typs synthetisiert und getestet[8].

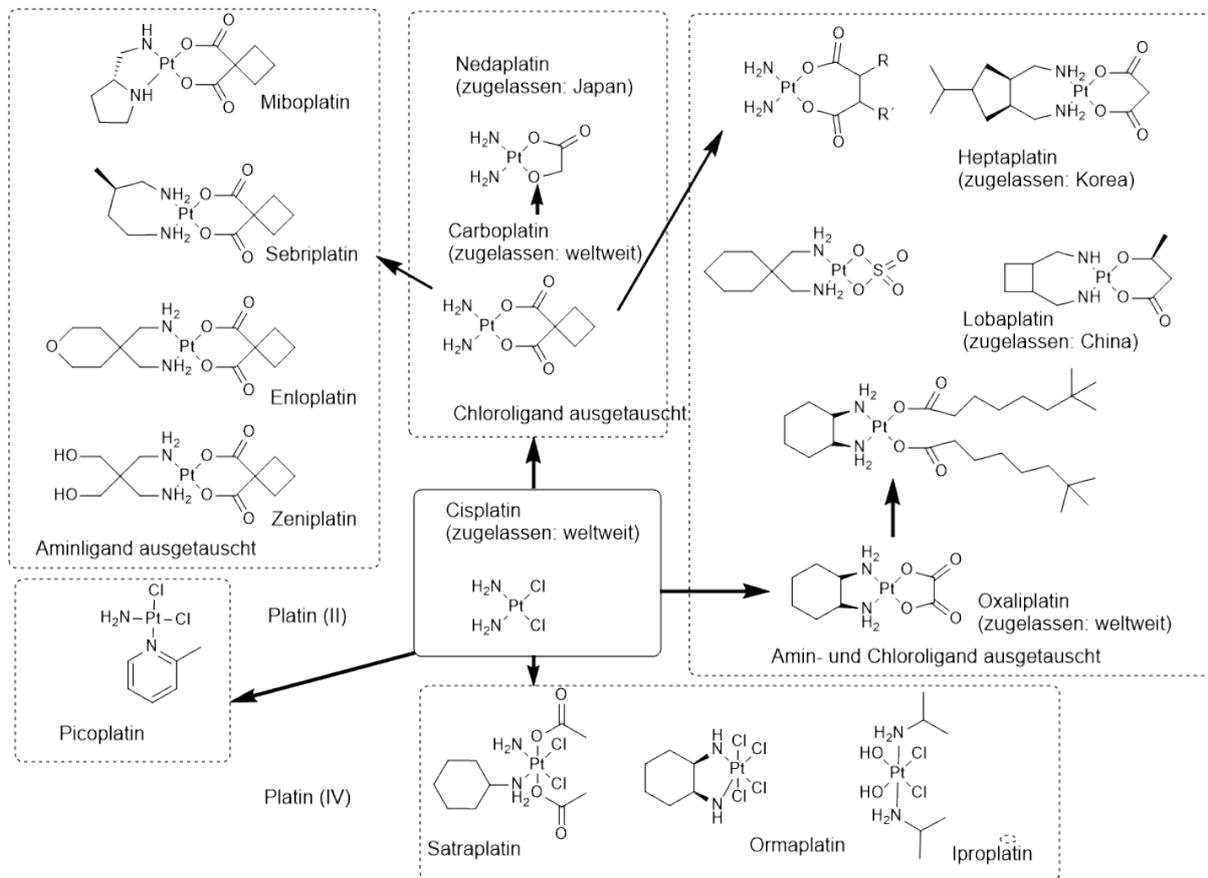


Abbildung 1. Übersicht – Platinkomplexe - zugelassen/in klinischer Erprobung[9]

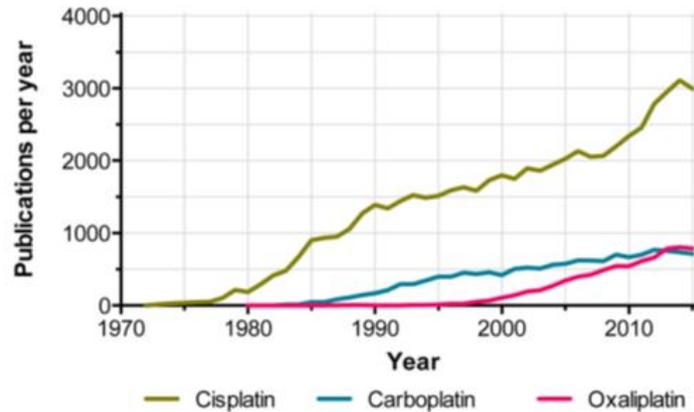
Aber auch andere Metallionen wie z.B. Palladium, Ruthenium, Gallium, Gold, Silber, Eisen, Kupfer, werden als Zentralatome in Komplexen verwendet und die antiproliferativen Eigenschaften dieser Verbindungen sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen[8;10-17].

Obwohl die gegenwärtig in der Praxis eingesetzten Medikamente auf Platinbasis einen enormen Schub für die erfolgreiche Behandlung zahlreicher Tumorerkrankungen gebracht haben bzw. immer noch erbringen[18], besteht, auf Grund der z.T. drastischen Nebenwirkungen, ein hoher Bedarf an innovativen Antitumorwirkstoffen. Die neuen Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tumorbilogie haben ebenfalls zu effektiven Medikamenten mit neuen Wirkprinzipien geführt.

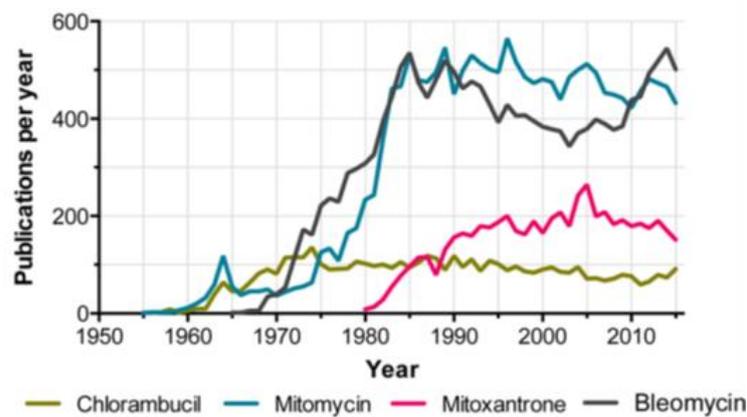
Trotz dieser neuen Entwicklungen wird das Gebiet der klinisch relevanten Platinkomplexe noch intensiv bearbeitet. Dies zeigt ein Vergleich der Publikationshäufigkeit (Cisplatin, Car-

boplatin, Oxaliplatin; Abbildung 2/A) mit anderen „DNA-targeting“ Chemotherapeutika (Chlorambucil, Mitomycin, Mitocantron, Bleomycin Abbildung2/B) sowie weiteren gegenwärtig als „Shotgun“ oder „Blockbuster“ bezeichneten Medikamenten (Paclitaxel, Doxorubicin, Imatinib, Trastuzumab Abbildung 2/C)[19].

A.



B.



C.

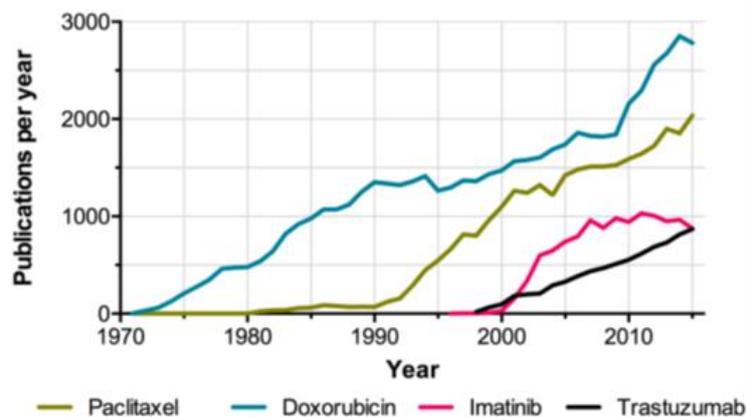


Abbildung 2. Publikationen pro Jahr ausgewählter Gruppen von Chemotherapeutika [aus A Drug of Such Damned Nature (14)]

Das Interesse der Wissenschaft richtet sich hinsichtlich der Platinkomplexe hauptsächlich darauf Cisplatin-Resistenzen zu überwinden und das Wirkprinzip des Platinkomplexes mit einem spezifischen Transport- bzw. Andocksystem zu verbinden, um so gezielt nur die Krebszellen zu bekämpfen und Nebenwirkungen zu minimieren.

Diese Strategie, Konjugate aus Platinkomplexen und „Shuttle“-Molekülen zu verwenden ist nicht neu und reicht in ihren Anfängen bis in die 1980er Jahre zurück. Angerer et al. haben nichtsteroidale Konjugate untersucht und konnten zeigen, dass sie eine starke Affinität zu Estrogen-Rezeptoren haben. Die *in vivo* Experimente bestätigten eine hohe Aktivität gegenüber hormon-abhängigen Mammakarzinom-Zelllinien, wohingegen keine Aktivität gegen hormon-unabhängigen Zelllinien zu verzeichnen war[20-24].

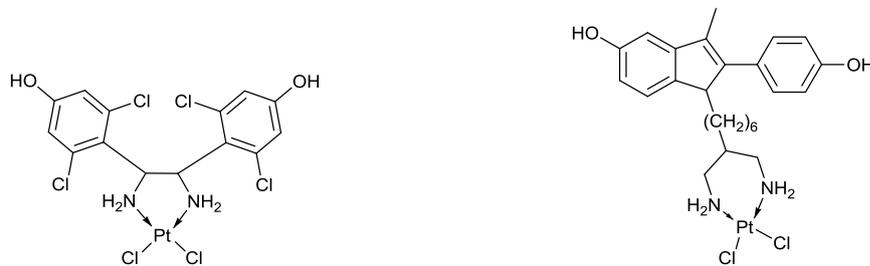


Abbildung 3. Beispiele für nichtsteroidale Platin-Konjugate [21;22] mit und ohne Spacer

Aber auch steroidale Platin-Konjugate wurden schon frühzeitig hergestellt und getestet[25] und bis heute sind derartige Konjugate Gegenstand der Forschung[26-29]

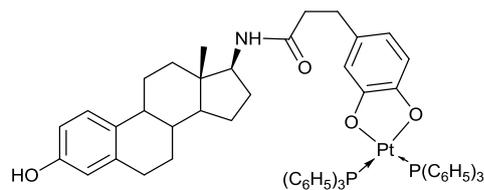


Abbildung 4. Beispiel für ein steroidales Platin-Konjugat[25]

Aus der Idee heraus, Biomoleküle zum gezielten Transport von Cisplatin-Fragmenten zu nutzen, entstand eine Vielzahl interessanter Arbeiten, welche Gallensäure als „Shuttle“ benutzen[30-49]. Gallensäure zirkuliert im enterohepatischen Kreislauf und kann so als Transporter genutzt werden, um gezielt Galle/Leber-Tumore zu behandeln. Zwei dieser Strukturen werden in Abbildung 5 gezeigt. Für die Verbindung Bamet R2 wird zudem festgestellt, dass dieses Konjugat in der Lage ist Cisplatin-Resistenzen zu brechen [34].

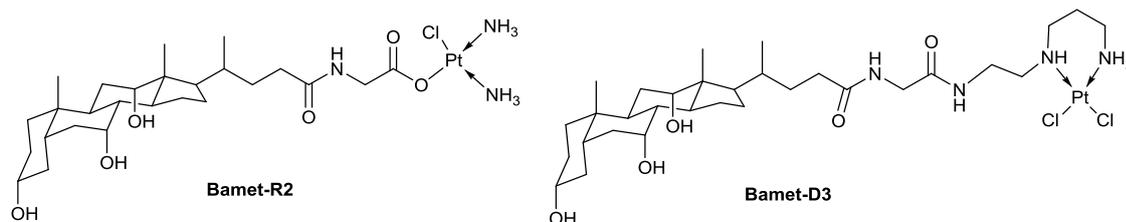


Abbildung 5. Beispiele für Gallensäure-Cisplatin-Konjugate (Bamet-R2[50] und Bamet-D3[40])

2. Zielstellung

In der Arbeitsgruppe Medizinisch-Pharmazeutische Chemie des Biozentrums der Universität war parallel zu den Arbeiten von Criado et al. [30;31;33;50], welche die Herstellung und Untersuchung der Bamet-Konjugate zum Gegenstand hatten, eine Stoffklasse entwickelt worden, die ebenfalls ein Konjugat aus Gallensäure und einem Cisplatin-Fragment darstellt. Diese als ChAPt bezeichneten Substanzen[35;41;51] zeichnen sich dadurch aus, dass die Platinkomplexe (Cisplatin/Carboplatin) über einen Spacer unterschiedlicher Länge (4, 6, 8, 11)verknüpft sind (Abbildung 6).

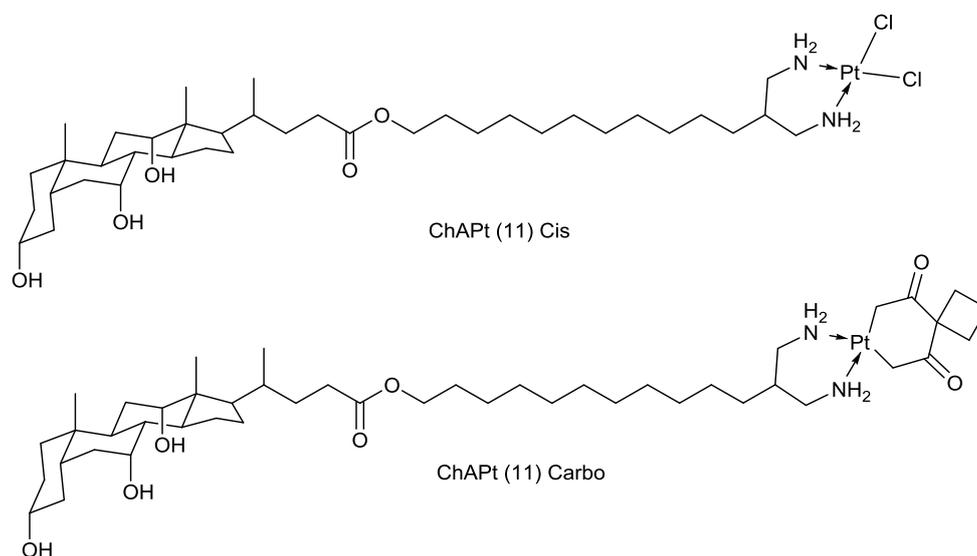


Abbildung 6. ChAPt-Konjugat mit Cisplatin-Fragment und Spacer mit 11 $-CH_2-$ Gruppen sowie ChAPt Carbo mit Carboplatin-Fragment und ebenfalls Spacerlänge 11.

Dem Spacerkonzept lag die Idee zugrunde, dass es vorteilhaft sein könnte die beiden Eigenschaftsanteile des Konjugates räumlich zu trennen, damit die Anbindung des Cisplatin-Fragmentes an die DNA nicht durch das voluminöse Gallensäurefragment sterisch behindert wird. Auch bei diesen Verbindungen wurden resistenzbrechende Eigenschaften festgestellt.

Auslöser für die nochmalige Untersuchung von Vertretern dieser Verbindungsklasse im Rahmen der vorliegenden Arbeit, waren kürzlich in der Arbeitsgruppe Medizinisch-Pharmazeutische Chemie des Biozentrums durchgeführte Untersuchungen von Betulinsäure-Cisplatin-Konjugaten[52].

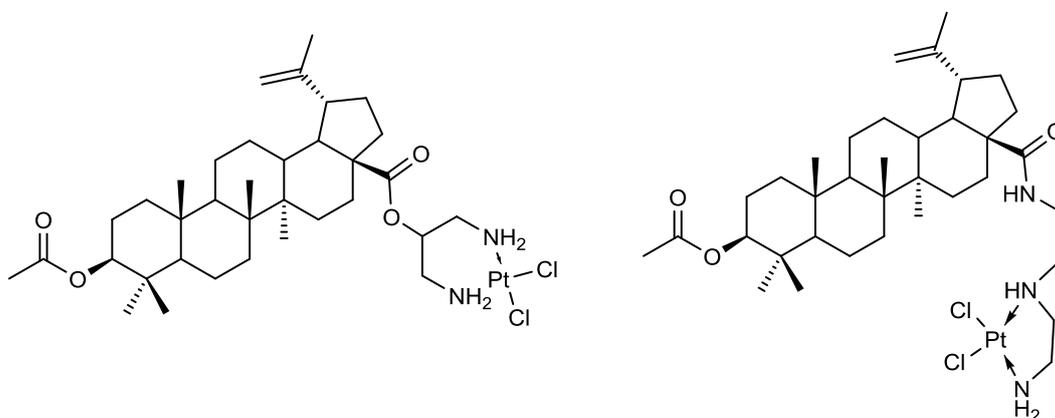
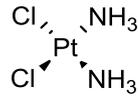


Abbildung 7. Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate [52]

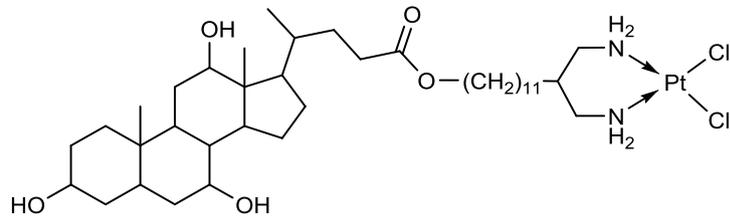
Diese Substanzen waren mit dem Ziel synthetisiert worden, zwei unterschiedliche Wirkstoffe in einem Molekül zu vereinen. Dadurch sollte eine stärkere zytotoxische Wirkung erreicht werden. Die umfangreichen Untersuchungen führten jedoch zu der Erkenntnis, dass der Wirkmechanismus dem der Betulinsäure entspricht und das Platinfragment keinen Einfluss auf die Wirkung hat[53].

Daraus ergab sich die These, dass auch bei den ChAPt-Verbindungen, auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von Gallensäure und Betulinsäure, der Platinkomplex nicht für die zytotoxische Wirkung verantwortlich ist. Da von diesen Verbindungen bisher lediglich der IC_{50} -Wert und der Platineintrag in die Zellen bestimmt worden war, sollten im Rahmen dieser Arbeit zusätzliche zellbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, die mehr Klarheit über den Wirkmechanismus dieser Verbindungen bringen könnten. Für die Untersuchungen standen folgende Verbindungen zur Verfügung (s. nächste Seite):

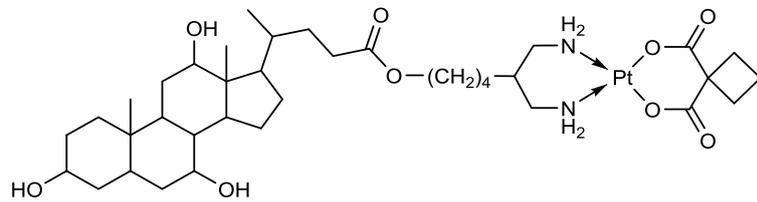
Cisplatin



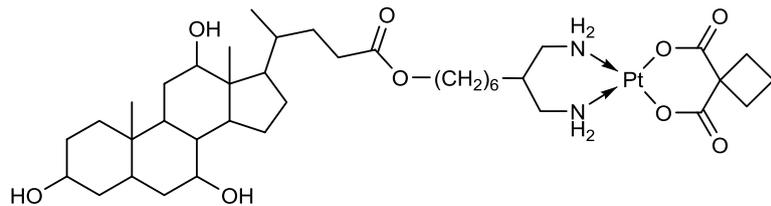
ChAPt(11)Cis 1



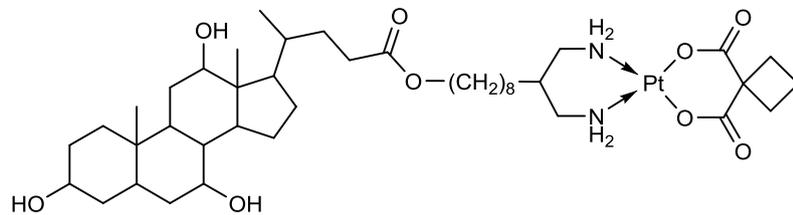
ChAPt(4)Carbo 2



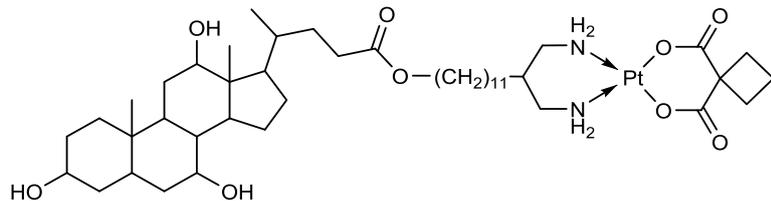
ChAPt(6)Carbo 3



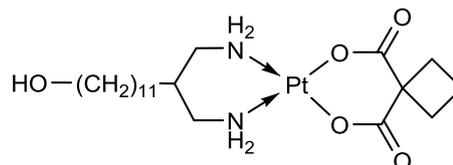
ChAPt(8)Carbo 4



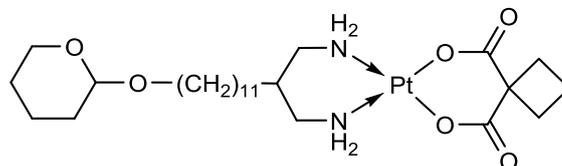
ChAPt(11)Carbo 5



HO(11)Carbo 6



THP(11)Pt 7



Bei den Verbindungen **6** und **7** handelt es sich um Synthesestufen der Gallensäure-Konjugate, wobei Verbindungen des Typs **7** bereits Gegenstand ausführlicher Untersuchungen waren[54].

Zur Überprüfung der These, dass die zytotoxische Wirksamkeit der Gallensäure-Cis- bzw. Carboplatin-Konjugate auf den lipophilen Molekülteil zurückzuführen ist, sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Analyse der Zytotoxizität der Substanzen **1** – **7** und Cisplatin mittels SRB assay.
2. Zellzyklusanalyse der Verbindungen ChAPt(11)Cis **1**, ChAPt(8)Carbo **4**, ChAPt(11)Carbo **5** und Cisplatin.
3. Apoptoseanalyse der Verbindungen ChAPt(11)Cis **1**, ChAPt(8)Carbo **4**, ChAPt(11)Carbo **5** und Cisplatin mittels AnnexinV assay und Caspase(3, 8, 9)assay.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Zellkultivierung

Die humanen Zelllinien A2780 (ovarian cancer), DLD1 (colorectal adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), 8505C (anaplastic thyroid), MCF-7 (breast) wurden in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 10 % FBS, 1x Penicillin und Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Zellkulturen wurden vom Aninstitut des Biozentrum (BSH) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Passagieren der Zellen

Nach dem Entfernen des alten Mediums werden die Zellen mit 4 ml PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung werden die Zellkulturflaschen kurz geschwenkt und für fünf bis sieben Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Trypsinreaktion wird daraufhin durch Zugabe von 4 ml neuem Medium gestoppt. Die Zellen werden in diesem Medium resuspendiert und ein Teil dieser Suspension in eine neue 25 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml entsprechendem Medium überführt (siehe Tabelle 2 für Volumen der Zellsuspensionslösung). Werden die Zellen über drei statt über zwei Tage kultiviert, werden zusätzlich 8 ml Medium hinzugegeben. Bei Kultivierung in 75 cm² Kulturflaschen wurde die doppelte Menge PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ zum Waschen und die doppelte Menge an Trypsin-EDTA-Lösung sowie Medium zum Resuspendieren verwendet. In der neuen Zellkulturflasche wurden bei einer Kultivierung über drei Tage 36 ml Medium verwendet.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Freezing medium: 70 % RPMI 1640 Medium

20 % FBS

1x Penicillin und Streptomycin

10 % DMSO

Zur Sicherung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren und dort gelagert. Für das Einfrieren wurden die Zelllinien in 75 cm² Zellkulturflaschen für drei Tage kultiviert. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Am dritten Tag wurde nach dem in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Verfahren die Zellen mit Trypsin behandelt und in 8 ml Medium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurde mit 10 µl *Trypan Blue Solution* gemischt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels automatischem Zellzähler Countess[®]. Die resuspendierten Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 150xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in *Freezing medium* aufgenommen. Dabei wurde eine Zellkonzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Cryoröhrchen überführt und verpackt im *Nalgene™ freezing container* bei -80 °C für mindestens zwei Tage gelagert. Danach wurden die Cryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.4 Mikroskopie

Zur morphologischen Charakterisierung wurden die Zellen auf Objektträgern präpariert und anschließend unter dem Mikroskop angeschaut. Hierfür wurden Zellen verwendet, die für zwei Tage kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit 4 ml PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen und für fünf Minuten mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 4 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 240xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ aufgenommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der überstehenden Flüssigkeit vorsichtig resuspendiert. 25µl davon wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen versehen. Die Untersuchung der Morphologie erfolgte unter Hellfeldbedingungen.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Sulforhodamin B-Assay

Lösungen:

SRB Stammlösung: 4 % Kiton Red S in 1 %iger Essigsäure

SRB *working solution* (0.4%) 10 % Sulforhodamin B Stammlösung in 1 %iger Essigsäure

Tris-Puffer 1.2 g Tris in 1 l destilliertes Wasser

Durchführung:

Zuerst wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS w/o Ca^{2+} & Mg^{2+} gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellkulturflaschen kurz geschwenkt und für fünf bis sechs Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml entsprechendem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden in dem zugegebenen Medium resuspendiert. Für das nachfolgende Zählen der vitalen Zellen wurden 10 μl Zellsuspension mit 10 μl *Trypan Blue Solution* gemischt. Das Zählen erfolgte mit Hilfe des automatischen Zellzählers Countess®. Die Volumina mit der entsprechenden Zellzahl für das Kultivieren der Zellen auf einer 96-well-Platte wurden mit Medium auf insgesamt 10 ml verdünnt. Pro well einer 96-well-Platte wurden 100 μl dieser Zellsuspension aufgetragen. Pro Platte wurde eine Zelllinie kultiviert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 5 % CO_2 und 37 °C für 24 Stunden.

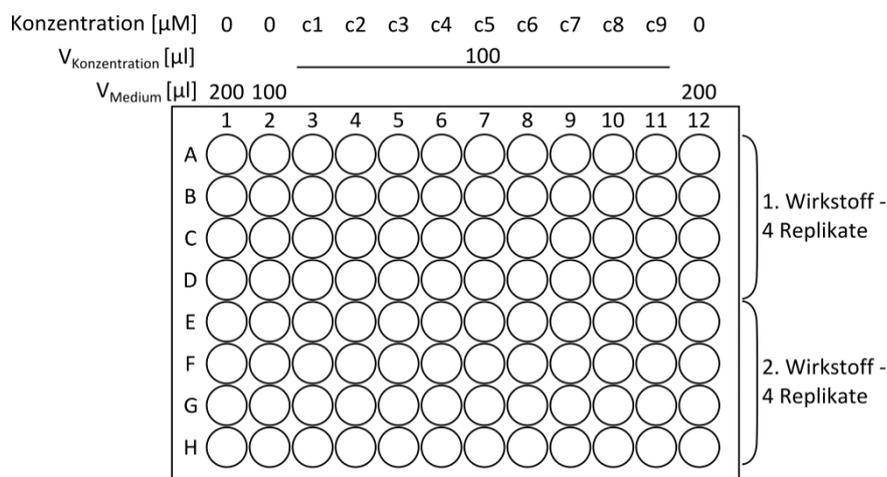


Abbildung 8. Auftragungsschema des SRB-Assays. In den Spalten 1 und 12 wurden keine Zellen aufgetragen sondern lediglich Medium als Negativkontrolle. In den Zeilen A bis D wurde die Konzentrationsreihe eines Wirkstoffs mit steigender Konzentration von c1 bis c8 aufgetragen mit vier technischen Replikaten. In den Zeilen E bis H wurde die Konzentrationsreihe eines zweiten Wirkstoffs aufgetragen. Die zweite Spalte diente als 100 % Kontrolle, da hier zwar Zellen aufgetragen wurden, jedoch kein Wirkstoff.

Für die Behandlung mit dem Wirkstoff wurden zunächst Konzentrationsreihen mit doppelter Konzentration im entsprechenden Medium erstellt. Der Faktor zwischen den Konzentrationen bewegte sich zwischen zwei und drei. Es wurden je 100 μl der entsprechenden Konzentration oder Medium pro well aufgetragen. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 96 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 . Die Inkubation wurde danach bis 96 Stunden nach Start der Behandlung

mit dem Wirkstoff fortgesetzt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Medium entfernt und pro well 100 µl TCA (10 %) zugegeben. Die Platten wurden für mindestens zwei Stunden bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Platten am Plattenwäscher fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 µl SRB *working solution* (0.4%) (pro well) für 40 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Platten am Mikroplattenwäscher mit Essigsäure (1 %) gewaschen und danach bei Raumtemperatur für mindestens 24 Stunden getrocknet. Vor dem Auslesen der OD-Werte wurde je 100 µl Tris-Puffer in jedes well gegeben, die Platten für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach leicht horizontal geschüttelt. Die Messung der OD-Werte erfolgte am Mikroplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 570 nm.

Für die Auswertung wurden die Daten normalisiert.

$$\text{Überlebensrate} = \frac{\text{OD} - \text{OD}_{\text{Puffer}}}{\text{OD}_{100\%} - \text{OD}_{\text{Puffer}}} \cdot 100 \%$$

Gleichung 1: Gleichung zur Normalisierung der OD-Werte beim SRB-Assay. $\text{OD}_{\text{Puffer}}$ ist der Mittelwert der gemessenen Absorption der wells in den Spalten 1 und 12 der vier technischen Replikate. $\text{OD}_{100\%}$ ist der Mittelwert der gemessenen Absorption der wells in der Spalte 2, in denen Zellen ohne Wirkstoff inkubiert wurden. OD ist der entsprechende Messwert.

Die Modellierung der Dosis-Wirkungskurven wurde in GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Funktion *dose-response-Inhibition: log(inhibitor) vs. response (variable slope)* verwendet. Die Berechnung der IC_{80} -Werte erfolgte mit Hilfe der Parameter IC_{50} -Wert und Hill-Koeffizient.

$$\text{IC}_F = \left(\frac{100 - F}{F} \right)^{\frac{1}{H}} \cdot \text{IC}_{50}$$

Gleichung 2: Berechnung der IC_{80} -Konzentration. F entspricht in der Formel dem Anteil der Inhibition. In diesem Fall ist $F = 80$. Der Parameter H ist der Hilfskoeffizient und stellt den Anstieg der Dosis-Wirkungskurve an der IC_{50} -Konzentration dar. Der IC_{50} -Wert wurde ebenfalls mittels Dosis-Wirkungskurve bestimmt und eingesetzt.

3.2.2 Zellzyklusanalyse

Lösungen:

Staining Buffer: 2 % FBS
0.01 % NaN₃ (Stammlösung: 2 % in H₂O)
in PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺

Staining Solution: 0.02 mg/ml PI (Stammlösung: 1 mg/ml in PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺) (frisch)
in *Staining Buffer*

Durchführung:

Es wurden 2.0×10^5 Zellen in 10 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium in den Zellkulturflaschen entfernt und durch Medium mit Wirkstoff (ChAPt(11)Cis 1, ChAPt(8)Carbo 4, ChAPt(11)Carbo 5 und Cisplatin) mit der IC80-Konzentration oder doppelten IC50-Konzentration. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die anschließenden Schritte wurden für jeden Zeitpunkt wiederholt.

Das Medium wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 1 ml PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen. Die PBS-Lösung wurde in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA wurden die Zellen für fünf bis sechs Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen in 2 ml entsprechendem Medium resuspendiert und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Von nun an wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ aufgenommen und die Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor dem Messen der Zellzahl wurde das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ resuspendiert. Das Zählen der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystems, USA) (acquisition volume: 50 µl, stop: 10.000 events in all gates). $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Wenn die Zellzahl in 1 ml geringer war, wurde für das Experiment die geringste gemessene Zellzahl verwendet und dafür später die

PI-Konzentration der *Staining Solution* angepasst, sodass die Menge PI auf $1 \cdot 10^6$ Zellen 20 μg entspricht. Die Zellen wurden bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Ethanol (70 %, -20 °C) resuspendiert und bei 4 °C mindestens zwei Stunden aber meist über Nacht gelagert. Die Zellen wurden bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml *Staining Buffer* gemischt und wiederum bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 μl RNAse A Lösung (100 mg/ml in PBS w/ Ca^{2+} & Mg^{2+}) resuspendiert. Danach erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C. Die Zellen wurden mit 1 ml *Staining Solution* gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Vor der Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen vorsichtig gemischt. Zunächst wurden die Kontrollzellen am Durchflusszytometer gemessen, wobei die Spannung des BL2-A Detektors so eingestellt wurde, dass der G_1 -Peak bei einer Fluoreszenzintensität von $2 \cdot 10^6$ sein Maximum hat. Die Messung wurde für jede Probe dreimal durchgeführt.

3.2.4 AnnexinV-Assay

Durchführung:

Es wurden 2.0×10^5 Zellen in 10 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 für 24 Stunden inkubiert. Für jede Substanz je Zelllinie und Zeitpunkt wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. Anschließend wurde das Medium in den Zellkulturflaschen entfernt und durch Medium mit Wirkstoff (ChAPt(11)Cis 1, ChAPt(8)Carbo 4, ChAPt(11)Carbo 5 und Cisplatin) mit der IC80-Konzentration ersetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die anschließenden Schritte wurden für jeden Zeitpunkt wiederholt.

Das Medium wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 1 ml PBS w/o Ca^{2+} & Mg^{2+} gewaschen. Die PBS-Lösung wurde in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA wurden die Zellen für fünf bis sechs Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen in 2 ml entsprechendem Medium resuspendiert und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Von nun an wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca^{2+} & Mg^{2+} aufgenommen und die Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und

das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca^{2+} & Mg^{2+} resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor dem Messen der Zellzahl wurde das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca^{2+} & Mg^{2+} resuspendiert. Das Zählen der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (acquisition volume: 50 μl , stop: 10.000 events in all gates).

Die Zellen wurden im Anschluss bei 120xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in *AnnexinV Binding Buffer* resuspendiert und dabei wurde eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen eingestellt. 100 μl der Kontrollzellen wurden in vier neue 1.5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Für alle anderen Zellen wurde ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 100 μl Zellsuspension vorbereitet. Eine Probe Kontrollzellen wurde mit 5 μl AnnexinV-FITC, eine weitere mit 3 μl PI-Stammlösung (1 mg/ml in PBS w/ Ca^{2+} & Mg^{2+}) und eine dritte mit 5 μl AnnexinV-FITC und 3 μl PI-Stammlösung gemischt. Die vierte Probe Kontrollzellen ist die *unstained* Kontrolle. Alle weiteren Zellsuspensionen wurden mit 5 μl AnnexinV-FITC und 3 μl PI-Stammlösung versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit 400 μl *AnnexinV Binding Buffer* gemischt. Zunächst wurde am Durchflusszytometer die Kompensationsmatrix bestimmt. Für alle nachfolgenden Messungen wurden folgende Eigenschaften eingestellt:

Acquisition volume: 150 μl

Flow rate: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$

Stop: 20.000 events in all gates.

Dazu wurde zunächst die *unstained* Probe gemessen und dabei die Spannungen der Detektoren BL-1 und BL-3 so eingestellt, dass die Autofluoreszenzpeaks bei einer Intensität von 10^3 ihr Maximum hat. Daraufhin wurde die nur mit AnnexinV-FITC inkubierte Probe gemessen und das Gate für den Detektor BL-1 so verschoben, dass nur die positiven Signale (bei rund 10^6) enthalten sind. Das gleiche wurde mit der mit nur PI inkubierten Probe durchgeführt nur, dass hier der Detektor BL-3 verwendet wurde. Anschließend wurden von allen doppelgefärbten Proben drei Replikate gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Attune® Software Pack v.1.2.5 (Life Technologies GmbH, Darmstadt) und GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

3.2.5 Caspase-Assay

Durchführung:

Es wurden 8.0×10^5 Zellen in 10 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Für jede Substanz (ChAPt(11)Cis 1, ChAPt(8)Carbo 4, ChAPt(11)Carbo 5 und Cisplatin) wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. Anschließend wurde das Medium in den Zellkulturflaschen entfernt und durch Medium mit Wirkstoff mit der IC80-Konzentration ersetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24h, 48h und 72h inkubiert. Die anschließenden Schritte wurden für jeden Zeitpunkt wiederholt.

Das Medium wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen 2x mit 1 ml PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen. Die PBS-Lösung wurde in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA wurden die Zellen für fünf bis sechs Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen in 2 ml entsprechendem Medium resuspendiert und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Von nun an wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden (bei 1500 rpm, 5 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ aufgenommen und die Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen (bei 1500 rpm, 5 min, 4 °C) fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum (bei 1500 rpm, 5 min, 4 °C) für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor dem Messen der Zellzahl wurde das Zellpellet in 1 ml PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ resuspendiert. Das Zählen der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (acquisition volume: 50 µl, stop: 10.000 events in all gates).

Die Zellen werden (1500 rpm, 5 min, 4 °C) für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in PBS w/ Ca²⁺ & Mg²⁺ resuspendiert, wobei eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt wurde. Wenn in einem Experiment die Anzahl der Zellen unter $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml für mindestens eine Probe lag, dann wurde für alle Proben die Zellzahl entsprechend auf die höchste erreichbare Zellzahl in 900 µl für die Probe mit der geringsten Zellzahl eingestellt. Je 300 µl der Zellsuspension wurde in drei 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für jede der drei verwendeten Caspasen 3, 8 und 9 wurde in je einem Reaktionsgefäß 1 µl des entsprechenden *Staining Kits* mit der Zellsuspension gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden anschließend

(1500 rpm, 5 min, 4 °C) für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl *Washing Buffer* resuspendiert. Der Zentrifugations- und Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 300 µl *Washing Buffer* gemischt und für die Analyse am Durchflusszytometer verwendet.

Zunächst wurden jeweils die Kontrollzellen gemessen, wobei die Spannung des Detektors BL-1 (für Caspase 3 und 8) beziehungsweise BL-3 (für Caspase 9) so eingestellt wurde, dass der Autofluoreszenzpeak (Zellen mit inaktiver Caspase) sein Maximum bei einer Fluoreszenzintensität von 10^3 hat. Es wurden pro Probe zwei Replikate gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 IC₅₀ und IC₈₀ –Werte

Die *in vitro* Zytotoxizität von Cisplatin sowie der lipophilen Verbindungen **1** – **7** wurde mittels SRB-assay an 5 unterschiedlichen Zelllinien bestimmt (Tabelle 1). Die IC₅₀ und IC₈₀ –Werte sind die Konzentrationen, welche relativ zur unbehandelten Kontrolle eine 50%ige bzw. 80%ige Inhibierung bewirken.

Tabelle 1. Zytotoxizitätswerte humaner Tumorzelllinien. Die IC₅₀-Werte (in μM mit Standardabweichung). Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von mindestens 3 Replikaten dar.

Compound	DLD1	A2780	HepG2	8505C	MCF7
Cisplatin	0,64 \pm 0,01	0,33 \pm 0,02	1,15 \pm 0,05	1,34 \pm 0,04	0,41 \pm 0,03
1	16,96 \pm 0,26	14,43 \pm 1,43	15,5 \pm 0,5	17,1 \pm 1,98	14,2 \pm 1,29
2	56,13 \pm 0,57	54,50 \pm 1,47	58,4 \pm 0,98	56,13 \pm 0,57	47,13 \pm 0,84
3	40,53 \pm 0,6	30,80 \pm 2,53	41,03 \pm 1,26	40,78 \pm 2,16	37,48 \pm 1,31
4	38,97 \pm 0,69	30,7 \pm 2,16	39,76 \pm 0,69	38,6 \pm 1,32	35,08 \pm 2,61
5	17,27 \pm 0,33	16,8 \pm 0,76	18,2 \pm 1,39	16,67 \pm 1,25	16,77 \pm 0,44
6	40,95 \pm 0,98	30,87 \pm 2,53	39,38 \pm 1,26	39,88 \pm 1,58	40,37 \pm 1,86
7	53,5 \pm 3,35	72,1 \pm 2,58	66,1 \pm 0,05	53,7 \pm 2,62	73,30 \pm 2,98

Alle Verbindungen zeigen eine Wirkung gegen die Tumorzellen, die jedoch stark durch die Struktur der Verbindungen beeinflusst wird. Cisplatin zeigt die höchste Zytotoxizität. Verbindungen **1** und **5**, mit jeweils der Spacerlänge 11, haben die höchste Aktivität der Gallensäurekonjugate. Bei kürzeren Kettenlängen nimmt der IC₅₀-Wert deutlich zu (**2**, **3**, **4**). Die Carboplatin-derivate ohne Gallensäure-Fragment (**6**, **7**) zeigen ebenfalls eine deutlich geringere Aktivität, was zumindest bei Verbindung **7** verwundert, da das strukturell analoge Cisplatin-Konjugat eine ähnlich starke Inhibierung des Zellwachstums wie die Verbindungen **1** und **5** hervorgerufen hat[54]. Für die weiterführenden Untersuchungen (Zellzyklus, Apoptose) war es entsprechend der Methodenvorschrift notwendig von ausgewählten Verbindungen den IC₈₀-Wert zu bestimmen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Die IC₈₀-Werte (in μM mit Standardabweichung). Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von mindestens 3 Replikaten dar

Compound	Cisplatin	1	4	5
HepG2	2.0 \pm 0.05	24.7 \pm 0.89	71.6 \pm 0.69	21.7 \pm 1.39

4.2. Zellzyklusanalysen

Anhand von DNA-Histogrammen kann die Verteilung der Zellen im Zellzyklus bestimmt werden. Dafür wurden HepG2 Zellen mit den Verbindungen ChAPt(11)Cis 1, ChAPt(8)Carbo 4, ChAPt(11)Carbo 5 und Cisplatin behandelt und nach 24h, 48h und 72h mittels eines Durchflusszytometers eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Für die Behandlung wurde die IC₈₀-Konzentration ausgewählt. Mit diesen Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob die Substanzen einen Zellzyklusarrest induzieren können.

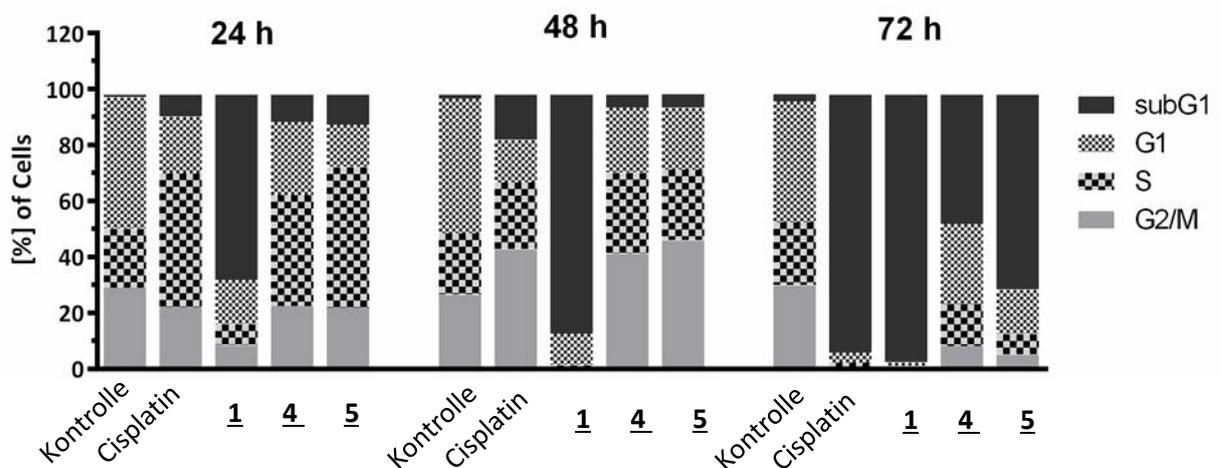


Abbildung 9. Prozentuale Verteilung von HepG2-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlung mit Cisplatin sowie den Verbindungen 1, 4 und 5 für 24, 48 und 72 Stunden. Für die Behandlung wurde die IC₈₀-Konzentration verwendet. Gezeigt werden die Mittelwerte von 3 Replikaten.

Zellen, die in den Zustand der Apoptose übergegangen sind, findet man im Allgemeinen als subdiploiden Peak (SubG1). Der SubG1-Peak gibt die Zahl der Zellen wieder, bei denen die DNA fragmentiert vorliegt. Cisplatin sowie die Verbindungen 4 und 5 verursachen zeitabhängig den Arrest unterschiedlicher Zellzyklus-Phasen. Nach 24 h tritt ein S-Phasen Arrest auf und nach 48 h ein G2/M-Phasen-Arrest. Nach 72 Stunden steigt die Zahl der Zellen in der SubG1-Phase sehr stark an. Im Unterschied zu Cisplatin verursacht die Verbindung 1 keinen S-Phasen- bzw. G2/M-Phasen-Arrest, sondern es erhöht sich unmittelbar der SubG1-Peak (Abbildung 10 und 11), während die Zahl der Zellen in den anderen Phasen kontinuierlich abnimmt.

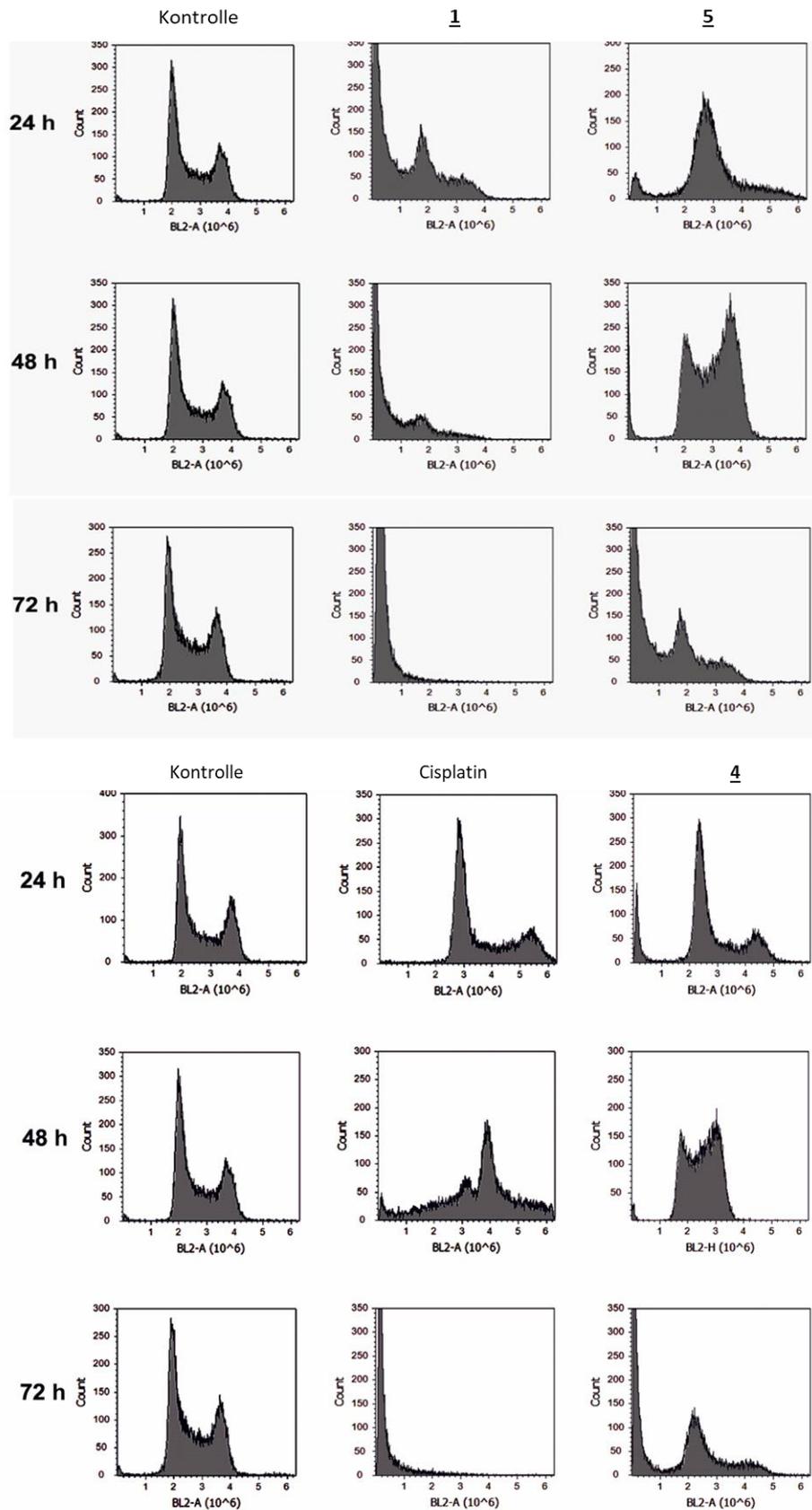


Abbildung 10. Zellzyklusanalyse von HepG2-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin sowie der Verbindung 1, 4 und 5 für 24, 48 und 72 Stunden. Für die Behandlung wurde die IC₈₀-Konzentration verwendet. Gezeigt werden die Mittelwerte von 3 Replikaten.

4.3 Apoptoseanalyse der Verbindungen.

4.3.1 Annexin V – assay

Eine Möglichkeit nachzuweisen, ob eine Substanz in der Zelle Apoptose auslöst, ist das AnnexinV-assay. Dafür wird eine Eigenschaft genutzt, die nur für apoptotische Zellen, aber nicht für nekrotische Zellen charakteristisch ist. Kurz nach der Induktion der Apoptose geht die Phospholipidassymmetrie der Zellmembran verloren[55]. In normalen Zellen sind Phosphatidylserine nur in der zum Inneren der Zelle gerichteten Lipidschicht der Zellmembran zu finden. In apoptotischen Zellen hingegen findet man sie in großer Zahl auch auf der äußeren Zellmembran. Die Barriere-Funktion ist aber noch vorhanden. Zur Sichtbarmachung dieses Vorganges setzt man zwei unterschiedliche Farbstoffe ein – AnnexinV und Propidiumiodid[56;57]. AnnexinV bindet an die Phosphatidylserine, Propidiumiodid ist nicht membrangängig und gelangt somit bei intakter Barriere-Funktion der Zellmembran nicht in die Zellen. Die Verteilung der Farbstoffe an bzw. in der Zelle wird im Durchflusszytometer bestimmt und nach Auswertung der Daten können 4 Populationen unterschieden.

- lebende Zellen – kein Signal für AnnexinV, kein Signal für Propidiumjodid
- früh apoptotische Zellen – positives Signal für AnnexinV, kein Signal für Propidiumjodid
- spät apoptotische Zellen – positives Signal für AnnexinV, positives Signal für Propidiumjodid
- nekrotische Zellen – kein Signal für AnnexinV, positives Signal für Propidiumjodid

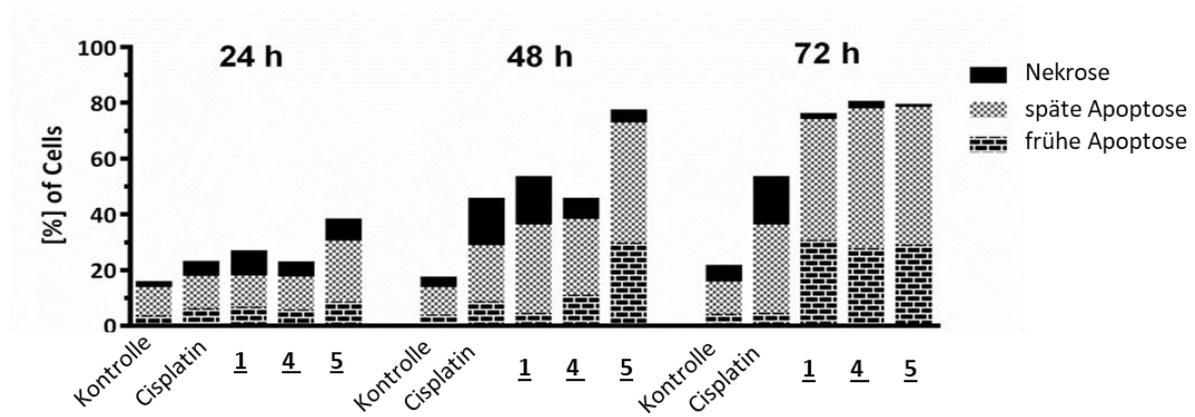


Abbildung 11. Verteilung von Zellen in Prozenten auf die Populationen - frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose. Die HepG2 Zellen wurden mit Cisplatin sowie den Verbindungen **1**, **4** und **5** mit dem IC₈₀ behandelt (24 h, 48 h und 72 h). Gezeigt werden die Mittelwerte von 3 Replikaten.

Für die Apoptoseanalyse mittels AnnexinV-assay wurden die HepG2 Zellen mit Cisplatin sowie den Verbindungen 1, 4 und 5 mit der IC_{80} Konzentration behandelt. Nach 24 h, 48 h und 72 h erfolgte die Färbung mit AnnexinV/Propidiumiodid und die FACS-Analyse (Abbildung 11, 12a, 12b). Die Ergebnisse nach 24 h weisen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Zahl der apoptotischen Zellen zwischen den behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle auf. Nach 48 Stunden ist bei Zellen die mit den Verbindungen Cisplatin und dem Cisplatin-konjugat 1 behandelt wurden, die Apoptoserate (früh+spät) im Vergleich zur Kontrolle um 15 bzw. 22% gestiegen, 14% der Zellen zeigen Nekrose. Zellen, die mit den Carboplatin-konjugaten 4 und 5 behandelt wurden, weisen für den gleichen Zeitraum eine im Vergleich zur Kontrolle gestiegene Apoptoserate um 25 bzw. 59% auf. Auch nach 72 h ist ein deutlicher Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen festzustellen.

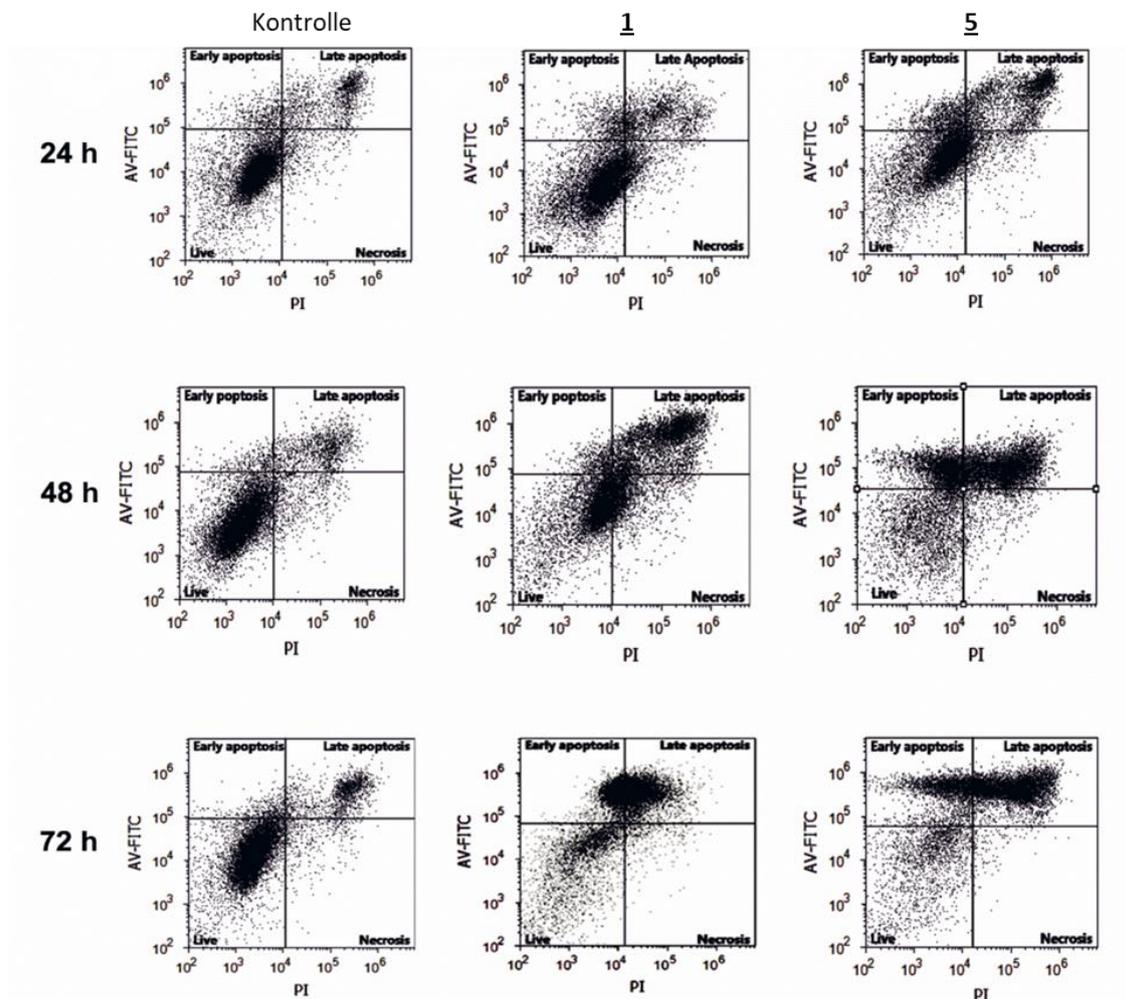


Abbildung 12a. Graphische Darstellung der Verteilung von Zellen auf die Populationen – lebend, frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose. Die HepG2 Zellen wurden mit den Verbindungen 1 und 5 mit dem IC_{80} behandelt (24 h, 48 h und 72 h).

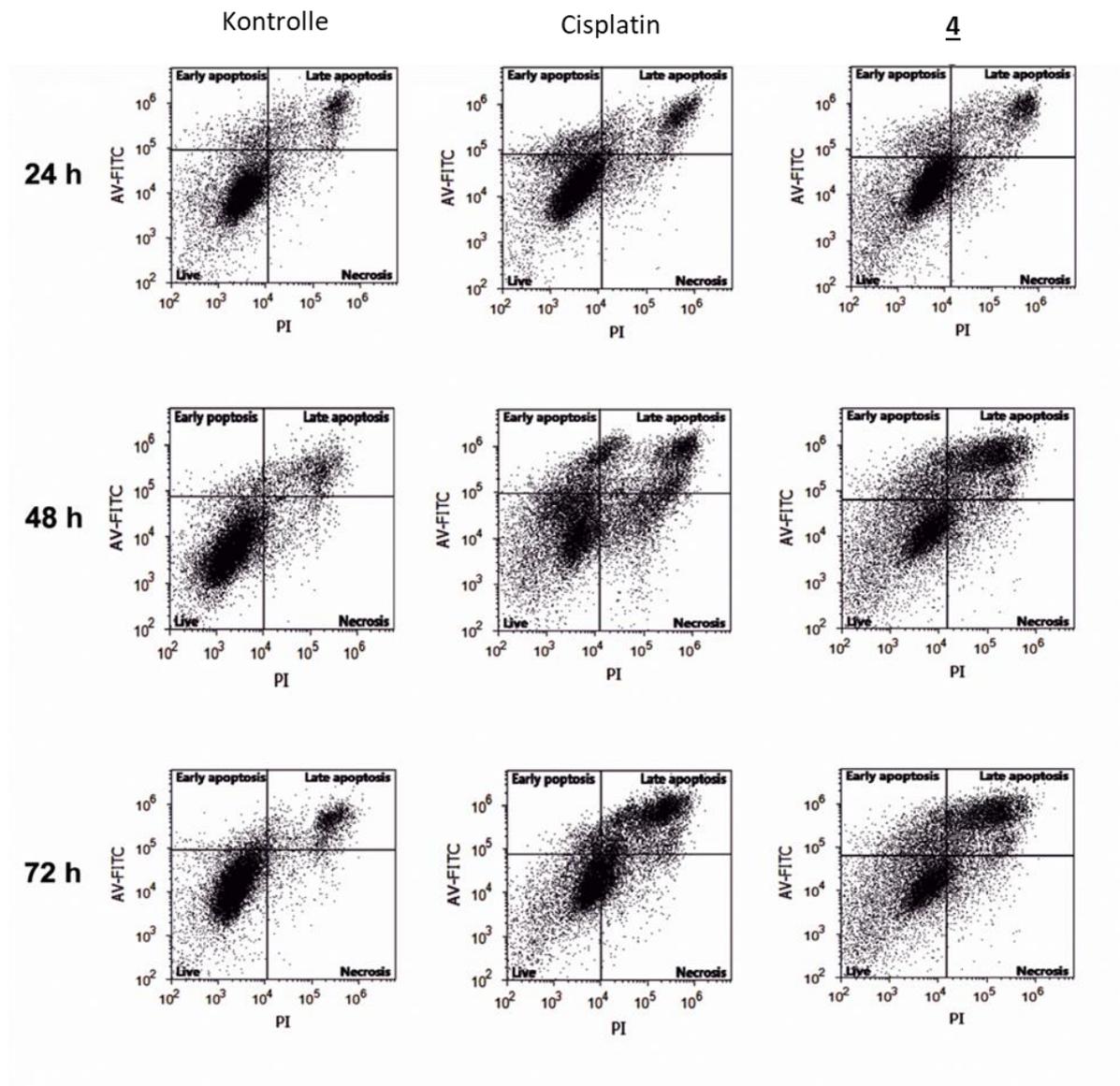


Abbildung 12b. Graphische Darstellung der Verteilung von Zellen auf die Populationen – lebend, frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose. Die HepG2 Zellen wurden mit den Verbindungen Cisplatin und 4 mit dem IC₈₀ behandelt (24 h, 48 h und 72 h).

4.3.2 Caspase assay

Durch Messung der Caspasenaktivität hat man eine weitere Möglichkeit die Induktion von Apoptose nachzuweisen. Der von uns verwendete Assay FLICA (*fluorochrome labeled inhibitor of caspases*) beruht darauf, dass ein für die jeweilige Caspase spezifischer Inhibitor eingesetzt wird, welcher nur an das aktive Zentrum der Caspase binden kann[58]. Die Bestimmung erfolgt wiederum mittels Durchflusszytometrie. Hierbei können zwei Populationen bestimmt werden. Im Falle einer inaktiven Caspase erhält man lediglich das Autofluoreszenz – Signal. Bei

aktiven Caspasen erhöht sich die Fluoreszenz in der Zelle um das 10-fache. Es wurden die Initiator-Caspasen 8 und 9 gemessen, welche den Zelltod auslösen, gleichfalls wurde die Aktivität der Effektor-Caspase 3 bestimmt, welche zelleigene Proteine spaltet, aber auch Nukleasen aktiviert, die wiederum die DNA spalten.

Die HepG2 Zellen wurden mit Cisplatin sowie den Verbindungen **1**, **4** und **5** in IC_{80} – Konzentration für 24 h, 48 h und 72 h behandelt (Abbildung 13). Auch in der Kontrolle sind zu allen 3 Messzeitpunkten eine gewisse Anzahl aller 3 Caspasen aktiv (<20%). Nach 24 h fällt der Anstieg der Caspasenaktivierung gegenüber der Kontrolle noch verhältnismäßig gering aus, Ausnahmen bilden die Verbindungen **4** und **5**, bei denen die Caspase 3 schon deutlich aktiviert wurde. Bei Verlängerung der Behandlungszeit auf 48 h sieht man bei Verbindung **1** den stärksten Aktivitätsanstieg bei allen 3 Caspasen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Muster der Caspasenaktivierung bei allen 4 Wirkstoffen ähnlich ist, die Verbindungen 1 und 5 die höchsten Steigerungen erreichen und alle 3 Caspasen in ähnlicher Weise aktiviert werden.

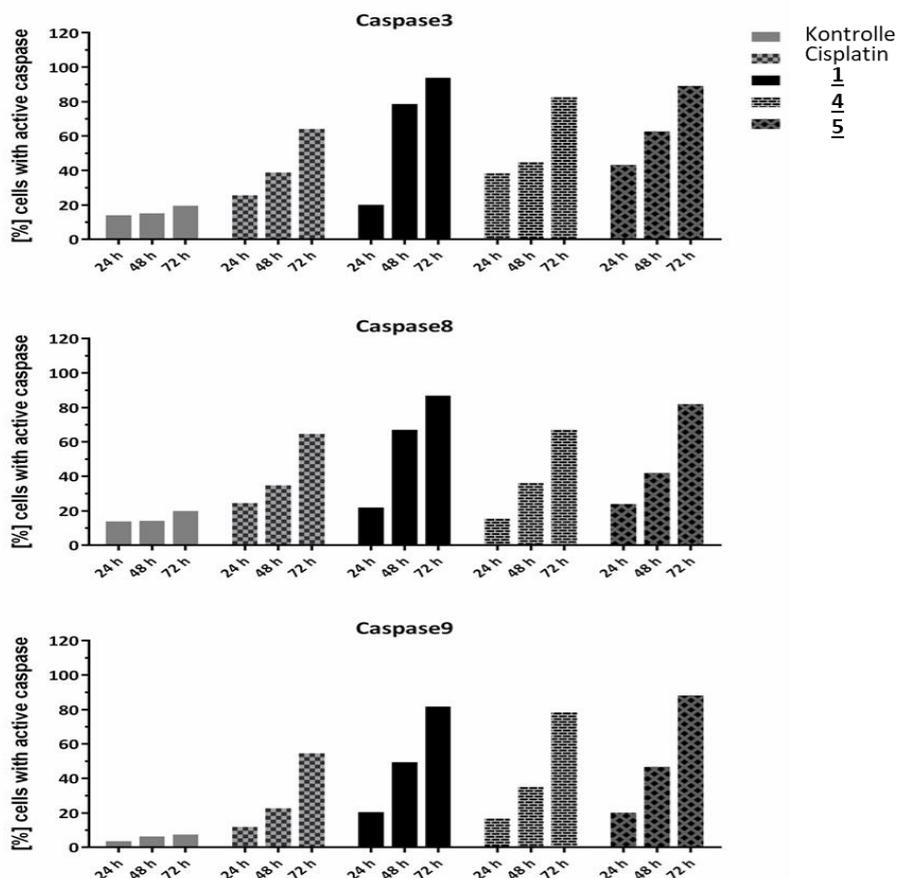


Abbildung 13. Caspase – assay von HepG2 Zellen. Gezeigt sind unbehandelte und mit Cisplatin sowie den Verbindungen **1**, **4** und **5** in IC_{80} – Konzentration behandelte Zellen (24 h, 48 h und 72 h). Es wurde 2 Replikate durchgeführt.

5. Diskussion

Ausgangspunkt für die inhaltliche Zielstellung dieser Arbeit waren die Untersuchungen von Betulinsäure-Cisplatin-Konjugaten, die zu der Erkenntnis führten, dass der Wirkmechanismus dieser Verbindungen dem der Betulinsäure entspricht und das Platinfragment keinen Einfluss auf die Wirkung hat[53].

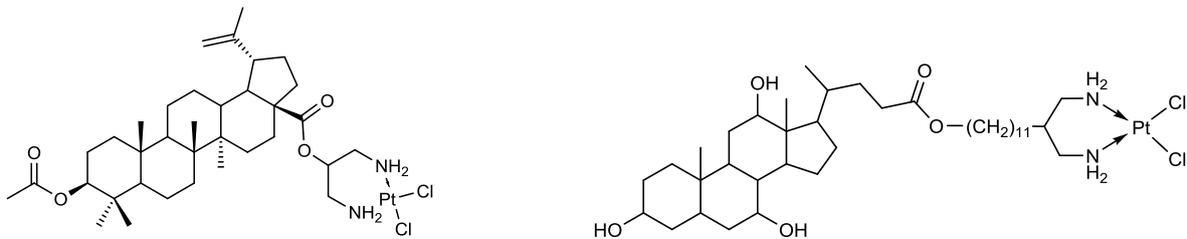


Abbildung 14. Betulinsäure-Cisplatin-Konjugat (links) und Gallensäure-Cisplatin-Konjugat (rechts)

Die Vermutung lag nahe, dass die hohe Wirksamkeit und die resistenzbrechenden Eigenschaften der Gallensäure-Cisplatin-Konjugate ebenso auf das lipophile Grundgerüst zurückzuführen sein könnten.

Worin bestehen die wesentlichen Unterschiede in den Wirkmechanismen?

Wirkmechanismus Cisplatin/Carboplatin:

Cisplatin und Carboplatin sind planare Metallkomplexe, die sich durch ihre Abgangsgruppen unterscheiden. Carboplatin (cis-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)platin(II)) wurde mit dem Ziel entwickelt, die toxischen Nebenwirkungen von Cisplatin zu verringern und die Stabilität und Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Dies wird durch den Malonsäure-Chelatring erreicht, der in Boot-Konformation vorliegt, dadurch über der Platinebene lokalisiert ist, was wiederum die Ausbildung von Kolumnarstrukturen verhindert und somit die Solvatisierung erleichtert. Dies hat allerdings auch zur Folge, dass Nukleophile weniger gut angreifen können [59;60].

Das Wirkprinzip der beiden Verbindungen ist gleich. Die Aufnahme der Verbindungen erfolgt durch passiven Transport, aber auch aktiv durch den Kupfertransporter CTR1 sowie organische Kationentransporter (OCT). Desweiteren beeinflussen die Efflux-Kupfertransporter (ATP7A/ATP7B) die Konzentration der Platinverbindungen in der Zelle [61]. Auf Grund des Chlorid-Unterschusses in der Zelle findet ein Austausch der Abgangsgruppen (bei Cisplatin – Chlorid, bei Carboplatin – Cyclobutan-1,1-dicarboxylat) durch das Nukleophil Wasser statt. Der

Ligandenaustausch geschieht bei Carboplatin langsamer, da der Cyclobutanring das Platinzentrum abschirmt. Dies führt zu einer geringeren Reaktivität und einem reduzierten Toxizitätsprofil [62].

Der aus dem di-aqua-Komplex gebildete Di-hydroxy-Komplex ist dann in der Lage, die DNA im Zellkern, als auch mitochondriale DNA anzugreifen (Abbildung 15). Es bilden sich, durch kovalente Anbindung des Platinkomplexes an Guanin und Adenin (GG und AG-Dinukleotidsequenzen), hauptsächlich 1,2-oder 1,3 intrastrang- Quervernetzungen. Dies führt zu Störungen der helikalen Struktur der DNA, welche wiederum durch Reparaturenzyme, Transkriptionsfaktoren oder HMG-Proteine erkannt werden und eine Hemmung der DNA-Replikation und Transkription bewirkt, was letztendlich den programmierten Zelltod auslöst. [61;63].

Die Ursachen für die Resistenzen gegenüber Platinverbindungen sind vielfältig. Gesteigerter Efflux der Substanzen spielt genauso eine Rolle, wie zelluläre Detoxifikation oder gesteigerte Reparatur von induzierten DNA-Schädigungen [62-64].

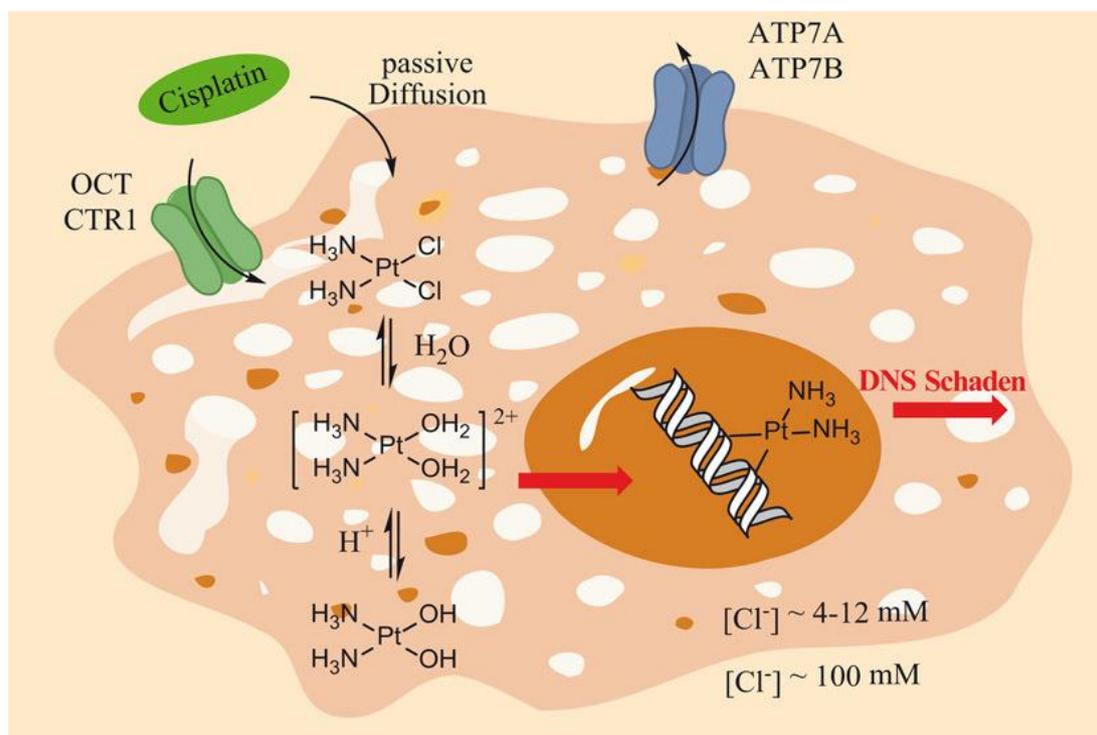


Abbildung 15. Wirkmechanismus von Cisplatin (aus Metal complexes as anticancer agents: concepts in tumor research and mechanisms of action [61])

Die durch die Störung der helikalen Struktur der DNA ausgelösten Prozesse haben einen charakteristischen Einfluss auf den Zellzyklus. Es gibt zwei Kontrollpunkte im Zellzyklus (G1/S und G2/M) die verhindern sollen, dass Mutationen angereichert bzw. weitergegeben werden. Der

G1/S Kontrollpunkt erlaubt den Einsatz aller Reparaturmechanismen bevor die DNA dupliziert wird. Der G2/M Kontrollpunkt ermöglicht die Reparatur von in der S- oder G2-Phase geschädigter DNA, damit sie nicht in der nachfolgenden Teilung weitergegeben wird. Charakteristisch für die Wirkung von Platinkomplexen ist demnach ein S- oder G2/M-Phasenarrest [65-67].

Wirkmechanismus Betulinsäure:

Die Apoptoseinduktion bei Betulinsäure und –derivaten beruht auf einem p53- und CD95 unabhängigen Weg [68]. Allgemein wird anerkannt, dass die Voraussetzung für die Einleitung der Apoptose die Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) ist und dies mit der Aktivierung von Caspasen sowie der Bildung von ROS einhergeht [69;70]. Hervorgerufen wird dies durch die Freisetzung von Cytochrom c aus der mitochondrialen Matrix. Bei Betulinsäure erfolgt die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran (MMP) unabhängig von den Proteinen BAK und BAX [70;71]. Potze et al. [72] konnten zeigen, dass Betulinsäure in die mitochondriale Membran eingebaut wird und dort die Oxidation der Cardiolipide beeinflusst, wodurch oxidierte Cardiolipide in die äußere Membran umverteilt werden und zu MOMP führen. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass Betulinsäure mit den in humanen Mitochondrien am häufigsten vorkommenden Cardiolipid BHCL sehr stark interagiert und so cardiolipidreiche Domänen in der Membran zerstört werden. Gleichfalls könnten die betulinsäurereichen Domänen in der inneren Membran als katalytisches Zentrum für ROS dienen [73]. Neben diesem gerade beschriebenen Wirkmechanismus, werden weitere Wirkungen der Betulinsäure zur Induktion der Apoptose beschrieben z.B. Nekroptose und Autophagie [74-81].

Charakteristisch für Betulinsäure- und deren Derivate ist, neben der Caspasenaktivierung, der bei Zellzyklusuntersuchungen auftretende SubG1-Peak ohne vorherigen S- oder G2/M-Phasenarrest.

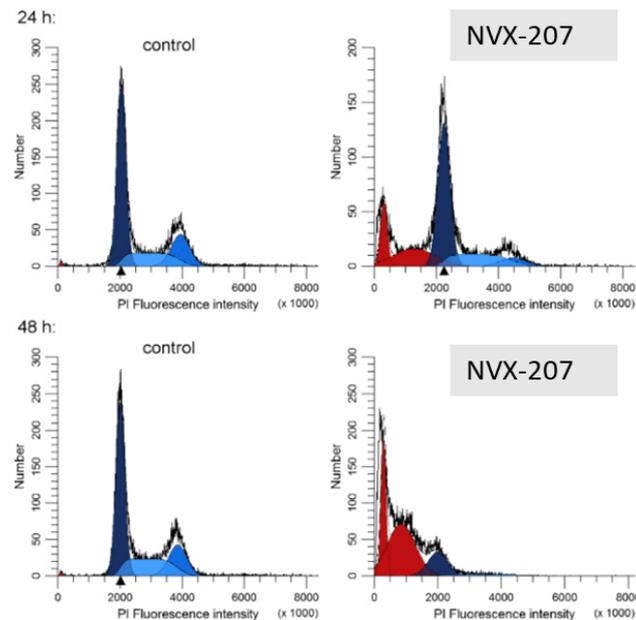


Abbildung 16. Typisches Bild einer Zellzyklusanalyse eines Betulinsäurederivates (NVX-207) nach 24 h und 48 h[82], subG1 (rot)

Nach Behandlung mit Betulinsäure bzw. Betulinsäurederivaten nehmen die Zellen in der SubG1-Phase im gleichen Maße zu wie die Zellen in den anderen Phasen des Zellzyklus abnehmen [82-91]. Einige Autoren stellen auch einen G0/G1-Arrest fest[92-94]. Hierbei ist jedoch zu bemerken, dass die Messungen nur über einen Zeitraum von 24 h und mit niedriger Wirkstoffkonzentration erfolgten und in Abhängigkeit von Substanz und Zelltyp der SubG1-Peak erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten kann.

Im Falle der Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate (Abbildung 14) ergaben die Untersuchungen, dass sie sich hinsichtlich der Caspasenaktivität, der Apoptoseinduktion und selbst in der Größenordnung des IC_{50} -Wertes nicht wesentlich von den Werten der Betulinsäure unterscheiden. Exemplarisch sei dies an Hand der Zellzyklusuntersuchungen gezeigt, bei denen Cisplatin einen S und G2/M Arrest zeigt, Betulinsäure keinen Zellzyklusarrest hervorruft sondern direkt zu einem starken Anstieg des SubG1-Peaks führt.

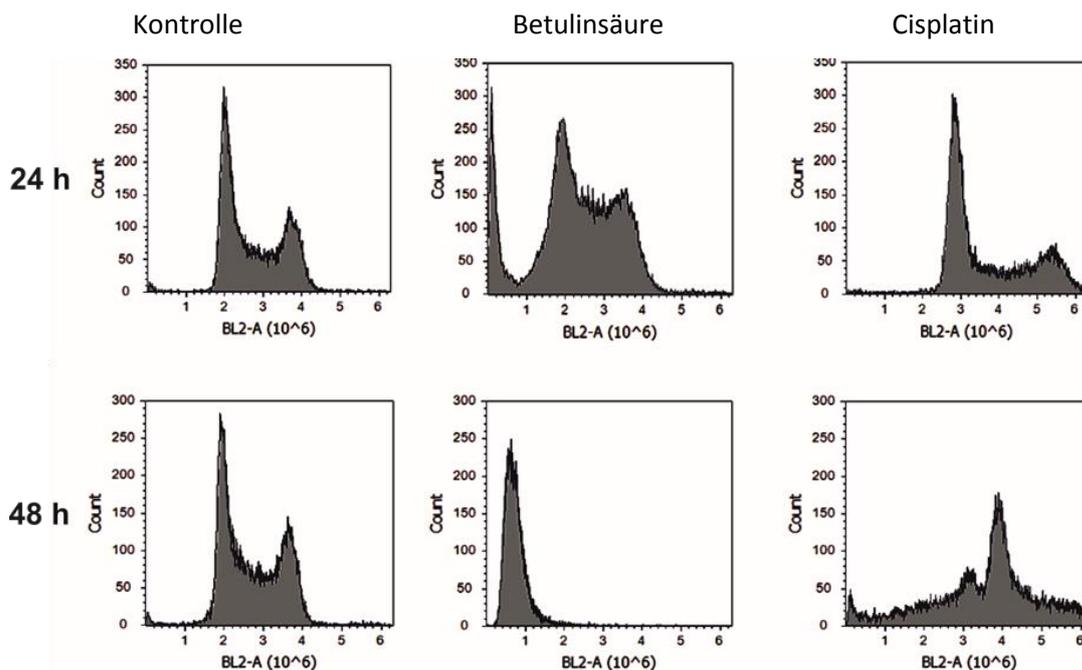


Abbildung 17. Vergleich der Zellzyklusuntersuchung nach Behandlung mit Betulinsäure bzw. Cisplatin [53].

Überraschenderweise führt der, im Verhältnis zum Gesamtmolekül, geringfügige strukturelle Unterschied zwischen ChAPt(11)Cis 1 und ChAPt(11)Carbo 5, der nur im Austausch der Chloro-Liganden gegen das Cyclobutan-1,1-dicarboxylat besteht, zu deutlichen Unterschieden in der Beeinflussung des Zellzyklus (Abbildung 18). Die Behandlung mit ChAPt(11)Cis 1 führt schon nach kurzer Zeit unmittelbar zu einem starken Anstieg des SubG1-Peaks ohne vorherigen S- oder G2/M-Phasenarrest. Dies entspricht den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate[53].

Im Gegensatz dazu bewirkt ChAPt(11)Carbo 5, ähnlich wie Cisplatin einen S und G2/M Arrest (Abbildung 17). Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen aber hierfür längst nicht den Schluss zu, dass das Molekül, ähnlich wie Cisplatin oder Carboplatin zum Zellkern vordringt und dort DNA-Schäden hervorruft. Hierfür wäre eine Analyse der Platinakkumulation notwendig.

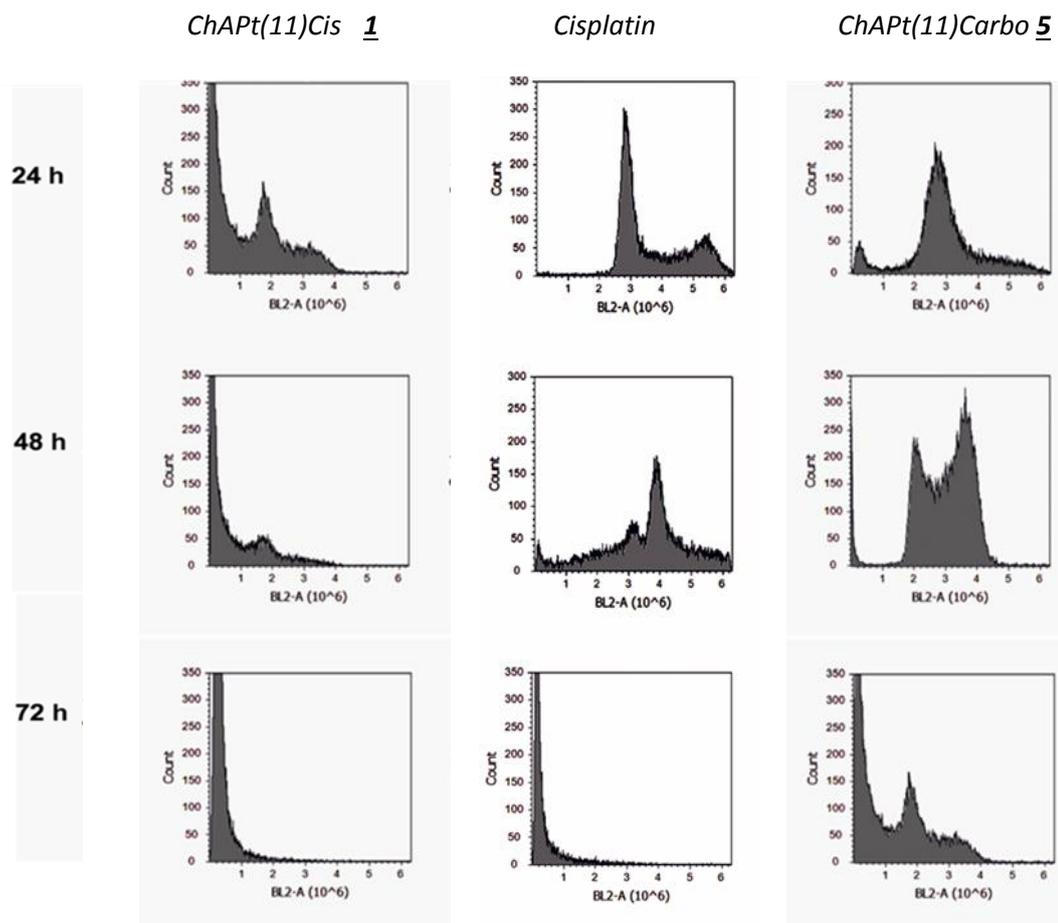


Abbildung 18. Vergleich der Zellzyklusuntersuchung nach Behandlung mit ChAPt(11)Cis 1, Cisplatin, ChAPt(11)Carbo 5

Im Falle von ChAPt(11)Cis 1 wurde diese bereits gemessen und ein sehr schnelles Eindringen dieser Verbindung, insbesondere in Cisplatin-resistente Zellen, festgestellt[41;51]. Zum damaligen Zeitpunkt wurde jedoch nicht untersucht, ob auch im Zellkern eine höhere Konzentration vorliegt.

Dies wurde aber einige Zeit später an einer Substanz getestet, die eine Zwischenstufe auf dem Syntheseweg zu ChAPt(11)Cis 1 und ChAPt(11)Carbo 5 ist und eine ähnlich hohe Lipophilie besitzt (Abbildung 19)[54].

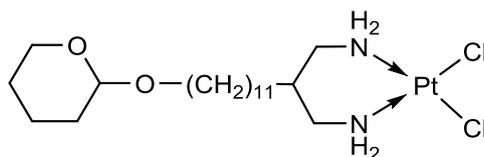


Abbildung 19. 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II), THP-C11-Pt

Diese Substanz hatte das Interesse geweckt, weil sie ebenfalls in der Lage war die Cisplatin-Resistenz zu brechen, jedoch bedeutend leichter zugänglich war. Es wurden mehrere interessante und für diese Untersuchung relevante Resultate gefunden[54]:

1. Die Geschwindigkeit der Platinakkumulation in der Zelle ist stark von der Spacerlänge abhängig, steigende Lipophilie erhöht die Eindringgeschwindigkeit.
2. Die hohe zelluläre Platinakkumulation ist nicht mit einer höheren DNA-Platinierung verbunden.
3. Die Substanz verursacht keinen Zellzyklus-Arrest, sondern führt direkt zu einem Anstieg des SubG1-Peaks.
4. THP-C11-Pt induziert einen raschen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, welcher durch ROS vermittelt wird.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die Gallensäure-Cisplatin-Konjugate und ebenso die Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate ihre Wirkung, inklusive Resistenzbrechung, nicht durch die Interaktion mit der genomischen DNA erreichen, sondern einer der Hauptangriffspunkte derartiger lipophilen Strukturen die Mitochondrienmembran ist. Ob die Verbindung ChAPt(11)Carbo **5**, auf Grund des langsameren Ligandenaustausches doch in der Lage ist mit der genomischen DNA zu interagieren, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht endgültig geklärt werden. Die Befunde für ChAPt(11)Cis **1** sowie THP-C11-Pt (Abbildung 18) legen nahe, dass die schnelle Akkumulation dieser Substanzen in der Zelle zu einem massiven Einbau in die Mitochondrienmembran führt und dadurch unmittelbar Apoptose ausgelöst wird. Mögliche Wechselwirkungen mit der genomischen DNA werden dadurch überdeckt bzw. spielen keine Rolle.

Die Ergebnisse einer Reihe von Publikationen, welche sich ebenfalls mit lipophilen, resistenzbrechenden Platinkomplexen [28;29;39;95-98] bzw. „mitochondria-targeted“ Platinkomplexen[99-101] beschäftigen, können im Nachhinein ebenfalls in diesem Sinne interpretiert werden.

Ebenso sind eine Vielzahl von Konzepten und Verbindungen betroffen, die in einer Reihe von Publikationen als „Next Generation of Cisplatin-Like Platinum(II)Complexes“ bezeichnet werden (Abbildung 20) [48;102-106].

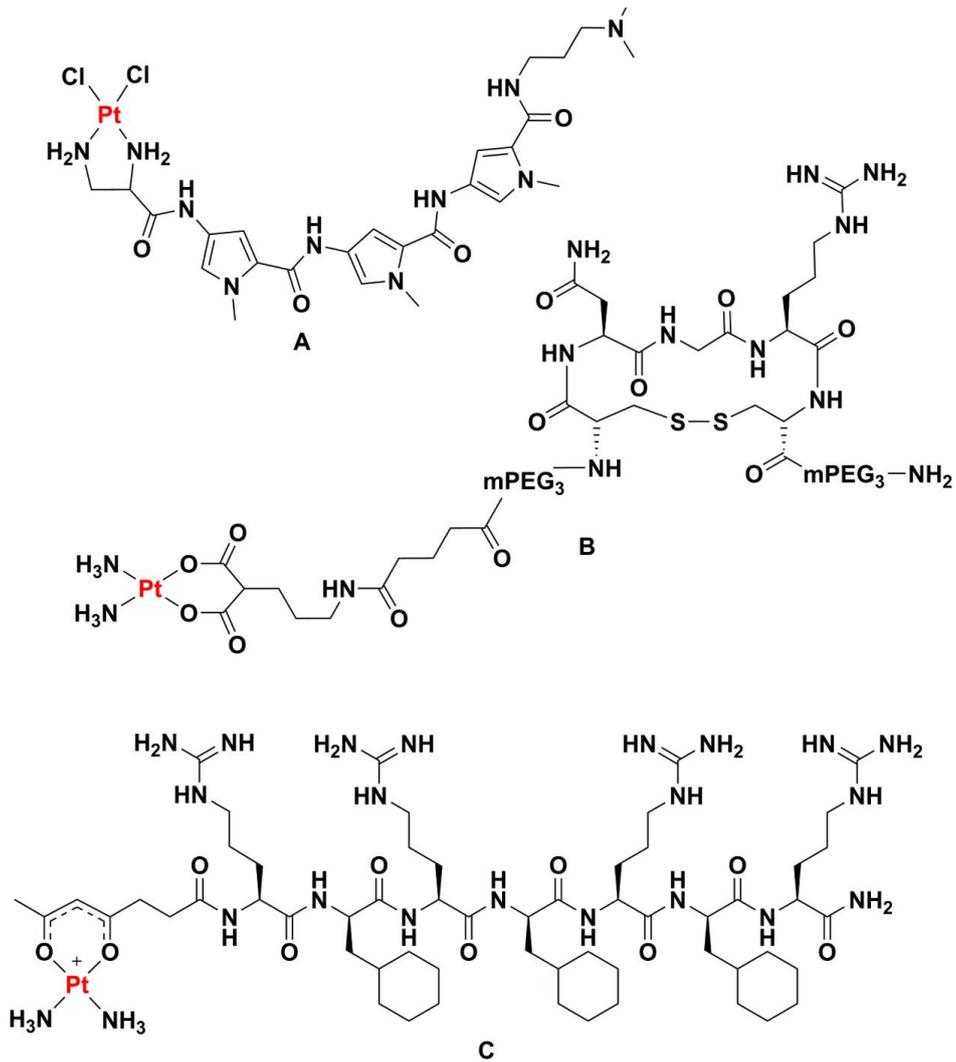


Abbildung 20. Beispiele für „Next Generation of Cisplatin-Like Platinum(II)Complexes“, Estrogen-Receptor-, Folat- and Peptid-Targeting Platin(II)komplexe, aus Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. [106]

Und trotzdem haben diese Projekte zu Erkenntnissen geführt, die es ermöglichen neue Modelle zu entwickeln, die zu besseren Ergebnissen führen.

Beispielhaft dafür sei ein modernes, vielversprechendes Drug-Targeting-Konzept genannt, welches auf den Erkenntnissen der vorherigen Entwicklungen beruht und zeigt, dass das Potential von Cisplatin und seiner Analoga effektiv genutzt werden kann, indem Antikörper zu einem zielgerichteten Transport verwendet werden[107;108].

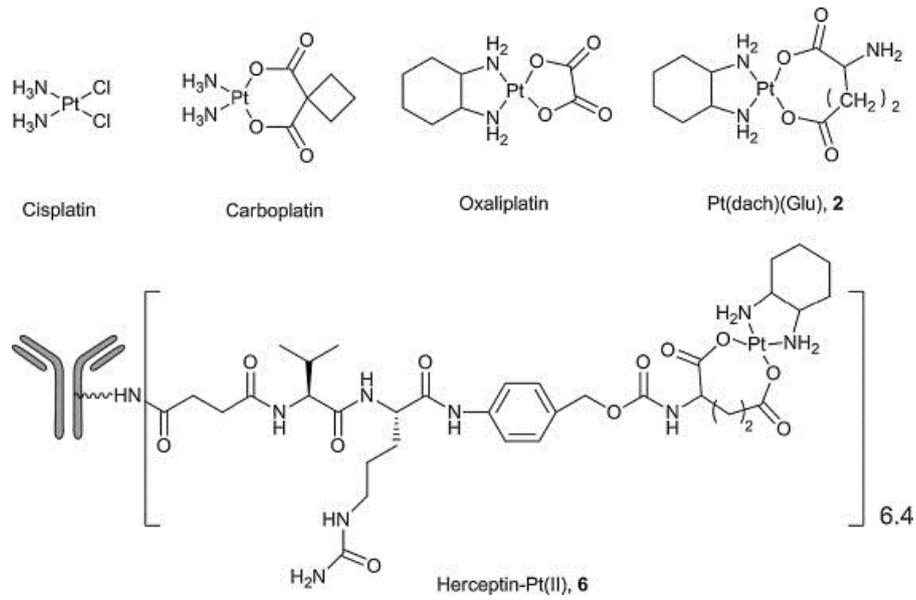
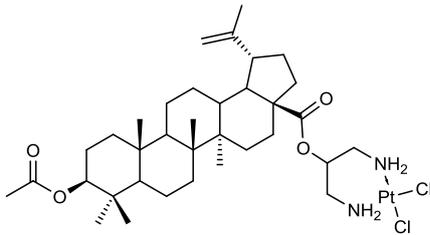


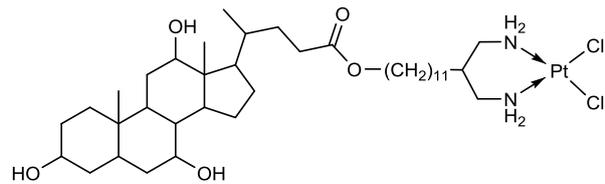
Abbildung 21. Antikörper-Pt(II)-Konjugat (aus [107]) Das Herceptin-Pt-Konjugat zeigt eine spezifische Wirkung gegen die HER2-positive Tumorzelllinie SK-BR-3, es bindet an die Zellen und wird internalisiert.

6. Zusammenfassung

Ausgangspunkt für die inhaltliche Zielstellung dieser Arbeit waren die umfangreichen Untersuchungen von Betulinsäure-Cisplatin-Konjugaten, die zu der Erkenntnis führten, dass der Wirkmechanismus dieser Verbindungen dem der Betulinsäure entspricht und das Platinfragment keinen Einfluss auf die Wirkung hat[53].



Betulinsäure-Cisplatin-Konjugat



Gallensäure-Cisplatin-Konjugat (rechts)

Die Vermutung lag nahe, dass die hohe Wirksamkeit und die resistenzbrechenden Eigenschaften der Gallensäure-Cisplatin-Konjugate ebenso auf das lipophile Grundgerüst zurückzuführen sein könnte.

Zur Überprüfung dieser These wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Analyse der Zytotoxizität von 4 Gallensäure-Carboplatin-Konjugaten unterschiedlicher Spacerlänge, eines Gallensäure-Cisplatin-Konjugates, zwei Vorstufen dieser Konjugate sowie von Cisplatin mittels SRB assay.
2. Zellzyklusanalyse der Verbindungen ChAPt(11)Cis **1**, ChAPt(8)Carbo **4**, ChAPt(11)Carbo **5** und Cisplatin.
3. Apoptoseanalyse der Verbindungen ChAPt(11)Cis **1**, ChAPt(8)Carbo **4**, ChAPt(11)Carbo **5** und Cisplatin mittels AnnexinV assay und Caspase(3, 8, 9) assay.

Zellzyklusanalysen sowie Apoptoseanalysen wurden mit den Gallensäure-Carboplatin-Konjugaten erstmals durchgeführt.

Alle Verbindungen zeigen eine Wirkung gegen die Tumorzellen, die jedoch stark durch die Struktur der Verbindungen beeinflusst wird. Verbindungen ChAPt(11)Cis und ChAPt(11)Carbo mit jeweils der Spacerlänge 11, haben die höchste Aktivität der Gallensäurekonjugate. Bei kürzeren Kettenlängen nimmt der IC₅₀-Wert deutlich zu.

Mittels AnnexinV-assay und Caspasen-assay konnte der Nachweis geführt werden, dass die Gallensäure-Cisplatin- sowie die Gallensäure-Carboplatin-Verbindungen Apoptose induzieren.

Die Zellzyklusuntersuchung führte zu dem überraschendem Ergebnis, dass der im Verhältnis zum Gesamtmolekül geringfügige strukturelle Unterschied zwischen ChAPt(11)Cis 1 und ChAPt(11)Carbo 5, welcher nur im Austausch der Chloro-Liganden gegen das Cyclobutan-1,1-dicarboxylat besteht, deutliche Unterschiede in der Beeinflussung des Zellzyklus hervorruft. Die Behandlung mit ChAPt(11)Cis 1 führt schon nach kurzer Zeit unmittelbar zu einem starken Anstieg des SubG1-Peaks ohne vorherigen S- oder G2/M-Phasenarrest. Dies entspricht den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate[53].

Im Gegensatz dazu bewirkt ChAPt(11)Carbo 5, ähnlich wie Cisplatin einen S und G2/M Arrest. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen aber hierfür längst nicht den Schluss zu, dass das Molekül, ähnlich wie Cisplatin oder Carboplatin zum Zellkern vordringt und dort DNA-Schäden hervorruft. Hierfür wäre eine Analyse der Platinakkumulation notwendig.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Paschke, S., Mueller, T., Schmoll, H.-J., Vanchanagir, K.,. More insight into the mode of action of lipophilic antitumor drugs containing a platinum(II)fragment. *J Med Biomed Appl Sci* 2017;5(3):111-24.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65[2], 87-108. 2015.
- [3] Croce CM. Oncogenes and cancer. *N.Engl.J.Med.* 358[5], 502-511. 2008.
- [4] Weinstein IB, Joe A. Oncogene Addiction. *Cancer Res.* 68[9], 3077-3080. 2008.
- [5] Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, Cobaleda C, Sanchez-Garcia I. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBO J.* 32[11], 1502-1513. 2013.
- [6] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell (Cambridge, Mass.)* 100[1], 57-70. 2000.
- [7] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell (Cambridge, MA, U.S.)* 144[5], 646-674. 2011.
- [8] Trudu F, Amato F, Vanhara P, Pivetta T, Pena-Mendez EM, Havel J. Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *Journal of Applied Biomedicine* 2015;13(2):79-103,
- [9] Bergamo A, Sava G. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chem Soc Rev* 2015;44(24):8818-35.
- [10] Braga SS, Silva AMS. A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics* 2013;32(20):5626-39.
- [11] Fanelli M, Formica M, Fusi V, Giorgi L, Micheloni M, Paoli P. New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coord Chem Rev* 2016;310:41-79.
- [12] Kapdi AR, Fairlamb IJS. Anti-cancer palladium complexes: a focus on PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chem Soc Rev* 2014;43(13):4751-77.
- [13] Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol* 2014;19:144-53.
- [14] Plotek M, Dudek K, Kyzioł A. Selected copper(I) complexes as, potential anticancer agent. *Chemik* 2013;67(12):1181-90.

- [15] Riccardi C, Musumeci D, Irace C, Paduano L, Montesarchio D. Ru(III) Complexes for Anticancer Therapy: The Importance of Being Nucleolipidic. *Eur J Org Chem* 2016;Ahead.
- [16] Spreckelmeyer S, Orvig C, Casini A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. *Molecules* 2014;19(10):15584-610, 27.
- [17] Yang Q, Luo W, Wang J, Liu H. Organometallic Ru (II) complexes as anticancer agents. *Zhongguo Kexue: Huaxue* 2014;44(4):437-47.
- [18] Taylor M, Filby A. Health Impact Analysis of Cisplatin, Carboplatin and Oxaliplatin. *Johnson Matthey Technol Rev* 2017;61:32-9.
- [19] Cheff DM, Hall MD. A Drug of Such Damned Nature. Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research. *J.Med.Chem.* 60[11], 4517-4532. 2017.
- [20] Von Angerer E. Platinum complexes with specific activity against hormone-dependent tumors. *Met.Complexes Cancer Chemother.* 73-83. 1993.
- [21] Knebel NG, Von Angerer E. 2-Phenylindole-linked [2-(aminoalkyl)pyridine]dichloroplatinum(II): complexes with a selective action on estrogen receptor positive mammary tumors. *J.Med.Chem.* 34[7], 2145-2152. 1991.
- [22] Von Angerer E, Birnboeck H, Knebel N. Platinum complexes with a selective action on estrogen receptor-positive mammary tumors. *Anti-Cancer Drug Des.* 4[1], 21-35. 1989.
- [23] Knebel N, Schiller CD, Schneider MR, Schoenenberger H, Von Angerer E. Carrier mediated action of platinum complexes on estrogen receptor positive tumors. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 25[2], 293-299. 1989.
- [24] Knebel N, von AE. Platinum complexes with binding affinity for the estrogen receptor. *J Med Chem* 31[9], 1675-1679. 1988.
- [25] Georgiadis MP, Haroutounian SA, Chondros KP. Synthesis and biological studies of steroidal cis-platinum(II) complexes. *Inorg.Chim.Acta* 138[3], 249-252. 1987.
- [26] Neumann W, Crews BC, Sarosi MB, Daniel CM, Ghebreselasie K, Scholz MS, et al. Conjugation of Cisplatin Analogues and Cyclooxygenase Inhibitors to Overcome Cisplatin Resistance. *ChemMedChem* 10[1], 183-192. 2015.
- [27] Fortin S, Bresseur K, Morin N, Asselin E, Berube G. New platinum(II) complexes conjugated at position 7 of 17 -acetyltestosterone as new combi-molecules against prostate cancer: Design, synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation. *Eur.J.Med.Chem.* 68, 433-443. 2013.

- [28] Zamora A, Rodriguez V, Cutillas N, Yellol GS, Espinosa A, Samper KG, et al. New steroidal 7-azaindole platinum(II) antitumor complexes. *J.Inorg.Biochem.* 128, 48-56. 2013.
- [29] Zhang P, Yang Yw, Shen Zr. Progress in synthesis and antitumor activities of estradiol-linked platinum complex. *Mini-Rev.Med.Chem.* 13[2], 265-272. 2013.
- [30] Criado JJ, Macias R, I, Medarde M, Monte MJ, Serrano MA, Marin JJ. Synthesis and characterization of the new cytostatic complex cis-diammineplatinum(II)-chlorocholylglycinate. *Bioconjug Chem* 8[4], 453-458. 1997.
- [31] Criado JJ, Herrera MC, Palomero MF, Medarde M, Rodriguez E, Marin JJG. Synthesis and characterization of a new bile acid and platinum(II) complex with cytostatic activity. *J.Lipid Res.* 38[5], 1022-1032. 1997.
- [32] Marin JJG, Palomero MF, Herrera MC, Macias RIR, Criado JJ, Serrano MA. In vitro cytostatic activity and DNA-interaction of the new liver organotropic complex chlorobis-cholylglycinate-platinum(II). *Anticancer Res.* 18[3A], 1641-1647. 1998.
- [33] Criado JJ, Garcia-Moreno MC, Macias RR, Marin JJG, Medarde M, Rodriguez-Fernandez E. Synthesis and characterization of sodium cis-dichlorochenodeoxycholyglycinato(O,N) platinum(II) - cytostatic activity. *BioMetals* 12[3], 281-288. 1999.
- [34] Briz O, Serrano MA, Macias RIR, Marin JJG. Overcoming cisplatin resistance in vitro by a free and liposome-encapsulated bile acid derivative: Bamet-R2. *Int.J.Cancer* 88[2], 287-292. 2000.
- [35] Paschke R, Kalbitz J, Paetz C. Novel spacer linked bile acid-cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization. *Inorg.Chim.Acta* 304[2], 241-249. 2000.
- [36] Carrasco J, Criado JJ, Macias RIR, Manzano JL, Marin JJG, Medarde M, et al. Structural characterization and cytostatic activity of chlorobischolylglycinatogold(III). *J.Inorg.Biochem.* 84[3-4], 287-292. 2001.
- [37] Criado JJ, Manzano JL, Rodriguez-Fernandez E. Synthesis and characterization of Pt(II) complexes with bile acids. Kinetic studies. Cytostatic activity. *Recent Res.Dev.Lipids* 4[Pt. 1], 63-82. 2001.

- [38] Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, El-Mir MY, Serrano MA. Liver targeting of cisplatin-derived cytostatic drugs (Bamets) by coupling to bile acids. *Falk Symp.* 120[Biology of Bile Acids in Health and Disease], 271-277. 2001.
- [39] Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, et al. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chlorocholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol.Pharmacol.* 61[4], 853-860. 2002.
- [40] Larena MG, Martinez-Diez MC, Maclas RIR, Dominguez MF, Serrano MA, Marin JJG. Relationship between tumor cell load and sensitivity to the cytostatic effect of two novel platinum-bile acid complexes, Bamet-D3 and Bamet-UD2. *J.Drug Targeting* 10[5], 397-404. 2002.
- [41] Paschke R, Kalbitz J, Paetz C, Luckner M, Mueller T, Schmoll HJ, et al. Cholic acid-carboplatin compounds (CarboChAPt) as models for specific drug delivery: synthesis of novel carboplatin analogous derivatives and comparison of the cytotoxic properties with corresponding cisplatin compounds. *J.Inorg.Biochem.* 94[4], 335-342. 2003.
- [42] Criado JJ, Manzano JL, Rodriguez-Fernandez E. Bile acid-metal organotropic compounds with in vitro anticancer activity and as DNA markers in investigations of biological effects of cytotoxic platinum complexes. *Focus DNA Res.* 139-170. 2005.
- [43] Criado JJ, Manzano JL, Rodriguez-Fernandez E. New organotropic compounds. Synthesis, characterization and reactivity of Pt(II) and Au(III) complexes with bile acids: DNA interactions and 'in vitro' anticancer activity. [Erratum to document cited in CA140:052755]. *J.Inorg.Biochem.* 99[10], 2092. 2005.
- [44] Barbara C, Orlandi P, Bocci G, Fioravanti A, Di Paolo A, Natale G, et al. In vitro and in vivo antitumour effects of novel, orally active bile acid-conjugated platinum complexes on rat hepatoma. *Eur.J.Pharmacol.* 549[1-3], 27-34. 2006.
- [45] Perez-Andres M, Benito JJ, Rodriguez-Fernandez E, Corradetti B, Primo D, Manzano JL, et al. Bisursodeoxycholate(ethylenediamine)platinum(ii): a new autofluorescent compound. Cytotoxic activity and cell cycle analysis in ovarian and hematological cell lines. *Dalton Trans.* [44], 6159-6164. 2008.
- [46] Gabano E, Ravera M, Osella D. The drug targeting and delivery approach applied to platinum antitumour complexes. A coordination point of view. *Curr Med Chem* 16[34], 4544-4580. 2009.

- [47] Almendral-Parra MJ, Alonso A, Criado JJ, Manzano JL, Rodriguez-Fernandez E. Preparation and characterization of a new trans-platinum glycocholate complex. *Inorg.Chim.Acta* 376[1], 651-654. 2011.
- [48] Sanchez-Paradinas S, Almendral-Parra MJ, Perez-Andres M, Orfao A, Rodriguez-Fernandez E, Criado JJ, et al. Enhanced cytotoxic activity of bile acid cisplatin derivatives by conjugation with gold nanoparticles. *J Inorg Biochem* 131, 8-11. 2014.
- [49] Diez P, Gonzalez-Munoz M, Gonzalez-Gonzalez M, Degano RM, Jara-Acevedo R, Sanchez-Paradinas S, et al. Functional insights into the cellular response triggered by a bile-acid platinum compound conjugated to biocompatible ferric nanoparticles using quantitative proteomic approaches. *Nanoscale* 9[28], 9960-9972. 2017.
- [50] Criado JJ, Macias RIR, Medarde M, Monte MJ, Serrano MA, Marin JJG. Synthesis and Characterization of the New Cytostatic Complex cis-Diammineplatinum(II)-Chlorocholyglycinate. *Bioconjugate Chem.* 8[4], 453-458. 1997.
- [51] Paschke R, Paetz C, Mueller T, Schmoll HJ, Mueller H, Sorkau E, et al. Biomolecules linked to transition metal complexes - new chances for chemotherapy. *Curr.Med.Chem.* 10[19], 2033-2044. 2003.
- [52] Emmerich D, Vanchanagiri K, Baratto LC, Schmidt H, Paschke R. Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment. *Eur.J.Med.Chem.* 75, 460-466. 2014.
- [53] Vanchanagiri K, Mueller T, Paschke R. Elucidation of Anticancer Mode of action of Betulinic acid-Cisplatin Conjugates on Lung cancer A549 cells In vitro. *International Journal Of Medical Science And Clinical Inventions* 2016;3(10):2285-97.
- [54] Dietrich A, Mueller T, Paschke R, Kalinowski B, Behlendorf T, Reipsch F, et al. 2-(4-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): A Novel Platinum Compound that Overcomes Cisplatin Resistance and Induces Apoptosis by Mechanisms Different from that of Cisplatin. *J.Med.Chem.* 51[17], 5413-5422. 2008.
- [55] Demchenko AP. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Exp.Oncol.* 34[3], 263-268. 2012.
- [56] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184[1], 39-51. 1995.

- [57] Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I, Kyurkchiev S. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis* 10[1], 209-217. 2005.
- [58] Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of Caspases Measured in Situ by Binding of Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases (FLICA): Correlation with DNA Fragmentation. *Exp.Cell Res.* 259[1], 308-313. 2000.
- [59] Voigt W, Dietrich A, Schmoll H. Overview of development status and clinical action. Cisplatin and its analogues. *Pharm Unserer Zeit* 35[2], 134-143. 2006.
- [60] Ott I, Gust R. Special qualities of inorganic cytostatics. Medicinal chemistry of platinum complexes. *Pharm Unserer Zeit* 35[2], 124-133. 2006.
- [61] Kuehn FE, Schmidt A. Metal complexes as anticancer agents: concepts in tumor research and mechanisms of action. *Chem.Unserer Zeit* 51[2], 86-95. 2017.
- [62] Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 77[6], 1103-1124. 2016.
- [63] Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 5[5], e1257. 2014.
- [64] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents Med.Chem.* 7[1], 3-18. 2007.
- [65] William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 26[3A], 2093-2100. 2006.
- [66] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 7[1], 3-18. 2007.
- [67] Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells. *Cell Cycle* 8[18], 3043-3054. 2009.
- [68] Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, et al. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 57[21], 4956-4964. 1997.
- [69] Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 18[4], 157-164. 2008.
- [70] Liu Y, Luo W. Betulinic acid induces Bax/Bak-independent cytochrome c release in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol.Cells* 33[5], 517-524. 2012.

- [71] Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis* 14[2], 191-202. 2009.
- [72] Potze L, Di Franco S, Grandela C, Pras-Raves ML, Picavet DI, van Veen HA, et al. Betulinic acid induces a novel cell death pathway that depends on cardiolipin modification. *Oncogene* 35[4], 427-437. 2016.
- [73] Broniatowski M, Flasiński M, Zieba K, Miskowicz P. Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems. *Biochim.Biophys.Acta, Biomembr.* 1838[10], 2530-2538. 2014.
- [74] Raghuvar Gopal DV, Narkar AA, Badrinath Y, Mishra KP, Joshi DS. Protection of Ewing's sarcoma family tumor (ESFT) cell line SK-N-MC from betulinic acid induced apoptosis by α -DL-tocopherol. *Toxicol.Lett.* 153[2], 201-212. 2004.
- [75] Tiwari R, Puthli A, Balakrishnan S, Sapra BK, Mishra KP. Betulinic Acid-Induced Cytotoxicity in Human Breast Tumor Cell Lines MCF-7 and T47D and its Modification by Tocopherol. *Cancer Invest.* 32[8], 402-408. 2014.
- [76] Potze L, Mullauer FB, Colak S, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. *Cell Death Dis.* 5[4], e1169. 2014.
- [77] Tan Y, Yu R, Pezzuto JM. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin.Cancer Res.* 9[7], 2866-2875. 2003.
- [78] Kasperczyk H, Katia LF-B, Westhoff MA, Behrend L, Zwacka RM, Debatin K, et al. Betulinic acid as new activator of NF-kappaB: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* 24[46], 6945-6956. 2005.
- [79] Karna E, Szoka L, Palka JA. Betulinic acid inhibits the expression of hypoxia-inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells. *Mol.Cell.Biochem.* 340[1&2], 15-20. 2010.
- [80] Bar FMA, Khanfar MA, Elnagar AY, Liu H, Zaghoul AM, Badria FA, et al. Rational Design and Semisynthesis of Betulinic Acid Analogues as Potent Topoisomerase Inhibitors. *J.Nat.Prod.* 72[9], 1643-1650. 2009.
- [81] Lee WS, Im KR, Park YD, Sung ND, Jeong TS. Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of *Lycopus lucidus* TURCZ. *Biol.Pharm.Bull.* 29[2], 382-384. 2006.
- [82] Liebscher G, Vanchangiri K, Mueller T, Feige K, Cavalleri J-MV, Paschke R. In vitro anticancer activity of Betulinic acid and derivatives thereof on equine melanoma cell lines from grey horses and in vivo safety assessment of the compound NVX-207 in two horses. *Chem.-Biol.Interact.* 246, 20-29. 2016.

- [83] Meira CS, Fernandes do Espirito Santo R, Barbosa dos Santos T, Orge ID, Silva DKC, Guimaraes ET, et al. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF- κ B/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. *Eur.J.Pharmacol.* 815, 156-165. 2017.
- [84] Sidova V, Zoufaly P, Pokorny J, Dzubak P, Hajduch M, Popa I, et al. Cytotoxic conjugates of betulinic acid and substituted triazoles prepared by Huisgen Cycloaddition from 30-azidoderivatives. *PLoS One* 12[2], e0171621-1-e0171621/25. 2017.
- [85] Yao N, Li Yj, Zhang Dm, Liu DL, Tang MK, Yiu A, et al. B4G2 Induces Mitochondrial Apoptosis by the ROS-Mediated Opening of Ca-Dependent Permeability Transition Pores. *Cell.Physiol.Biochem.* 37[3], 838-852. 2015.
- [86] Baratto LC, Porsani MV, Pimentel IC, Pereira Netto AB, Paschke R, Oliveira BH. Preparation of betulinic acid derivatives by chemical and biotransformation methods and determination of cytotoxicity against selected cancer cell lines. *Eur.J.Med.Chem.* 68, 121-131. 2013.
- [87] Reiner T, Parrondo R, de las Pozas A, Palenzuela D, Perez-Stable C. Betulinic acid selectively increases protein degradation and enhances prostate cancer-specific apoptosis: possible role for inhibition of deubiquitinase activity. *PLoS One* 8[2], e56234. 2013.
- [88] Surowiak P, Drag M, Materna V, Dietel M, Lage H. Betulinic acid exhibits stronger cytotoxic activity on the normal melanocyte NHEM-neo cell line than on drug-resistant and drug-sensitive MeWo melanoma cell lines. *Mol.Med.Rep.* 2[4], 543-548. 2009.
- [89] Yamai H, Sawada N, Yoshida T, Seike J, Takizawa H, Kenzaki K, et al. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *Int.J.Cancer* 125[4], 952-960. 2009.
- [90] Kommera H, Kaluderovic GN, Kalbitz J, Draeger B, Paschke R. Small structural changes of pentacyclic lupane type triterpenoid derivatives lead to significant differences in their anticancer properties. *Eur.J.Med.Chem.* 45[8], 3346-3353. 2010.
- [91] Kommera H, Kaluderovic GN, Bette M, Kalbitz J, Fuchs P, Fulda S, et al. In vitro anticancer studies of α - and β -glucopyranose betulin anomers. *Chem.-Biol.Interact.* 185[2], 128-136. 2010.
- [92] Goswami P, Paul S, Banerjee R, Kundu R, Mukherjee A. Betulinic acid induces DNA damage and apoptosis in SiHa cells. *Mutat.Res., Genet.Toxicol.Environ.Mutagen.* 828, 1-9. 2018.

- [93] Sousa MC, Varandas R, Santos RC, Santos-Rosa M, Alves V, Salvador JAR. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine. *PLoS One* 9[3], e89939-1-e89939/12. 2014.
- [94] Yang Lj, Chen Y, Ma Q, Fang J, He J, Cheng Yq, et al. Effect of betulinic acid on the regulation of Hiwi and cyclin B1 in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Acta Pharmacol.Sin.* 31[1], 66-72. 2010.
- [95] Schobert R, Biersack B, Dietrich A, Grotemeier A, Mueller T, Kalinowski B, et al. Monoterpenes as Drug Shuttles: Cytotoxic (6-Aminomethylnicotinate) dichloridoplatinum(II) Complexes with Potential To Overcome Cisplatin Resistance. *J.Med.Chem.* 50[6], 1288-1293. 2007.
- [96] Biersack B, Dietrich A, Zoldakova M, Kalinowski B, Paschke R, Schobert R, et al. Lipophilic Pt(II) complexes with selective efficacy against cisplatin-resistant testicular cancer cells. *J.Inorg.Biochem.* 105[12], 1630-1637. 2011.
- [97] Buss I, Garmann D, Galanski M, Weber G, Kalayda GV, Keppler BK, et al. Enhancing lipophilicity as a strategy to overcome resistance against platinum complexes? *J.Inorg.Biochem.* 105[5], 709-717. 2011.
- [98] Hu W, Zhao J, Hua W, Gou S. A study on platinum(IV) species containing an estrogen receptor modulator to reverse tamoxifen resistance of breast cancer. *Metallomics* 10[2], 346-359. 2018.
- [99] Xue X, You S, Zhang Q, Wu Y, Zou Gz, Wang PC, et al. Mitaplatin Increases Sensitivity of Tumor Cells to Cisplatin by Inducing Mitochondrial Dysfunction. *Mol.Pharmaceutics* 9[3], 634-644. 2012.
- [100] Zhou W, Wang X, Hu M, Zhu C, Guo Z. A mitochondrion-targeting copper complex exhibits potent cytotoxicity against cisplatin-resistant tumor cells through multiple mechanisms of action. *Chem.Sci.* 5[7], 2761-2770. 2014.
- [101] Li J, He X, Zou Y, Chen D, Yang L, Rao J, et al. Mitochondria-targeted platinum(ii) complexes: dual inhibitory activities on tumor cell proliferation and migration/invasion via intracellular trafficking of -catenin. *Metallomics* 9[6], 726-733. 2017.
- [102] Bai L, Gao C, Liu Q, Yu C, Zhang Z, Cai L, et al. Research progress in modern structure of platinum complexes. *Eur.J.Med.Chem.* 140, 349-382. 2017.
- [103] Butler JS, Sadler PJ. Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 17[2], 175-188. 2013.
- [104] Callari M, Dag A, Lu H, Stenzel MH. Modulating the cellular uptake of platinum drugs with glycopolymers. *Polym.Chem. Ahead.* 2015.

- [105] Gabano E, Ravera M, Osella D. The drug targeting and delivery approach applied to Pt-antitumour complexes. A coordination point of view. *Curr.Med.Chem.* 16[34], 4544-4580. 2009.
- [106] Johnstone TC, Lippard SJ, Suntharalingam K. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev* 116[5], 3436-3486. 2016.
- [107] Huang R, Sun Y, Zhang Xy, Sun Bw, Wang Qc, Zhu J. Biological evaluation of a novel Herceptin-platinum (II) conjugate for efficient and cancer cell specific delivery. *Biomed.Pharmacother.* 73, 116-122. 2015.
- [108] Huang R, Wang Q, Zhang X, Zhu J, Sun B. Trastuzumab-cisplatin conjugates for targeted delivery of cisplatin to HER2-overexpressing cancer cells. *Biomed.Pharmacother.* 72, 17-23. 2015.

8. Thesen der Dissertation

1. Die Zytotoxizität der Gallensäure-Carboplatin-Konjugate (ChaPt-Carbo) wird, genau wie die der analogen Gallensäure-Cisplatin-Konjugate (ChaPt-Cis), sehr stark von der Länge des Spacers zwischen den Fragmenten beeinflusst, die IC₅₀-Werte der Konjugate mit der Spacerlänge von 11 Kohlenstoffatomen sind bei Carbo- und Cisplatin-Konjugaten in allen 5 Zelllinien vergleichbar.
2. AnnexinV-assay und Caspase-assay zeigen, dass die Verbindungen ChaPt-Carbo und ChaPt-Cis Apoptose induzieren, im Vergleich mit Cisplatin ist die Apoptose-rate insbesondere bei ChaPt(11)Carbo und ChaPt(11)Cis nach 48 h und 72 h höher.
3. Nach 24 h fällt der Anstieg der Caspasenaktivierung bei Cisplatin und ChaPt(11)Cis gering aus, bei ChaPt(11)Carbo fällt sie deutlich höher aus, bei Verlängerung der Behandlungszeit auf 48 h sieht man bei ChaPt(11)Cis den stärksten Aktivitätsanstieg bei allen 3 Caspasen.
4. Insgesamt kann festgestellt werden, dass das Muster der Caspasenaktivierung bei allen untersuchten Verbindungen (Cisplatin, ChaPt-Carbo, ChaPt-Cis) ähnlich ist, die Verbindungen ChaPt(11)Cis und ChaPt(11)Carbo die höchsten Steigerungen erreichen und alle 3 Caspasen in ähnlicher Weise aktiviert werden.
5. Cisplatin sowie ChaPt(11)Carbo verursachen zeitabhängig den Arrest unterschiedlicher Zellzyklus-Phasen. Nach 24 h tritt ein S-Phasen Arrest auf und nach 48 h ein G2/M-Phasen-Arrest. Nach 72 Stunden steigt die Zahl der Zellen in der SubG1-Phase sehr stark an.
6. Im Unterschied zu Cisplatin verursacht die Verbindung ChaPt(11)Cis keinen S-Phasen- bzw. G2/M-Phasen-Arrest, sondern es erhöht sich unmittelbar der SubG1-Peak, während die Zahl der Zellen in den anderen Phasen kontinuierlich abnimmt.

7. Die Ergebnisse stützen die These, dass die Gallensäure-Cisplatin-Konjugate und ebenso die Betulinsäure-Cisplatin-Konjugate ihre Wirkung, inklusive Resistenzbrechung, nicht durch die Interaktion mit der genomischen DNA erreichen, sondern einer der Hauptangriffspunkte derartiger lipophiler Strukturen die Mitochondrienmembran ist. Ob aber die Verbindung ChAPt(11)Carbo 5, auf Grund des langsameren Ligandenaustausches doch in der Lage ist mit der genomischen DNA zu interagieren, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht endgültig geklärt werden.

8. Die Befunde für ChAPt(11)Cis legen nahe, dass die schnelle Akkumulation dieser Substanzen in der Zelle zu einem massiven Einbau in die Mitochondrienmembran führt und dadurch unmittelbar Apoptose ausgelöst wird. Mögliche Wechselwirkungen mit der genomischen DNA werden dadurch überdeckt bzw. spielen keine Rolle.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum, Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Gemäß § 7 (2) der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom 09.12.2008 erkläre ich hiermit, keine früheren Promotionsversuche unternommen zu haben.

Ort, Datum, Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Schmoll für die Überlassung des Themas und die gewährte Hilfe durch seine Arbeitsgruppe bedanken, insbesondere bin ich Herrn Dr. Thomas Müller für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge dankbar, gleiches gilt für Dr. Matthias Bache.

Der Gründerwerkstatt Biowissenschaften im Biozentrum der Universität und den dort tätigen Mitarbeitern bin ich zu Dank verpflichtet, da ich dort die fachlich-methodischen sowie die gerätetechnischen Grundlagen zur Verfügung gestellt bekam, um die experimentellen Arbeiten durchzuführen. Hier gilt mein Dank besonders Kranthi Vanchanagiri, der mir stets mit seinem fachkundigen Wissen zur Seite stand.

Der AG Medizinisch-Pharmazeutische Chemie des Biozentrums danke ich für die Bereitstellung der Substanzen.

Zudem geht ein Dank an Dr. Gerd Hause für die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops.

Ein herzlicher Dank geht an meine Eltern und Großeltern sowie meinen Bruder, die mich während der gesamten Zeit des Studiums immer unterstützt haben. Vielen, vielen Dank.