

**Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 als Zielproteine
für die Therapie und Bildgebung von Tumoren**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplomchemikerin Franziska Graf

geboren am 04. Mai 1983 in Räckelwitz

Eingereicht am 17. Februar 2010

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Steinbach
Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée

Tag der Verteidigung: 06. Juli 2010

Die Dissertation wurde in der Zeit von September 2006 bis Februar 2010
im Institut für Radiopharmazie, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT	1
1.1	Der Zellzyklus	1
1.2	Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4/6).....	4
1.2.1	Entdeckung und Struktur der Cdk4/6	4
1.2.2	Funktion und Regulation der Cdk4/6 im Zellzyklus	5
1.2.3	Cdk4/6 und Embryogenese.....	8
1.2.4	Cdk4/6 und Homöostase.....	9
1.2.5	Cdk4/6 und Kanzerogenese.....	10
1.3	Die Cdk4/6 als Zielproteine für die Tumorthherapie.....	11
1.4	Die Tumordiagnostik mittels Positronen-Emissions-Tomographie.....	16
1.5	Zielstellung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Geräte.....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3	Chemikalien, Medien und Enzyme.....	21
2.1.4	Antikörper und Immunchemikalien	25
2.1.5	Primer	25
2.1.6	Puffer und Lösungen	26
2.1.7	Biologisches Material	28
2.2	Zellbiologische Methoden.....	29
2.2.1	Rekultivierung und Kryokonservierung von Zellen.....	29
2.2.2	Kultivierung der Zelllinien	29
2.2.3	Arretierung von Zellen in der Zellzyklusphase G ₁	30
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	30
2.2.5	Untersuchung der Zellvitalität.....	30
2.2.6	Untersuchung des Wachstumsverhaltens.....	31
2.2.7	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse.....	31
2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	32
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.3.1	Proteinextraktion	32
2.3.2	Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	33
2.3.3	Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran	33
2.3.4	Immunchemischer Antigennachweis.....	34
2.4	Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1	RNA Präparation	35
2.4.2	DNase-Behandlung der isolierten RNA.....	35
2.4.3	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	35
2.4.4	Quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	36
2.5	Histologische Methoden	38
2.5.1	Fixierung und Paraffineinbettung von Geweben	38
2.5.2	Immunfärbung der Paraffinschnitte	38
2.5.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinschnitte	39
2.6	Radiopharmakologische Methoden	39
2.6.1	Radiomarkierung der Pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine	39
2.6.2	Stabilitätsuntersuchungen	42
2.6.3	Zelluläre Radiotracer-Aufnahme	43
2.6.4	Bioverteilung.....	44
2.6.5	Positronen-Emissions-Tomographie	44

2.6.6	Autoradiographie	45
2.7	Statistische Methoden	45
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Untersuchungen zum Vorkommen der Cdk4/6 in Zellen und Geweben	47
3.1.1	Vorkommen der Cdk4/6 in Zellen	47
3.1.2	Vorkommen der Cdk4/6 in Tumoren	52
3.1.3	Vorkommen der Cdk4/6 in Organen der Maus	54
3.2	Zelluläre und molekulare Effekte der Pyrido[2,3-<i>d</i>]pyrimidin-Derivate.....	57
3.2.1	Vitalität und Zellproliferation	57
3.2.2	Zellzyklusphasenverteilung	62
3.2.3	pRb-Phosphorylierung.....	67
3.2.4	mRNA-Expression	70
3.3	Radiopharmakologische Charakterisierung ausgewählter ¹²⁴I- bzw. ¹⁸F- markierter Pyrido[2,3-<i>d</i>]pyrimidin-Derivate	72
3.3.1	Radiomarkierung der Pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine.....	72
3.3.2	Stabilitätsuntersuchungen <i>in vitro</i>	72
3.3.3	Zelluläre Radiotracer-Aufnahme	72
3.3.4	Bioverteilung und <i>in vivo</i> -Stabilität in Ratten.....	78
3.3.5	PET-Untersuchungen und Autoradiographie	81
4	DISKUSSION	87
4.1	Nachweis und Lokalisierung der Cdk4/6 in Zellen und Geweben.....	87
4.2	Zelluläre und molekulare Wirksamkeit der Pyrido[2,3-<i>d</i>]pyrimidine.....	89
4.2.1	Hemmung der Zellproliferation.....	90
4.2.2	Hemmung der G ₁ -Phasen-Progression.....	91
4.2.3	Hemmung des Cdk4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalwegs	93
4.3	¹²⁴I- und ¹⁸F-markierte Pyrido[2,3-<i>d</i>]pyrimidine als Radiotracer für die funktionelle Bildgebung der Cdk4/6.....	96
4.3.1	<i>In vitro</i> -Untersuchungen mit den radiomarkierten Pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidinen.....	97
4.3.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen mit den radiomarkierten Pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidinen	100
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	104
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	109
7	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE	118
8	DANKSAGUNG	120
9	VERSICHERUNG UND ERKLÄRUNG.....	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	Amerikanische Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (<i>American Type Culture Collection</i>)
Aqua dest.	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAK	Cdk-aktivierende Kinase
Cdk	Cyclin-abhängige Kinasen
Cdk4/6	Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CKIA	8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-(4-piperazin-1-yl-phenylamino)- 8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on (1)
CKIB	8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-(5-(piperazin-1-yl)-pyridin-2-yl- amino)-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on (2)
CKIC	8-Cyclopentyl-2-(4-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)phenylamino)-6- iod-5-methyl-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on (3)
CKID	8-Cyclopentyl-2-(5-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)pyridin-2- ylamino)-6-iod-5-methyl-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on (4)
CKIE	6-Acetyl-8-cyclopentyl-2-(4-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)phenyl- amino)-5-methyl-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on (5)
CNT	<i>Concentrative nucleoside transporters</i>
C _t	Schwellenwertzyklus (<i>threshold cycle</i>)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EC	Elektroneneinfang (<i>electron capture</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENT	<i>Equilibrative nucleoside transporters</i>
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]Fluor-2-desoxy-D-glucose

FKS	Fötale Kälberserum
<i>frame</i>	Zeitintervall
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
ID	injizierte Dosis
%ID	Prozent der injizierten Dosis
Ig	Immunglobulin
kb	Kilo-Basenpaare
MIP	Maximum-Intensitäts-Projektion (<i>maximum intensity projection</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MRP5	<i>Multidrug resistance protein 5</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom-Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonooleat

1 EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

Die Regulation der Zellteilung, des Wachstums und der Differenzierung von Zellen im menschlichen Organismus sind komplexe Prozesse, bei denen vor allem Proteinkinasen herausragende Funktionen übernehmen. Für alle Mitglieder dieser großen Enzymfamilie ist die katalytische Übertragung einer Phosphatgruppe auf Proteinsubstrate charakteristisch. Die Proteinphosphorylierung ist als Schlüsselreaktion bei der Signaltransduktion in Zellen ein wichtiger posttranslationaler Kontrollmechanismus zur Regulation der Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren. Aufgrund dessen haben Dysfunktionen der regulatorischen Proteinkinasen die Entstehung zahlreicher Erkrankungen wie beispielsweise Krebs zur Folge.

Als außergewöhnliche Eigenschaften von Tumorzellen werden unter anderem ihr sehr hohes Potential zur Zellteilung und die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalmolekülen beschrieben [1]. Diese Kennzeichen sind eng verknüpft mit der fehlerhaften Regulation des Zellzyklus in neoplastischen Zellen. Dabei kommt den Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, Cdk) als Untergruppe der Proteinkinasen eine zentrale Bedeutung im Zellzyklus zu. Die Aufklärung der Rolle einzelner Kinasen aus der Gruppe der Cdk bei der Entwicklung von Tumoren und im Zusammenspiel verschiedener tumorigener Faktoren ist Gegenstand der aktuellen naturwissenschaftlich-medizinischen Forschung.

Die vorliegende Dissertation befasst sich, unter Berücksichtigung der besonderen Bedeutung der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4/6) bei der Kanzerogenese, mit neuen Ansätzen zur zielgerichteten Charakterisierung der Cdk4/6 als vielversprechende molekulare Zielproteine für die Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen.

1.1 Der Zellzyklus

Die Vermehrung von Zellen setzt eine korrekte Verdopplung der genetischen Information und die Aufteilung dieser auf zwei identische Tochterzellen voraus. Die Reproduktion eukaryotischer Zellen verläuft hochgradig koordiniert durch komplexe Kontrollmechanismen in einem zyklischen Prozess. Dabei werden je nach biochemischen bzw. morphologischen Merkmalen der Zellen die vier Phasen G_1 , S, G_2 und M unterschieden (Abbildung 1-1) [2]. Die G_1 -Phase bildet in Abhängigkeit von mitogenen Signalen und Nährstoffen die Wachstumsphase, in der die für die nächste Phase benötigten Ressourcen vorbereitet und zur Verfügung gestellt werden. Der Restriktionspunkt R am Ende der G_1 -Phase definiert den irreversiblen Übergang in die

folgenden Phasen des Zellzyklus. Die Verdopplung der Chromosomen im Zellkern während der Synthesephase S findet zeitlich getrennt von der gleichmäßigen Aufteilung des Erbmateri als auf zwei Tochterzellen (Mitose) und der eigentlichen Zellteilung (Zytokinese) während der M-Phase statt. Zwischen S- und M-Phase liegt die Zwischenphase (*gap*) G_2 , in welcher der korrekte Abschluss der DNA-Replikation kontrolliert und die M-Phase vorbereitet wird.

Zellen können den Zellzyklus zeitweise bzw. in Folge der terminalen Differenzierung endgültig (beispielsweise Nervenzellen oder Erythrozyten) verlassen und in die Ruhephase G_0 übertreten. Diese Entscheidung ist vom Verhältnis wachstumsstimulierender bzw. antiproliferativer Signale und der aktivierten intrazellulären Signalkaskade abhängig.

Die Aktivierung und Regulierung des Zellzyklus-Kontrollsystems erfolgt im Zellkern. Dabei kommt den Cdk eine fundamentale Rolle zu [3].

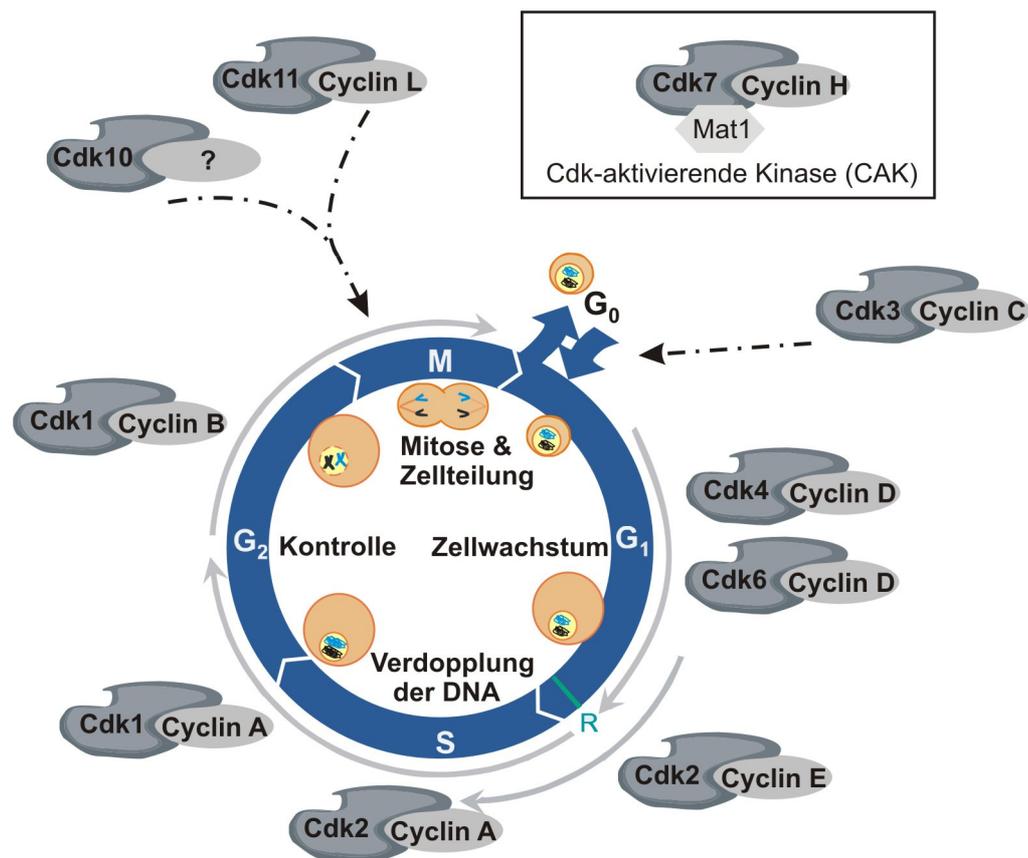


Abbildung 1-1: Die Regulation des Zellzyklus durch Cdk-Cyclin-Komplexe

(modifiziert nach Malumbres & Barbacid [4], Mat1: *Cdk7-Cyclin H assembly factor ménage à trois 1*).

Die Cdk gehören zur Familie der Serin/ Threonin-Kinasen und zeichnen sich durch die hochkonservierte Aminosäuresequenz PSTAIRE im aktiven Zentrum aus [5]. In komplexen mehrzelligen Organismen werden verschiedene Cdk synthetisiert, wobei gegenwärtig für den Menschen 13 Cdk bekannt sind [6]. Dabei übernehmen nur Cdk1, Cdk2, Cdk4 und Cdk6 Schlüsselfunktionen bei der Kontrolle des Zellzyklus. Cdk3 veranlasst den Wiedereintritt von Zellen aus der Ruhephase G_0 in die G_1 -Phase. Die Aktivität der Cdk5 wurde bisher nur in postmitotischen neuronalen Zellen oder differenzierten Neuronen nachgewiesen, was die zentrale Rolle der Cdk5 für den neuronalen Zellzyklusarrest und die Differenzierung unterstützt [7, 8]. Cdk7 ist Bestandteil der Cdk-aktivierenden Kinase (*Cdk-activating kinase*, CAK) und phosphoryliert andere Cdk [9]. Cdk8 und Cdk9 fungieren wie auch Cdk7 als Regulatoren der Transkription durch Phosphorylierung von RNA-Polymerase-Komponenten [10, 11]. Für Cdk10 und Cdk11 wurden Funktionen beim G_2 /M-Übergang beschrieben [12-14]. Über die Bedeutung von Cdk12 und Cdk13 ist, abgesehen von ihrer Beteiligung an der Regulation von alternativen mRNA-Splice-Prozessen, wenig bekannt [15, 16].

Für die katalytische Aktivität der Cdk, mit Ausnahme von Cdk5, ist die Assoziation mit der regulatorischen Untereinheit, dem sogenannten Cyclin, essentiell. Während des Zellzyklus sind verschiedene Cdk-Cyclin-Paare wirksam (Abbildung 1-1), die durch gezielte Phosphorylierung von Proteinen den weiteren Verlauf der einzelnen Phasen steuern. Bisher wurden mindestens 29 verschiedene Cycline (Cyclin A, B, C, D, usw.) identifiziert, die Homologien in einer Sequenz von etwa 100 bis 150 Aminosäuren zeigen [4, 17]. Diese sogenannte Cyclin-Box ist für die Bindung an die PSTAIRE-Helix der Cdk verantwortlich. Während des Zellzyklus variiert die Expression der Cycline, so dass der Beginn jeder Zellzyklusphase bzw. der Übergang zwischen den einzelnen Phasen über die periodische Synthese bzw. Ubiquitin-vermittelte Proteolyse der verschiedenen Cycline definiert wird [18]. Dabei lagern sich die Zellzyklusphasen-spezifischen Cycline und entsprechenden Cdk zu einem nichtkovalenten 1:1-Komplex zusammen. Die Bindung des Cyclins an die Cdk resultiert in der induzierten Anpassung und Ausbildung einer substratspezifischen katalytischen Untereinheit der Cdk. Neben der zeitlichen Abfolge der Aktivierung verschiedener Cdk über die Cycline wird die Aktivität der Cdk außerdem über deren Phosphorylierung, die Bindung von Aktivatoren bzw. Inhibitoren und die subzelluläre Lokalisierung gesteuert [19].

1.2 Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4/6)

1.2.1 Entdeckung und Struktur der Cdk4/6

Die Cdk4 (früher PSK-J3) und Cdk6 (früher PLSTIRE) wurden 1987 bzw. 1992 durch Klonierung und anschließende Bestimmung der Aminosäuresequenz als potentielle Zellzyklus-relevante Proteine aufgrund der Homologien zu den bereits bekannten Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk1 und Cdk2 entdeckt [20, 21]. Analysen der Aminosäuresequenzen ergaben für Cdk4 und Cdk6 eine Homologie von 71%; die Homologien zu anderen Proteinen der Cdk-Familie lagen bei 40 bis 50%. Aufgrund der sehr ähnlichen Aminosäuresequenz der Cdk4 und Cdk6, identischer Substratspezifitäten und enzymatischer Aktivitäten besitzen beide Proteine überlappende Funktionen bei der Embryonalentwicklung und Homöostase des Menschen [4]. Allerdings wurden verschiedene Proteinkonzentrationen und Aktivitäten in den einzelnen Organen beobachtet [22, 23].

Die dreidimensionale Struktur der Cdk4/6 folgt dem allgemeinen Aufbau aller Mitglieder dieser Proteinfamilie. Ausführliche Strukturuntersuchungen wurden an Kristallen der Cdk2 durchgeführt und bilden die Grundlage für die folgende Strukturbeschreibung [24, 25].

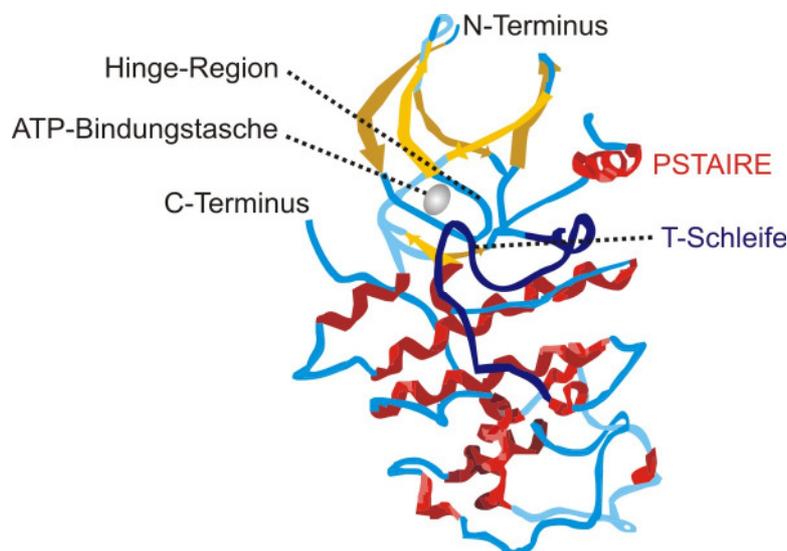


Abbildung 1-2: Schematische Struktur einer Cdk (illustriert nach De Bondt *et al.* [24])

Die α -Helices sind als rote Strukturen, β -Faltblattstrukturen als gelbe Pfeile und die verbindenden Bereiche in hellblau dargestellt. Die T-Schleife ist dunkelblau eingefärbt. Aufgrund der hohen Flexibilität wurden die Strukturmodule im Anschluss an die PSTAIRE-Region nicht abgebildet.

Die dreidimensionale Struktur der katalytischen Einheit der Cdk beinhaltet mit etwa 300 Aminosäuren eine N-terminale Domäne und eine C-terminale Domäne, die über eine nur

wenige Aminosäuren umfassende Scharnier-ähnliche Domäne (*hinge region*) miteinander verbunden sind (Abbildung 1-2). Im Bereich der N-terminalen Domäne, die größtenteils aus β -Faltblatt-Strukturen aufgebaut ist, befindet sich die nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren benannte streng konservierte Sequenz PSTAIRE als α -Helix. Für die Cdk4/6 variiert diese für die Cyclin-Bindung verantwortliche Sequenz mit PISTVRE bzw. PLSTIRE [26]. Die Bindung des regulatorischen Cyclins an diese Region hat eine Konformationsänderung im katalytischen Zentrum zur Folge, so dass regulatorische Bereiche zugänglich werden und die Phosphatreste des ATP über bestimmte Aminosäurereste neu koordiniert sowie für die Phosphatübertragung in Position gebracht werden. Die C-terminale Domäne ist vorrangig aus α -Helices aufgebaut und über die Scharnier-Domäne so zur N-terminalen Domäne gedreht, dass das katalytische Zentrum mit der ATP-Bindungsstelle gebildet wird. Die monomere, inaktive Form der Cdk lässt keinen Zugang zum katalytischen Zentrum zu, da dieses durch die sogenannte T-Schleife blockiert wird. Erst durch die Positionsänderung und gezielte Phosphorylierung eines Threoninrestes in der T-Schleife wird das katalytische Zentrum zugänglich [27].

1.2.2 Funktion und Regulation der Cdk4/6 im Zellzyklus

Die Cdk4/6 haben bedeutende Funktionen in der Regulation und Kontrolle der G₁-Phase des Zellzyklus. Die regulatorische Rolle der Cdk4/6 und deren komplexe Regulationsmechanismen im Zellzyklus wurden in den letzten zwei Jahrzehnten aufgeklärt (zusammengefasst in [4, 28]). Die enzymatischen Aktivitäten der Cdk4/6 leiten während der G₁-Phase des Zellzyklus wichtige Schritte für die Initiierung der DNA-Replikation und die spätere Zellteilung ein. Dabei wird die Aktivität der Cdk4/6 durch die Assoziation mit einem Cyclin D, die Interaktion mit verschiedenen regulatorischen Proteinen, die Aktivierung durch Kinasen bzw. Phosphatasen und deren subzelluläre Lokalisation bestimmt (Abbildung 1-3).

Als Antwort auf extrazelluläre mitogene Signale werden in ruhenden Zellen die Transkription und Synthese von Cyclinen des D-Typs (Cyclin D1, D2, D3) und deren Interaktion mit Cdk4/6 initiiert. Ein Mitglied der Cip/Kip- (*Cdk2 interacting proteins/ kinase inhibitor proteins*)-Proteinfamilie, p27^{Kip1}, wurde als stabilisierender Faktor für die Formierung des Cdk4-Cyclin D-Komplexes in proliferierenden Zellen beschrieben [28]. Die Phosphorylierung der Cdk4 am Aminosäurerest Thr¹⁷² in der T-Schleife durch die Cdk-aktivierende Kinase (CAK) ist ebenfalls essentiell für deren katalytische Funktion und führt zu einer drastischen Aktivitätssteigerung [29]. Die aktivierten Cdk4/6-Cyclin D-Komplexe können nun in den Zellkern transferiert werden. In diesem Zellkompartiment phosphorylieren sie Mitglieder der Retinoblastom-(Rb)-Proteinfamilie. Die

Phosphorylierung der Rb-Proteine pRb, p107 und p130 erfolgt schrittweise und geordnet durch verschiedene Cdk-Cyclin-Komplexe, mit deutlich unterschiedlichen Präferenzen für die zahlreichen Serin- und Threoninreste der Rb-Proteine. Die für die Cdk4/6 bekannten spezifischen Phosphorylierungsstellen sind pRb-Ser⁷⁸⁰, pRb-Ser⁷⁹⁵ und p107-Ser⁸⁴² [30-32]. Hypophosphorylierte Rb-Proteine binden an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und sind somit in die transkriptionelle Kontrolle von Genen involviert [33]. Die Cdk4/6-Cyclin D-vermittelte Phosphorylierung der Rb-Proteine resultiert in der Dissoziation von Rb aus dem Komplex mit E2F. E2F induziert daraufhin die Transkription von Genen, welche bedeutsame Genprodukte für die G₁/S-Transition bzw. die S-Phase kodieren (beispielsweise E2F-1, *proliferating cell nuclear antigen* PCNA, Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, Cyclin E, u. a.) [34]. Neben der Rb-Protein-Phosphorylierung wurde auch die Phosphorylierung anderer Substrate, wie beispielsweise Marcks (*Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*), Cdt1 (*replication licensing factor*) und Smad3 (*antiproliferative transcription factor*) durch den Cdk4-Cyclin D-Komplex beschrieben [35-37]. Dies weist auf eine weitreichende, komplexe regulatorische Bedeutung der Cdk4/6 im Zellzyklus hin.

Die Aktivität des Cdk4/6-Cyclin D-Komplexes wird ausschließlich in einer kurzen Zeitperiode der G₁-Phase benötigt. Für die korrekte zeitliche Abfolge der einzelnen Zellzyklus-Kontrollproteine muss eine nahezu vollständige Hemmung der Cdk4/6-Aktivität vor dem Übergang von der G₁- zur S-Phase gewährleistet werden. Zur Beeinflussung der Cdk4/6-Aktivität stehen verschiedene negativ regulatorische Mechanismen zur Verfügung. Zum Einen wird die Cdk4/6-Substrat-Phosphorylierung durch den Export von Cdk4/6-Cyclin D-Komplexen oder Cyclin D aus dem Zellkern verhindert [38]. Des Weiteren kann die Aktivität des Cdk4/6-Cyclin D-Komplexes durch eine Src-Kinasen-vermittelte inhibierende Phosphorylierung bzw. Cdc25-Phosphatase-vermittelte aktivierende Dephosphorylierung des Cdk4-Aminosäurerests Tyr¹⁷ reguliert werden [39]. Zusätzlich können endogene Inhibitoren mit Cdk4/6-Cyclin D-Komplexen (Cip/Kip-Proteine) bzw. mit den monomeren Cdk4/6 (INK4-Proteine) interagieren. Die Cip/Kip-Proteine p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} inhibieren Cdk4/6-Cyclin D-Komplexe in Abhängigkeit ihres Wachstumsstadiums und der Kultivierungsbedingungen [28]. Es wird angenommen, dass durch die Bindung der Cip/Kip-Proteine an Cdk4/6-Cyclin D-Komplexe in der G₁-Phase diese Inhibitoren von Cdk2-Cyclin E-Komplexen titriert werden und somit ein weiteres Fortschreiten des Zellzyklus gefördert wird [40]. Die INK4-Proteine (*inhibitors of Cdk4*) p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D} sind spezifische Inhibitoren der Cdk4/6. Sie verhindern die Assoziation mit Cyclin D durch kompetitive Inhibierung und Ausbildung eines trimeren Komplexes mit der Cdk4/6 [26].

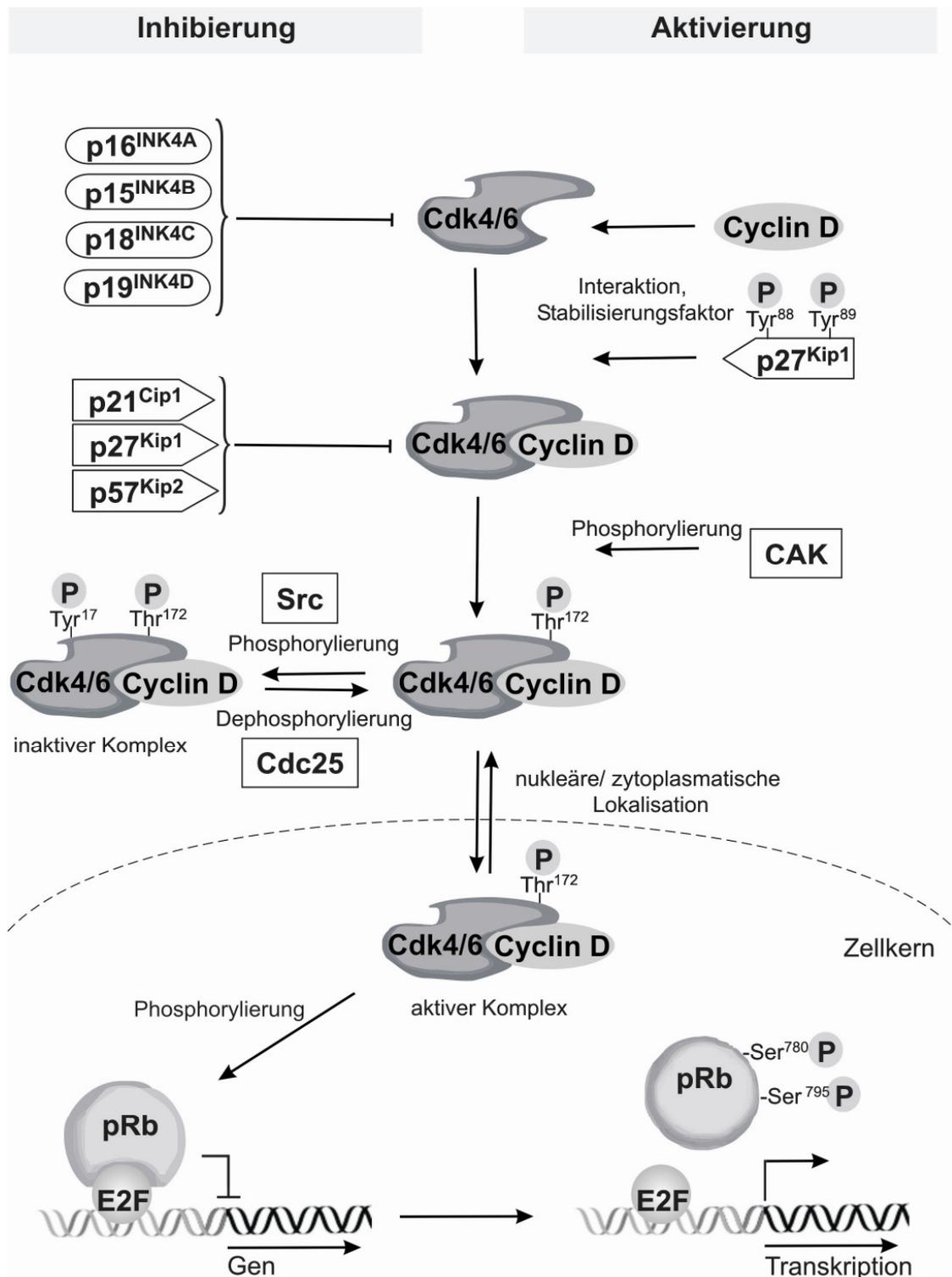


Abbildung 1-3: Der Cdk4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalweg

Die Funktion der Cdk4/6 im Zellzyklus ist die Phosphorylierung von Retinoblastom-Proteinen (pRb). Die katalytische Aktivität der Cdk4/6 wird durch positive und negative Effektoren (Cip/Kip-Proteine, INK4-Proteine), Kinasen (CAK: Cdk-aktivierende Kinase, Src: Sarkomavirus-Tyrosinkinase) und Phosphatasen (Cdc25-Phosphatase) sowie ihre zelluläre Lokalisation reguliert.

1.2.3 Cdk4/6 und Embryogenese

Das klassische Model der Zellzykluskontrolle beschreibt die aufeinanderfolgende Aktivierung verschiedener Cdk in höheren Eukaryoten, was entscheidend für die exakte Embryogenese und spätere Homöostase ist. Dabei wurden die Cdk4/6 sowie Cdk2 als bedeutende Kontrollkinasen der Interphase (G_1 , S, G_2) und die Cdk1 der M-Phase beschrieben. Interessanterweise werden die Cdk4/6 im sehr frühen Stadium der Embryogenese nur für untergeordnete Zellzyklus-Kontrollprozesse benötigt, jedoch nicht für die Rb-Inaktivierung [22]. In murinen Eizellen wurde ein geringer Anteil an Cdk4/6 und Cyclin D [41], ein Fehlen von pRb in frühen embryonalen Zellen [42] sowie die Resistenz von Cdk4/6-Cyclin D-Komplexen zu p16^{INK4A}-Inhibitoren festgestellt [43].

Genetische Studien an Mäusen stellten das klassische Model der Zellzyklus-Kontrolle, die Notwendigkeit verschiedener Cdk-Cyclin-Komplexe in der Interphase und somit auch die Funktion der Cdk4/6 in der Embryogenese in Frage. Murine embryonale Stammzellen mit Deletionen des *cdk4*- oder *cdk6*-Gens waren zur vollständigen Embryonalentwicklung in der Lage. Allerdings führte der Cdk4/6-Verlust zu Kleinwüchsigkeit, Unfruchtbarkeit und der Fehlentwicklung hochspezialisierter Zelltypen, wie beispielsweise pankreatischer Betazellen, laktotropher Zellen des Hypophysenvorderlappens und Erythrozyten [44-48].

Ein Fehlen beider Kinasen Cdk4 und Cdk6 resultierte aufgrund der geringen hämatopoetischen Zellproliferation in einer spät-embryonalen Letalität [48]. Dies wurde auch für Mausembryonen festgestellt, denen gleichzeitig alle Cycline vom D-Typ fehlten [49]. Andere organische Schäden wurden jedoch in keiner der beiden Studien festgestellt. Die kompensatorische Funktion von Cdk4 und Cdk6 wird in Untersuchungen zur Entwicklung von *cdk4*^{-/-};*cdk2*^{-/-} bzw. *cdk6*^{-/-};*cdk2*^{-/-} Mäusen deutlich, die lebend geboren wurden und sich vollständig entwickelten [50, 51]. Allerdings zeigten diese Mäuse aufgrund der limitierten Anzahl an Kardiomyozyten bzw. Abnormalitäten der Hämatopoese eine frühe Sterblichkeit.

Mäusen mit einem Knockout aller drei Interphase-Kinasen Cdk2, Cdk4 und Cdk6 war die Entwicklung und Organogenese bis zum Embryonaltag (E) 12 bis 13 möglich. Dies verdeutlichte die zentrale Rolle der Cdk1 im Zellzyklus. Die Cdk1 ist in der Lage, an die verschiedenen Cycline zu binden und den Zellzyklus in der frühen Embryogenese allein zu regulieren [52]. Das Auftreten von beträchtlichen Defekten des Herzens und der Hämatopoese durch den Verlust der Interphase-Kinasen trägt jedoch zum frühzeitigen embryonalen Tod (E13,5-15,5) bei und verdeutlicht wiederum die unbedingte Notwendigkeit der Cdk4/6 für eine vollständige und gesunde Entwicklung von Säugetieren.

1.2.4 Cdk4/6 und Homöostase

In adulten Säugetieren ist die Erhaltung des Status quo von Zellpopulationen bzw. Geweben essentiell. Die als Homöostase bezeichnete Phase ist durch eine Balance zwischen antiproliferativen und mitogenen Signalen charakterisiert. Darüber hinaus müssen adulte Vorläuferzellen erhalten werden, die in der Lage sind, proliferierende Zellen zur Geweberegeneration zu bilden. Als Konsequenz davon müssen Cdk-Cyclin-Komplexe und deren endogene Regulatoren, wie beispielsweise INK4- oder Cip/Kip-Proteine die Ruhephase bzw. den Wiedereintritt in den Zellzyklus dieser Zellen regulieren [6]. Die Kontrolle der Cdk4/6-Aktivität ist bei diesen Prozessen ein entscheidender Beitrag. Während der Seneszenz von Stammzellen akkumuliert p16^{INK4A} und induziert einen G₁-Phasenarrest durch Assoziation mit Cdk4/6 [53]. Zudem wird die Expression und Synthese der Cdk4/6 durch den Transkriptionsfaktor NFATc1 (*nuclear factor of activated T cells c1*) unterdrückt und limitiert das folliculäre Wachstum [54].

Verschiedene Studien untermauern die zwingende Notwendigkeit der Präsenz der Cdk4/6 für die Anlage und Erhaltung der homöostatischen Zellpopulation sowie die Funktionalität spezialisierter Gewebe in Säugetieren. Die Cdk4 besitzt wichtige regulatorische und kompensatorische Funktionen während der postnatalen Entwicklung des Gehirns. Eine siRNA-vermittelte Reduzierung der Cdk4 in Cdk2-defekten Zellen führte zu einer verminderten Proliferation und einem geringeren Selbsterneuerungspotential neuronaler Vorläuferzellen sowie zu einer reduzierten Neuronenvernetzung [55]. Die entscheidende Abhängigkeit der neuronalen Entwicklung von der Cdk4-Aktivität wurde ebenfalls für die Proliferation von Schwann-Zellen in Mäusen, die kurzzeitige synaptische Plastizität und metabotrope-Glutamat-Rezeptor-vermittelte Langzeit-Depression gezeigt [56, 57].

Die Cdk4 ist weiterhin essentiell für die postnatale Entwicklung spezialisierter endokriner Zelltypen. Wie bereits für die Embryogenese erwähnt wurde, führt ein Fehlen der Cdk4 in der Keimbahn von Mäusen zu einer Störung der Proliferation laktotropher Zellen im Hypophysenvorderlappen und damit einhergehender Sterilität [58] bzw. zu einer verminderten Proliferation der Betazellen im Pankreas und somit zu einem Diabetes mellitus bei diesen Mäusen [59]. Ein Wiedereinbringen der Cdk4 in diese Zellen führte zur Erneuerung und Wiederherstellung von deren Funktionen.

Abnormitäten der Cdk4/6-Expression bzw. -Aktivität in adulten Säugetieren begünstigen die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimerschen und Parkinsonschen Erkrankung sowie die Kanzerogenese [6, 60-62].

1.2.5 Cdk4/6 und Kanzerogenese

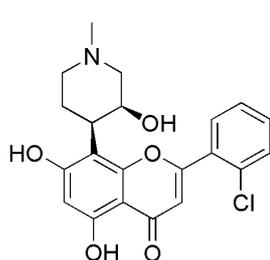
Die fehlerhafte Regulierung des Zellzyklus ist eine grundlegende Eigenschaft von Tumorzellen [4]. Für humane Tumoren wurde generell eine Fehlkontrolle und durch multiple Mechanismen ausgelöste Hyperaktivierung des Cdk4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalwegs beschrieben [6]. Während der Kanzerogenese wird die erhöhte Cdk4/6-Aktivität oftmals durch eine verstärkte Expression des positiven Regulators Cyclin D, die Unterdrückung der endogenen Inhibitoren INK4- und Cip/Kip-Proteine oder epigenetischen Veränderungen des Substrats pRb hervorgerufen [63]. Die Hyperaktivierung der Cdk4/6 wurde in verschiedenen Tumorentitäten festgestellt, mit vorrangiger Bedeutung der Cdk4 in epithelialen malignen Tumoren (endokrine Gewebe und Schleimhäute) und der Cdk6 in mesenchymalen Tumoren (Sarkome und Leukämien) [6].

Im Gegensatz zu anderen Cdk wurde die Störung der Cdk4/6-vermittelten Zellzykluskontrolle jedoch nicht nur durch deren Regulatoren und Substrate verursacht, sondern auch direkt durch Mutationen und Vervielfältigung der Cdk4/6 selbst. Eine Punktmutation im *cdk4*-Gen, die im Protein durch eine Substitution der Aminosäure Arginin an der Position 24 durch ein Cystein (R24C) charakterisiert ist, führt zur Unempfindlichkeit der Cdk4 gegenüber INK4-Proteinen und wurde zuerst bei Patienten mit Melanomen beschrieben [64, 65]. Der Beitrag dieser Mutation zur Tumorentwicklung wurde später bei *cdk4*^{R24C}-Knockin-Mäusen untersucht und förderte das spontane Auftreten von endokrinen und epithelialen Hyperplasien, wie beispielsweise Insulinomen, Sarkomen, Tumoren der Hypophyse, der Leber und der Brust, sowie Melanomen, nach karzinogener Behandlung der Haut [66-68]. Die *cdk4*^{R24C}-Mutation führte weiterhin zu einem enormen Wachstum von Karzinogen-induzierten primären Melanomen und förderte die spontane Metastasierung in den Lymphknoten und Lungen der Mäuse [69]. Eine analoge Punktmutation im *cdk6*-Gen wurde für eine humane Neuroblastom-Zelllinie beschrieben und ist verantwortlich für die Unterbindung der Cdk6-Inhibierung durch p16^{INK4A} [70]. Chromosomale Translokationen, die den *cdk6*-Promotor beeinflussen, führten zur verstärkten Expression des *cdk6*-Gens und trugen zu den onkogenen Eigenschaften von Milz-Marginalzonen-Lymphomen und B-Zell-lymphozytischen Leukämien bei [71, 72]. Im Allgemeinen wurde die Überexpression und verstärkte Synthese der Cdk4/6 in einem breiten Spektrum von humanen Tumoren beobachtet, u. a. in Gliomen, Sarkomen, Lymphomen, Melanomen, Plattenepithelkarzinomen, Mammakarzinomen und Leukämien (zusammengefasst in [73]). Jüngere genetische Studien bei Mäusen bestätigten die Ergebnisse zur Cdk4/6-assoziierten Förderung der Tumorbildung und zeigten Beziehungen zu bekannten

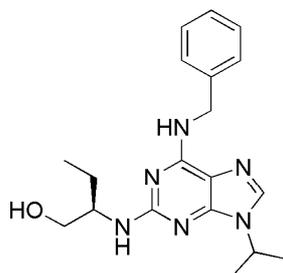
Onkogenen auf. Eine *cdk4*-Deletion in Mäusen verhinderte die durch Karzinogen- oder C-Myc-induzierte typische Entwicklung von Haut-Neoplasien nahezu vollständig [74, 75]. Die durch den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors ErbB-2 (*Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*, Synonyme: HER2/neu) hervorgerufene Brustkrebs-Tumorentwicklung wurde durch eine *cdk4*- und *cyclin D1*-Deletion inhibiert [76-78]. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Aktivierung und Akkumulation von Cdk4-Cyclin D-Komplexen im Zellkern von Tumorzellen auch ohne mitogene Stimuli durch einen onkogenen Ras-(*rat sarcoma viral oncogene*)-Signalweg induziert werden kann [79].

1.3 Die Cdk4/6 als Zielproteine für die Tumorthherapie

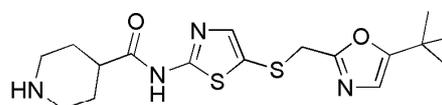
Die wichtige Rolle der Cdk4/6 bei der Regulation des Zellzyklus und deren Beitrag zur verstärkten Zellproliferation während der Kanzerogenese trug zur Entwicklung therapeutischer Konzepte bei, die eine Arretierung von Tumorzellen im Zellzyklus zum Ziel haben. Als vielversprechender Ansatz wurde dabei die systematische Inhibierung der Cdk-Aktivität verfolgt, wobei direkte und indirekte therapeutische Strategien realisiert wurden. Direkte Strategien wirken gezielt auf Untereinheiten der Cdk, indirekte streben eine Beeinflussung der vorgeschalteten regulatorischen Wege an, die die Aktivität der Cdk kontrollieren (zusammengefasst in [80]). Die Mehrheit der chemisch-pharmazeutischen Arbeiten konzentrierte sich auf die Entwicklung spezifischer niedermolekularer Cdk-Inhibitoren, die direkt die katalytische Untereinheit der Cdk beeinflussen [81].



Flavopiridol



CYC-202



BMS-387032

Abbildung 1-4: Strukturen ausgewählter Cdk-Inhibitoren der ersten Generation

Die erste Generation pharmakologischer Cdk-Inhibitoren, wie beispielsweise Flavopiridol [82, 83], CYC-202 (*R*-Roscovitine) [84, 85] oder BMS-387032 [86] (Abbildung 1-4) waren zunächst vielversprechende Verbindungen für die Tumorthherapie. Allerdings wurde in

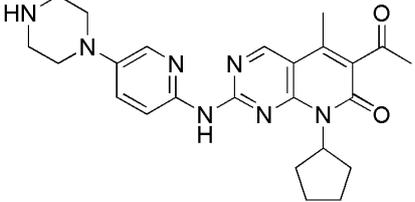
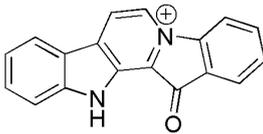
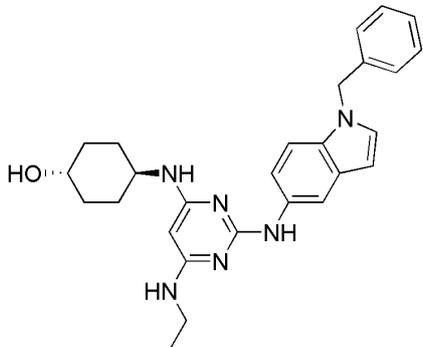
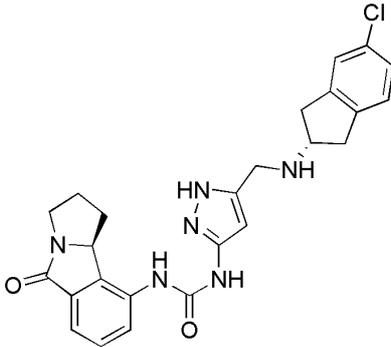
präklinischen und in Phase I klinischen Studien ihre geringe Selektivität gegenüber bestimmten Cdk festgestellt. Die gleichzeitige Inhibierung verschiedener Cdk resultierte in irreführenden Ergebnissen hinsichtlich der Vorteile für die Tumorbehandlung (zusammengefasst in [19]). Ausgehend vom heutigen Kenntnisstand, sind generelle Nebeneffekte und Toxizitäten einer unbeabsichtigten Inhibierung von beispielsweise Cdk1 und Cdk7 nicht verwunderlich. Die in den letzten Jahren erkannte Relevanz der Cdk10 und Cdk11 für die Tumorsuppression verdeutlicht, dass die Beeinflussung der Cdk10- und Cdk11-Aktivität durch Cdk-Inhibitoren therapeutische Effekte der Inhibitoren limitieren würde [87, 88].

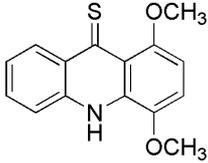
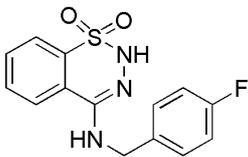
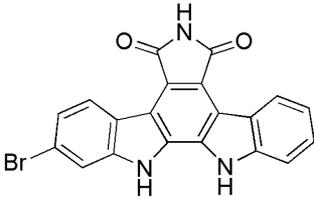
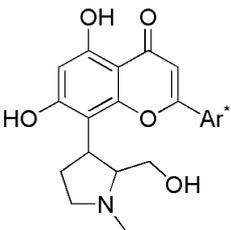
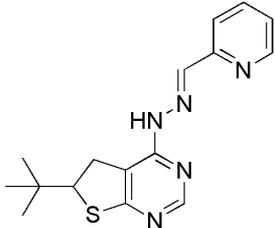
Für die Synthese und Evaluierung der nächsten Cdk-Inhibitor-Generationen wurde neben der Wirksamkeit und Spezifität auch die Selektivität zur entsprechenden Cdk berücksichtigt. Dabei stellt die allgemeine Struktur zahlreicher Proteinkinasen, insbesondere das Faltungsmuster des katalytischen Zentrums mit ATP-Bindungstasche eine Herausforderung für die Entwicklung individueller Subtyp-spezifischer und selektiver Inhibitoren dar. Für das strukturbasierte Design der neuen spezifischen und selektiven Cdk-Inhibitoren sind genaue Kenntnisse über Sekundär- und Tertiärstruktur sowie das Verständnis der Interaktion von Cdk und deren Bindungsmolekülen von großer Bedeutung [89].

In den letzten Jahren wurden entscheidende Fortschritte bei der Entwicklung selektiver und therapeutisch wirksamer Cdk4/6-Inhibitoren erzielt. Alle identifizierten Moleküle haben nahezu planare Heterozyklenstrukturen und gehören verschiedenen chemischen Verbindungsklassen an. Beispiele potenter und selektiver Cdk4/6-Inhibitoren sind in Tabelle 1-1 aufgeführt [90].

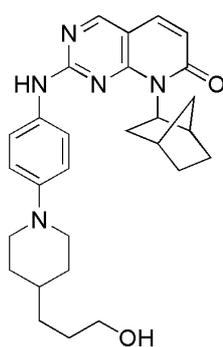
Tabelle 1-1: Verbindungsklassen und Beispiele potenter und selektiver Cdk4/6-Inhibitoren
(modifiziert nach Lee & Sicinsky, 2006 [90])

¹ Konzentration, die zur halbmaximalen Inhibierung (50%) der Kinase-Aktivität benötigt wird.

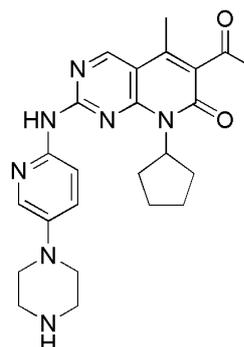
Verbindungsklasse	Kinase-Komplex	IC ₅₀ ¹ [μmol/l]	Literatur
Pyrido[2,3-d]pyrimidine			
PD 0332991 	Cdk4-Cyclin D1: Cdk4-Cyclin D3: Cdk6-Cyclin D2: Cdk1-Cyclin B: Cdk2-Cyclin A/E: Cdk5-p25:	0,011 0,009 0,015 > 10 > 10 > 10	[91]
Oxindole			
Fascaplysin 	Cdk4-Cyclin D1: Cdk6-Cyclin D1: Cdk4-Cyclin D2/3: Cdk6-Cyclin D2: Cdk2-Cyclin A/E: Cdk1-Cyclin B: Cdk5-p35:	0,35 3,4 > 100 > 50 > 50 > 100 20	[92]
Triaminopyrimidine			
CINK4 	Cdk4-Cyclin D1: Cdk6-Cyclin D1: Cdk4/6-Cyclin D2: Cdk2-Cyclin A/E: Cdk1-Cyclin B: Cdk5-p35:	1,5 5,6 > 50 > 50 > 100 25	[93]
Diarylharnstoffe			
Verbindung 15b 	Cdk4-Cyclin D: Cdk2-Cyclin A: Cdk1-Cyclin B:	0,0023 0,44 1,80	[94]

Verbindungsklasse	IC ₅₀ ¹	Literatur
Beispiel (Name und Struktur)	Kinase-Komplex [μmol/l]	
Aminothioacridone		
625987	Cdk4-Cyclin D1: 0,20 Cdk1-Cyclin A: > 100 Cdk2-Cyclin A/E: > 100	[95]
		
Benzothiadiazine		
645787	Cdk4-Cyclin D1: 0,33 Cdk1-Cyclin A: > 100 Cdk2-Cyclin A/E: > 100	[95]
		
Indolcarbazole		
Verbindung 4d	Cdk4-Cyclin D1: 0,076 Cdk2-Cyclin E: 0,52 Cdk1-Cyclin B: 2,1	[96]
		
Flavone		
P276-00	Cdk4-Cyclin D1: 0,063 Cdk6-Cyclin D3: 0,396 Cdk1-Cyclin B: 0,079 Cdk2-Cyclin A: 0,224 Cdk2-Cyclin E: 2,540 Cdk7-Cyclin H: 2,870 Cdk9-Cyclin T1: 0,020	[97]
		
* nicht genau veröffentlicht		
Thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl-hydrazone		
Verbindung 15	Cdk4: 0,90 Cdk2: 2,80	[98]
		

Insbesondere für einige auf dem Grundgerüst der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine basierende Verbindungen, wurde eine große Wirksamkeit hinsichtlich der Cdk4/6-Inhibierung ($IC_{50} < 15 \text{ nmol/l}$) mit herausragender Selektivität gegenüber Cdk1 und Cdk2, sowie anderer Proteinkinasen gezeigt [99, 100]. Strukturbasierte Untersuchungen der Cdk4/6 mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten PD 0183812 und PD 0332991 (Abbildung 1-5) gaben Aufschluss über die Ursachen der selektiven Inhibierung. Simulationen der Interaktion von PD 0183812 mit dem katalytischen Zentrum der Cdk4 [89, 101] und Kristallstrukturanalysen der humanen Cdk6 mit PD 0332991 [102] identifizierten intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Konformation der Hinge-Region der Cdk4/6 als wichtige Strukturen für die Orientierung und Selektivität der Bindung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine. Des Weiteren wurde festgestellt, dass der unter physiologischen Bedingungen positiv geladene tertiäre Amin-Stickstoff des Piperidin-Substituenten von PD 0183812 bzw. des Piperazin-Substituenten von PD 0332991 mit Aminosäuren des Eingangs zur ATP-Bindungstasche wechselwirkt (Asp⁹⁹, Glu¹⁴⁴ der Cdk4 bzw. Asp¹⁰², Asp¹⁰⁴ der Cdk6) und somit die inhibitorische Potenz dieser Verbindungen erhöht.



PD 0183812



PD 0332991

Abbildung 1-5: Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine sind potente und selektive Cdk4/6 Inhibitoren.

Für beide Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate, PD 0183812 und PD 0332991 (Abbildung 1-5), wurden *in vitro* sehr gute Erfolge in Bezug auf die Inhibierung der Cdk4/6-vermittelten Tumorzellproliferation erzielt [91, 103, 104]. *In vivo*-Untersuchungen mit PD 0332991 in Tumor-Xenograft-Mausmodellen zeigten eine erfolgreiche antitumorogene Wirkung [91, 104-106]. In aktuellen klinischen Studien wird die Eignung dieses Cdk4/6-Inhibitors für den pharmazeutischen Einsatz beim Menschen untersucht (vgl. 4.2, <http://www.clinicaltrials.gov>).

1.4 Die Tumordiagnostik mittels Positronen-Emissions-Tomographie

In der onkologischen Klinik und medizinischen Forschung nimmt die Bedeutung des nicht-invasiven diagnostischen Verfahrens Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Erkennung, Beurteilung und Therapiekontrolle von Tumoren stetig zu. Der einzigartige Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren, wie der Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT), die vorrangig anatomisch-morphologische Strukturen zeigen, liegt in der zeitlich und räumlich aufgelösten Darstellung spezifischer biochemischer und physiologischer Prozesse im lebenden Organismus [107]. Die Möglichkeiten der dreidimensionalen Abbildung und Quantifizierung funktioneller Stoffwechselforgänge mit der PET sind eine Grundlage für die Erforschung zellulärer und molekularer Mechanismen von pathophysiologischen Prozessen *in vivo* und für die Entwicklung und Evaluierung neuer Strategien zur Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen.

Das Messprinzip der PET bedingt die Applikation einer mit einem kurzlebigen Positronenemitter markierten biologisch-funktionalen Substanz, die sich aufgrund des Stoffwechsels im Organismus verteilt, unter Umständen metabolisiert, eliminiert bzw. in Geweben akkumuliert wird. Das aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften am häufigsten für die PET verwendete Positronen-emittierende Nuklid ist ^{18}F . Die günstige Halbwertszeit des ^{18}F von 109,8 Minuten erlaubt mehrstufige Synthesen und Untersuchungen in einem zeitlich ausreichenden Rahmen. Die geringe Positronenenergie des Radionuklids ^{18}F bedingt eine geringe Reichweite der Positronen im Gewebe und ermöglicht somit eine hohe Ortsauflösung der tomographischen Messungen. Neben dem ^{18}F werden für die PET beispielsweise die biologisch relevanten Radionuklide ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O oder auch ^{124}I eingesetzt (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2: Eigenschaften ausgewählter PET-Nuklide [108, 109]
EC - Elektroneneinfang (*electron capture*)

Nuklid	Halbwertszeit	Umwandlung	maximale Positronenenergie/ mittlere Reichweite in H_2O
^{18}F	109,8 min	β^+ (96,9%), EC	0,64 MeV/ 0,6 mm
^{11}C	20,4 min	β^+ , EC	0,96 MeV/ 1,1 mm
^{13}N	9,9 min	β^+ , EC	1,19 MeV/ 1,4 mm
^{15}O	2,1 min	β^+ , EC	1,72 MeV/ 1,5 mm
^{124}I	6048 min (4,18 d)	β^+ (23%), EC, γ	2,14 MeV/ 3,5 mm

Nach Applikation der radioaktiv markierten Substanz (klinisch zugelassenes Radiopharmakon oder Radiotracer in der Entwicklung) in den Organismus, kann der Ort der Umwandlung des Radionuklids zu einem bestimmten Zeitpunkt und damit die Verteilung des Radiotracers mit Hilfe der PET erfasst werden. Der Zellkern des radioaktiven Nuklids stabilisiert sich durch die Umwandlung eines Protons in ein Neutron und gleichzeitiger Aussendung eines Positrons (e^+) und Neutrinos (ν). Das instabile Positron bildet zunächst mit einem Elektron ein kurzlebiges Positron-Elektron-Paar (Positronium), welches sich unter der Aussendung von zwei γ -Quanten gleicher Energie mit je 511 keV umwandelt (Annihilation). Die γ -Quanten werden entgegengesetzt ausgesandt und führen bei Koinzidenz der Registrierung von zwei gegenüberliegenden Szintillationsdetektoren im ringförmigen Detektorsystem des Positronen-Emissions-Tomographen auf den Ort der Annihilation zurück. Dies ermöglicht die Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder und einen Rückschluss auf die räumliche Verteilung der Aktivität im Organismus. Das Messprinzip der PET ist in Abbildung 1-6 schematisch zusammengefasst.

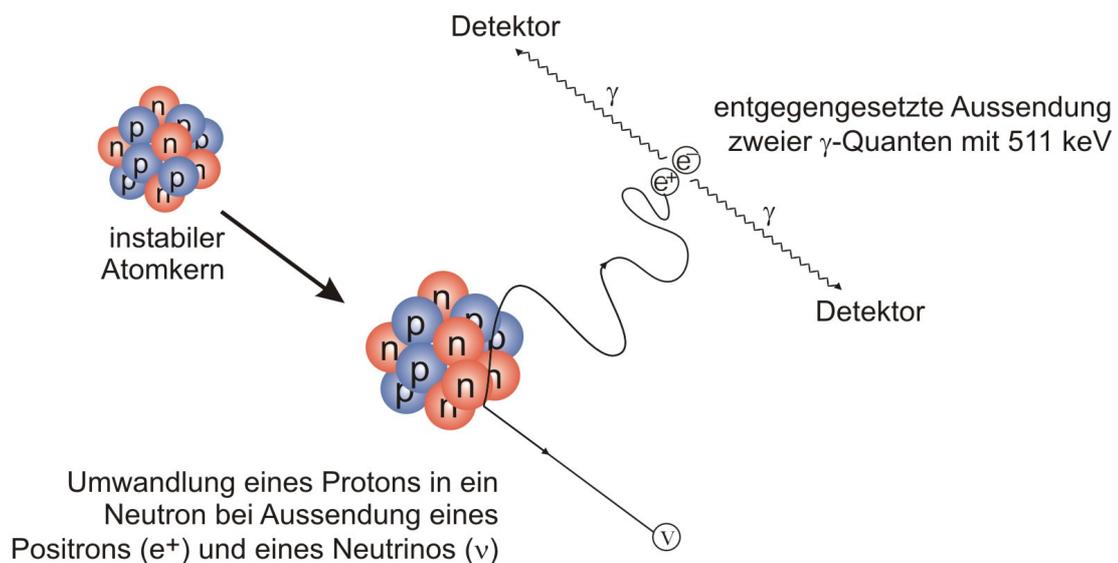


Abbildung 1-6: Das Messprinzip der Positronen-Emissions-Tomographie

Für die Visualisierung von Tumoren mit Hilfe der PET wird gegenwärtig in der Onkologie routinemäßig das Radiopharmakon 2- ^{18}F Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}F FDG) eingesetzt [110]. Die ^{18}F FDG-PET-Untersuchungen reflektieren den Glucosemetabolismus als charakteristisch erhöhte metabolische Eigenschaft im Tumor. Allerdings kann aufgrund der Inhomogenität des Tumorgewebes nicht zwischen krankhaften neoplastischen Zellen oder gesunden Zellen wie beispielsweise Endothelzellen oder inflammatorischen Zellen differenziert werden. Unter anderem sind Makrophagen Bestandteil der Tumormasse und

besitzen aufgrund ihres verstärkten Glucosemetabolismus eine deutlich höhere [^{18}F]FDG-Akkumulation als Tumorzellen [111]. Der hohe Glucosemetabolismus in verschiedenen Organen wie beispielsweise im Gehirn und im Herzen ist ebenfalls eine bedeutende Limitation für die Anwendung des [^{18}F]FDG bei der Tumordiagnostik [110].

Die weitere Entwicklung alternativer PET-Radiopharmaka für die Bildgebung maligner Erkrankungen stützt sich vor allem auf die Identifizierung typischer molekularer und biochemischer Charakteristika von Tumorzellen, die auch einen Einfluss auf die Wahl geeigneter Therapiemöglichkeiten erkennen lassen [109]. Trotz der großen Fortschritte bei der Differenzierung tumorbiologischer Prozesse und den in klinischen Studien gezeigten Vorteilen vieler neuartiger PET-Radiotracer für die Onkologie besteht nach wie vor Bedarf an Zielmolekülen und entsprechenden radiopharmakologischen Sonden zur spezifischen Charakterisierung von Tumoren.

1.5 Zielstellung

Für die spezifische Bildgebung von Tumoren und die Erforschung tumorigener Prozesse *in vivo* ist die Entwicklung und Evaluierung neuer alternativer PET-Radiotracer von großer Bedeutung. Gerade die funktionelle Untersuchung der für die Kanzerogenese relevanten Zellzyklus-regulierenden Proteinkinasen Cdk4/6 ist von großem Interesse. Gegenwärtig können präzise Aussagen zum Cdk4/6-Proteinstatus und zu deren Aktivität in Tumoren oder anderen Organen nur durch aufwendige Analysen *ex vivo* erzielt werden. Die nicht-invasive Bildgebung mit Hilfe funktioneller Methoden wie der PET bietet einzigartige Möglichkeiten zur Charakterisierung des Vorkommens der Cdk4/6 bzw. der Cdk4/6-Aktivität in Tumoren. Daraus können möglicherweise wichtige Aussagen zur Prognose des Patienten und den Verlauf der Therapie abgeleitet werden.

Ausgehend von diesem Hintergrund wurde folgende Hypothese formuliert:

Selektive Cdk4/6-Inhibitoren besitzen ein starkes tumortherapeutisches Potential und sind vielversprechende neue Radiotracer für die Bildgebung sowie funktionelle Charakterisierung der Cdk4/6 in Tumoren *in vivo* mittels PET.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die biochemische und radiopharmakologische Charakterisierung neuer potentieller Cdk4/6-Inhibitoren aus der Verbindungsklasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine und deren Bewertung hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit zur gezielten Cdk4/6-Inhibierung in ausgewählten Tumorzelllinien sowie ihres Potentials zur funktionellen Bildgebung der Cdk4/6 in Tumoren mittels PET am Tiermodell.

Folgende konkrete Fragestellungen sollen beantwortet werden:

Wie hoch sind die Expression und Proteinbiosynthese der Cdk4/6 in den ausgewählten Zelllinien? Wie ist die Verteilung der Cdk4/6 in den Organen und Xenograft-Tumoren der Tiermodelle?

Besitzen die neuen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate das Potential zur Inhibierung des Cdk4/6-vermittelten Signalwegs in den Tumorzelllinien und zur therapeutischen Inhibierung der Tumorzellproliferation?

Sind radioaktiv markierte Cdk4/6-Inhibitoren aus der Verbindungsklasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine geeignet zur funktionellen Charakterisierung der Cdk4/6 in Tumoren mittels PET *in vivo*?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

	Firma
Aktivimeter <i>ISOMED 100</i>	Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank <i>HeraCell</i>	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
<i>DNA Engine Gradient Cyclers PTC-200</i>	MJ Research, Watertown (USA)
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur™</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammer <i>Mini Sub Cell GT</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gamma-Radioaktivitäts-Zähler <i>COBRA II</i>	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Gelauswertekammer <i>Gene Flash</i>	Syngene Bio Imaging, Cambridge (Großbritannien)
Gelelektrophorese-System (Miniprotean)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HPLC <i>Hewlett Packard Series 1100</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
Kleintier-PET Scanner <i>microPET P4</i>	CTI Concorde Microsystems, Knoxville (USA)
<i>Lumineszenz Imager System</i>	Biostep, Jahnsdorf
<i>Mastercycler® ep realplex</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop <i>Axiolmager A1</i>	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop <i>Axiovert 40 CFL</i>	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikrotom <i>Jung Cryopolycut</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Photometer <i>Bio</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer <i>Synergy HT</i>	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Radioluminographie-Scanner <i>BAS 5000</i>	FUJIFILM Europe, Düsseldorf
Schüttelinkubator Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Schüttler <i>unimax 1010</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sterilbank <i>Steril Guard II Type A/ B3</i>	The Baker Company, Sandford (USA)
Stromversorgungsgerät <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>TissueLyser</i>	Qiagen, Hilden
<i>TransBlot Semi-Dry Blotter</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Vortex-Genie 2 mixer</i>	Scientific Industries, Inc., Bohemia (USA)
Zellzählgerät <i>Casy® Model TT</i>	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge <i>Biofuge stratos</i>	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zentrifuge <i>5415 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Materialien für den biologisch-biochemischen Gebrauch wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Eppendorf AG, Hamburg, Fisher Scientific GmbH, Nidderau bzw. Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen bezogen.

	Firma
Membran <i>Westran CS RL, PVDF 0,45 µm</i>	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Objekträger <i>SuperFrost Plus</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Objekträger mit Aufsatz (<i>chamber slides</i>)	BD Biosciences, Heidelberg
Reagenzgläser <i>Polystyrene 5 ml für FACS</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Reaktionsgefäße <i>0.2 ml Thermo-Strips</i>	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Zellkulturflaschen 25 cm ² / 75 cm ²	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten 6-, 24- und 96-well	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml/ 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

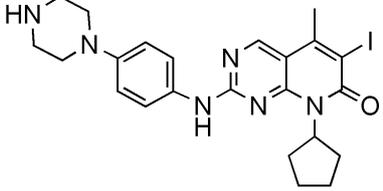
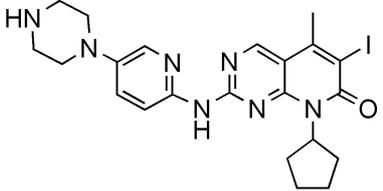
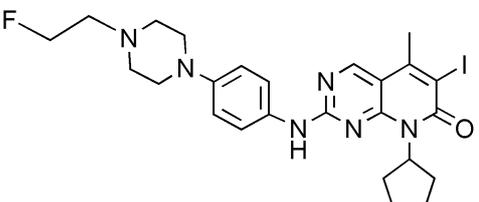
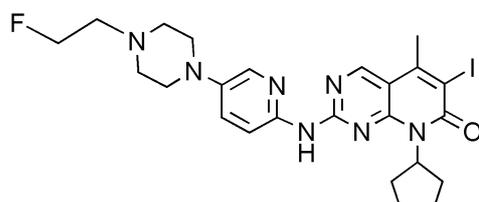
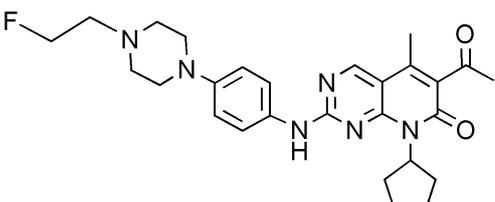
2.1.3 Chemikalien, Medien und Enzyme

Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivate

Das Design neuer Cdk4/6-Inhibitoren erfolgte auf der Grundlage des von VanderWel *et al.* beschriebenen Cdk4/6-selektiven Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivats **30** [100] (in dieser Arbeit als CKIA (**1**) bezeichnet, Tabelle 2-1).¹ Die Verbindungen wurden für die biologisch-biochemischen Untersuchungen als gelb bis grün-braune Feststoffe mit Reinheiten von > 97% erhalten, in DMSO gelöst (Stammlösung: 10 mmol/l), bei -20°C gelagert und für die Experimente in sterilem PBS bzw. Zellkulturmedium verdünnt.

¹ Die organischen Synthesen der Pyrido[2,3-d]pyrimidine wurden von Frau Lena Köhler in der Abteilung PET-Tracer am Institut für Radiopharmazie, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, erarbeitet und sind in ihrer Dissertation „Radiotracer für die molekulare Bildgebung des Zellzyklus: Radiomarkierung von Inhibitoren der Cdk4/6 mit den Radionukliden Iod-124 und Fluor-18“ zusammengefasst (der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der TU Dresden im Januar 2010 vorgelegt) [112].

Tabelle 2-1: Überblick der in dieser Arbeit untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate

Bezeichnung	Systematischer Name und Strukturformel
CKIA	8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-(4-piperazin-1-yl-phenylamino)-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on 
CKIB	8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-(5-(piperazin-1-yl)-pyridin-2-yl-amino)-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on 
CKIC	8-Cyclopentyl-2-(4-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)phenyl-amino)-6-iod-5-methyl-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on 
CKID	8-Cyclopentyl-2-(5-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)pyridin-2-yl-amino)-6-iod-5-methyl-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on 
CKIE	6-Acetyl-8-cyclopentyl-2-(4-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)phenyl-amino)-5-methyl-8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7-on 

Die käuflich erworbenen Chemikalien und Reagenzien wurden mit größtmöglicher Reinheit von den angegebenen Firmen bezogen. Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe sowie Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim erworben.

	Firma
Accutase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Agarose UltraPure	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Antibiotika Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
BCA-Protein-Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Carboxymethylzellulose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Casyton	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Coomassie Brilliantblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Desoxyribonuklease I (RNase-frei) mit 10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂ und 25 mmol/l EDTA	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Eosin B	Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerol-2-phosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Obergünzburg
McCoy's 5 A modifiziert - Flüssigmedium mit 2,2 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methylbenzoat	Merck KGaA, Darmstadt
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

Natriumazid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Nonidet P40	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>Orange Loading Dye Solution (6x)</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Paraffin (42-44 °C)	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin (58-60 °C)	VWR International GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (10x) pH 7,4 ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	Gibco™, Invitrogen Corporation (Großbritannien)
<i>Precision Plus Protein Standards™</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Proteinstandard BSA 400 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamidlösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , stabilem L-Glutamin, LE (<i>low endotoxine</i>)	Biochrom AG, Berlin
Sulfinpyrazon	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim
Trypsin (0,5%)/ EDTA (0,2%) Lösung (10x) in 10x PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Valinomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

VenorGeM [®] -Mykoplasmen-Detektionskit	Minerva Biolabs, Berlin
Verapamil	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.1.4 Antikörper und Immunchemikalien

Bezeichnung	Bestellnummer und Firma
<i>primäre Antikörper</i>	
polyklonal Kaninchen anti-Cdk4 (C-22)	sc260 SantaCruz Biotechnology
polyklonal Kaninchen anti-Cdk4 (H-22)	sc601 SantaCruz Biotechnology
polyklonal Kaninchen anti-Cdk6 (C-21)	sc177 SantaCruz Biotechnology
polyklonal Kaninchen anti-Phospho-pRb(Ser⁷⁸⁰)	#9307 CellSignaling Technology
polyklonal Kaninchen anti-Phospho-pRb(Ser^{807/811})	#9308 CellSignaling Technology
monoklonal Maus anti-pRb(4H1)	#9309 CellSignaling Technology
polyklonal Kaninchen anti-β-Aktin	A5060 Sigma-Aldrich GmbH
<i>sekundäre Antikörper – Konjugate</i>	
Ziege anti-Kaninchen IgG – Peroxidase	A0545 Sigma-Aldrich GmbH
Kaninchen anti-Maus IgG – Peroxidase	A9044 Sigma-Aldrich GmbH
Esel anti-Kaninchen IgG – Biotin	RPN1004V1 Amersham Biosc.
Esel anti-Kaninchen IgG – Cy3	711-165-152 dianova

Zur Detektion biotinylierter Antikörper wurde der *ExtrAvidin[®]-Peroxidase Komplex* (E2886, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) verwendet. Der Nachweis von Proteinen auf der Membran erfolgte nach Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper mit dem Chemilumineszenz-Verfahren unter Verwendung des *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrat* (Pierce, Rockford, USA).

2.1.5 Primer

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe des über das Internet aufrufbaren Programms *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) und der mRNA-Sequenz aus den angegebenen Datensätzen ermittelt (Tabelle 2-2). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer Intron-überspannend, das heißt die komplementären Basen zu Vorwärts- und Rückwärtsprimern in zwei verschiedenen Exons des jeweiligen Gens lokalisiert sind. Alle Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert.

Tabelle 2-2: Primersequenzen zur mRNA-Quantifizierung

Der Datensatz bezeichnet die Zugriffsnummer zu den Einträgen in der Datenbank *Nucleotide* aus der *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Position bezieht sich auf die Einträge des dazugehörigen Datensatzes. (f: *forward*, r: *reverse*)

Bezeichnung	Position	Datensatz	Sequenz
Cdk4-f	568 - 587	NM_000075	5'-CCG AAA CGA TCA AGG ATC TG-3'
Cdk4-r	874 - 855		5'-CCA CAG AAG AGA GGC TTT CG-3'
Cdk6-f	901 - 930	NM_001259	5'-GCC CGC ATC TAT AGT TTC CA-3'
Cdk6-r	1131 - 1112		5'-TCT CCT GGG AGT CCA ATC AC-3'
E2F-1-f	796 - 815	NM_005225	5'-AGC TGG ACC ACC TGA TGA AT-3'
E2F-1-r	945 - 926		5'-GAG GGG CTT TGA TCA CCA TA-3'
PCNA-f	444 - 463	NM_002592	5'-GGC GTG AAC CTC ACC AGT AT-3'
PCNA-r	688 - 669		5'-TCT CGG CAT ATA CGT GCA AA-3'
β-Aktin-f	736 - 755	NM_001101	5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3'
β-Aktin-r	969 - 950		5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'

2.1.6 Puffer und Lösungen

	Zusammensetzung
Blockpuffer	5% Magermilchpulver (w/v) in TBS/ Tween
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v) 0,1% Coomassie Brilliantblau (w/v)
DAB-Färbelösung	50 mmol/l Tris – HCl (pH 8,0) 4 mg/ml NH ₄ Ni ₂ SO ₄ 0,4 mg/ml DAB 0,03% H ₂ O ₂ (v/v)
Einfriermedium	10% DMSO in FKS
Entfärbelösung 1	50% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v)
Entfärbelösung 2	10% Methanol (v/v) 5% Eisessig (v/v)

Lysepuffer (pH 7,5)	50 mmol/l Tris – HCl 150 mmol/l NaCl 0,5% Nonidet P40 (v/v) 10 mmol/l Glycerol-2-phosphat je 1 mmol/l Na ₃ VO ₄ , NaF und DTT Protease-Inhibitoren frisch zugeben: 1 mmol/l PMSF 1 µg/ml Leupeptin
MTT Stammlösung	5 mg/ml MTT in PBS
NaOH/ SDS-Lösung	1% SDS (w/v) in 0,1 M NaOH
PBS (pH 7,4)	150 mmol/l NaCl 74 mmol/l KH ₂ PO ₄ 8,1 mmol/l Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 2,7 mmol/l KCl
PBS/ Tween	0,1% Tween 20 (v/v) in PBS (pH 7,4)
PBS-Waschlösung (pH 7,4) (Radiotraceraufnahme)	274 mmol/l NaOH 5,4 mmol/l KCl 3,0 mmol/l KH ₂ PO ₄ 14,6 mmol/l Na ₂ HPO ₄ 0,5 mmol/l MgCl ₂ · 6 H ₂ O 1 mmol/l CaCl ₂ · 2 H ₂ O
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 mol/l Tris – HCl
SDS-PAGE Elektrodenpuffer	25 mmol/l Tris 200 mmol/l Glycin 0,1% SDS (w/v)
SDS-Blotpuffer (nach Bjerrum und Schafer-Nielson)	48 mmol/l Tris 39 mmol/l Glycin 20% Methanol (v/v) 0,004% SDS (w/v)
SDS-Probenpuffer	62,5 mol/l Tris – HCl (pH 6,8) 10% Glycerol (v/v) 5% β-Mercaptoethanol (v/v) 2% SDS (w/v) 0,01% Bromphenolblau (w/v)

Sörensenpuffer (pH 7,4)	je 0,01 mol/l KH_2PO_4 und Na_2HPO_4
Stripping-Puffer	0,5 mol/l Tris – HCl (pH 6,8) 2% SDS (w/v) frisch zugeben: 0,07% β -Mercaptoethanol (v/v)
TAE-Puffer (pH 8,5)	40 mmol/l Tris 0,1% Eisessig (v/v)
TBS/ Tween (pH 8,0)	10 mmol/l Tris 150 mmol/l NaCl 0,05% Tween 20 (v/v)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 mol/l Tris – HCl

2.1.7 Biologisches Material

Humane Tumorzelllinien

Name	Ursprung	Bestellnummer *	Zellkulturmedium
HT-29	kolorektales Adenokarzinom	91072201	McCoy's 5A
FaDu	Pharynx-Plattenepithelkarzinom	HTB-43	RPMI 1640
THP-1	akute monozytäre Leukämie	88081201	RPMI 1640

* European Collection of Cell Cultures bzw. ATCC (HTB-Nummer)

Das verwendete Kompletmedium zur Kultivierung der Tumorzelllinien beinhaltet neben dem oben genannten Zellkulturmedium 10% FKS und 1% Antibiotika Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Alle verwendeten Zellen wurden mit dem VenorGeM[®]-Mykoplasmen-Detektionskit regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Für die Experimente wurden ausschließlich negativ getestete Zellen verwendet.

Versuchstiere

Die Haltung der Tiere sowie die Durchführung der Experimente erfolgten in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzbestimmungen und mit der Genehmigung und Kontrolle des zuständigen lokalen Tierversuch-Ethikkomitees.

Tiername	Einrichtung/ Firma
<i>nu/nu</i> -NMRI-Maus (Nacktmaus) mit FaDu-Tumor-Xenotransplantat (weiblich, Alter: 7-14 Wochen, 30-34 g)	Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
Wistar-Ratte Unilever (männlich, Alter: 6-10 Wochen, 150-250 g)	Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Rekultivierung und Kryokonservierung von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zur Rekultivierung dem Lager entnommen und die schnell aufgetauten Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden langsam 5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums zu der Zellsuspension getropft. Dabei wurde das Röhrchen vorsichtig geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren für 5 Minuten bei $200 \times g$ wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie nachfolgend beschrieben (2.2.2) mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. 100 μ l der Zellsuspension wurden zur Zellzahlbestimmung entnommen. Die übrigen Zellen wurden 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert, anschließend in Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben. Dabei wurden pro Röhrchen je 5×10^6 Zellen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden zunächst mindestens einen Tag bei -80°C im Einfrierbehälter gelagert und anschließend in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.2 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in 25 cm^2 (75 cm^2) Zellkulturflaschen bei 37°C und gesättigter Wasserdampfatosphäre bei einem CO_2 -Partialdruck von 5% kultiviert.

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und der mit Hilfe eines Mikroskops beurteilten Konfluenz (60-80%) wurden die adhärenen Zellen ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Die dazu nötigen Arbeitsschritte wurden mit sterilen Materialien und unter der Sterilbank durchgeführt. Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 3 ml (5 ml) PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml (2 ml) Trypsin in die Kulturflasche gegeben und die Zellen im Brutschrank unter den angegebenen Bedingungen für 2 Minuten inkubiert. Nach Abnahme des Trypsins wurden die Zellen

nochmals für 4 Minuten im Brutschrank inkubiert, um ein vollständiges Ablösen von der Zellkulturflasche zu erreichen. Die Zellen wurden in 5 ml frischem Zellkulturmedium mit FKS aufgenommen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde bis zu 7 ml (15 ml) Endvolumen mit Medium aufgefüllt und in neuen Zellkulturflaschen kultiviert.

Zur Passagierung der Suspensionszelllinie THP-1 wurde die Zellsuspension in ein Röhrchen überführt und 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellett in frischem Medium resuspendiert und ein Aliquot der Suspension in einer neuen Zellkulturflasche mit insgesamt 7 ml (15 ml) Zellkulturmedium kultiviert.

Durch die Zugabe von 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) zum Zellkulturmedium (64 nmol/l) für 72 h wurden die THP-1-Zellen zu adhärenen reifen Zellen mit Eigenschaften von Makrophagen differenziert (THP-1-Makrophagen).

2.2.3 Arretierung von Zellen in der Zellzyklusphase G₁

Um Vergleichsdaten von Zellen im G₁-Phasenarrest zu erhalten, wurden diese aufgrund von Serummangel in die G₁-Phase gezwungen. Zunächst wurden die adhärenen Tumorzelllinien HT-29 und FaDu bis zur Konfluenz kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 72 h in Medium mit 0,25% FKS kultiviert. Der Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde durch Zugabe von Medium mit 10% FKS nach der Passagierung der Zellen induziert.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl der Zellsuspension in ein Röhrchen pipettiert und mit 10 ml Casyton-Puffer verdünnt. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Zellzählgerätes *Casy[®] Model TT* automatisch nach Auswahl der entsprechenden Zelllinie im Bedienfeld. Zur Berechnung des benötigten Volumens der Zellsuspension für weitere Experimente bzw. zur Erfassung der Zellzahl nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten wurde die ausgegebene Lebendzellzahl pro ml zugrunde gelegt.

2.2.5 Untersuchung der Zellvitalität

Zur Beurteilung der Zellvitalität bzw. der Zytotoxizität wurde nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) inkubiert. Die Umwandlung des MTT in ein dunkelblaues, wasserunlösliches Formazansalz ist proportional zur Aktivität intrazellulärer Dehydrogenasen und somit indirekt ein Maß für die Stoffwechselaktivität bzw. Vitalität der

Zellen. Dabei kann jedoch nicht zwischen dem Verhalten der Gesamtzellpopulation und dem einzelner Zellen auf den jeweiligen Wirkstoff unterschieden werden.

Vor der Zugabe der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate (0,1 µmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l) wurden $2,5 \times 10^4$ (HT-29, FaDu) bzw. 15×10^4 (THP-1) Zellen für 24 h mit 0,5 ml Zellkulturmedium in den Kavitäten von 24-well Platten kultiviert. Die MTT-Inkubation (0,5 mg/ml) erfolgte für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Danach wurde die MTT-Lösung vollständig abgenommen. Die THP-1-Zellen wurden zuvor zentrifugiert. Durch die Zugabe von 500 µl DMSO wurden die Zellen lysiert und der gebildete blau-violette Farbstoff gelöst. Die photometrische Bestimmung des Formazans erfolgte bei 550 nm und 690 nm am Photometer *Synergy HT*.

2.2.6 Untersuchung des Wachstumsverhaltens

Der Einfluss der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate auf die Zellproliferation wurde in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationsdauer untersucht. Dazu wurden zunächst $2,5 \times 10^5$ Zellen mit 3 ml Medium in eine 6-well Platte gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden einmalig verschiedene Konzentrationen (0,1 µmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l) der Verbindungen zugegeben und nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.2.4). Als Kontrolle wurde das gleiche Volumen an PBS in das Zellkulturmedium gegeben.

2.2.7 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse ermöglicht die Bestimmung der Verteilung von Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Dabei wird jede Einzelzelle der Zellsuspension hinsichtlich ihrer Streulichteigenschaften und ihres DNA-Gehaltes charakterisiert. Dies ermöglicht eine statistische Analyse der Gesamtzellpopulation. Der DNA-Gehalt einer Zelle wird nach entsprechender Anregung indirekt über die Fluoreszenzintensität des zwischen den Basenpaaren der DNA interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid ($\lambda_{\text{Exzitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 615 \text{ nm}$) bestimmt.

Nach der eintägigen Kultivierung von 2×10^6 Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen und anschließender 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate (0,05 µmol/l; 0,1 µmol/l; 0,5 µmol/l; 1 µmol/l; 5 µmol/l; 10 µmol/l) wurden die Zellen von der Flasche abgelöst (vgl. 2.2.2) und in einem Zentrifugenröhrchen mit eiskaltem PBS gewaschen (Zentrifugation: 5 min, $200 \times g$, 4°C). Die Zellen wurden eine Stunde in 70% Ethanol bei 4°C fixiert und nach erneutem Waschen in PBS für 30 min bei 37°C mit 1 µg/ml Ribonuclease A inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte nach Färbung der DNA mit 10 µg/ml

Propidiumiodid im Dunkeln für 30 Minuten am Durchflusszytometer *FACSCalibur™* unter Nutzung der Software *CellQuest Pro*. Dabei wurden insgesamt 20.000 Zellen in einer Ereignisregion bei einer maximalen Ereignisrate von 300 pro Sekunde gemessen. Zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung wurden aus den Daten Histogramme erzeugt und diese mit der Software *Modfit LT™* ausgewertet.

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Zur subzellulären Lokalisierung der Proteine Cdk4 und Cdk6 in Zellen wurden die Antigene durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Dazu wurden die auf Objektträgern mit Aufsatz (*chamber slides*) kultivierten Zellen mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung über Nacht bei 4°C sowie anschließend 10 min bei -20°C mit Methanol fixiert. Nach dem Waschen mit PBS/ Triton X-100 (0,3%) in 5% BSA in PBS/ Tween wurden die unspezifischen Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die primäre Antikörperinkubation (anti-Cdk4 (H-22), anti-Cdk6 (C-21), je 1:100) erfolgte in 5% BSA in PBS/ Tween bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und der Cy3-konjugierte ($\lambda_{\text{Exzitation}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 615 \text{ nm}$) anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper (vgl. 2.1.4, 1:1000) für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Die Färbung der Zellkerne erfolgte für 5 Minuten mit 200 nmol/l DAPI. Nach einer letzten Waschsequenz in PBS und destilliertem Wasser wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe sowie Roti®-Histol entwässert und in Roti®-Histokitt eingedeckt. Parallel dazu wurden Kontrollzellen ohne Inkubation des primären Antikörpers mitgeführt (Negativkontrolle).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

Die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihres Cdk4- und Cdk6-Proteingehalts bzw. der intrazellulären Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins pRb in Abhängigkeit der Konzentration an Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten erfolgte immunbiochemisch nach Zelllyse und Trennung der Proteine nach ihrer Größe.

2.3.1 Proteinextraktion

Nach 24-stündiger Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten (0,1 $\mu\text{mol/l}$; 1 $\mu\text{mol/l}$; 10 $\mu\text{mol/l}$) wurden die in 25 cm² Zellkulturflaschen kultivierten Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Lysepuffer (pH 7,5) versetzt. Die Zellen wurden zunächst mit einem Zellschaber von der Kulturflasche abgelöst und anschließend an einer Kanüle geschert. Große Zellfragmente wurden von der Proteinlösung durch 15-minütiges

Zentrifugieren bei $15.000 \times g$ und 4°C abgetrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte mit dem BCA-Protein-Assay nach Herstellerangaben und BSA als Proteinkonzentrationsstandard am Photometer *Synergy HT* bei 562 nm.

2.3.2 Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Trennung denaturierter Proteine nach der von Laemmli 1970 beschriebenen Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) basiert auf dem Prinzip des Molekularsieb-Effekts einer polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid und N,N'-Bisacrylamid [113]. Die Zusammensetzung und Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde entsprechend des Trennbereichs von 250 bis 30 kDa mit 7,5% (pRb: 110 kDa) und von 150 bis 25 kDa mit 10% (Cdk4: 34 kDa und Cdk6: 37 kDa) gewählt (Tabelle 2-3).

50 μg des Gesamtproteins der Extrakte wurden mit SDS-Probenpuffer 60 Minuten bei 99°C denaturiert und anschließend im SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt. Die Elektrophorese wurde mit SDS-PAGE-Elektrodenpuffer bei 120 bis 140 V durchgeführt. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente das gefärbte Proteingemisch *Precision Plus Protein Standards* (250 - 10 kDa).

Tabelle 2-3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele (2 kleine Gele)

% Acrylamid:	Trenngel		Sammelgel
	7,5%	10%	5%
Aqua dest. [μl]	2950	2250	2100
Trenngelpuffer [μl]	3150	3150	-
Sammelgelpuffer [μl]	-	-	385
30% Acrylamid [μl]	2100	2800	525
10% SDS [μl]	100	100	30
10% APS [μl]	100	100	60
TEMED [μl]	10	10	3

2.3.3 Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran

Für den immunchemischen Nachweis der im SDS-Polyacrylamid-Gel getrennten Proteine wurden diese zunächst auf eine Membran (PVDF; $0,45 \mu\text{m}$) übertragen und immobilisiert. Dabei wurde das *Semi-dry-Blot*-Verfahren angewendet, bei dem ein in SDS-Blotpuffer getränktes Filterpapier, die Membran, das SDS-Polyacrylamid-Gel und zwei weitere

getränkte Filterpapiere luftblasenfrei übereinander gelegt wurden. Der elektrophoretische Transfer erfolgte im *TransBlot Semi-dry Blotter* bei 10 V für 90 Minuten.

Zur Kontrolle des Transfers und des Proteinauftrags wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel anschließend in Coomassie-Färbelösung für 20 Minuten gefärbt und danach in Entfärbelösung 1 und 2 wieder entfärbt. Proteinrückstände bleiben danach blau gefärbt.

2.3.4 Immunchemischer Antigennachweis

Im Anschluss an den Elektrotransfer der Proteine erfolgte der Nachweis bestimmter Proteine bzw. der Protein-Phosphorylierung auf der Membran mit spezifischen Antikörpern. Die Membran wurde zunächst eine Stunde im Blockpuffer und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Danach wurde mit TBS/ Tween gewaschen und für eine Stunde der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper zur Membran gegeben. Die Verdünnungen und Inkubationspuffer der einzelnen Antikörper sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Verdünnungen und Inkubationsmedien der Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Inkubationsmedium
<i>primäre Antikörper</i>		
anti-Cdk4 (H-22)	1:1000	5% BSA (w/v) in TBS/ Tween
anti-Cdk6 (C-21)	1:1500	5% BSA (w/v) in TBS/ Tween
anti-Phospho-pRb(Ser ⁷⁸⁰)	1:1000	5% BSA (w/v) in TBS/ Tween
anti-Phospho-pRb(Ser ^{807/811})	1:1000	5% BSA (w/v) in TBS/ Tween
anti-pRb(4H1)	1:2000	Blockpuffer
anti-β-Aktin	1:1000	5% BSA (w/v) in TBS/ Tween
<i>sekundäre Antikörper – Konjugate</i>		
anti-Kaninchen IgG – Peroxidase	1:10.000	Blockpuffer
anti-Maus IgG – Peroxidase	1:10.000	Blockpuffer

Nach erneutem Waschen in TBS/ Tween erfolgte die Detektion der spezifischen Antikörperbindung durch Inkubation mit dem *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat* im *Lumineszenz Imager System*. Das Prinzip beruht dabei auf der oxidativen Spaltung von Luminol durch die Peroxidase, wobei die bei der Reaktion ausgesendete chemische Lumineszenz von der Kamera des *Imager Systems* erfasst wird.

Zur Detektion eines zweiten Proteins auf der Membran wurde diese für 15 Minuten mit Stripping-Puffer bei 55 °C inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden dadurch denaturiert und abgelöst. Nach einer 15-minütigen Waschsequenz in TBS/ Tween und

erneutem Blocken konnte die Membran für den immunchemischen Nachweis von β -Aktin verwendet werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA Präparation

Für die RNA-Isolierung wurden 2×10^6 Zellen mit 7 ml Zellkulturmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivaten für 24 Stunden. Danach wurde das Medium vollständig von den Zellen abgenommen und diese mit 3 ml PBS gewaschen. Die Isolierung der RNA aus den Zellen wurde mit dem miRNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Konzentrationsmessung der isolierten RNA erfolgte am Photometer, wobei die Extinktion bei 260 nm bestimmt wurde ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ }\mu\text{g/ml}$). Die Konzentrationsangabe erfolgte in $\mu\text{g/ml}$. Zur Reinheitsbestimmung wurde außerdem die Extinktion bei 280 nm gemessen. Für die isolierten RNA-Proben lag das Verhältnis der gemessenen Absorptionen bei 260 nm und 280 nm zwischen 1,8 und 2,3.

2.4.2 DNase-Behandlung der isolierten RNA

Um eventuell in den RNA-Proben enthaltene DNA-Fragmente zu entfernen wurde nach der RNA-Isolierung eine DNase-Behandlung angeschlossen. Dazu wurden in einem RNase-freien Gefäß 1 μg RNA auf 8 μl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und mit 1 μl 10x DNase I-Puffer mit MgCl_2 sowie 1 μl DNase I (1 U/ μl) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde nach Zugabe von 1 μl 25 mmol/l EDTA für weitere 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert und nach erneuter Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm für die Reverse Transkription (RT) mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet.

2.4.3 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Überprüfung der Spezifität der aus den jeweiligen mRNA-Sequenzen ermittelten Primer (vgl. 2.1.5) wurde mit jedem Primerpaar eine RT-PCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Dabei wird durch Reverse Transkription (RT) an den entsprechenden mRNA-Einzelstrang der komplementäre DNA-Strang synthetisiert (cDNA) und anschließend die cDNA mittels PCR vervielfältigt.

Als Proben dienten die zuvor mit DNase behandelten RNAs der unbehandelten Zellen. Zur Durchführung wurde das *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum® Taq DNA Polymerase* verwendet. Der nachfolgend aufgeführte Reaktionsansatz wurde in ein PCR-Gefäß gegeben, sorgfältig durchmischt und das angegebene RT-PCR-Programm im PCR-Gerät *DNA Engine Gradient Cycler* gestartet (Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: Reaktionsansatz und Programm der RT-PCR

Reaktionsansatz		RT-PCR-Programm		
			<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
10,00 µl	5x Reaktionsmix	1. cDNA-Synthese:	58 °C	30 min
1,00 µl	Primer f (10 µmol/l)	2. Denaturierung:	94 °C	5 min
1,00 µl	Primer r (10 µmol/l)	3. PCR:	40 Zyklen	
0,15 µl	SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq Mix	Denaturierung	94 °C	30 s
		Primeranlagerung	58 °C	30 s
<u>7,85 µl</u>	100 ng RNA	Elongation	72 °C	1 min
20,00 µl		4. finale Elongation	72 °C	5 min
		5. Kühlung:	4 °C	bis Ende

Die Detektion der amplifizierten Produkte für jedes Primerpaar erfolgte nach der Trennung in einem 2%igem Agarosegel durch Färben mit Ethidiumbromid. Dazu wurden zu jedem Reaktionsansatz 5 µl *Orange Loading Dye Solution* gegeben und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl *O'GeneRuler DNA Ladder Mix* (100 bp bis 10 kb) mitgeführt. Durch die Bestimmung der Größe aller amplifizierten Produkte auf dem Agarosegel und Vergleich mit den durch die Primer flankierten Fragmentlängen aus den mRNA-Sequenzen (Tabelle 2-7) wurde die Spezifität der Primer festgestellt.

2.4.4 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die fluoreszenzbasierte quantitative Echtzeit-RT-PCR ermöglicht durch die simultane Abbildung der DNA-Amplifikation nach jedem Zyklus einen Rückschluss auf die ursprünglich in einer Probe enthaltene mRNA-Menge. Damit ist ein relativer Vergleich der Genexpression in verschiedenen Proben möglich.

Die Methode wurde in einem Ansatz mit je 50 ng DNase-behandelter RNA, mRNA-spezifischen Primern (vgl. 2.1.5) und dem *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jede zu untersuchende Probe wurde der Reaktionsansatz laut Tabelle 2-6 pipettiert. Die Negativkontrolle jedes Primerpaares beinhaltet anstelle der RNA je 7,8 µl Wasser.

Tabelle 2-6: Reaktionsansatz und Programm der quantitativen Echtzeit-RT-PCR

Reaktionsansatz		Programm	
		Temperatur	Zeit
10,0 µl 2x QuantiTect SYBR Mix 1,0 µl Primer f (10 µmol/l) 1,0 µl Primer r (10 µmol/l) 0,2 µl QuantiTect RT Mix <u>7,8 µl</u> 50 ng RNA 20,0 µl	1. cDNA-Synthese:	58 °C	30 min
	2. Denaturierung:	94 °C	5 min
	3. PCR:	40 Zyklen	
	Denaturierung	95 °C	20 s
	Primeranlagerung	56-60 °C	20 s
	Elongation	68 °C	1 min
		55 °C	15 s
	4. Schmelzpunktbest.:	55-95 °C	in 20 min
		95 °C	15 s
	5. Kühlung:	4 °C	bis Ende

Die Quantifizierung der jeweiligen mRNA erfolgte am *Mastercycler® ep-realplex* unter Verwendung des in Tabelle 2-6 angegebenen Programms. Für die Primeranlagerung wurde im PCR-Block ein Temperaturgradient erzeugt (56–60 °C), so dass für jedes Primerpaar die optimale Schmelztemperatur im PCR-Reaktionsgefäß vorlag (Tabelle 2-7). Neben der mRNA-Expression der interessierenden Gene wurde die Expression von β -Aktin mitbestimmt. Für dieses Gen wird eine gleichbleibende Expression unabhängig von den verschiedenen Kultivierungsbedingungen angenommen. Solch ein Gen wird als Haushaltsgen bezeichnet.

Die relative mRNA-Expression ergibt sich aus dem jeweiligen C_t -Wert (*threshold cycle*, Schwellenwertzyklus) des untersuchten Zielgens und dem des Haushaltsgens β -Aktin nach folgender Berechnung: relative mRNA-Expression = $2^{-\Delta C_t}$, wobei ΔC_t der Differenz aus $C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Haushaltsgen})$ entspricht.

Tabelle 2-7: Schmelztemperaturen und erwartete Produktgrößen der verwendeten Primer

Primerpaar	Schmelztemperatur	Produktgröße (bp)
Cdk4	58 °C	307
Cdk6	58 °C	221
E2F-1	58 °C	150
PCNA	56 °C	245
β -Aktin	60 °C	234

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Fixierung und Paraffineinbettung von Geweben

Die Fixierung der Organe und Gewebe aus HT-29- bzw. FaDu-Tumor-tragenden *nu/nu*-NMRI-Mäusen erfolgte unter tiefer Urethannarkose durch transkardiale Perfusion. Für die Perfusion wurden die Mäuse zunächst sternotomiert und anschließend der rechte Ventrikel des Herzens mit einer Kanüle punktiert. Mit Hilfe einer Pumpe wurde das Blut des großen Kreislaufs aus dem linken Ventrikel mit einer 37°C warmen physiologischen Kochsalzlösung herausgespült. Anschließend wurde das Gewebe mit 100 ml einer 37°C warmen Lösung aus 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Die fixierten Organe Herz, Lunge, Leber, Niere, Skelettmuskel (aus dem Oberschenkel) und HT-29- oder FaDu-Xenograft-Tumore wurden präpariert und über Nacht in 4% Paraformaldehyd-Lösung nachfixiert. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (zweimal je 2 Stunden 70%, 85%, 96% und 99% Ethanol) sowie in Isopropanol entwässert und dreimal in Methylbenzoat bis zum Absinken der Gewebe inkubiert. Die Gewebe wurden für 1 Stunde in einem 1:1-Gemisch aus Methylbenzoat und Paraffin bei 42-44°C und anschließend in reines Paraffin mit steigenden Schmelzpunkten (je zweimal 2 Stunden 42-44°C und 58-60°C) überführt. Die Gewebeblöcke wurden in flüssigem Paraffin (58-60°C) eingebettet und gut gekühlt. Für die Immunfärbung wurden 5 µm dicke Schnitte der einzelnen Organe mit einem Schlittenmikrotom angefertigt, zum Glätten in 58°C warmes destilliertes Wasser überführt und auf einen Objektträger *SuperFrost Plus* aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht.

2.5.2 Immunfärbung der Paraffinschnitte

Die immunhistochemische Färbung der Cdk4 bzw. Cdk6 erfolgte über die indirekte Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode an Paraffinschnitten. Die Gewebeschnitte wurden in Roti[®]-Histol entparaffiniert und nacheinander in 99% Ethanol, 96% Ethanol und destilliertem Wasser rehydriert. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte 5 min bei 37°C mit einer 0,1% Trypsinlösung inkubiert, anschließend 10 min mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität 10 min mit 3% H₂O₂ in Methanol behandelt. Nach dreimaligem Waschen in PBS/ Tween und dem Blocken in PBS mit 5% BSA für 1 h bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren, wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper (vgl. 2.1.4, anti-Cdk4 (C-22) bzw. anti-Cdk6 (C-21), 1:100 in PBS mit 5% BSA) in einer feuchten Kammer inkubiert. Parallel dazu wurden Kontrollschnitte jedes Organs ohne primären Antikörper inkubiert (Negativkontrollen).

Nach dem Waschen in PBS/Tween erfolgte die einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (vgl. 2.1.4, anti-Kaninchen IgG – Biotin, 1:1000 in PBS mit 5% BSA), an den nach dreimaligem Waschen der ExtrAvidin®-Peroxidase Komplex (vgl. 2.1.4, 1:1000 in PBS mit 5% BSA, 1 h) gebunden wurde. Nach einer erneuten Waschsequenz in PBS/Tween und anschließend in 50 mmol/l Tris (pH 8,0) erfolgte die Farbreaktion mit der DAB-Färbelösung, die nach 2-3 min mit destilliertem Wasser gestoppt wurde. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe sowie Roti®-Histol entwässert und die Objektträger in Roti®-Histokitt eingedeckt.

2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinschnitte

Als Vergleichsfärbung und zur Lokalisierung der Zellkerne wurde mit benachbarten Schnitten der zur Immunfärbung verwendeten Paraffinschnitte eine Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung durchgeführt. Das im Blauholz als natürlicher Farbstoff vorkommende Hämatoxylin färbt als Hämalaun alle sauren oder basophilen Strukturen der Zelle (beispielsweise die Zellkerne) blau. Zur Kontrastverbesserung werden mit dem synthetischen Farbstoff Eosin alle basischen und azidophilen Zellstrukturen (beispielsweise das Zytoplasma) orange-rot gefärbt. Die Paraffinschnitte wurden wie in 2.5.2 beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch Inkubation in einer Hämatoxylin-Lösung für 3 Minuten. Anschließend wurde in Leitungswasser gewaschen und das Zytoplasma 3 Minuten in Eosin B gefärbt. Die Schnitte wurden nach erneutem Waschen in Leitungswasser in der aufsteigenden Ethanolreihe sowie Roti®-Histol entwässert und mit Roti®-Histokitt eingedeckt.

2.6 Radiopharmakologische Methoden

2.6.1 Radiomarkierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine

Die radiochemischen Arbeiten und entsprechenden organischen Synthesen wurden von Frau Lena Köhler in der Abteilung PET-Tracer am Institut für Radiopharmazie, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, erarbeitet und sind in ihrer Dissertation beschrieben [112] bzw. veröffentlicht [114, 115].

Die Radiomarkierungen zur Darstellung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate [¹²⁴I]CKIA ([¹²⁴I]**1**) aus der Markierungsvorstufe **6**, [¹²⁴I]CKIB ([¹²⁴I]**2**) aus der Markierungsvorstufe **7** und [¹⁸F]CKIE ([¹⁸F]**5**) aus der Markierungsvorstufe **8** (Abbildung 2-1, Abbildung 2-2) werden im Folgenden kurz beschrieben:

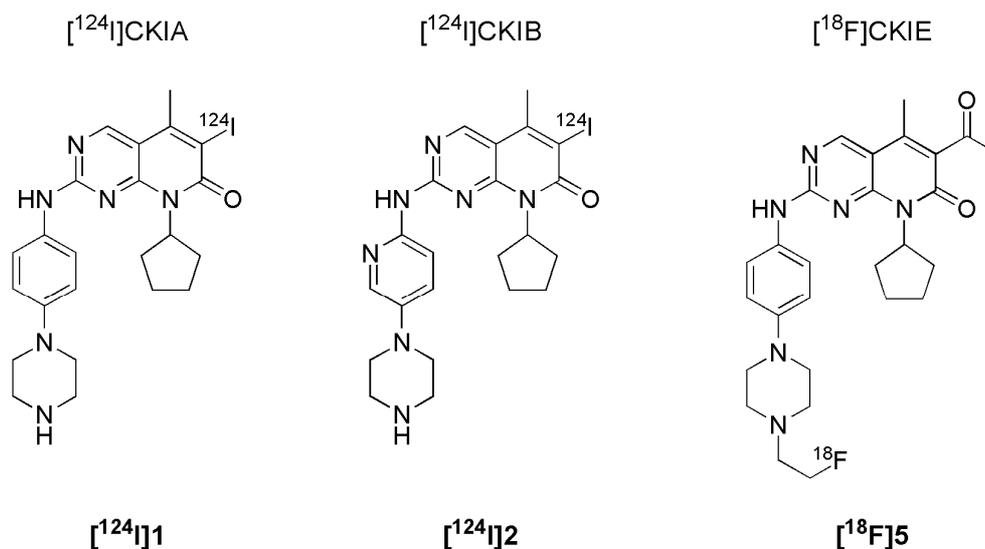


Abbildung 2-1: ^{124}I - und ^{18}F -markierte Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine

Die vielstufigen Synthesen der Markierungsvorstufen **6**, **7** und **8** (Abbildung 2-2) orientierten sich an der von VanderWel *et al.* [100] vorgestellten Syntheseroute zu CKIA (**1**, vgl. Tabelle 2-1).

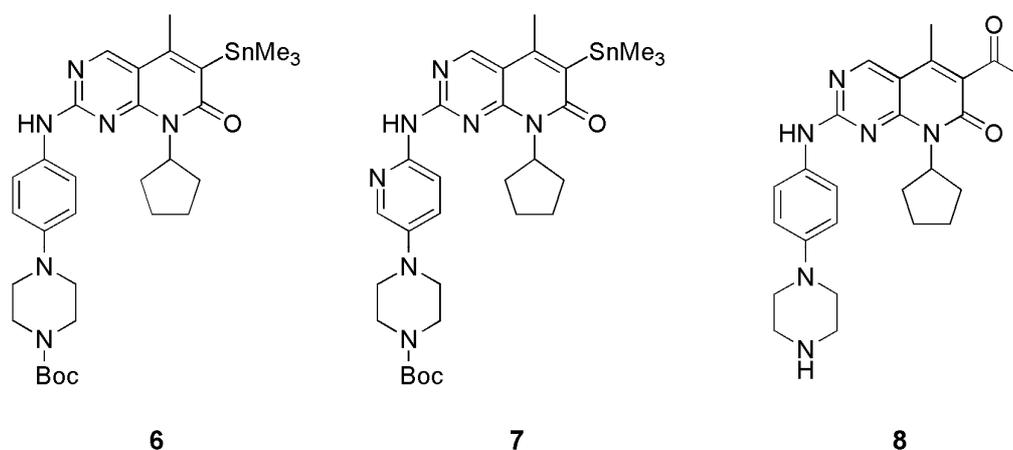


Abbildung 2-2: Markierungsvorstufen zur Radiomarkierung

Darstellung der Verbindungen $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$

Die Radioiodierung zur Darstellung der Verbindungen $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{1}$) und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{2}$) erfolgte durch elektrophile Substitution mittels regioselektiver Destannylierung und anschließender Schutzgruppen-Abspaltung. Abbildung 2-3 zeigt den generellen Ablauf der Radioiodierung am Beispiel der Darstellung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{1}$).

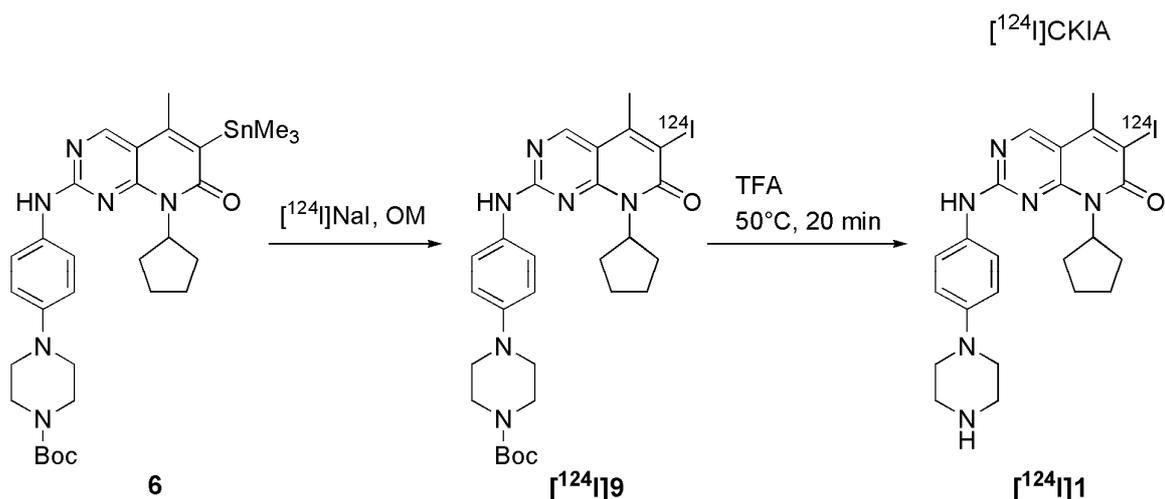


Abbildung 2-3: Zweistufige Synthese von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{1}$) aus der Markierungsvorstufe **6 (OM: Oxidationsmittel, Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl)**

Für die Radiomarkierungen im präparativen Maßstab stellte sich Iodogen als geeignetes Oxidationsmittel zur *in situ*-Erzeugung der reaktiven I^+ -Spezies heraus. Tabelle 2-8 fasst die optimalen Bedingungen der Radiosynthese zusammen.

Tabelle 2-8: Optimale Markierungsbedingungen zur Darstellung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{1}$)

$[^{124}\text{I}]\mathbf{9}$	100-200 μg Markierungsvorstufe 6 , 50 μl DMSO, 100 μl Methanol (5% Eisessig), 10 μl $[^{124}\text{I}]\text{NaI}$ in NaOH (0,1 mol/l), 21 $^{\circ}\text{C}$, 10 min
$[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{1}$)	200 μl Trifluoressigsäure (TFA), 50 $^{\circ}\text{C}$, 20 min

Bei einer Versuchsdurchführung laut Tabelle 2-8 wurden in einer Beispielsynthese aus 36,08 MBq $[^{124}\text{I}]\text{NaI}$ innerhalb von 104 Minuten 11,8 MBq $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{1}$) und nach der Übertragung der optimalen Bedingungen 32,6 MBq $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ ($[^{124}\text{I}]\mathbf{2}$) ausgehend von 186,1 MBq $[^{124}\text{I}]\text{NaI}$ innerhalb von 107 Minuten dargestellt.

Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$

Die Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ ($[^{18}\text{F}]\mathbf{5}$) erfolgte ausgehend von 1-Brom-2-ethyltosylat **10** und der Markierungsvorstufe **8**. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2-4 dargestellt; die Markierungsbedingungen der $[^{18}\text{F}]\text{Fluorierung}$ sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst.

Verbindung in die Schwanzvene injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten arterielle Blutproben entnommen.

Zur Analyse wurde das HPLC-System *Hewlett Packard Series 1100* mit der Säule *Zorbax VII 300SB-C18* (250 x 9,4 mm, 5 µm) sowie einem UV- und Radioaktivitäts-Detektor verwendet. Nach Injektion von [¹²⁴I]CKIA wurde die Elution in einem Gradienten aus Sörensenpuffer (pH 7,4) und Methanol (in 5 Minuten von 40% auf 90% Methanol, 25 Minuten bei 90% Methanol) durchgeführt und nach [¹²⁴I]CKIB- bzw. [¹⁸F]CKIE-Injektion in einem Gradienten aus Wasser und ACN mit je 0,1% TFA (in 20 Minuten von 20% auf 80% ACN). Die Trennung erfolgte bei Zimmertemperatur mit einer Flussrate von 3 ml pro Minute.

2.6.3 Zelluläre Radiotracer-Aufnahme

Vor den Untersuchungen zur Aufnahme der Radiotracer [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurden die Zellen (5×10^4 HT-29, FaDu bzw. 2×10^5 THP-1, THP-1-Makrophagen) für 24 Stunden mit 0,5 ml Kulturmedium in 24-well Zellkulturplatten kultiviert.

Der Radiotracer wurde im Zellkulturmedium RPMI 1649 mit 10% FKS und 1% Antibiotika verdünnt und für die entsprechenden Zeitintervalle (0 bis 120 Minuten) bei 37°C bzw. 4°C mit den Zellen inkubiert. Die zugegebene Aktivität pro Kavität betrug dabei ca. 25 kBq ([¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB) bzw. 250 kBq ([¹⁸F]CKIE) und wurde zuvor am Aktivimeter *ISOMED 100* nuklidspezifisch (¹²⁴I/¹⁸F) bestimmt.

Für die Blockierungsversuche wurden die Zellen vor der Zugabe des Radiotracers 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen an nichtradioaktivem CKIA, CKIB oder CKIE (0,5 µmol/l bis 100 µmol/l) inkubiert. Für die Inhibierungsversuche erfolgte 30 Minuten vor der Zugabe des Radiotracers die Inkubation der Zellen mit Natriumazid (15 mmol/l), Valinomycin (10 µmol/l), Verapamil (10 µmol/l), Sulfinpyrazon (250 µmol/l) bzw. Dipyridamol (10 µmol/l). Anschließend wurde der entsprechende Radiotracer für 60 Minuten bei 37°C zugegeben.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen sofort auf Eis gelagert, das Medium vollständig abgenommen und dreimal mit eiskalter PBS-Waschlösung gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden 500 µl NaOH/SDS-Lösung zugegeben und 30 Minuten geschüttelt. Für die sich anschließende Aktivitätsmessung wurden 250 µl der Zellsuspension in ein Messröhrchen gegeben und im Gamma-Radioaktivitäts-Zähler *COBRA II* gemessen. Bei der Auswertung wurde die gemessene Aktivität auf 500 µl Gesamtzellsuspension berechnet. Zur Bestimmung der zu jeder Kavität gegebenen

Gesamtaktivität wurden je 25 µl des Radiotracers mit 225 µl NaOH/SDS gemessen (Dreifachbestimmung).

Neben der Aktivität wurde für jede Kavität der Zellkulturplatte der Proteingehalt bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Protein-Assay nach Herstellerangaben und Messung der Absorption bei 562 nm am Photometer *Synergy HT*. Dazu wurden je 25 µl der NaOH/SDS-Zellsuspensionslösung als Doppelbestimmungen in eine Mikrotiterplatte 96-well pipettiert. Für die Erstellung der Kalibrierkurve wurde der BSA-Proteinstandard verwendet. Die Proteinkonzentration wurde anschließend auf 500 µl Gesamtzellsuspension berechnet und für jede Kavität in mg angegeben.

Die zelluläre Aufnahme des jeweiligen Radiotracers ist in Prozent zur gegebenen Gesamtaktivität pro mg Protein angegeben (%ID/ mg Protein).

2.6.4 Bioverteilung²

Die Verteilung der Verbindungen [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurde in männlichen Wistar-Ratten 5 Minuten bzw. 60 Minuten nach der Injektion (p. i.) untersucht. Aliquote von 0,2-0,3 MBq der jeweiligen Verbindung wurden in je 500 µl E153 Infusionslösung mit 1% humanem Serumalbumin aufgenommen und intravenös in die Schwanzvene der mit Diethylether narkotisierten Tiere injiziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Tiere erneut anästhesiert und nach Entnahme der Blutproben durch Herzpunktion getötet. Die Organe und Gewebe wurden entnommen, gewogen und deren Aktivität im Gamma-Radioaktivitäts-Zähler gemessen. Die Daten jedes Organs wurden im Anschluss zur gesamten injizierten Aktivitätsmenge normalisiert und als standardisierte Aufnahmewerte (SUV, *standardized uptake values*) dargestellt:

$$\text{SUV} = \frac{\text{Aktivität des Organs} / \text{Organmasse}}{\text{injizierte Aktivität} / \text{Gesamtmasse der Ratte}}$$

2.6.5 Positronen-Emissions-Tomographie²

Die Kinetik der Verteilung von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurde in einem etablierten Tiermodell (*nu/nu*-NMRI-Maus mit FaDu-Tumor-Xenotransplantat) mit Hilfe des Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographen *microPET P4* (örtliche Auflösung: 1,8 - 2,3 mm) verfolgt. Die Tumortransplantation erfolgte auf das rechte Hinterbein der Mäuse am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden wie von Haase *et al.* beschrieben [116]. Den Versuchstieren wurden unter Anästhesie mit 9%

² Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden entsprechend der genehmigungsrechtlichen Bestimmungen durch Herrn Dr. Ralf Bergmann durchgeführt.

Desfluoran (v/v) und 40% Sauerstoff/Luft (Gasfluss: 1 Liter pro Minute) 5 bis 10 MBq (300 μ L) der entsprechenden radioaktiv markierten Verbindung innerhalb von 15 Sekunden in die Schwanzvene injiziert und gleichzeitig die dynamische PET-Messung mit einer Aufnahmedauer von einer Stunde gestartet. Dabei wurden die Mäuse im 8 cm großen Sichtfenster des Tomographen so positioniert, dass die Thorax-Abdominal-Region untersucht werden konnte. Die Aufnahme erfolgte in Zeitintervallen (*frames*): 15 x 10 s, 5 x 30 s, 5 x 60 s, 4 x 300 s, 3 x 600 s. Die Rekonstruktion der Daten wurde entsprechend der etablierten Algorithmen nach Wuest *et al.* vorgenommen [117].

Zur Ermittlung der zeitabhängigen Verteilung der radioaktiven Verbindungen in ausgewählten Organen wurden mit der Software ROVER (ABX GmbH, Radeberg) dreidimensionale ROIs (*region of interests*) festgelegt und Zeit-Aktivitäts-Kurven generiert. Die Zeit-Aktivitäts-Kurven geben die Konzentration radioaktiver Substanzen in dem entsprechenden ROI normalisiert zu der injizierten Gesamtaktivität und der Masse der Maus (standardisierte Aufnahmewerte (SUV_{PET})) über der Zeit wieder. In dieser Arbeit wurden die standardisierten Aufnahmewerte prozentual zum Maximalwert in dem jeweiligen Organ angegeben (SUV_{PET} % des Maximums). Des Weiteren wurden aus den Zeit-Aktivitäts-Kurven die biologischen Halbwertszeiten der Radiotracer im Blut berechnet. Dazu wurde eine Regression der Daten mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion der Software Prism 3.0 (GraphPad Software, USA) durchgeführt.

2.6.6 Autoradiographie

Nach den PET-Untersuchungen, eine Stunde nach Injektion der Verbindungen [124 I]CKIA, [124 I]CKIB bzw. [18 F]CKIE, wurden die Mäuse getötet und eine Ganztierautoradiographie durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse in 5% Carboxymethylzellulose (w/v) eingebettet und 80 μ m koronale Schnitte im Mikrotom *Jung Cryopolycut* bei -20°C angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend gefriergetrocknet und auf eine Phosphor-Radioluminographie-Detektionsplatte gelegt. Diese wurde im Radioluminographie-Scanner *BAS 5000* eingelesen und somit die Verteilung der Aktivität in den Körperschnitten sichtbar gemacht.

2.7 Statistische Methoden

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte mit dem Programm SPSS 16.0 für Windows (SPSS GmbH Software, München). Hierbei wurde zum Vergleich der einzelnen Datengruppen im Allgemeinen die Varianzanalyse ANOVA mit der PostHoc-Analyse nach

Bonferroni angewendet. Für bestimmte Datengruppen war die Durchführung anderer statistischer Tests (Wilcoxon-Rang-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test) notwendig, was explizit in den entsprechenden Abbildungsunterschriften angegeben ist. Bei der Unterscheidung aller Datengruppen wurde eine statistische Signifikanz angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei kleiner 5% ($p < 0,05$) lag.

3 ERGEBNISSE

Zur Überprüfung der aufgestellten Hypothese wurden verschiedene Tumorzelllinien (HT-29, FaDu, THP-1 und THP-1-Makrophagen) kultiviert und Untersuchungen an Mausorganen bzw. bei Tieren (Wistar-Ratten Unilever, *nu/nu*-NMRI-Mäuse mit FaDu-Tumor-Xenotransplantat) durchgeführt (vgl. 2.1.7).

3.1 Untersuchungen zum Vorkommen der Cdk4/6 in Zellen und Geweben

3.1.1 Vorkommen der Cdk4/6 in Zellen

Zur Charakterisierung der verwendeten Zellmodelle wurde die mRNA-Expression und Proteinbiosynthese der Cdk4/6 im Gesamtzelllysat untersucht.

Die Quantifizierung der Cdk4/6-mRNA erfolgte mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR (vgl. 2.4.4) nach Auswertung der Fluoreszenzsignale und des Schwellenwertzyklus (C_t -Wert) jeder Probe relativ zur Expression des Haushaltsgens β -Aktin. Im Vorfeld der Quantifizierungsstudien wurde die Spezifität der verwendeten Primerpaare durch RT-PCR und anschließende Trennung sowie Färbung der PCR-Produkte überprüft (vgl. 2.4.3). Dabei wurde für jedes Primerpaar in allen Zelllinien eine spezifische Bande bei der Fragmentlänge des jeweils erwarteten Produkts detektiert (Abbildung 3-1, Tabelle 2.6).

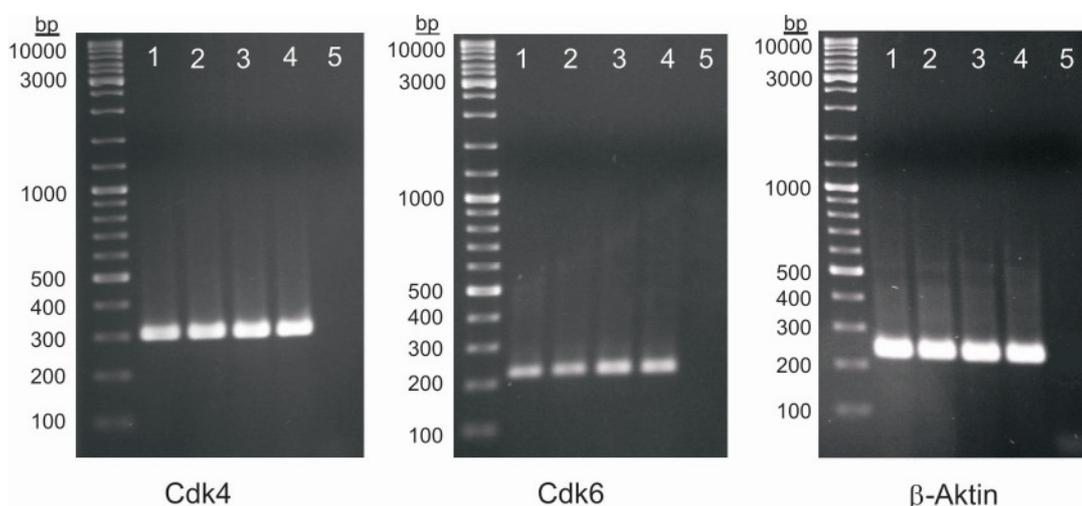


Abbildung 3-1: Produktspezifität der Primer für Cdk4, Cdk6 und β -Aktin

Die RT-PCR wurde mit mRNA-Proben aus den Zelllinien HT-29 (1), FaDu (2), THP-1 (3) und der THP-1-Makrophagen (4) durchgeführt. Als Negativkontrolle (5) wurde PCR-reines Wasser anstelle der mRNA verwendet.

In Abbildung 3-2 A sind exemplarisch für je eine Probe der untersuchten Zelllinien HT-29, FaDu, THP-1 und THP-1-Makrophagen die Fluoreszenzkurven über dem PCR-Zyklus sowie der Schwellenwert (rote Linie) dargestellt. Bei jedem Einzelversuch wurde die Identität des Produkts durch Messung der Schmelzkurven (Abbildung 3-2 A) und Bestimmung des Produkt-Schmelzpunkts verifiziert.

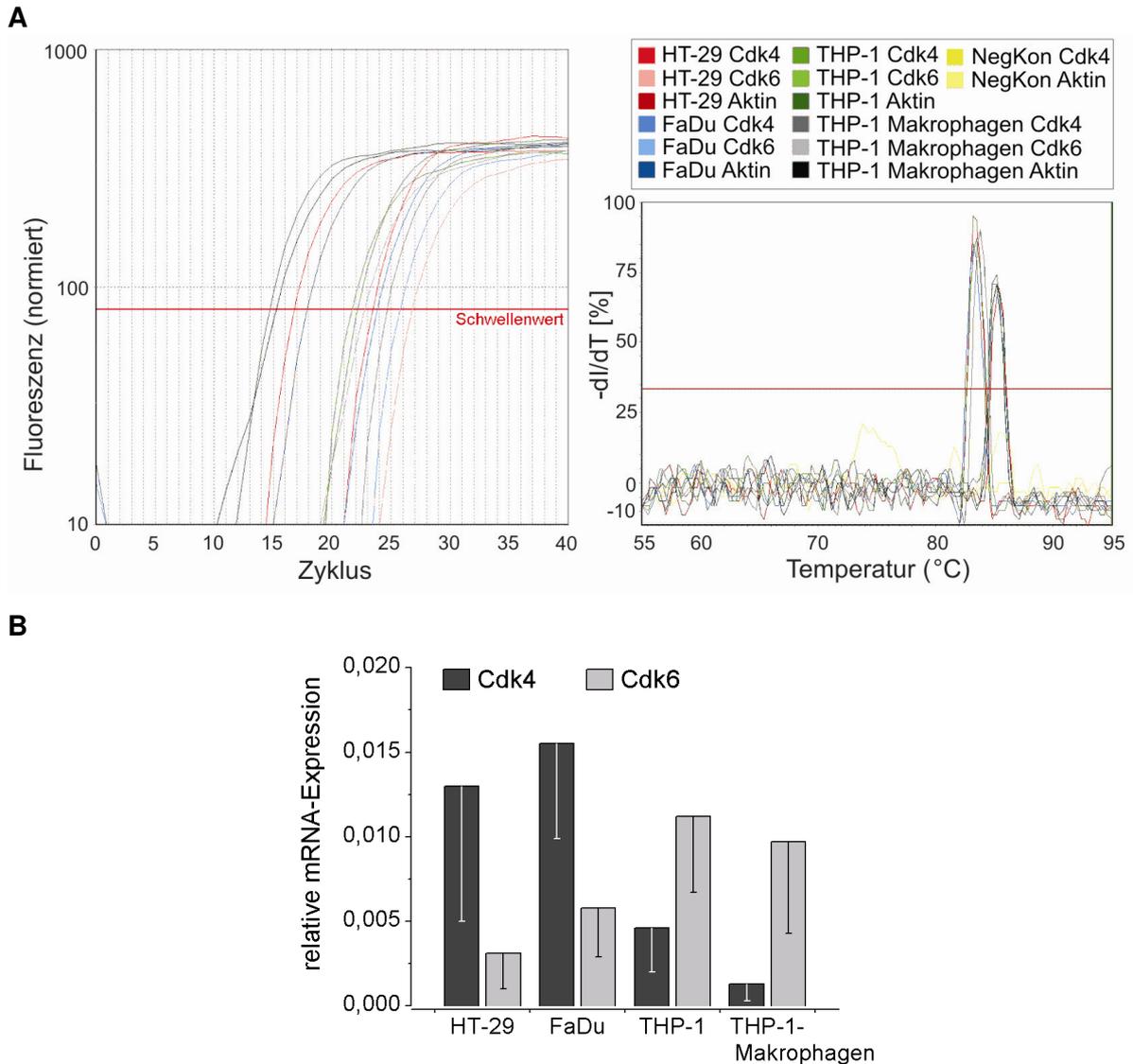


Abbildung 3-2: Quantitative Echtzeit-RT-PCR

A Rechts dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzsignale der amplifizierten mRNAs jeder Zelllinie in Abhängigkeit vom Zyklus. Die rote Linie markiert den Schwellenwert, der den C_t -Wert der einzelnen Proben bestimmt. Links sind die dazugehörigen Schmelzkurven der Genprodukte gezeigt.

B Abgebildet ist die mRNA-Expression der Cdk4 und Cdk6 relativ zu β -Aktin in den untersuchten Zelllinien. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 10$ bei je 4 unabhängigen Proben, Wilcoxon-Rang-Test, $p < 0,05$; relative mRNA-Expression = $2^{-\Delta C_t}$, $\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Haushaltsgen } \beta\text{-Aktin})$)

Die mRNA-Expression von Cdk4 und Cdk6 konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurden unterschiedliche Expressionslevel von Cdk4 und Cdk6 in den einzelnen Zelllinien ermittelt. Die Tumorzelllinien HT-29 und FaDu zeigten ein signifikant höheres Cdk4-mRNA-Expressionslevel als THP-1 bzw. THP-1-Makrophagen (Abbildung 3-2 B). Umgekehrt wurde eine signifikant höhere mRNA-Expression von Cdk6 in THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen im Vergleich zu den Zelllinien HT-29 und FaDu festgestellt.

Der Cdk4/6-Proteinnachweis erfolgte zunächst im Gesamtzelllysat mit spezifischen Antikörpern nach Trennung der Proteine und Transfer auf eine Membran (vgl. 2.3). Abbildung 3-3 zeigt repräsentative Bilder des Cdk4/6-Proteinnachweis in allen Zelllinien, mit spezifischen Banden für Cdk4 (34 kDa) im unteren Drittel zwischen 25 und 37 kDa und für Cdk6 (37 kDa) im oberen Drittel zwischen 25 und 37 kDa. Als interne Kontrolle des Auftrags gleicher Proteinmengen wurde β -Aktin (42 kDa) immunchemisch detektiert und zeigte in allen Zelllinien etwa gleiche Bandenstärken. Für HT-29- und FaDu-Zellen wurde eine deutlich stärkere Cdk4-Proteinbande beobachtet, als für die THP-1-Zelllinien. Der immunchemische Nachweis der Cdk6 zeigte im Gegensatz dazu für THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen stärkere Banden. Insbesondere die Cdk6-Proteinbande in HT-29-Zellen war im Vergleich zu den anderen Zelllinien deutlich schwächer.

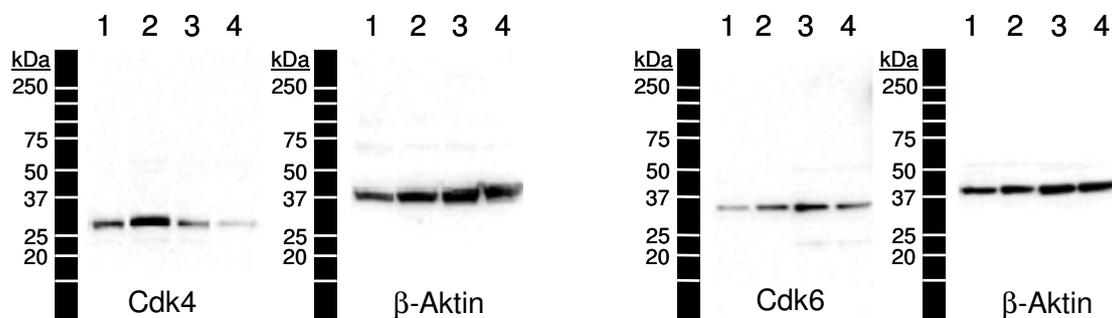


Abbildung 3-3: Proteinnachweis der Cdk4 und Cdk6 in Zellen

Der immunchemische Nachweis der Cdk4/6 im Gesamtzelllysat von HT-29 (1), FaDu (2), THP-1 (3) und THP-1-Makrophagen (4) erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen wurde im Anschluss daran β -Aktin nachgewiesen.

Zum Nachweis und der Lokalisierung der Cdk4/6 in den Zellen wurden die Proteine auch fluoreszenzmikroskopisch abgebildet (vgl. 2.2.8). Die Cdk4/6 wurden mit spezifischen Antikörpern durch rote Fluoreszenz sichtbar gemacht. Für jede Zelllinie wurde stets eine Negativkontrolle (Inkubation ohne primären Antikörper) mitgeführt. Zur subzellulären Lokalisierung wurde der Zellkern der Zellen mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt.

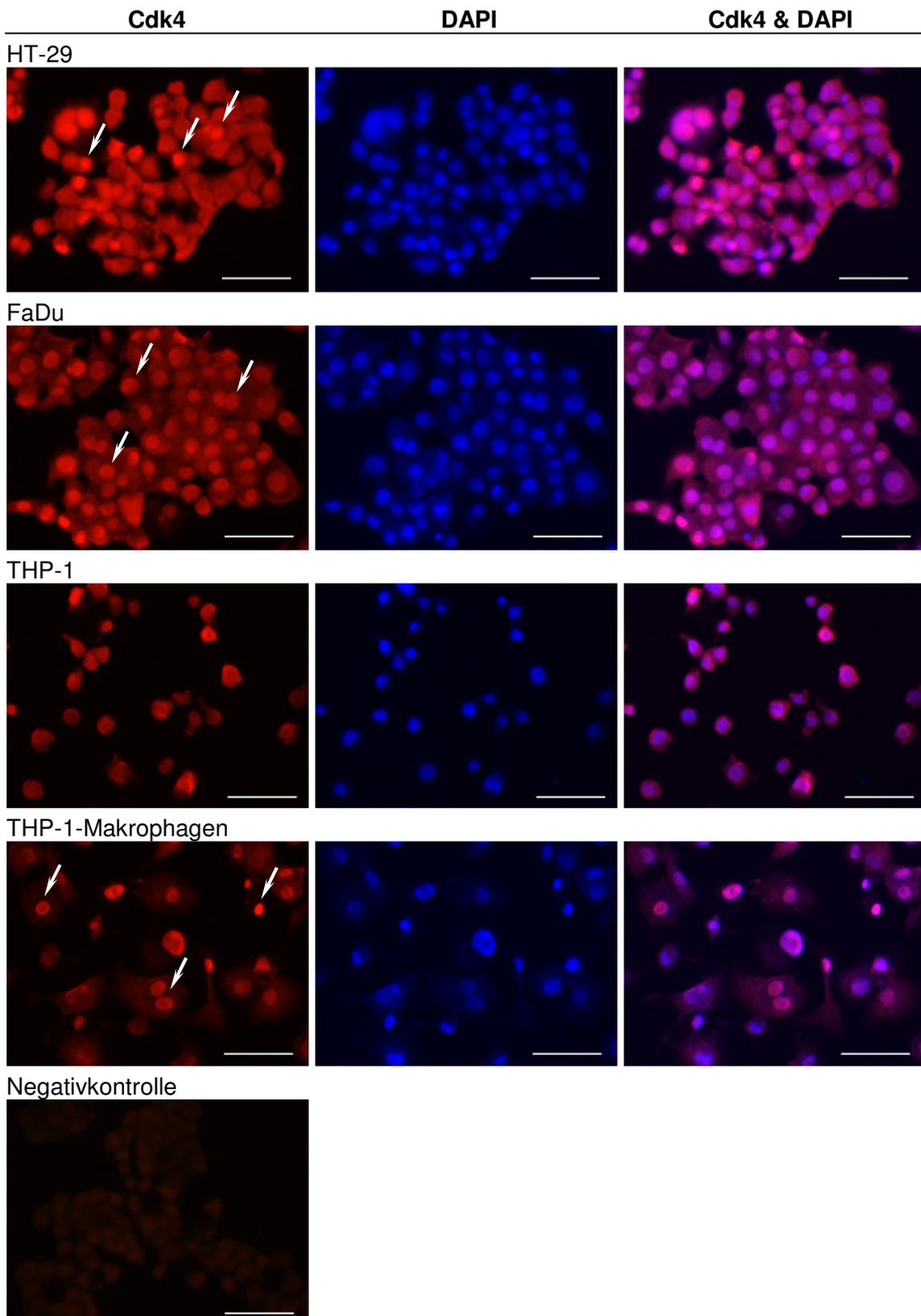


Abbildung 3-4: Nachweis und Lokalisierung der Cdk4 in Zellen

Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigen links die mit spezifischen Antikörpern lokalisierte Cdk4 (rot), in der Mitte die mit DAPI gefärbten Zellkerne (blau) und rechts die übereinander gelegten Bilder. Als repräsentative Negativkontrolle ist die Aufnahme von HT-29-Zellen gezeigt, die ohne den primären Antikörper inkubiert wurden. Pfeile verweisen auf eine starke Färbung im Zellkern. (Balken: 50 µm)

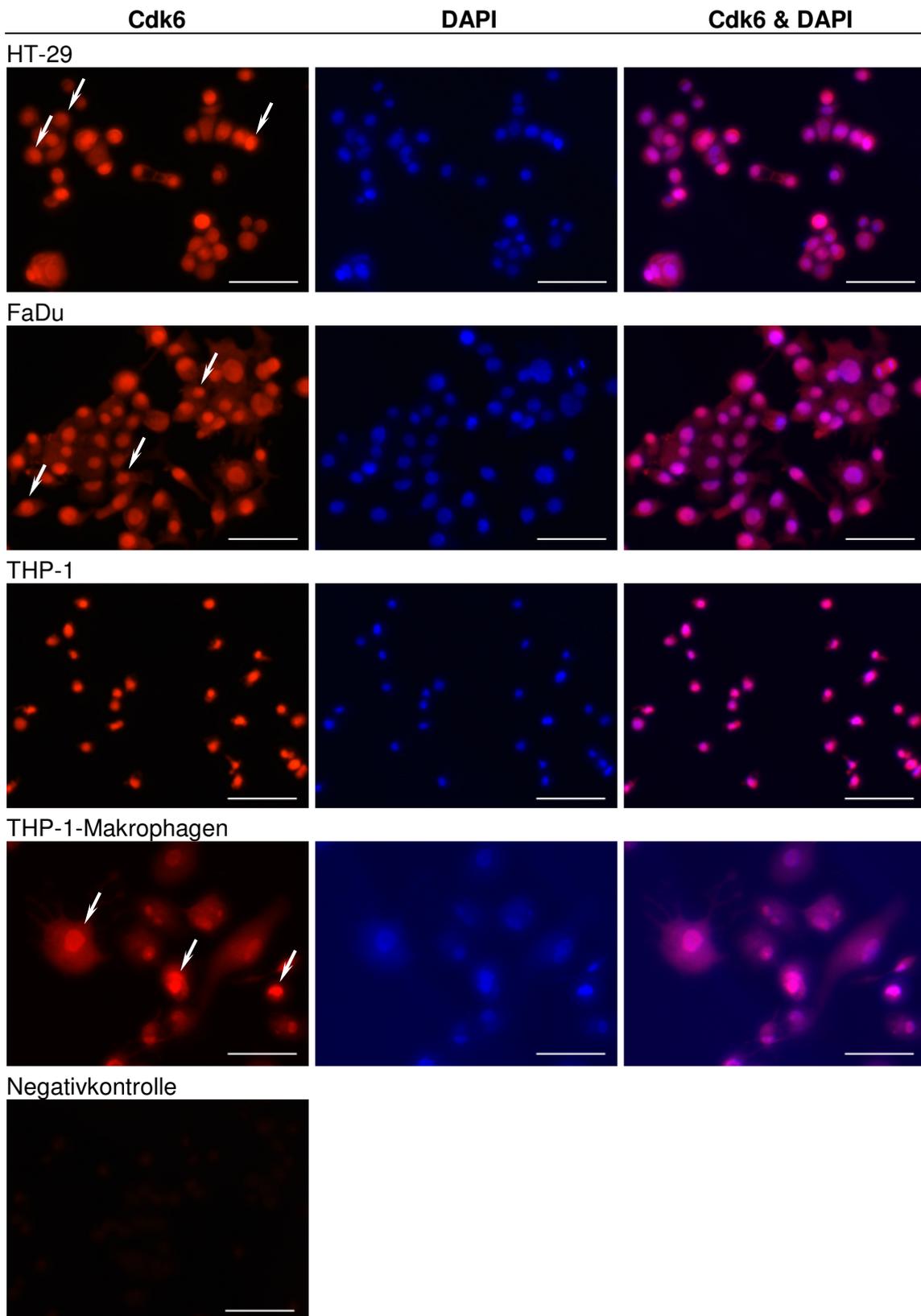


Abbildung 3-5: Nachweis und Lokalisierung der Cdk6 in Zellen

Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigen links die mit spezifischen Antikörpern lokalisierte Cdk6 (rot), in der Mitte die mit DAPI gefärbten Zellkerne (blau) und rechts die übereinander gelegten Bilder. Als repräsentative Negativkontrolle ist die Aufnahme von HT-29-Zellen gezeigt, die ohne den primären Antikörper inkubiert wurden. Pfeile verweisen auf eine starke Färbung im Zellkern. (Balken: 50 μ m)

Die roten Fluoreszenzsignale in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 widerspiegeln die bereits beim biochemischen Nachweis (Abbildung 3-3) gefundenen relativen Verhältnisse der Cdk4/6-Proteinmengen in den einzelnen Zelllinien. In den Tumorzelllinien HT-29 und FaDu wurden stärkere rote Fluoreszenzsignale und damit eine größere Menge an Cdk4-Protein im Vergleich zu den THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen detektiert (Abbildung 3-4). Die Proteinbiosynthese der Cdk6 wurde ebenso in allen untersuchten Tumorzelllinien fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (Abbildung 3-5). Bei einem Vergleich mit den blau gefärbten Zellkernen wurde festgestellt, dass die rote Fluoreszenz vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist (Pfeile). Neben dem deutlichen und hauptsächlichen Nachweis der Cdk4 und Cdk6 im Zellkern konnten auch Fluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden. In allen untersuchten Zelllinien wurde demnach das Vorkommen der Cdk4 im Zytoplasma gezeigt. Die zytoplasmatische Lokalisierung wurde ebenfalls für Cdk6 in FaDu-Zellen und THP-1-Makrophagen festgestellt.

3.1.2 Vorkommen der Cdk4/6 in Tumoren

Das Vorkommen und die Verteilung der Cdk4/6 in HT-29-Tumoren und den für die PET Untersuchungen verwendeten FaDu-Tumoren (Xenograft-Tumore auf *nu/nu*-NMRI-Mäusen) wurden immunhistochemisch an 5 µm dicken Paraffinschnitten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und der DAB-Farbreaktion detektiert (vgl. 2.5.2). Zum Vergleich der Zellkern-Lokalisierung wurde in Parallelschnitten eine HE-Färbung durchgeführt (vgl. 2.5.3).

Generell wurde eine starke Färbung der Cdk4 und Cdk6 in den HT-29-Tumorschnitten beobachtet (Abbildung 3-6). Dabei konzentrierte sich die Färbung besonders im Randbereich des HT-29-Tumors. Vereinzelt wurden besonders stark gefärbte Zellkerne identifiziert (Pfeile). Der zentrale Bereich war deutlich schwächer gefärbt, wobei auch die HE-Färbung deutlich weniger gefärbte Zellen im Zentrum der Tumorschnitte zeigte. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurde neben der starken Zellkernfärbung auch eine schwache Färbung des Zytoplasmas beobachtet.

Die FaDu-Tumorschnitte zeigten ebenfalls eine deutliche Färbung der Cdk4 und Cdk6 im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3-7). Allerdings waren die Zellkerne und das Zytoplasma der Zellen ähnlich gefärbt, wodurch kein Unterschied der subzellulären Lokalisierung der Cdk4/6 festgestellt werden konnte. An wenigen Stellen der FaDu-Tumorschnitte wurde eine stärkere Zellkernfärbung beobachtet (Pfeile). Im Vergleich zu den HT-29-Tumoren zeigten die FaDu-Tumorschnitte einen deutlich kompakteren Aufbau,

allerdings wurde auch hier im zentralen Bereich des Tumors eine Lockerung der Gewebsstruktur und eine etwas schwächere Färbung der Cdk4/6 beobachtet.

HT-29-Tumor

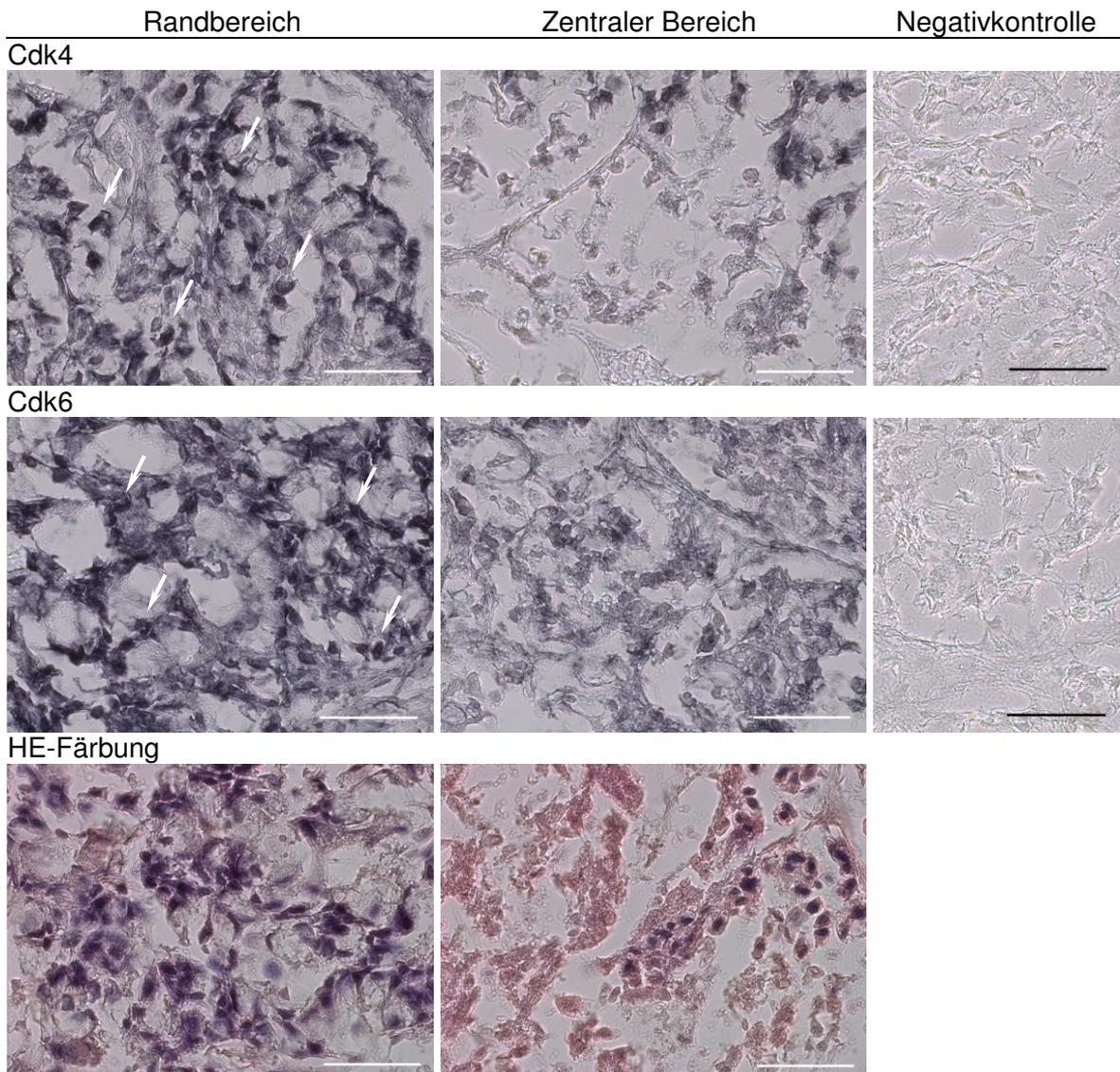
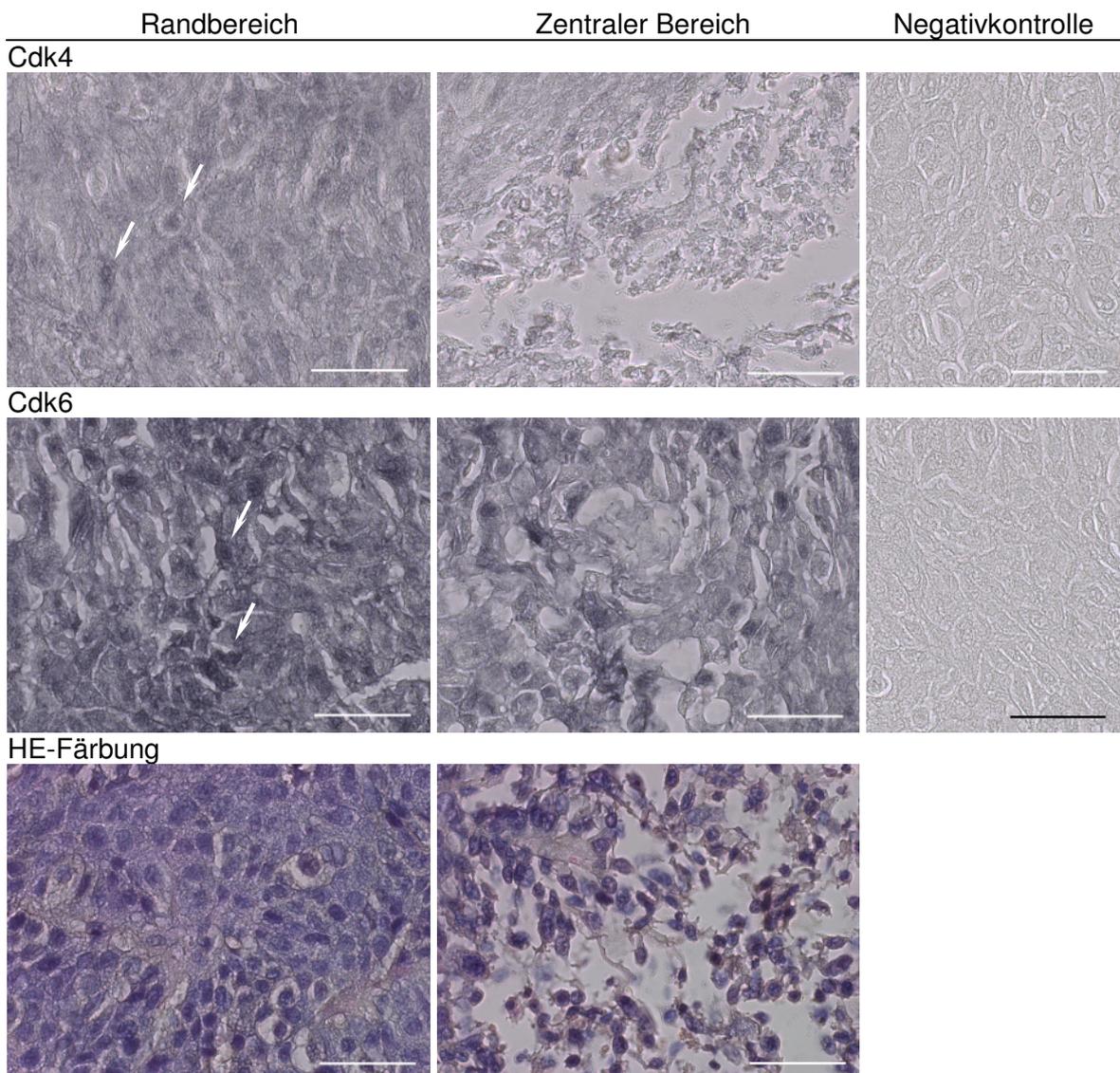


Abbildung 3-6: Immunhistochemischer Nachweis der Cdk4 und Cdk6 in HT-29-Tumoren

Zur Lokalisierung der Zellkerne wurde zusätzlich eine HE-Färbung durchgeführt. Links ist jeweils ein Bild des Randbereichs und in der Mitte aus dem zentralen Bereich des Tumors gezeigt. Rechts ist die Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) dargestellt. Die Pfeile verweisen auf eine starke Färbung im Zellkern. (Balken: 50 μ m)

FaDu-Tumor**Abbildung 3-7: Immunhistochemischer Nachweis der Cdk4 und Cdk6 in FaDu-Tumoren**

Zur Lokalisierung der Zellkerne wurde zusätzlich eine HE-Färbung durchgeführt. Links ist jeweils ein Bild des Randbereichs und in der Mitte aus dem zentralen Bereich des Tumors gezeigt. Rechts ist die Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) dargestellt. Die Pfeile verweisen auf eine starke Färbung im Zellkern. (Balken: 50 µm)

3.1.3 Vorkommen der Cdk4/6 in Organen der Maus

Zur späteren Interpretation der PET-Untersuchungen in Bezug auf die Cdk4/6-Bildgebung wurden im Vorfeld ebenso immunhistochemische Untersuchungen zur Cdk4/6-Verteilung in den ausgewählten Organen Herz, Lunge, Leber, Niere und im Skelettmuskel der Tumor-tragenden *nu/nu*-NMRI-Mäuse durchgeführt (vgl. 2.5.2). Zur Lokalisierung von Zellstrukturen wurden Parallelschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (vgl. 2.5.3).

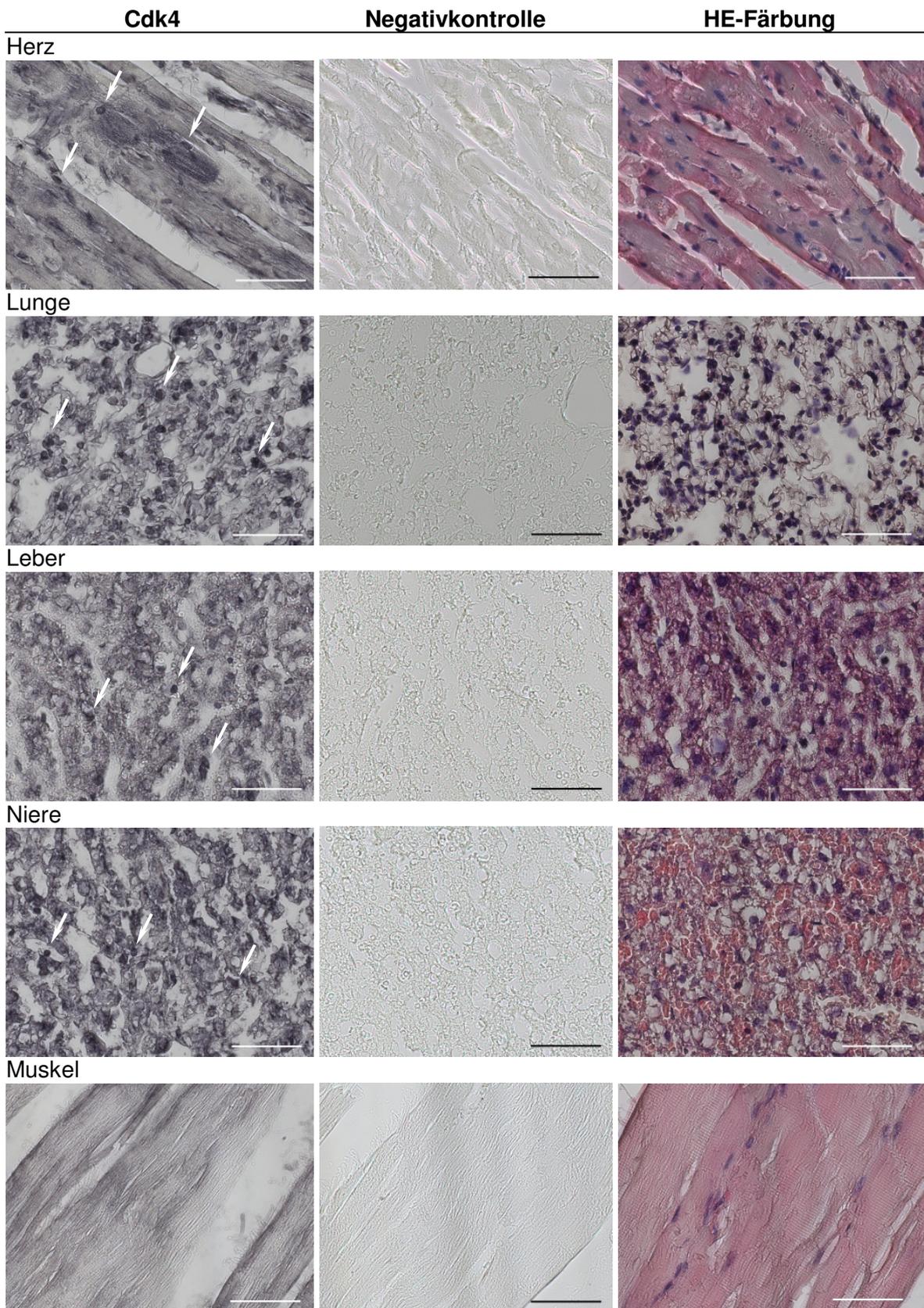


Abbildung 3-8: Immunhistochemischer Nachweis der Cdk4 in Organen der Maus (links). In der Mitte ist die Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) dargestellt. Zur Lokalisierung der Zellstrukturen wurde in Parallelschnitten die HE-Färbung durchgeführt (rechts). Die Pfeile verweisen auf eine starke Färbung im Zellkern. (Balken: 50 μ m)

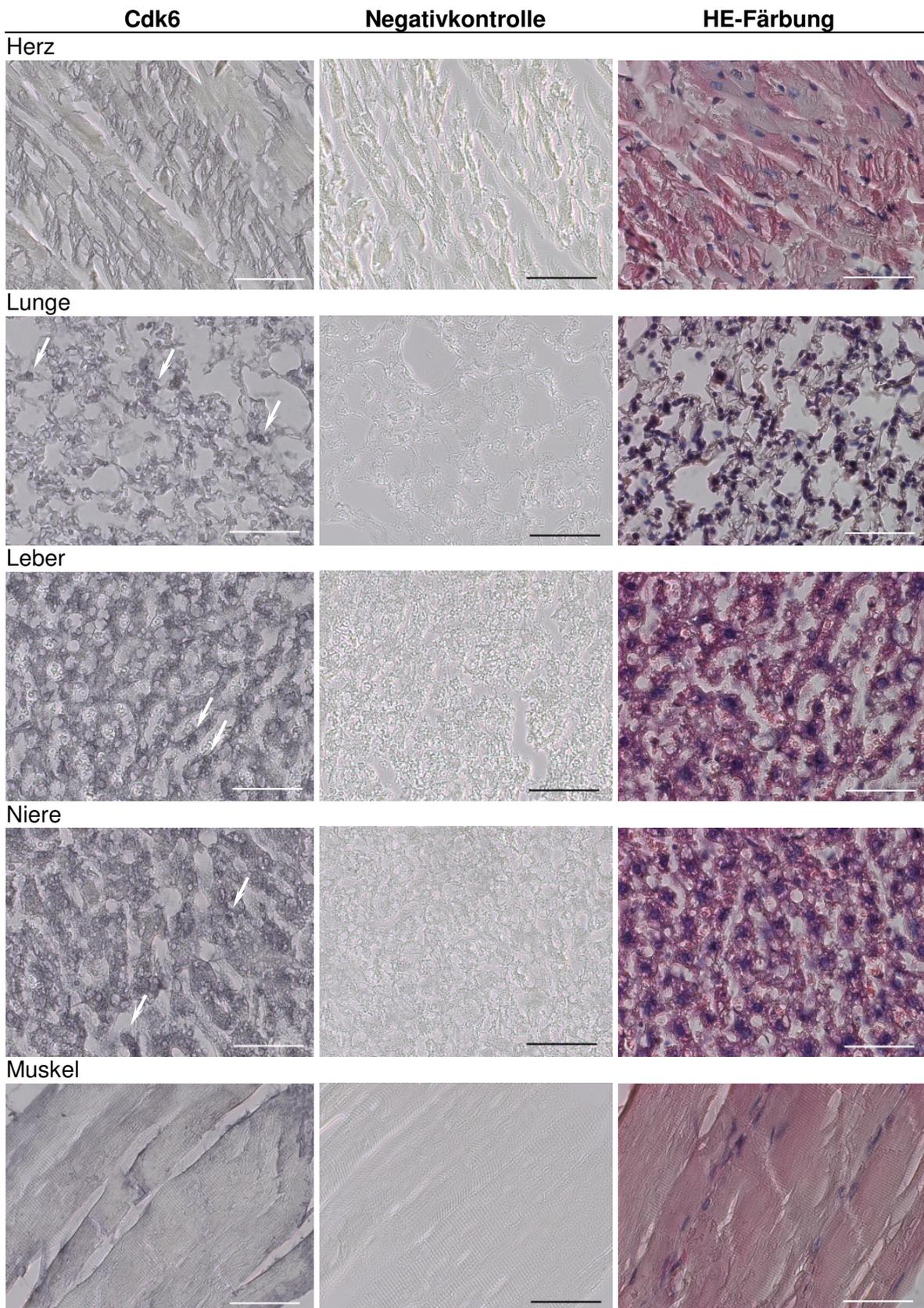


Abbildung 3-9: Immunhistochemischer Nachweis der Cdk6 in Organen der Maus (links). In der Mitte ist die Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) dargestellt. Zur Lokalisierung der Zellstrukturen wurde in Parallelschnitten die HE-Färbung durchgeführt (rechts). Die Pfeile verweisen auf eine starke Färbung im Zellkern. (Balken: 50 μ m)

In den Schnitten der Lunge, Leber und Niere wurde eine deutliche Färbung der Cdk4 in den Zellkernen beobachtet (Pfeile, Abbildung 3-8). Auch im Herz konnten Zellkerne nach Färbung der Cdk4 detektiert werden. Der Skelettmuskel zeigte keine Cdk4-Färbung der Zellkerne, allerdings wurde im Muskel ebenso wie bei den anderen Organen eine schwache Färbung der gesamten Gewebestruktur (Zytoplasma) im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet.

Im Vergleich zur Negativkontrolle wurde in allen untersuchten Geweben auch eine Färbung der Schnitte nach Inkubation mit dem Cdk6-spezifischen Antikörper beobachtet (Abbildung 3-9). Die Organschnitte der Lunge, Leber und Niere zeigten wiederum eine Färbung der Cdk6 in den Zellkernen (Pfeile). Im Herz und Skelettmuskel wurden keine Zellkerne nach Färbung der Cdk6 identifiziert.

3.2 Zelluläre und molekulare Effekte der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate

3.2.1 Vitalität und Zellproliferation

Die Charakterisierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine CKIA, CKIB, CKIC, CKID und CKIE erfolgte anhand der drei Tumorzelllinien HT-29, FaDu und THP-1, sowie anhand der THP-1-Makrophagen. Abbildung 3-10 zeigt die Zellzahl der Zelllinien in Abhängigkeit von der Zeit, wobei deutlich wird, dass die einzelnen Zelllinien ein sehr unterschiedliches Proliferationsverhalten aufwiesen. Für die kontinuierlich proliferierenden Zelllinien wurde aus den Mittelwerten der Zellzahl nach 48 h (N_0) und der Zellzahl nach 96 h (N) die Verdopplungszeit anhand folgender Formel berechnet: $t_v = (\log 2 \cdot 48 \text{ h}) / (\log N - \log N_0)$. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase wurde für HT-29-Zellen mit 20 Stunden, für FaDu-Zellen mit 25 Stunden und für THP-1-Zellen mit 33 Stunden bestimmt. Die THP-1-Makrophagen zeigten nach der Differenzierung keine Zellproliferation und dienten als nicht-proliferierendes Zellmodell zur Charakterisierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine.

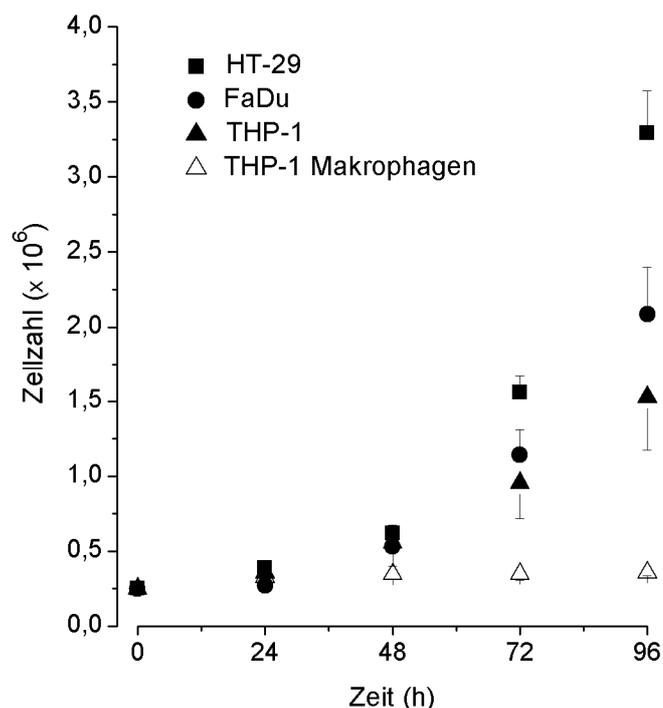


Abbildung 3-10: Untersuchung der Zellproliferation

Dargestellt sind die Zellzahlen der Tumorzelllinien HT-29, FaDu und THP-1 in Abhängigkeit von der Zeit. Ab dem Zeitpunkt 0 wurden die zuvor für 72 h mit TPA differenzierten THP-1-Makrophagen in Medium ohne TPA kultiviert und danach ebenfalls die Zellzahl der THP-1-Makrophagen bestimmt. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 12$)

Zur Untersuchung der Vitalität und Zellproliferation wurden die Zellen zunächst 24 Stunden in Zellkulturplatten kultiviert und anschließend die Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (vgl. 2.2.5, 2.2.6). Die Anzahl der Zellen wurde nach Inkubation mit dem entsprechenden Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin auf die Zellzahl der Kontrolle (0 $\mu\text{mol/l}$) bezogen und ist in den folgenden Abbildungen als relative Zellzahl in Form von Säulen dargestellt. Die nach MTT-Inkubation gemessenen Absorptionswerte wurden ebenfalls auf die Kontrollwerte (0 $\mu\text{mol/l}$) normiert und als relative Vitalität in Form von blau geränderten Punkten angegeben.

Die Zellproliferationsstudien zeigten signifikant verringerte Zellzahlen in allen Tumorzelllinien in Abhängigkeit vom entsprechenden Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivat und dessen Konzentration (Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12). Dabei wurde mit Ausnahme von 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIA bzw. CKIB mindestens die Ausgangszellzahl vor Zugabe des Inhibitors detektiert. Bei Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIA bzw. CKIB waren kaum noch lebende Zellen in den Zellkulturgefäßen zu finden, was auch an der dramatisch reduzierten relativen Zellzahl deutlich wird.

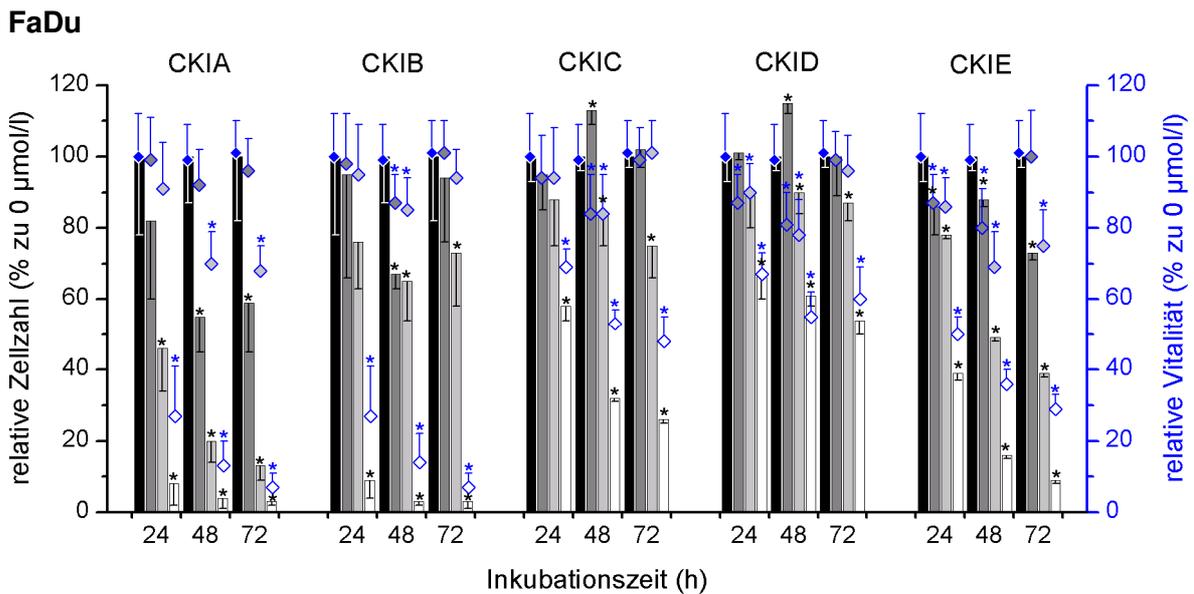
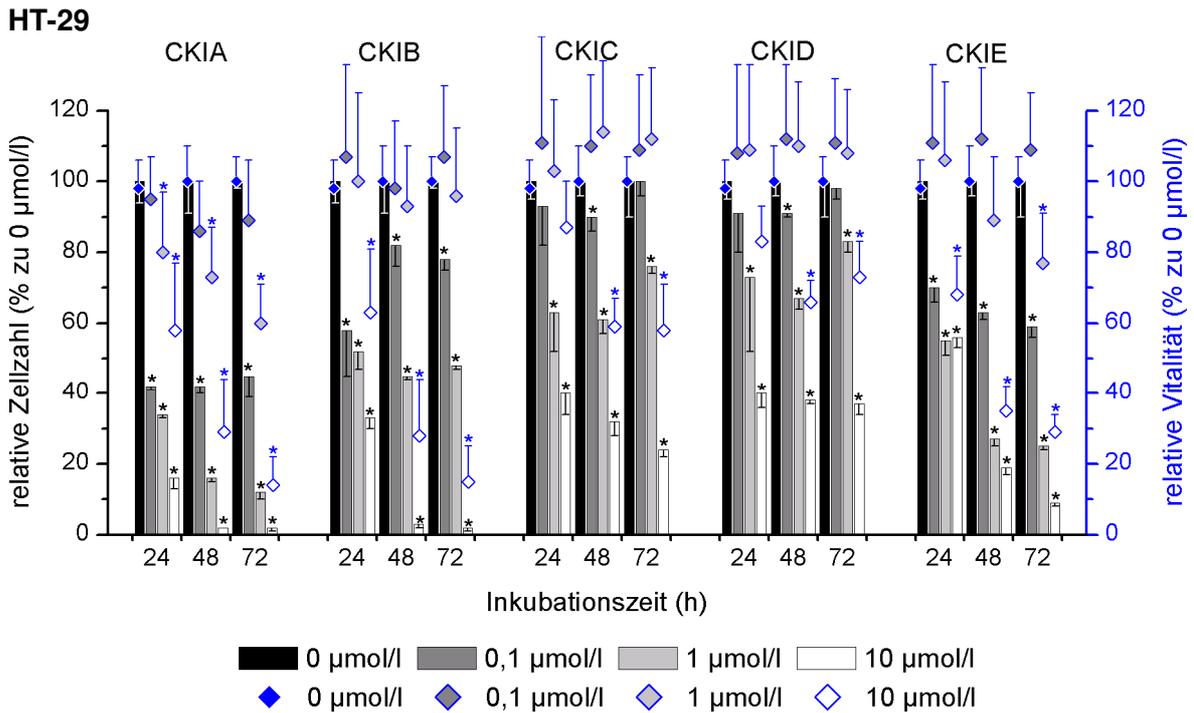


Abbildung 3-11: Relative Zellzahl und Vitalität der Zelllinien HT-29 und FaDu nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten

Die relative Zellzahl ist als Säule und die Vitalität als Punkt prozentual zu den unbehandelten Zellen (0 µmol/l) nach 24, 48 und 72 h dargestellt (Mittelwert ± Standardabweichung, $n = 6$ (Proliferationsrate) bzw. $n = 12$ (Vitalität), * $p < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle 0 µmol/l).

Für CKIA wurden in allen Zelllinien die größten Hemmeffekte der Zellproliferation beobachtet (Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12). Bereits 24 Stunden nach Inkubation mit 0,1 µmol/l und 1 µmol/l CKIA konnten signifikant verringerte relative Zellzahlen von 35-60% beobachtet werden. Nach 48 und 72 Stunden Inkubation mit 1 µmol/l blieben die relativen Zellzahlen niedrig bzw. verringerten sich weiter bis auf minimal 15%. CKIB zeigte

ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Tumorzellen, allerdings waren die Effekte im Vergleich zu CKIA geringer. Nach 48 und 72 Stunden wurden in HT-29-Zellen beispielsweise relative Zellzahlen von ca. 70% nach Inkubation mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und ca. 45% nach Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ CKIB erhalten. FaDu- und THP-1-Zellen zeigten ein geringeres Ansprechen auf CKIB hinsichtlich ihrer Zellproliferation. Für CKIC und CKID wurden im Vergleich zu den anderen untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten in allen Zelllinien die schwächsten Effekte festgestellt. Erst bei höheren Konzentrationen (1 und 10 $\mu\text{mol/l}$) wurden verringerte Zellzahlen unter 80% detektiert. Bei 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIC bzw. CKID betrug die relative Zellzahl je nach Zelllinie und Inkubationszeit 30-60%. Für CKIE wurden bereits nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ signifikante Reduzierungen der relativen Zellzahl um mindestens 20-30% in HT-29- und THP-1-Zellen beobachtet. Mit zunehmender Inkubationsdauer wurden für CKIE weiterhin geringere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Nach 72 Stunden wurden mit 1 $\mu\text{mol/l}$ CKIE in HT-29-, FaDu- und THP-1-Zellen relative Zellzahlen von unter 40% detektiert. Die Zellzahl bei Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIE lag nach 72 Stunden bei 10% für HT-29- und FaDu-Zellen. Im Vergleich zu den proliferierenden Zelllinien HT-29, FaDu und THP-1 zeigten sich bei Inkubation der THP-1-Makrophagen mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten keine deutlichen Konzentrations- und Inkubationszeit-abhängigen Effekte. Die relativen Zellzahlen waren zwar signifikant erniedrigt, lagen jedoch unabhängig von der Inkubationsdauer und der Konzentration (0,1 bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$) stetig bei 70-90%. Interessanterweise, wurden nach 24 und 48 Stunden Inkubation für CKIC und CKID die geringsten Zellzahlen beobachtet. Bei Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ der entsprechenden Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Verbindung wurden ähnlich geringe relative Zellzahlen wie bei den THP-1-Tumorzellen festgestellt.

Im Vergleich zur Zellzahl war die Vitalitätsverringering bei Konzentrationen bis 1 $\mu\text{mol/l}$ nicht so drastisch. Mit Ausnahme von 1 $\mu\text{mol/l}$ CKIA und CKIE sowie 10 $\mu\text{mol/l}$ aller Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate wurden in allen Zelllinien relative Vitalitäten von über 80% gemessen. Erst bei 10 $\mu\text{mol/l}$ zeigten sich signifikant verringerte relative Vitalitäten von unter 30% für CKIA, CKIB und CKIE bzw. unter 60% für CKIC und CKID.

Da bei Inkubation der Zellen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIA und CKIB nur noch sehr wenige lebende Zellen in den Zellkulturplatten beobachtet wurden und die Zellvitalität deutlich limitiert war, wurden bei weiteren Experimenten für CKIA und CKIB nur Konzentrationen bis 1 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

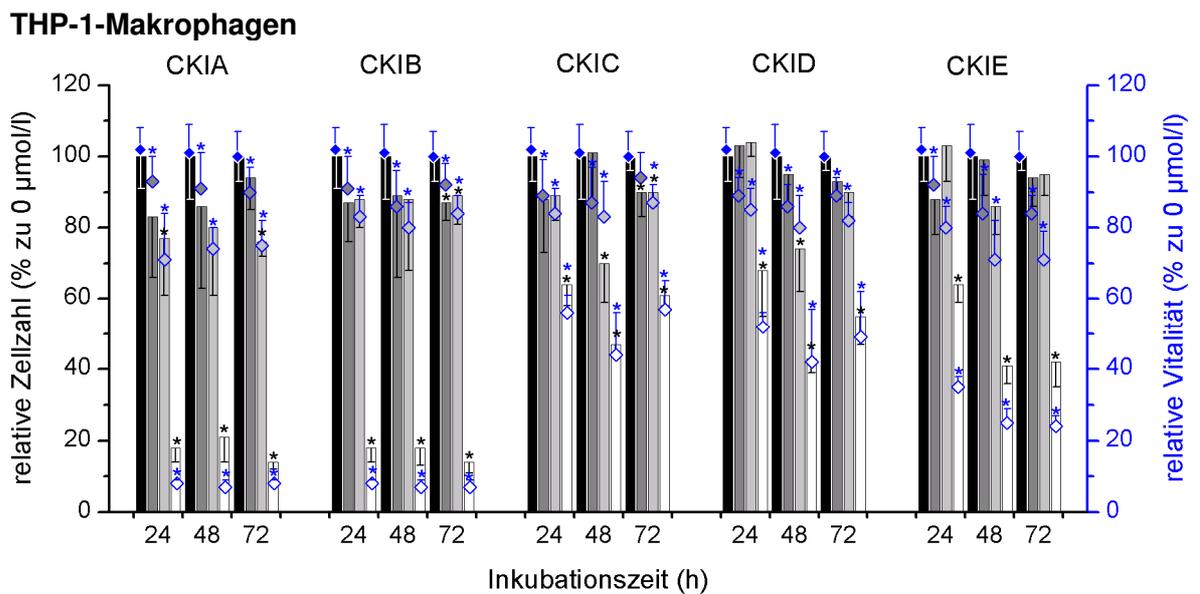
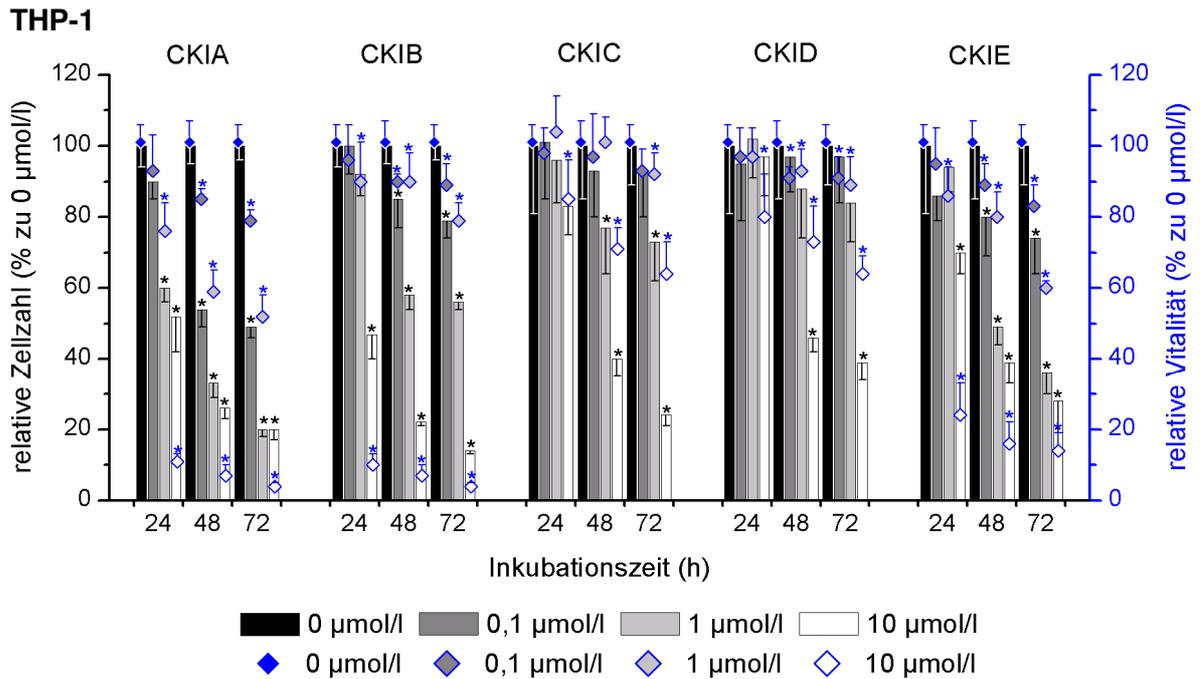


Abbildung 3-12: Relative Zellzahl und Vitalität der THP-1-Zellen und der THP-1-Makrophagen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivaten

Die relative Zellzahl ist als Säule und die Vitalität als Punkt prozentual zu den unbehandelten Zellen (0 µmol/l) nach 24, 48 und 72 h dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 6$ (Proliferationsrate) bzw. $n = 12$ (Vitalität), * $p < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle 0 µmol/l).

3.2.2 Zellzyklusphasenverteilung

Die exponentiell wachsenden Tumorzelllinien HT-29, FaDu und THP-1 sowie die nicht mehr proliferierenden THP-1-Makrophagen wurden nach Fixierung und Färbung mit dem DNA-interkalierenden Propidiumiodid durchflusszytometrisch analysiert (vgl. 2.2.7). Abbildung 3-13 zeigt repräsentative aus den Messdaten gewonnene Histogramme der unbehandelten Zelllinien, die mit Hilfe der Software *Modfit LT™* ausgewertet wurden.

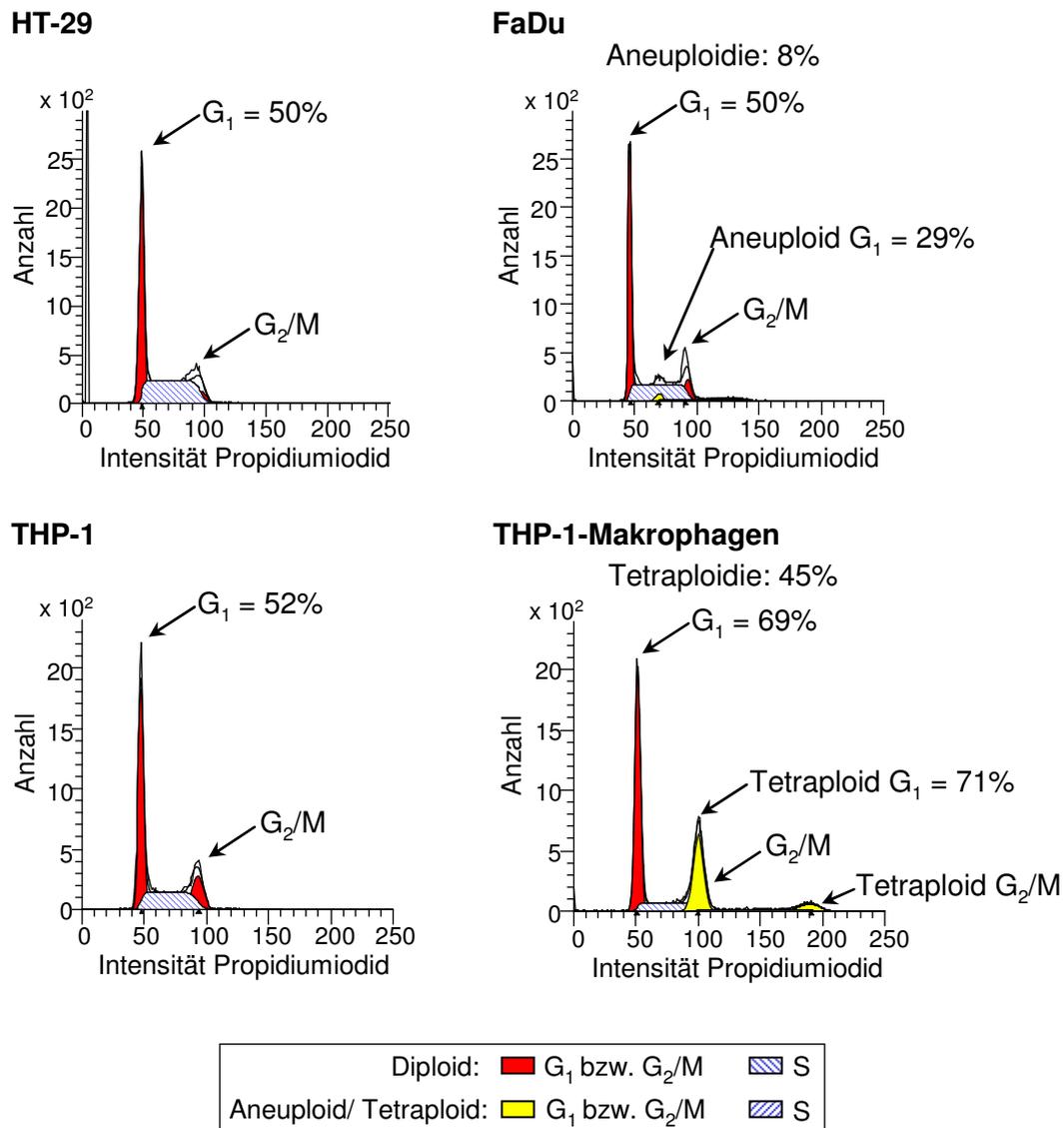


Abbildung 3-13: Repräsentative Histogramme durchflusszytometrischer Zellzyklusanalysen der unbehandelten Zelllinien HT-29, FaDu, THP-1 und der THP-1-Makrophagen

Die Histogramme wurden mit Hilfe der Software *Modfit LT™* ausgewertet und die prozentualen Anteile der Zellen in den entsprechenden Zellzyklusphasen durch Flächenintegration berechnet. Für jedes Histogramm ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G₁-Phase (diploider bzw. aneuploider/ tetraploider Zellen) aufgeführt. Bei auftretender Aneuploidie (FaDu) bzw. Tetraploidie (THP-1-Makrophagen) ist außerdem der prozentuale Anteil dieser Population von der Gesamtzellpopulation angegeben.

Für die Tumorzelllinien HT-29 und THP-1 lag der Anteil diploider Zellen in der G₁-Phase bei 50% bzw. 52%. Die Tumorzelllinie FaDu zeigte neben der diploiden Zellpopulation ebenfalls eine Population mit Aneuploidie. Der prozentuale Anteil aneuploider FaDu-Zellen lag bei 1–8%. Der Anteil diploider Zellen in der G₁-Phase konnte mit ca. 50%, der Anteil aneuploider Zellen mit ca. 29% bestimmt werden. Aufgrund des geringen und gleichbleibenden Anteils aneuploider FaDu-Zellen wurden bei späteren Auswertungen zur Vereinfachung der Darstellungen nur die diploiden Zellpopulationen bestimmt. Die Differenzierung der THP-1-Zellen mit dem Phorbol ester TPA zu THP-1-Makrophagen bewirkte eine Veränderung der Ploidie und Zellzyklusphasenverteilung. Für THP-1-Makrophagen wurde ein deutlicher Anteil tetraploider Zellen von 30-50% beobachtet. Der G₁-Phasenanteil der diploiden und tetraploiden Zellen wurde jeweils mit 65-70% bestimmt. Für die Einordnung und den Vergleich der durch die Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate erzielten Effekte wurden die konfluenten adhärennten Tumorzelllinien HT-29 und FaDu 72 Stunden unter Serummangel (0,25% FKS) kultiviert. Anschließend wurde die Zellzyklusphasenverteilung bestimmt (Abbildung 3-14). Durch den fast 100%igen Zell-Zell-Kontakt und Entzug des FKS konnten die Zellen in einen G₁-Phasenarrest gebracht werden. Der Anteil der HT-29-Zellen in der G₁-Phase lag bei 89%, der diploiden FaDu-Zellen bei 82% und der aneuploiden FaDu-Zellen bei 98%.

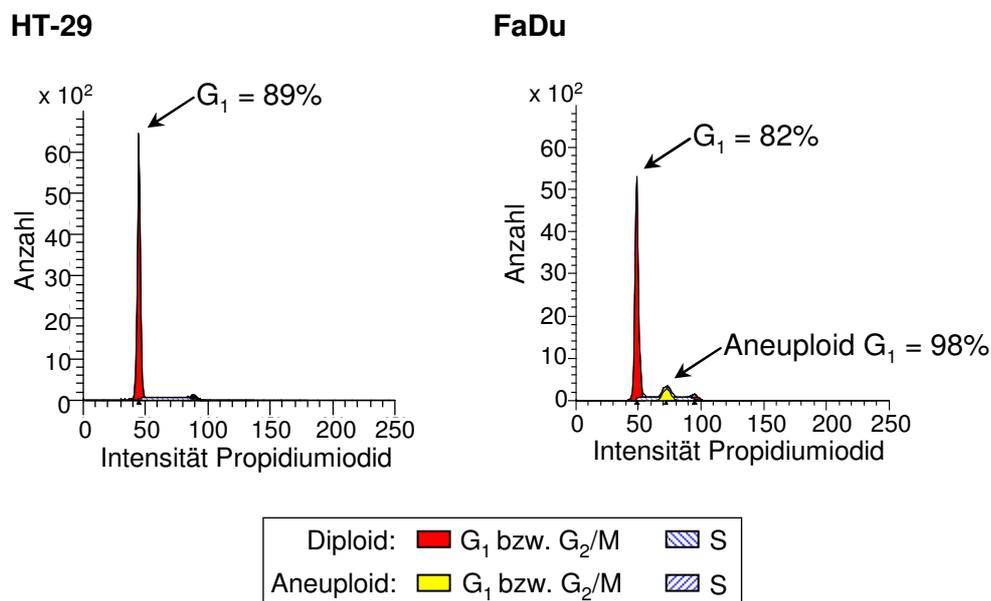


Abbildung 3-14: Repräsentative Histogramme zum G₁-Phasenarrest von HT-29- und FaDu-Zellen nach Kultivierung bei Serummangel (0,25% FKS, 72 h)

Die Histogramme wurden mit Hilfe der Software *Modfit LT™* ausgewertet und die prozentualen Anteile der Zellen in den entsprechenden Zellzyklusphasen durch Flächenintegration berechnet.

Bereits 24 Stunden nach Inkubation der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate wurden signifikante konzentrationsabhängige Effekte auf die Zellzyklusphasenverteilung der Tumorzellen beobachtet (Abbildung 3-15). Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase nahm nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen in Abhängigkeit von der Konzentration für HT-29-Zellen bis 90%, für FaDu-Zellen bis 85% und für THP-1-Zellen bis 92% zu. Gleichzeitig wurde eine Abnahme des Anteils in der S- und G₂/M-Phase festgestellt. In allen Tumorzelllinien wurden bei gleicher Konzentration deutlich größere Veränderungen der Zellzyklusphasenverteilung durch CKIA, CKIB und CKIE im Vergleich zu CKIC und CKID erzielt. Für CKIA, CKIB und CKIE konnte bei Konzentrationen bis maximal 1 µmol/l ein G₁-Phasenanteil von ca. 90% in HT-29-Zellen erreicht werden. In THP-1-Zellen war dieser Anteil bereits bei 0,1 µmol/l CKIA bzw. 0,5 µmol/l CKIE zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen (1 µmol/l CKIA und 5 µmol/l bzw. 10 µmol/l CKIE) zeigte die Zellzyklusphasenverteilung der THP-1-Zellen wieder Werte im Bereich der unbehandelten Zellen (0 µmol/l). Für CKIC wurde erst bei Konzentrationen von 5 µmol/l und 10 µmol/l eine Zunahme des G₁-Phasenanteils in HT-29- und THP-1-Zellen auf über 85% beobachtet. Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase wurde selbst bei 10 µmol/l CKID kaum über 80% erhöht.

Im Vergleich zu den Tumorzelllinien HT-29 und THP-1 zeigten FaDu-Zellen generell geringere Veränderungen der Zellzyklusphasenverteilung. Die Erhöhung des Anteils der Zellen in der G₁-Phase wurde im Vergleich zu HT-29- und THP-1-Zellen oftmals nur bei höherer Konzentration der entsprechenden Verbindung erreicht.

Zur Abschätzung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und zum direkten Vergleich der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate wurde der Anteil an Zellen in der G₁-Phase über der Konzentration abgebildet und die halbmaximalen Effektkonzentrationen (EC₅₀) nach sigmoider Kurvenanpassung exemplarisch für HT-29-Zellen berechnet (Abbildung 3-16). Die Verbindungen CKIA und CKIB zeigten nach 24 Stunden Inkubation einen deutlichen Anstieg des G₁-Phasenanteils mit EC₅₀-Werten von 72 nmol/l für CKIA und 172 nmol/l für CKIB. Für CKIE wurden ähnliche Effekte im nanomolaren Bereich festgestellt (EC₅₀: 214 nmol/l). Die Wirkungen von CKIC und CKID auf den Zellzyklus waren um den Faktor 10 bis 20 geringer. Für beide Verbindungen wurden für HT-29-Zellen EC₅₀-Werte von über 1 µmol/l berechnet.

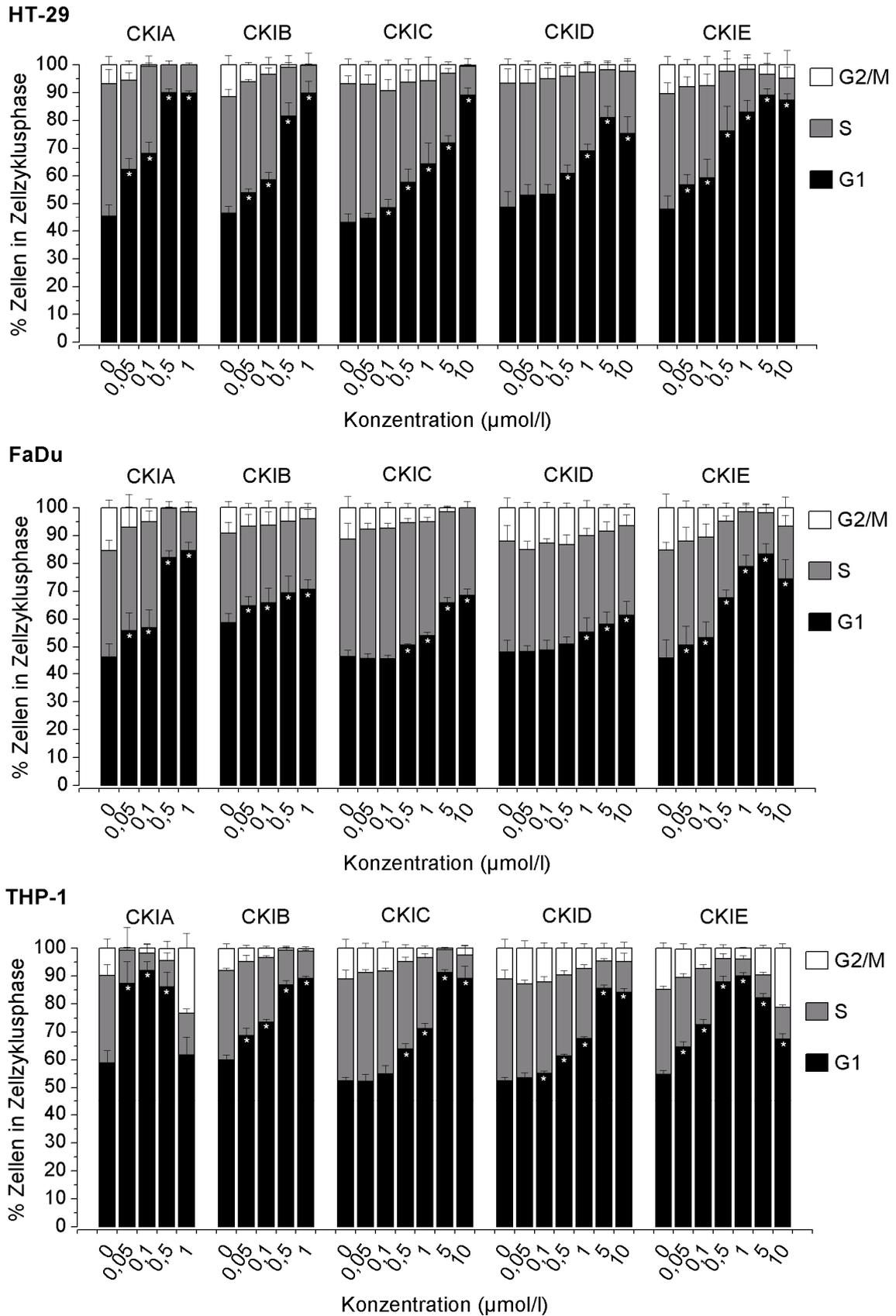


Abbildung 3-15: Zellzyklusphasenverteilung der HT-29-, FaDu- bzw. THP-1-Tumorzellen

Die Abbildungen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen in den entsprechenden Zellzyklusphasen 24 h nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 8$, Wilcoxon-Test, * $p < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle 0 $\mu\text{mol/l}$).

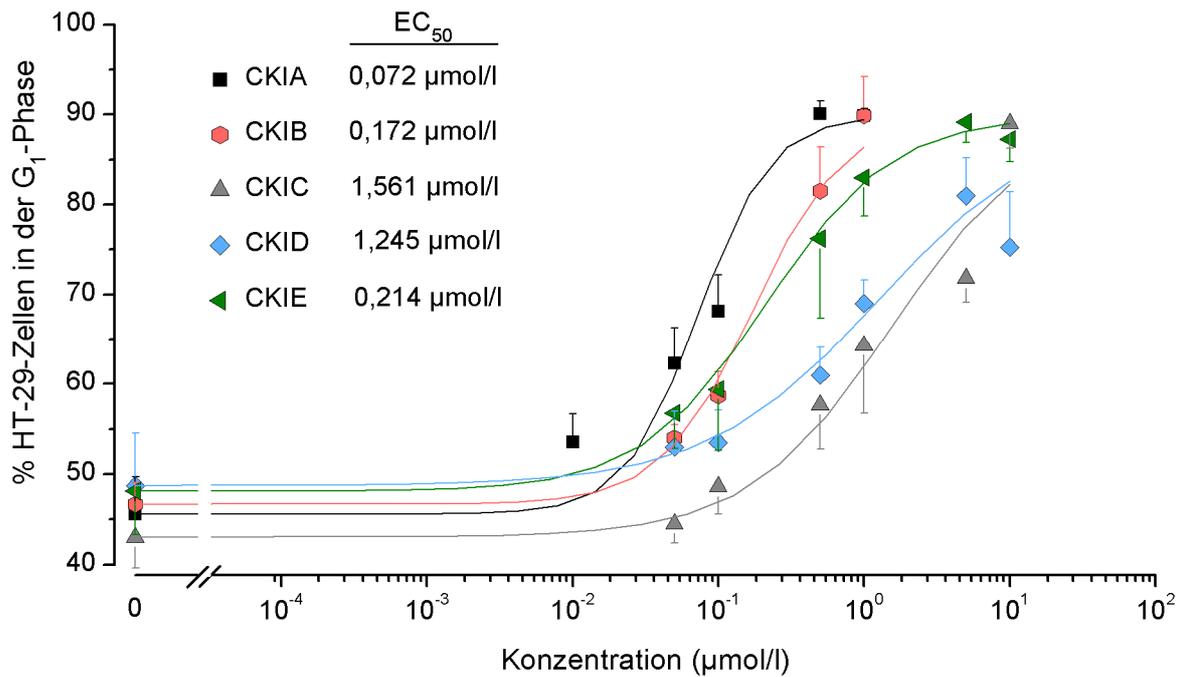


Abbildung 3-16: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivate

Der G₁-Phasenanteil der HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation ist in Abhängigkeit der Konzentration der Pyrido[2,3-d]pyrimidine dargestellt (Mittelwert ± Standardabweichung, $n \geq 8$). Die Berechnung der halbmaximalen Effektkonzentration (EC₅₀) erfolgte mit Hilfe des Programms Origin 7.5G durch Anpassung der sigmoiden Kurven (obere Asymptote: $y = 89,9$).

Zur Vereinfachung der Ergebnisdarstellung in Bezug auf die Pyrido[2,3-d]pyrimidin-abhängigen Effekte in THP-1-Makrophagen wurde in Abbildung 3-17 ausschließlich der prozentuale Zellzyklusphasenanteil der diploiden Zellpopulation dargestellt. Im Programm *Modfit LTTM* wird bei Anwendung des tetraploiden Modells zur Auswertung der Histogramme aufgrund der Überlagerung der diploiden G₂/M-Phase mit der tetraploiden G₁-Phase der prozentuale Anteil der diploiden G₂/M-Zellen zunächst ausgeblendet und später durch Rückrechnung übertragen. Dabei beträgt die Voreinstellung 8%, wodurch keine Standardabweichung für die G₂/M-Phase angegeben werden kann.

Die unbehandelten THP-1-Makrophagen wiesen bei Vernachlässigung des kalkulierten G₂/M-Anteils, eine ähnliche Zellzyklusphasenverteilung wie die proliferierende Tumorzelllinie THP-1 auf. Der G₁-Phasenanteil der THP-1-Makrophagen lag mit ca. 65% jedoch um etwa 10% höher, als bei den THP-1-Tumorzellen. Im Vergleich zu THP-1 und den anderen Tumorzelllinien HT-29 und FaDu zeigten THP-1-Makrophagen selbst bei hohen Konzentrationen an Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivaten nur geringe Veränderungen ihrer Zellzyklusphasenverteilung. Im Vergleich zur Kontrolle sind signifikante Zunahmen des prozentualen Anteils an Zellen in der G₁-Phase für CKIA, CKIC, CKID und CKIE zu beobachten, allerdings um maximal 15%.

THP-1-Makrophagen

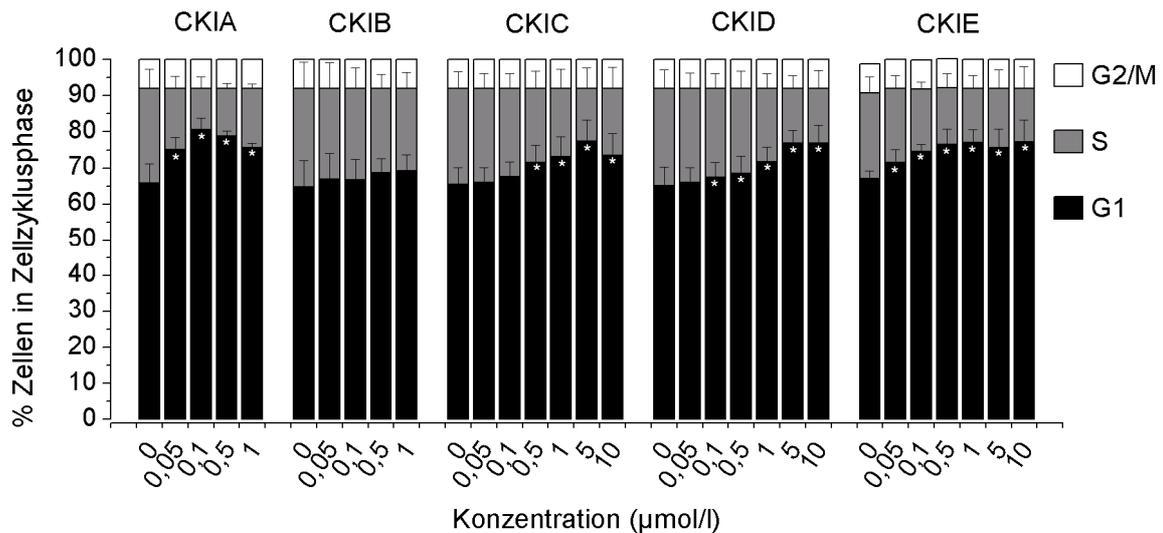


Abbildung 3-17: Zellzyklusphasenverteilung der THP-1-Makrophagen

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil diploid differenzierter Zellen in den entsprechenden Zellzyklusphasen 24 h nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 8$, Wilcoxon-Rang-Test, * $p < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle 0 $\mu\text{mol/l}$).

3.2.3 pRb-Phosphorylierung

Die Interaktion mit der Cdk4/6 und der Einfluss der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine auf den Cdk4/6-gesteuerten Signalweg wurde mit Hilfe immunchemischer Untersuchungen der Retinoblastom-Protein-(pRb)-Phosphorylierung näher charakterisiert. Dabei wurde die Cdk4/6-spezifische Phosphorylierung des pRb am Aminosäurerest Serin-780 (Phospho-pRb(Ser⁷⁸⁰)), die Gesamtproteinmenge an pRb sowie als interne Kontrolle β -Aktin untersucht (vgl. 2.3). Die Spezifität der Antikörper für die entsprechenden Proteine pRb (110 kDa) und β -Aktin (42 kDa) ist exemplarisch für Gesamtzelllysate von FaDu-Zellen in Abbildung 3-18 gezeigt.

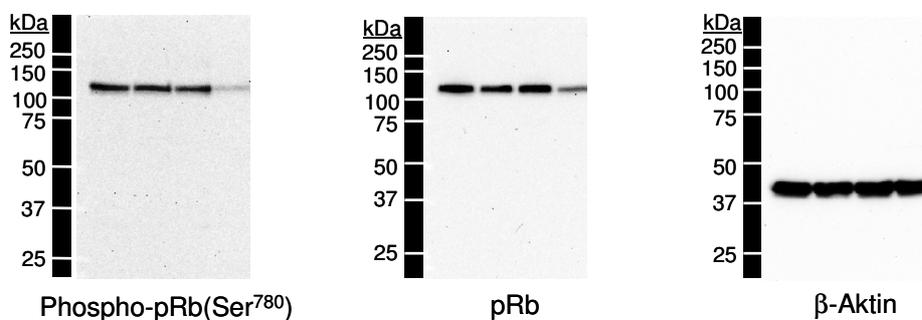


Abbildung 3-18: Spezifität der Antikörper

Die immunchemische Detektion von phosphoryliertem pRb(Ser⁷⁸⁰), pRb und β -Aktin ist exemplarisch gezeigt für FaDu-Gesamtzelllysate nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0; 0,1; 1; 10 $\mu\text{mol/l}$) an CKIC.

Die Untersuchungen der Cdk4/6-spezifischen pRb-Phosphorylierung nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivaten für 24 Stunden zeigten in allen untersuchten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Hypophosphorylierung des pRb am Serin-780 (Abbildung 3-19).

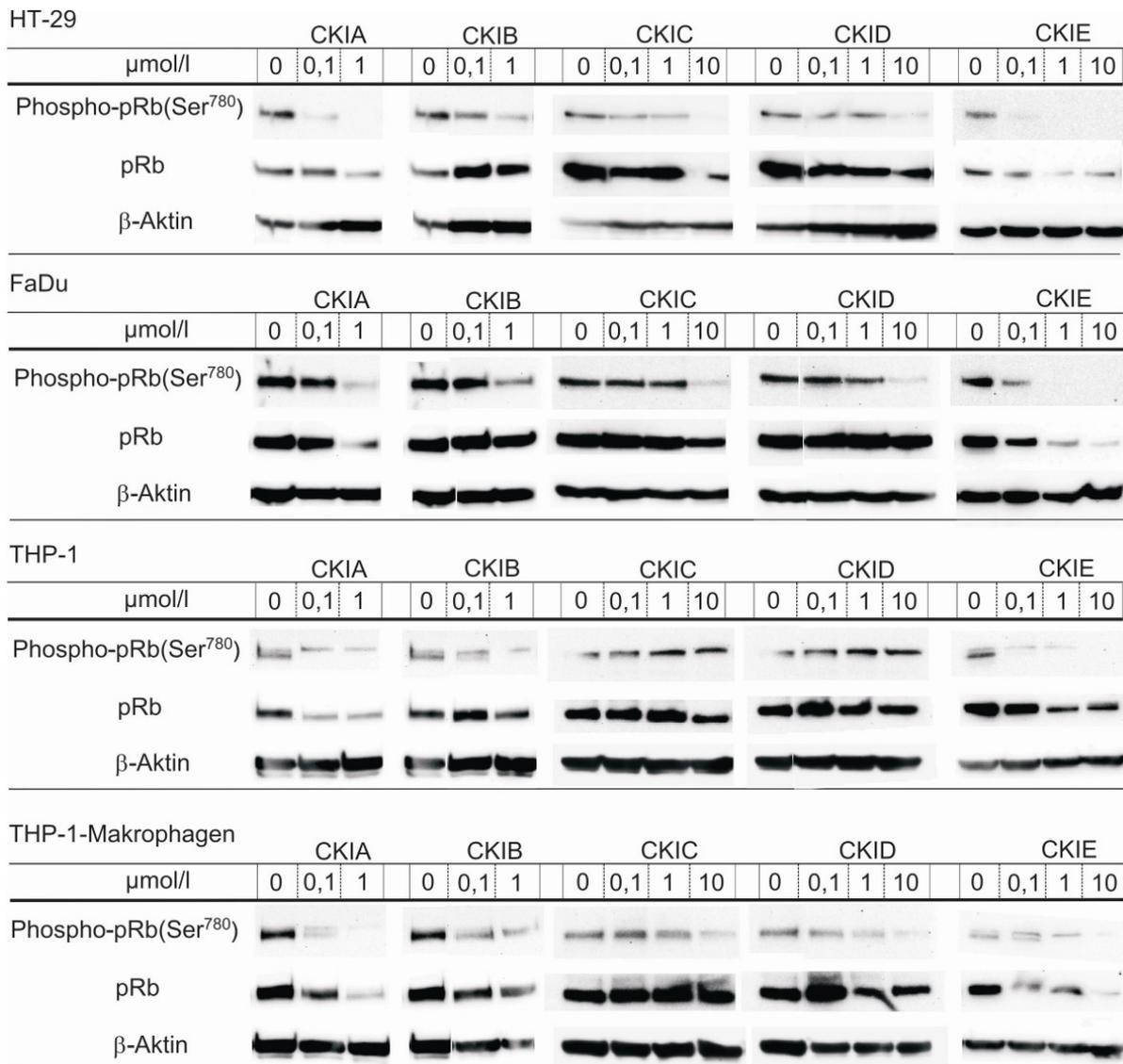


Abbildung 3-19: Untersuchung der Cdk4/6-spezifischen pRb-Phosphorylierung

Dargestellt sind repräsentative immunchemische Detektionen von phosphoryliertem pRb(Ser⁷⁸⁰), pRb und β-Aktin nach 24 h Inkubation der Tumorzelllinien HT-29, FaDu, THP-1 und der THP-1-Makrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivaten.

Besonders wirksam bereits bei geringen Konzentrationen (0,1 und 1 µmol/l) waren die Derivate CKIA, CKIB und CKIE (Abbildung 3-19). Bei Normierung der pRb-Serin-780-Phosphorylierung auf die Gesamtmenge an pRb wurde bereits nach 24 Stunden Inkubation mit CKIA, CKIB und CKIE in allen Zelllinien eine Abnahme der Cdk4/6-spezifischen Phosphorylierung des pRb um das Drei- bis Zehnfache beobachtet. Bei

1 $\mu\text{mol/l}$ CKIA und 1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIE war in den Zelllinien oftmals keine Phosphorylierung des Serin-780 mehr nachweisbar. Die Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate CKIC und CKID zeigten ebenfalls einen inhibierenden Einfluss auf die pRb-Phosphorylierung, jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen (10 $\mu\text{mol/l}$). Nach Inkubation mit CKIA und CKIE wurde neben der verringerten pRb-Phosphorylierung auch eine deutlich geringere Gesamtproteinmenge an pRb beobachtet. Für die anderen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate blieb die Gesamtmenge an pRb nahezu gleich.

Neben den quantitativen Unterschieden der pRb-Serin-780-Phosphorylierung nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten für eine bestimmte Zelllinie wurden auch Unterschiede der pRb-Proteinmenge bzw. Phosphorylierung zwischen den untersuchten Zelllinien beobachtet. Insbesondere für FaDu-Zellen wurden im Vergleich zu den anderen Zelllinien stärkere pRb-Proteinbanden und somit auch größere Proteinmengen detektiert (Abbildung 3-19).

Neben dem Einfluss der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate auf die Cdk4/6-spezifische Phosphorylierung wurde beispielhaft für CKIA und CKIB die Phosphorylierung der Cdk2-spezifischen Aminosäuren Serin-807 und Serin-811 (Phospho-pRb(Ser^{807/811})) untersucht. In HT-29- und FaDu-Zellen wurde nach Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ CKIA keine Phosphorylierung des pRb an Serin-807 bzw. Serin-811 beobachtet (Abbildung 3-20). Für die Zelllinie HT-29 wurde in Abhängigkeit der Konzentration an CKIA und CKIB eine verminderte Phosphorylierung detektiert.

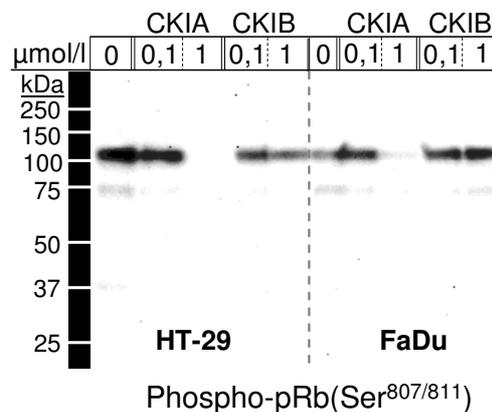


Abbildung 3-20: Untersuchung der Cdk2-spezifischen Phosphorylierung

Die Abbildung zeigt die immunchemische Detektion von phosphoryliertem pRb(Ser^{807/811}) 24 h nach Inkubation der HT-29- und FaDu-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an CKIA und CKIB.

3.2.4 mRNA-Expression

Der Einfluss der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate CKIA, CKIB und CKIE auf die mRNA-Expression der pRb-beeinflussten Gene wurde beispielhaft für E2F-1 und PCNA mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR untersucht (vgl. 2.4.4). Zum Vergleich wurde die mRNA-Expression G_1 -arretierter HT-29- und FaDu-Zellen durch Kultivierung bei Serummangel (– FKS; 0,25% FKS, 72 h) detektiert (siehe auch 3.2.2, Abbildung 3-14). Die Quantifizierung erfolgte relativ zum Haushaltsgen β -Aktin wie bereits unter 3.1.1 beschrieben. Die Spezifität der verwendeten Primerpaare wurde zuvor durch RT-PCR und anschließende Trennung sowie Färbung der PCR-Produkte untersucht (vgl. 2.4.3). Für jedes Primerpaar wurde in allen Zelllinien eine spezifische Bande bei der berechneten Produktgröße detektiert (Abbildung 3-21).

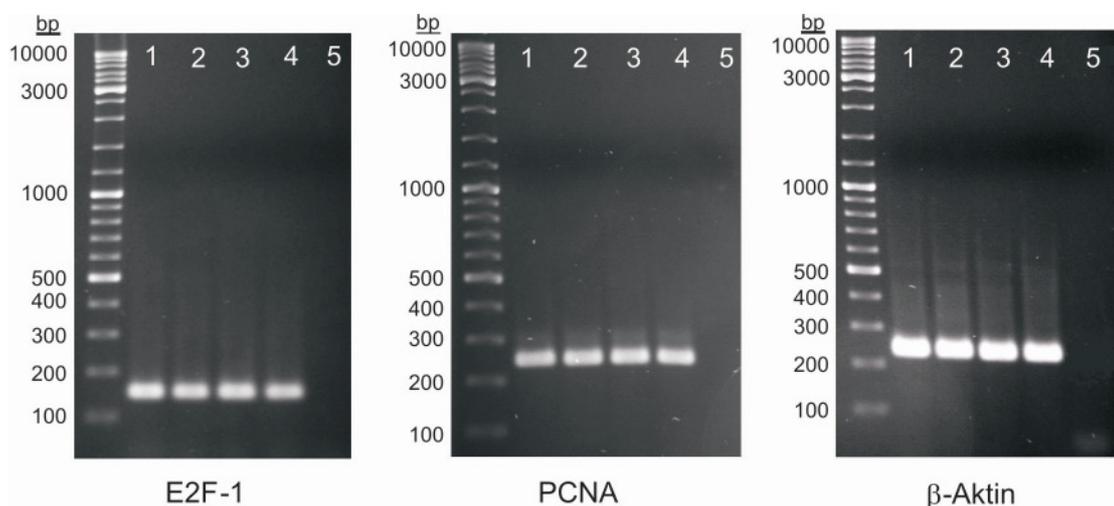


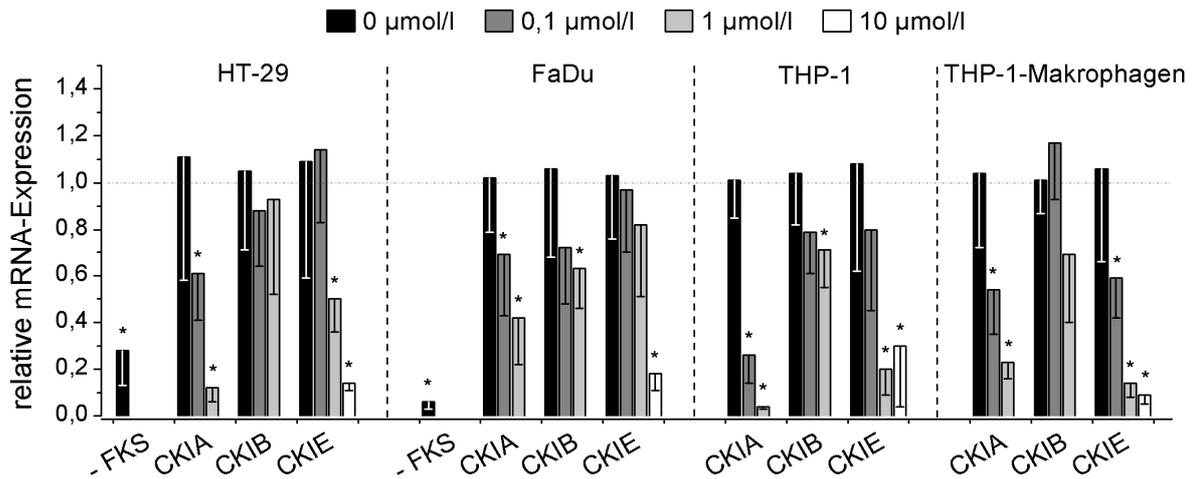
Abbildung 3-21: Produktspezifität der Primer für E2F-1, PCNA und β -Aktin

Die RT-PCR wurde mit mRNA-Proben aus den Zelllinien HT-29 (1), FaDu (2), THP-1 (3) und der THP-1-Makrophagen (4) durchgeführt. Als Negativkontrolle (5) wurde PCR-reines Wasser anstelle der mRNA verwendet.

Die in Abbildung 3-22 gezeigte E2F-1- sowie PCNA-mRNA-Expression nach Inkubation mit CKIA, CKIB bzw. CKIE wurde normiert auf die jeweils unbehandelten Zellen (0 $\mu\text{mol/l}$). In allen Zelllinien konnten nach 24-stündiger Inkubation signifikante konzentrationsabhängige Abnahmen der relativen mRNA-Expression von E2F-1 und PCNA beobachtet werden. Die Inkubationen mit 1 $\mu\text{mol/l}$ CKIA bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIE zeigten in allen Zelllinien für E2F-1 und PCNA ein signifikant verringertes mRNA-Expressionslevel. Die relative mRNA-Expression nahm bei 1 $\mu\text{mol/l}$ CKIA in HT-29-Zellen und bei 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIE in allen Zelllinien bis auf ca. 20% des Wertes der unbehandelten Zellen ab und lag dabei im Bereich der bei Serummangel kultivierten HT-29- bzw. FaDu-Zellen (– FKS). Nach 24-stündiger Inkubation mit CKIB ist ebenfalls eine Abnahme der relativen mRNA-Expression in den untersuchten Zelllinien zu erkennen, allerdings wurden nur um ca. 50%

verringerte E2F-1- und PCNA-mRNA-Level im Vergleich zu den unbehandelten Zellen detektiert. Bereits bei Behandlung mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate wurden verminderte relative mRNA-Expressionen beobachtet, diese waren jedoch statistisch nur signifikant für CKIA und CKIE in einigen Zelllinien.

E2F-1



PCNA

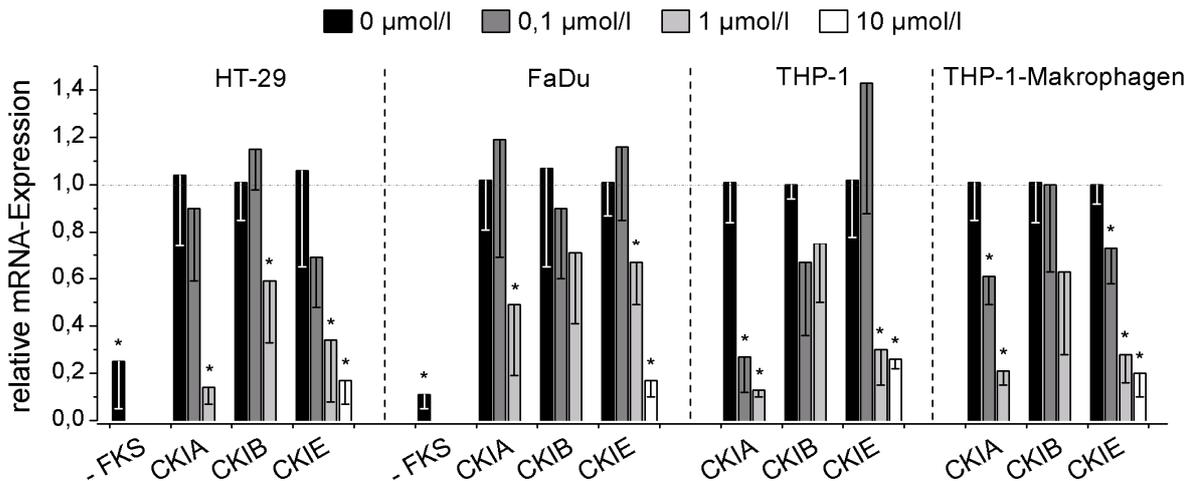


Abbildung 3-22: Relative mRNA-Expression von E2F-1 und PCNA

Dargestellt ist die mRNA-Expression nach 72-stündiger Kultivierung der Tumorzellen HT-29 und FaDu bei 0,25% FKS (Serummangel, - FKS) sowie nach 24-stündiger Inkubation aller Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an CKIA, CKIB und CKIE bezogen auf die jeweils unbehandelten Zellen (0 $\mu\text{mol/l}$) (relative mRNA-Expression = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, wobei $\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\beta\text{-Aktin})$ und $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Probe}) - \Delta C_t(\text{unbehandelte Zellen})$).

(Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 6$ bei je 3-4 unabhängigen Proben, * $p < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle 0 $\mu\text{mol/l}$)

3.3 Radiopharmakologische Charakterisierung ausgewählter ^{124}I - bzw. ^{18}F -markierter Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate

3.3.1 Radiomarkierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine

In Tabelle 3-1 sind die wichtigsten Ergebnisse zur Darstellung von [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE (vgl. 2.6.1) zusammengefasst. Die Lipophilie der radioaktiven Verbindungen wurde nach der Methode von Wilson *et al.* [118] ermittelt. Die Angabe erfolgte als $\log D_{7,4}$ -Wert.

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Radiomarkierung [112]

	[^{124}I]CKIA	[^{124}I]CKIB	[^{18}F]CKIE
Menge Markierungsvorstufe	0,25 mg	0,25 mg	6 mg
Synthesedauer	ca. 100 min	ca. 100 min	ca. 125 min
Radioaktivität Produkt	8,5–35,7 MBq	7,5–32,7 MBq	100–368 MBq
Radiochemische Ausbeute	24–34%	17–27%	3–8%
Radiochemische Reinheit	> 98%	> 98%	> 98%
Spezifische Aktivität [GBq/ μmol]	16,9 \pm 12,8	21,8 \pm 3,2	22,4 \pm 3,5
$\log D_{7,4}$ (experimentell)	2,76 \pm 0,11	2,00 \pm 0,04	2,21 \pm 0,04

3.3.2 Stabilitätsuntersuchungen *in vitro*

Die Stabilität der radioaktiv markierten Verbindungen [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE wurde *in vitro* in Ethanol, PBS (pH 7,4) sowie in Zellkulturmedium RPMI und *ex vivo* in Rattenplasma untersucht (vgl. 2.6.2). Die chromatographischen Analysen zeigten nach 30 Minuten und 24 Stunden Inkubation bei 37°C über 86% der intakten Verbindung [^{124}I]CKIA bzw. über 94% [^{124}I]CKIB in allen untersuchten Medien. Nach 60 Minuten Inkubation mit [^{18}F]CKIE bei 37°C wurden mindestens 86% der Ausgangsverbindung detektiert.

3.3.3 Zelluläre Radiotracer-Aufnahme

Die Aufnahme der radioaktiv markierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE in die adhärenen Zelllinien HT-29, FaDu und die THP-1-Makrophagen wurde in Abhängigkeit von der Zeit und Temperatur untersucht (vgl. 2.6.3). Für [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB wurde bei 37°C eine beachtliche und bis 2 Stunden stetig ansteigende Aufnahme in alle drei Zelllinien beobachtet (Abbildung 3-23). Dabei konnten kaum Unterschiede bei den Aufnahmeraten für die verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Die initialen Aufnahmen von [^{124}I]CKIA bis 10 Minuten (HT-29: 142,3 %ID/ mg Protein, FaDu: 268,7 %ID/ mg Protein, THP-1-Makrophagen: 183,7 %ID/ mg Protein) zeigten

zunächst geringere Werte im Vergleich zu [^{124}I]CKIB (HT-29: 480,3 %ID/ mg Protein, FaDu: 511,2 %ID/ mg Protein, THP-1-Makrophagen: 510,2 %ID/ mg Protein) (Abbildung 3-23). Nach 60 bzw. 120 Minuten wurden bei Beachtung der Standardabweichung keine Differenzen zwischen der Aufnahme von [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB beobachtet (ca. 1000 bis 1300 %ID/ mg Protein in allen Zelllinien nach 120 Minuten). Für [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB wurde in einem Einzelexperiment ($n = 4$) außerdem die zelluläre Aufnahme in HT-29 und FaDu nach 3 und 5 Stunden untersucht, wobei sich ein weiterer Anstieg der Aufnahme für [^{124}I]CKIA bis ca. 2000 %ID/ mg Protein (3 Stunden) und 2500 %ID/ mg Protein (5 Stunden) zeigte. Die Aufnahme von [^{124}I]CKIB blieb nach 3 und 5 Stunden nahezu konstant (ca. 1200 %ID/ mg Protein) [114].

Im Vergleich zu 37°C ist die zelluläre Aufnahme von [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB in allen Zelllinien bei einer Temperatur von 4°C signifikant geringer. Allerdings nimmt die Aufnahme der Radiotracer [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB bei 4°C von ca. 50 %ID/ mg Protein (unspezifische Bindung) bis ca. 200 %ID/ mg Protein nach 2 Stunden Inkubation zu. Dies entspricht etwa einem Fünftel des Wertes bei 37°C.

Die zelluläre Aufnahme von [^{18}F]CKIE war bei gleichen Bedingungen beträchtlich geringer im Vergleich zu [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB (Abbildung 3-24). Insgesamt betrachtet wurde für [^{18}F]CKIE ein ähnliches Aufnahmeprofil wie für die ^{124}I -markierten Verbindungen beobachtet. Die Aufnahmewerte bei 37°C stiegen jedoch deutlich langsamer. Während der initialen Aufnahmephase des [^{18}F]CKIE wurden die zellulären Aufnahmen von ca. 20 %ID/ mg Protein nach 1 Minute auf ca. 30 %ID/ mg Protein nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C erhöht (Abbildung 3-24). Nach 120 Minuten wurden bei 37°C Aufnahmewerte von ca. 40 bis 50 %ID/ mg Protein detektiert. Die untersuchten Zelllinien zeigten untereinander wiederum kaum Unterschiede in ihren Aufnahmewerten. Die zelluläre Aufnahme bei 4°C war auch für [^{18}F]CKIE signifikant geringer im Vergleich zu 37°C. Nach 120 Minuten wurde bei 4°C (ca. 15 %ID/ mg Protein) etwa ein Drittel der [^{18}F]CKIE-Aufnahme bei 37°C detektiert.

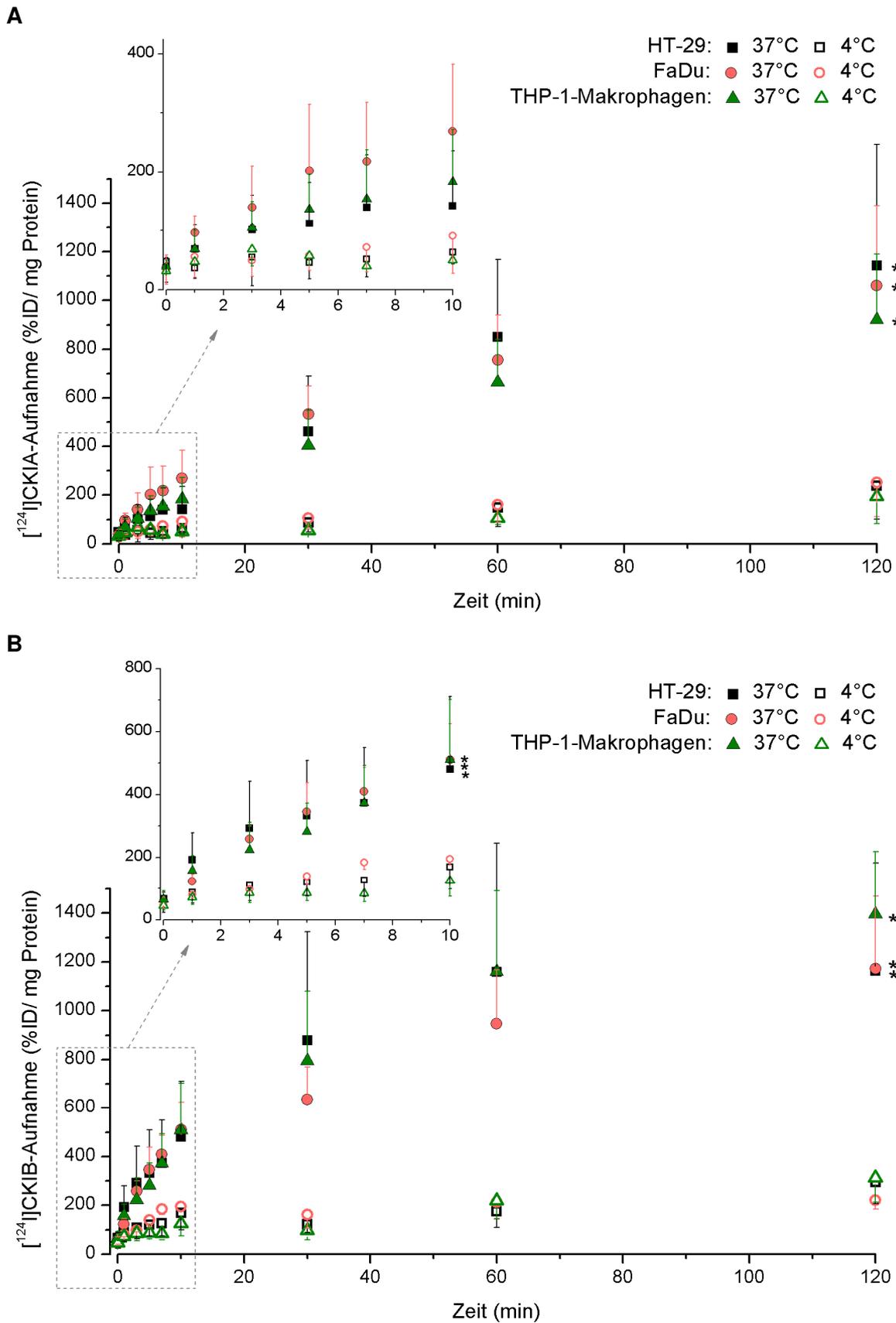


Abbildung 3-23: Zeitabhängige Aufnahme von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ (A) und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ (B) in HT-29- und FaDu-Tumorzellen sowie THP-1-Makrophagen
 (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 8$, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$ 37°C im Vergleich zu 4°C der jeweiligen Zelllinie)

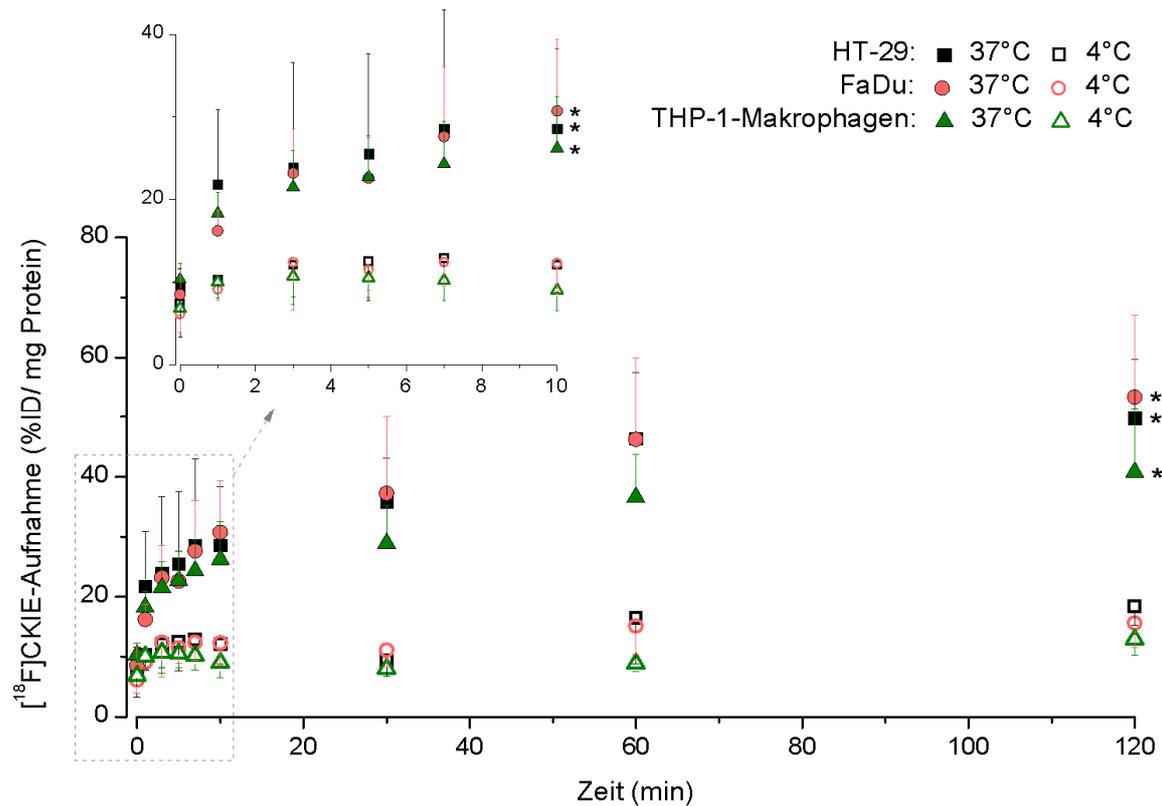


Abbildung 3-24: Zeitabhängige Aufnahme von $[^{18}\text{F}]$ CKIE in HT-29- und FaDu-Tumorzellen sowie THP-1-Makrophagen
(Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 12$, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$ 37°C im Vergleich zu 4°C der jeweiligen Zelllinie)

Zur Charakterisierung der Spezifität der Radiotraceraufnahme wurden Hemmexperimente mit nichtradioaktiven Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen bei 37°C durchgeführt (vgl. 2.6.3). Abbildung 3-25 zeigt die konzentrationsabhängige Inhibierung der zellulären Aufnahme von $[^{18}\text{F}]$ CKIE in Anwesenheit von nichtradioaktivem CKIE. Bereits bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ CKIE im Zellkulturmedium wurde eine signifikante Verringerung der $[^{18}\text{F}]$ CKIE-Aufnahme um ca. 30% beobachtet. Hemmexperimente mit geringeren Konzentrationen an CKIE wurden nicht durchgeführt. Bei 10, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ CKIE lagen die Werte mit 16-18 %ID/ mg Protein im Bereich der bei 4°C detektierten Aufnahme. Vergleichbare Einzelexperimente mit CKIA bei Charakterisierung der Aufnahme von $[^{124}\text{I}]$ CKIA bzw. CKIB bei Zugabe von $[^{124}\text{I}]$ CKIB zeigten ebenfalls konzentrationsabhängige Inhibierungen der Aufnahme des entsprechenden Radiotracers bis ca. ein Fünftel im Vergleich zur Kontrolle.

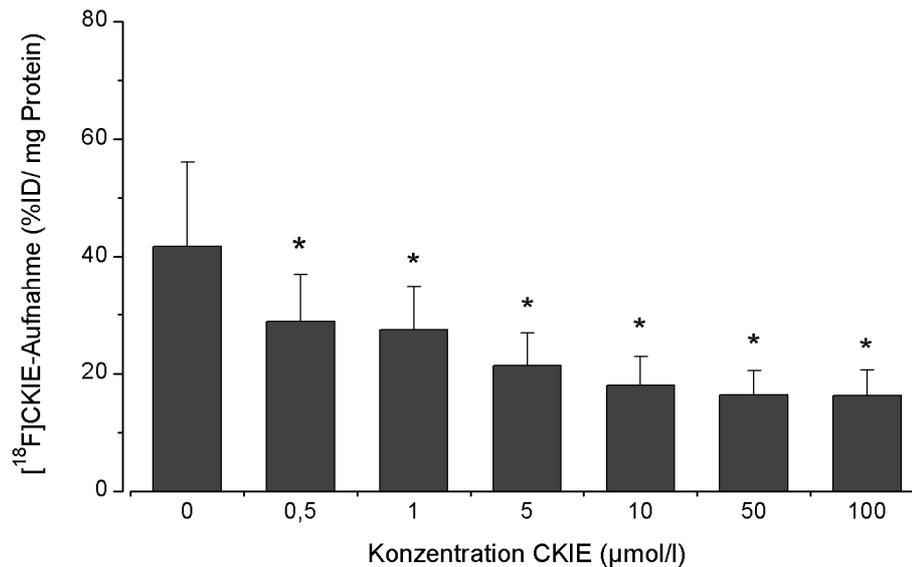


Abbildung 3-25: Inhibition der zellulären Aufnahme von [¹⁸F]CKIE durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an nichtradioaktivem CKIE

Die Abbildung zeigt die 60-minütige Aufnahme in FaDu-Tumorzellen bei 37°C (Mittelwert ± Standardabweichung, $n = 16$, Wilcoxon-Rang-Test, * $p < 0,05$ in Bezug zur Kontrolle 0 µmol/l).

Aufgrund der signifikant geringeren Aufnahmen von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE bei 4°C und bei Blockierung mit den entsprechenden nichtradioaktiven Verbindungen wurden weiterführende Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus der Radiotracer durchgeführt (vgl. 2.6.3). Die energieabhängige Aufnahme der Radiotracer [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurde durch die Blockade der ATP-Synthese bei Zugabe von Natriumazid (15 mmol/l) bzw. Valinomycin (10 µmol/l) charakterisiert (Abbildung 3-26). Weder für Natriumazid noch für Valinomycin wurde ein signifikanter Einfluss auf die Aufnahme von [¹²⁴I]CKIB oder [¹⁸F]CKIE bei 37°C festgestellt (Abbildung 3-26). Die Aufnahmewerte nach 60 Minuten Inkubation lagen im Bereich der Kontrolle (Radiotracer-Aufnahme ohne Inhibitor bei 37°C in FaDu-Tumorzellen).

Die Radiotracer [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurden weiterhin in Hinblick auf den Transport über multispezifische ABC-Transporter (*ATP-binding cassette proteins*) und Nucleosid-Transporter (*equilibrative nucleoside transporter ENT*) untersucht. Zur Charakterisierung der Aufnahme wurden die Inhibitoren Verapamil, Sulfinpyrazon (für ABC-Transporter) und Dipyridamol (für ENT) verwendet. Keiner der untersuchten Inhibitoren zeigte einen eindeutigen oder signifikanten Effekt auf die Aufnahme der Radiotracer [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE (Abbildung 3-27). Allerdings wurde für Verapamil eine tendenzielle Abnahme der Aufnahmen von [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE beobachtet. Mit Dipyridamol wurde eine erhöhte [¹²⁴I]CKIB-Aufnahme, jedoch geringere [¹⁸F]CKIE-Aufnahme detektiert, allerdings ohne statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle.

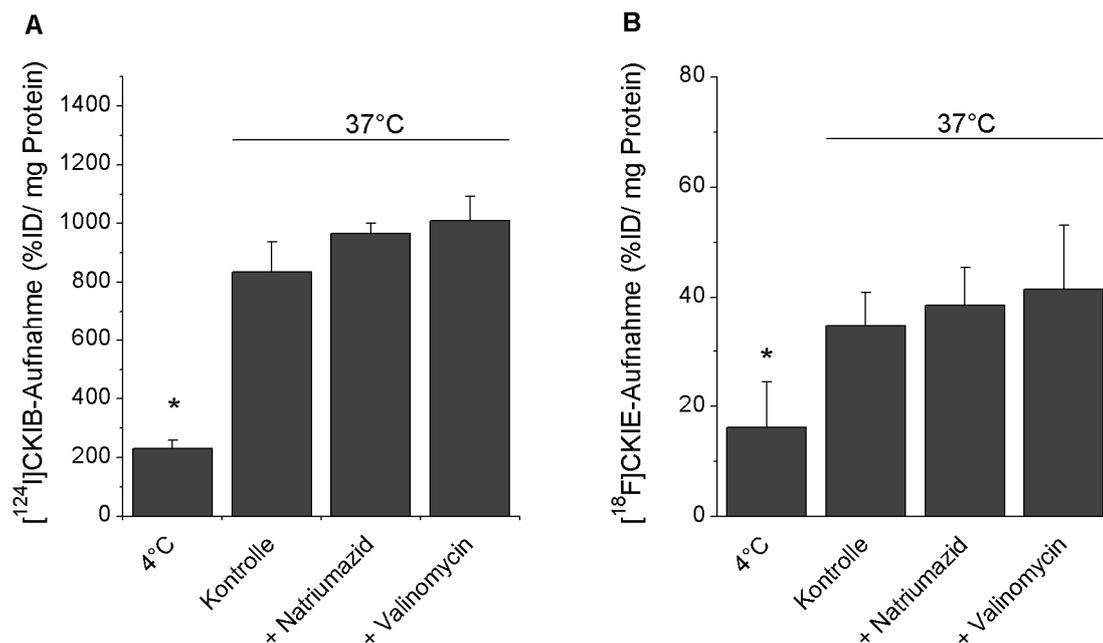


Abbildung 3-26: Untersuchungen zum energieabhängigen Transport von [¹²⁴I]CKIB (A) und [¹⁸F]CKIE (B)

Dargestellt ist die Aufnahme des jeweiligen Radiotracers in FaDu-Tumorzellen nach 60 min. Die Zellen wurden vor Zugabe des Radiotracers 15 min mit 15 mmol/l Natriumazid (+ Natriumazid) bzw. 10 µmol/l Valinomycin (+ Valinomycin) vorinkubiert (Mittelwert ± Standardabweichung, A: $n = 4$, B: $n = 8$, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle bei 37°C).

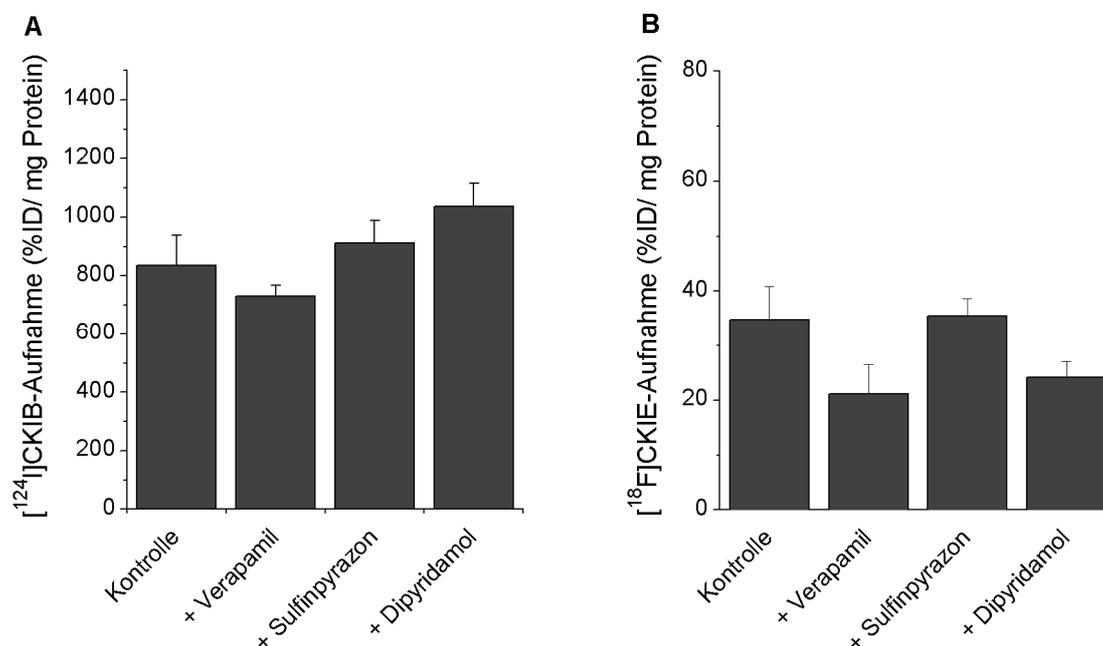


Abbildung 3-27: Untersuchungen zur Aufnahme von [¹²⁴I]CKIB (A) und [¹⁸F]CKIE (B)

Dargestellt ist die Aufnahme des jeweiligen Radiotracers in FaDu-Tumorzellen nach 60 min bei 37°C. Die Zellen wurden vor Zugabe des Radiotracers 15 min mit 10 µmol/l Verapamil (+ Verapamil), 250 µmol/l Sulfipyrazon (+ Sulfipyrazon) bzw. 10 µmol/l Dipyridamol (+ Dipyridamol) vorinkubiert (Mittelwert ± Standardabweichung, A: $n = 4$, B: $n = 8$).

3.3.4 Bioverteilung und *in vivo*-Stabilität in Ratten

Die Verteilung der untersuchten Radiotracer in Geweben und Organen wurde 5 Minuten nach Injektion, relevant für die Perfusionsphase, bzw. 60 Minuten nach Injektion, relevant für die metabolische Phase, bei männlichen Ratten untersucht (vgl. 2.6.4). Die Ergebnisse wurden als standardisierte Aufnahmewerte (SUV) für ausgewählte Organe dargestellt.

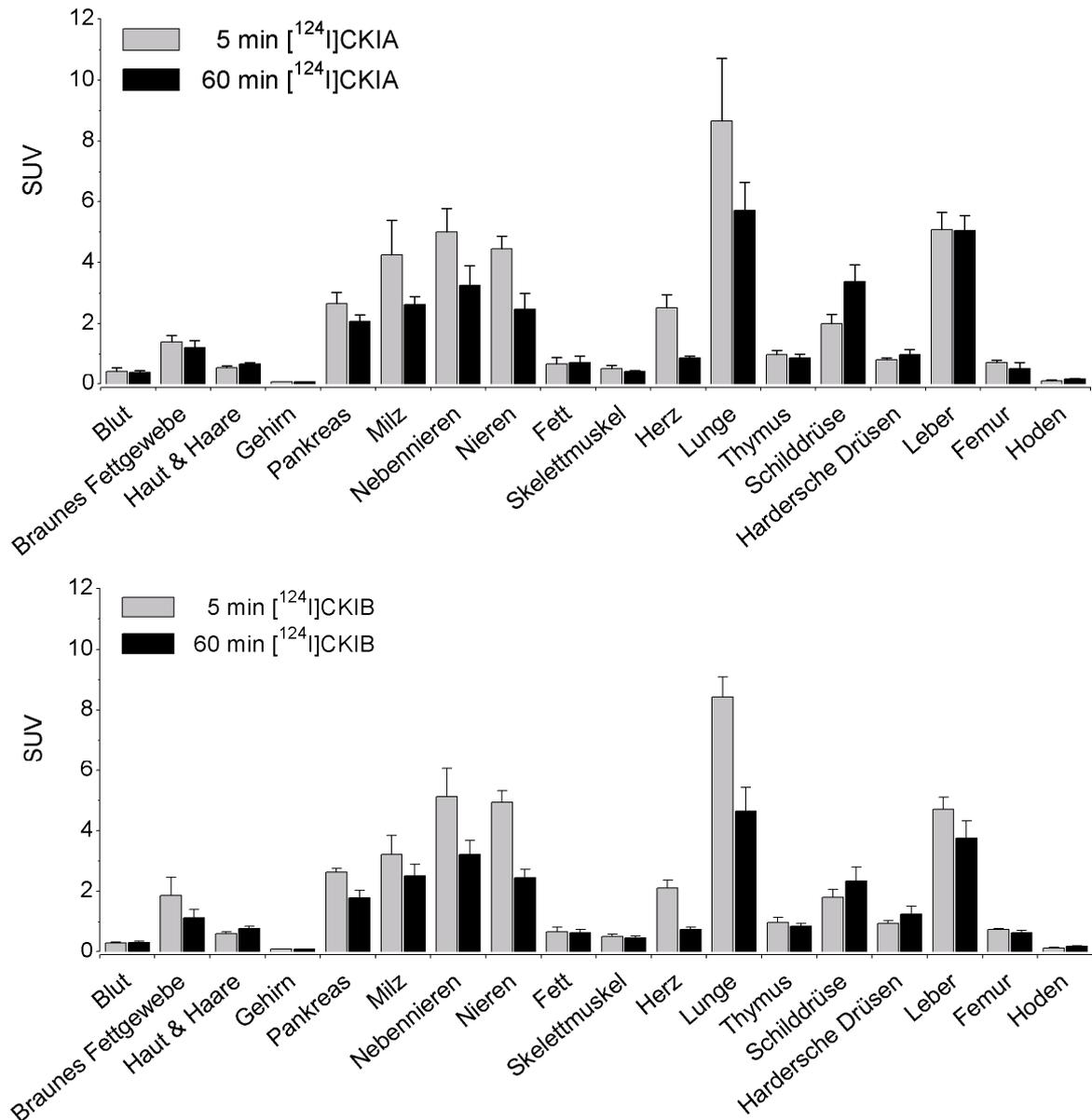


Abbildung 3-28: Bioverteilung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ in männlichen Wistar-Ratten 5 min bzw. 60 min nach intravenöser Injektion

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 8$) als standardisierte Aufnahmewerte ($\text{SUV} = (\text{Aktivität des Organs} / \text{Organmasse}) / (\text{gesamte injizierte Aktivitätsmenge} / \text{Gesamtmasse der Ratte})$).

$[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ zeigten sehr ähnliche Bioverteilungsmuster (Abbildung 3-28). Nach 5 Minuten wurde eine sehr hohe SUV-Werte in der Lunge ($8,67 \pm 2,04$ für $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$

und $8,43 \pm 0,66$ für $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$) detektiert. Ebenfalls hohe Konzentrationen an radioaktiven Substanzen wurden in der Milz, den Nieren und Nebennieren, sowie der Leber ($\text{SUV} > 3,2$) gefunden. Die Aktivität verringerte sich in diesen Organen bis 60 Minuten nach Injektion von $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$. Auch für $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ wurde mit Ausnahme der Leber eine geringere Akkumulation nach 60 Minuten beobachtet. Im Gegensatz zu anderen Organen nahm die Aktivität in der Schilddrüse nach 60 Minuten zu. In den anderen Geweben, wie Fett, Skelettmuskel, Femur oder Hoden wurden nur geringe Anreicherungen radioaktiver Substanzen festgestellt. Im Blut wurden ebenfalls sehr geringe Aktivitäten detektiert. Das Gehirn zeigte weder 5 noch 60 Minuten nach $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ - bzw. $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ -Injektion eine Anreicherung radioaktiver Substanzen.

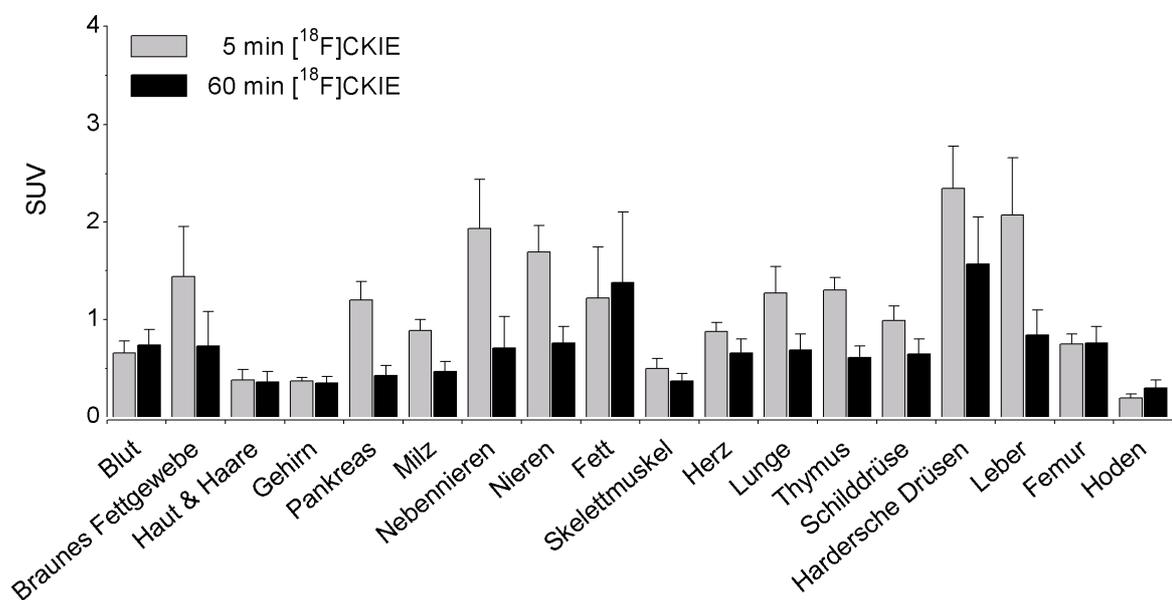


Abbildung 3-29: Bioverteilung von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ in männlichen Wistar-Ratten 5 min bzw. 60 min nach intravenöser Injektion
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 8$) als standardisierte Aufnahmewerte (SUV).

Das Verteilungsmuster von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ unterscheidet sich von denen der beiden ^{124}I -markierten Verbindungen. In den einzelnen Organen und Geweben wurden deutlich geringere Aktivitäten detektiert ($\text{SUV} < 2,5$), wobei die größten SUV-Werte in den Nieren und Nebennieren, im Fettgewebe, den Harderschen Drüsen und der Leber auftraten (Abbildung 3-29). Die anderen Organe zeigten ähnliche Anreicherungen im Bereich zwischen 0,5 und 1,5 SUV. Im Gehirn, im Skelettmuskel und in den Hoden wurden die geringsten Konzentrationen an radioaktiven Substanzen beobachtet. Prinzipiell wurde 5 Minuten nach Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ eine höhere Aktivität als 60 Minuten nach Injektion festgestellt. Die Konzentration im Femur, im Blut, im Gehirn und in den Hoden war bei beiden untersuchten Zeitpunkten gleich.

Die metabolische Stabilität der Radiotracer $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$, $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ und $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ bei Ratten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion der Radiotracer untersucht. Der Anteil an intaktem Radiotracer im Blut der Ratten wurde chromatographisch ermittelt (vgl. 2.6.2). Für $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ wurden sehr ähnliche Stabilitätsprofile erhalten. Die *in vivo*-Stabilitätsanalysen zeigten eine schnelle Abnahme des prozentualen Anteils an intaktem Radiotracer $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ bis ca. 20% innerhalb von 10 Minuten. 60 Minuten nach Injektion wurde eine weitere Abnahme des Anteils an intaktem Radiotracer im Blut der Ratten auf weniger als 5% beobachtet. Die Stabilitätsanalysen von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ im Blut der Ratten zeigten 2 Minuten nach Injektion noch 93% an intaktem Radiotracer. 30 und 60 Minuten nach Injektion betrug der Anteil an $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ weniger als 10%. Exemplarische HPLC-Radiochromatogramme zur Untersuchung der Stabilität von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ im Blut von Ratten sind in Abbildung 3-30 dargestellt.

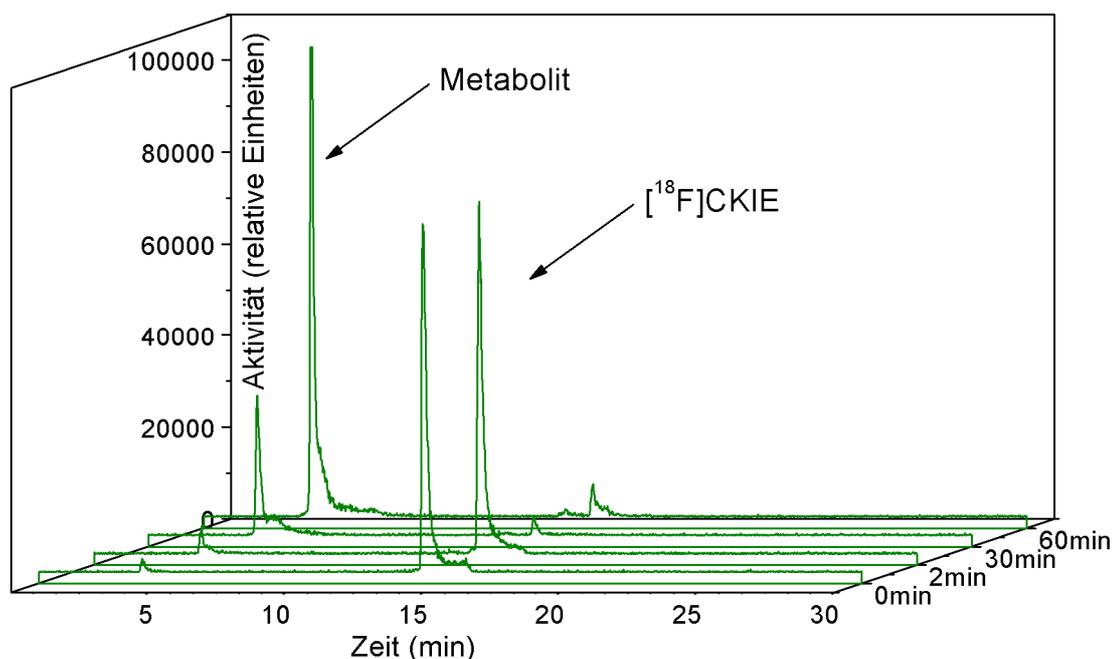


Abbildung 3-30: *In vivo*-Stabilität von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ im Blutplasma von Wistar-Ratten

Dargestellt sind repräsentative HPLC-Radiochromatogramme des aus der Vollblutprobe gewonnenen Plasmas einer Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 30 und 60 min) nach intravenöser Injektion des Radiotracers.

3.3.5 PET-Untersuchungen und Autoradiographie

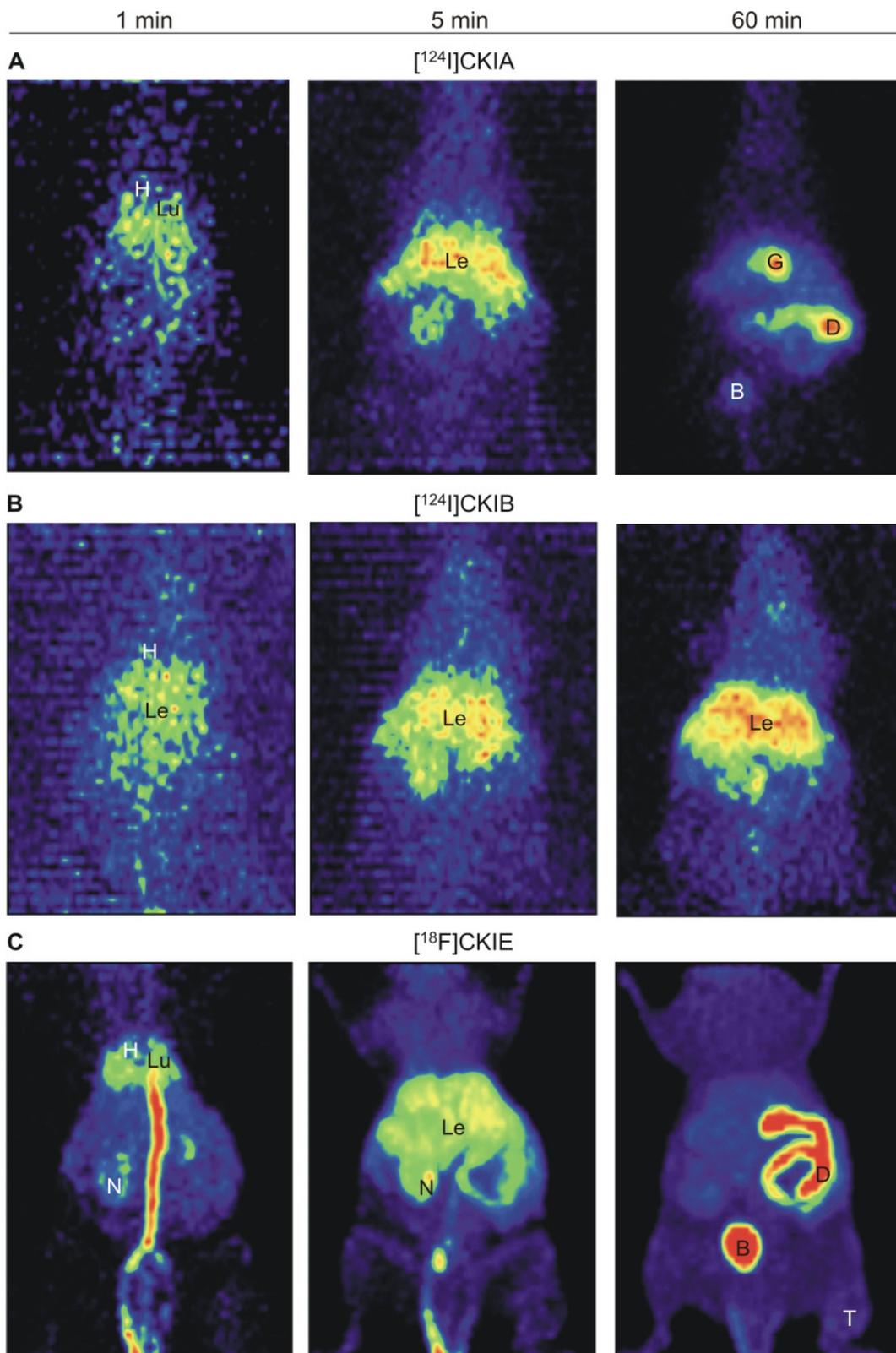


Abbildung 3-31: Kleintier-PET-Untersuchungen zur Verteilung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ (A), $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ (B) und $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ (C). Dargestellt ist die Maximum-Intensitäts-Projektion je einer exemplarischen PET-Aufnahme 1 min, 5 min und 60 min nach intravenöser Injektion der Radiotracer in FaDu-Tumor-tragende *nu/nu*-NMRI-Mäuse (Farben kennzeichnen die Aktivitätskonzentration: blau < grün < gelb < rot; H: Herz, Lu: Lunge, Le: Leber, G: Gallenblase, D: Darm, N: Niere, B: Blase, T: Tumor).

Die zeitabhängige Verteilung und Anreicherung der Radiotracer [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE wurde mittels Kleintier-PET-Untersuchungen bei FaDu-Tumor-tragenden *nu/nu*-NMRI-Mäusen charakterisiert (vgl. 2.6.5). Repräsentative Bilder des Thorax-Abdominal-Bereichs dieser Mäuse nach einmaliger intravenöser Injektion der Radiotracer sind in Abbildung 3-31 gezeigt. Die Maximum-Intensitäts-Projektion erzeugt aus den dreidimensionalen PET-Datensätzen zweidimensionale Bilder, indem Bereiche mit maximaler Intensität ausgewählt werden. Für [^{18}F]CKIE wurden aufgrund der geringeren Positronen-Energie und geringeren Reichweite des Positrons bei Umwandlung des Radionuklids ^{18}F schärfere Bilder im Vergleich zu den ^{124}I -markierten Verbindungen erzeugt. In der ersten Minute nach Injektion wurde die Verteilung der Radiotracer über das Blutgefäßsystem beobachtet. Die Aktivität wurde vor allem in der Herz- und Lungen-Region der Mäuse detektiert. Nach 5 Minuten zeigte sich bereits eine deutliche Akkumulation radioaktiver Substanzen im Bereich der Leber und in geringeren Konzentrationen auch in den Nieren. Zwischen 5 und 60 Minuten wurde eine weitere Substanzanreicherung im Abdomen der Mäuse beobachtet, insbesondere in der Leber, der Gallenblase, im Darm und in der Blase. Für [^{18}F]CKIE konnten geringe Aktivitäten im Bereich des Tumors detektiert werden.

Das Verteilungsprofil der Radiotracer [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE in FaDu-Tumor-tragenden Mäusen wurde nach den PET-Untersuchungen anhand der *ex vivo*-Autoradiographie charakterisiert (vgl. 2.6.6). Repräsentative Autoradiogramme 60 Minuten nach Injektion der Radiotracer und die entsprechenden histologischen Schnittbilder sind in Abbildung 3-32 zusammengefasst. Die Ergebnisse sind konsistent zu den PET-Bildern und verdeutlichen für [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE die höchsten Aktivitäten in der Leber und im Darm. Im Gegensatz zu [^{18}F]CKIE wurde für [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB keine Aktivität im Gehirn detektiert. Für [^{18}F]CKIE konnte anhand der Autoradiogramme auch eine Akkumulation der Aktivität in der Magenwand, im Knochen und in der Haut beobachtet werden.

Die Autoradiogramme für [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB zeigten nur marginale Anreicherungen radioaktiver Substanzen im Tumor. Für [^{18}F]CKIE wurde der Tumor anhand der deutlich stärkeren, kreisförmigen Aktivität im rechten Oberschenkel der Maus abgebildet (Abbildung 3-32 C rechts). Insbesondere wurde der proliferierende Randbereich des Tumors in den Autoradiogrammen (Abbildung 3-32 C links) und den PET-Bildern (Abbildung 3-33) detektiert.

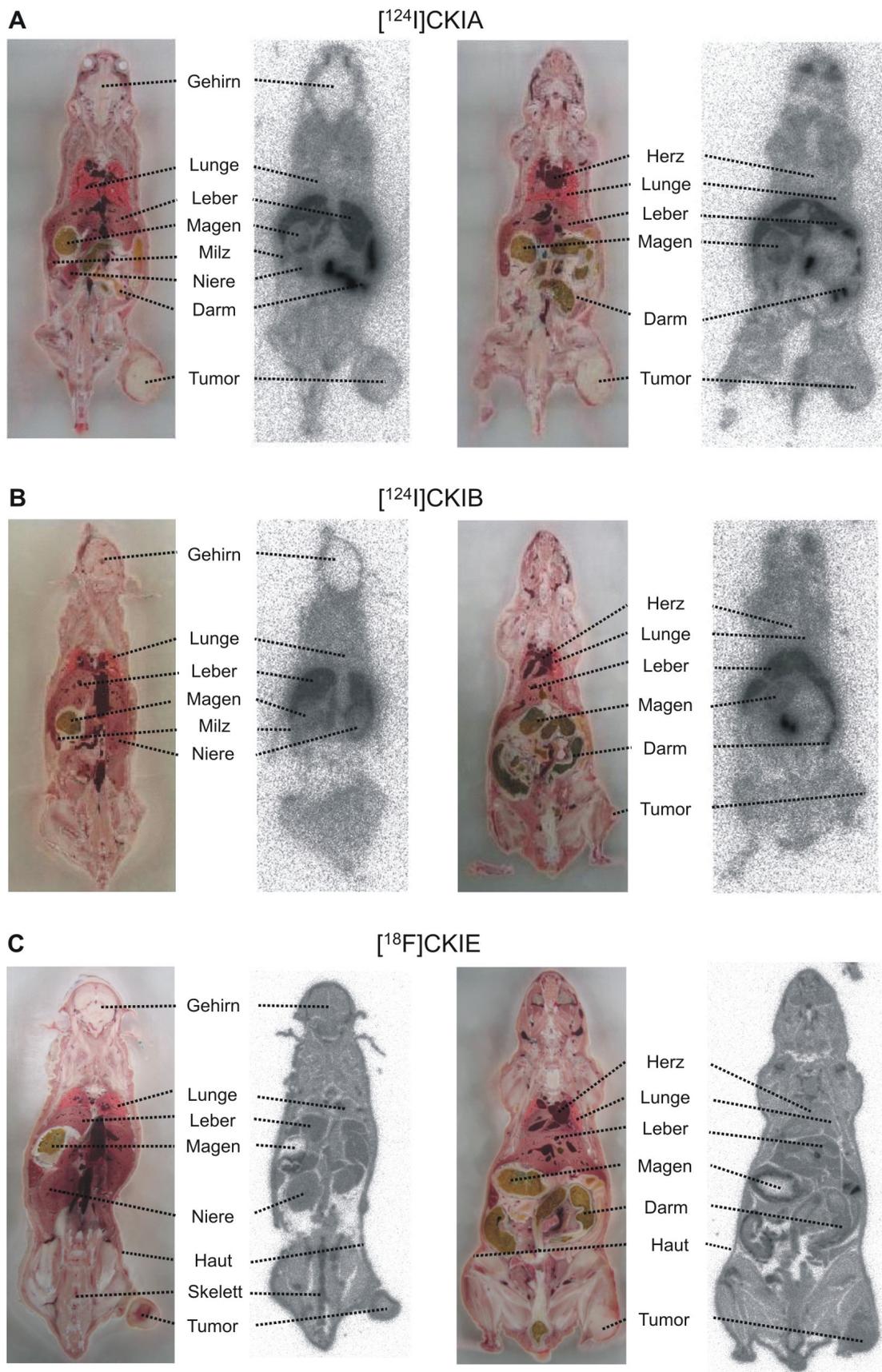


Abbildung 3-32: Verteilung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ (A), $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ (B) und $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ (C)

Dargestellt sind repräsentative *ex vivo*-Autoradiogramme und die entsprechenden histologischen Schnittbilder der FaDu-Tumor-tragenden *nu/nu*-NMRI-Mäuse 60 min nach intravenöser Injektion der Radiotracer.

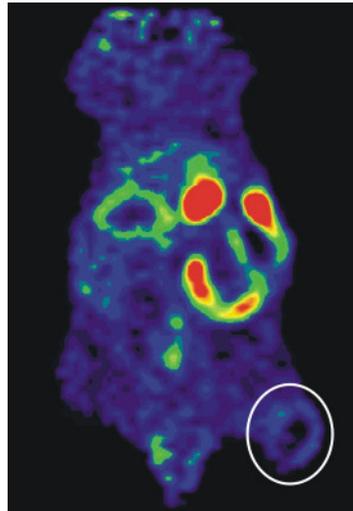


Abbildung 3-33: Aktivität im Randbereich des FaDu-Tumors

Dargestellt ist ein koronaler Schnitt einer repräsentativen FaDu-Tumor-tragenden *nu/nu*-NMRI-Maus zur mittleren Intervallzeit 55 min nach einmaliger intravenöser Injektion von [^{18}F]CKIE (Farben kennzeichnen die Konzentration radioaktiver Substanzen: blau < grün < gelb < rot).

Zur Ermittlung der Kinetik der Radiotracer wurden für ausgewählte Organe aus den PET-Datensätzen Zeit-Aktivitäts-Kurven berechnet. Die als standardisierte Aufnahmewerte (SUV_{PET}) ausgedrückte Konzentration radioaktiver Substanzen gibt Aufschluss über die quantitative zeitabhängige *in vivo*-Aufnahme der Radiotracer in ein Organ. Die nachfolgende Abbildung zeigt den SUV_{PET} -Wert in Prozent des Maximums und erlaubt einen Vergleich der Kinetiken verschiedener Verbindungen in den verschiedenen Organen.

Die Zeit-Aktivitäts-Kurven des Herzens repräsentieren die Verweildauer der radioaktiven Substanzen im zirkulierenden Blut. Für alle drei Verbindungen [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE zeigte sich ein sehr schneller Anstieg der Aktivität im Blut nach intravenöser Injektion bis ca. 100 Sekunden und anschließend eine sehr schnelle Eliminierung der Radiotracer aus dem Blut (Abbildung 3-34 A). Die in Anlehnung an eine monoexponentielle Funktion kalkulierten biologischen Halbwertszeiten für die Eliminierung der Radiotracer aus dem Blut (vgl. 2.6.5) betragen 7,2 Minuten für [^{124}I]CKIA, 5,5 Minuten für [^{124}I]CKIB sowie 7,9 Minuten für [^{18}F]CKIE. Für alle drei Radiotracer wurden sehr ähnliche Zeit-Aktivitäts-Kurvenverläufe und somit nahezu identische Kinetiken im Blut beobachtet.

Die rasche Eliminierung von [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB bzw. [^{18}F]CKIE aus dem Blut der Mäuse ging mit der hauptsächlichen Akkumulation radioaktiver Substanzen in der Leber einher. Bereits nach 3 bis 5 Minuten war die maximale Anreicherung in der Leber erreicht (Abbildung 3-34 B). Die Tracer-Kinetiken in der Leber unterschieden sich für die ^{124}I -markierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine und [^{18}F]CKIE. Die Aktivitäten in der Leber blieben für

$[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ($\log D_{7,4} = 2,76$) und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ ($\log D_{7,4} = 2,00$) nach 5 Minuten bis ca. 60 Minuten nach Injektion der Radiotracer auf einem konstanten Niveau. Für $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ ($\log D_{7,4} = 2,21$) wurde eine allmähliche Abnahme der Aktivität in der Leber bis 60 Minuten beobachtet.

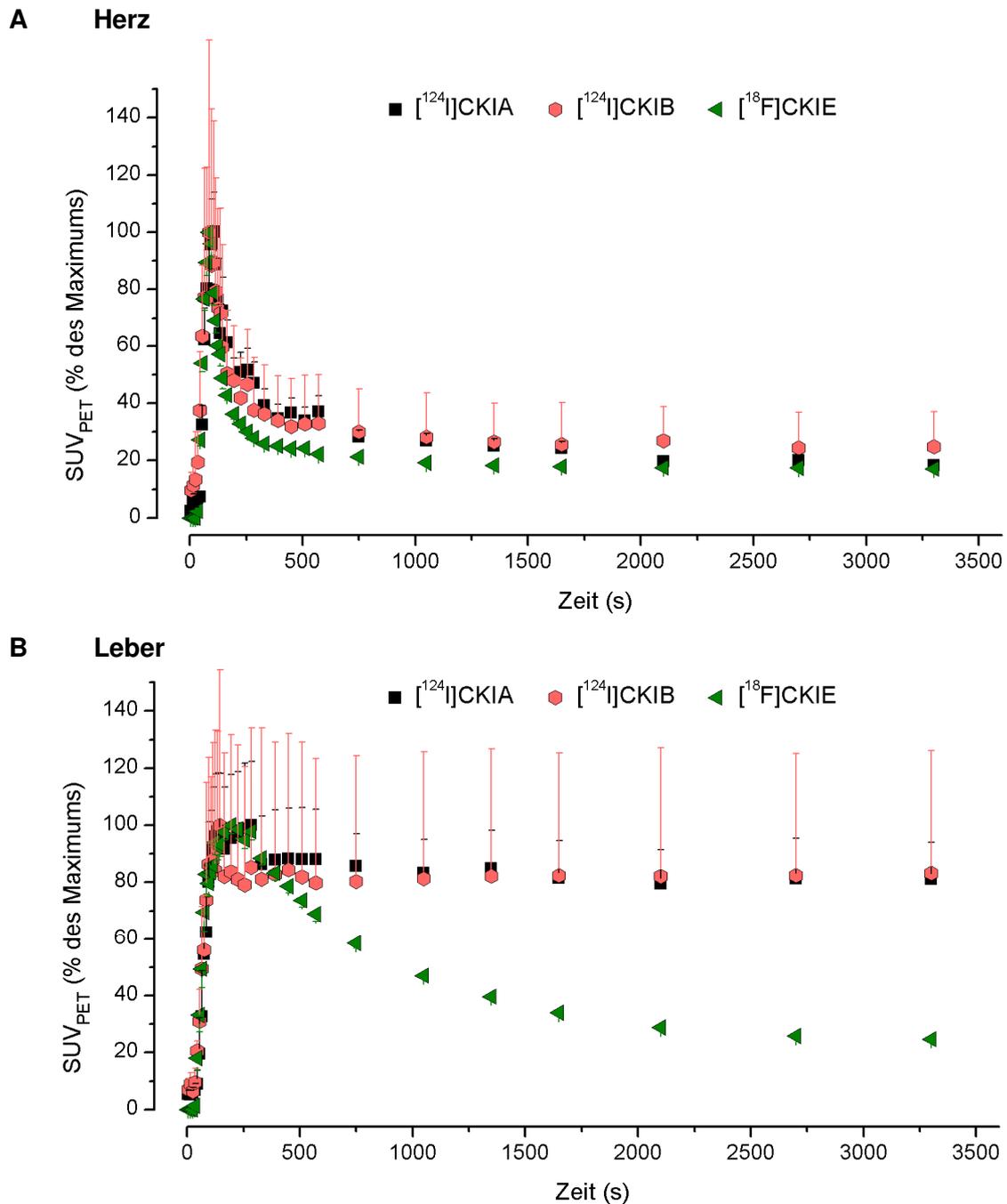


Abbildung 3-34: *In vivo*-Kinetik von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$, $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ und $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ im Herz (A) und in der Leber (B)

Dargestellt sind die Zeit-Aktivitäts-Kurven nach einmaliger intravenöser Injektion der Radiotracer in FaDu-Tumor-tragende *nu/nu*-NMRI-Mäuse. Die Ordinate zeigt die Konzentration radioaktiver Substanzen als standardisierten Aufnahmewert SUV_{PET} in % des Maximums (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$ für $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$, $n = 6$ für $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ und $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$).

Die Zeit-Aktivitäts-Kurven im Bereich der Schilddrüse, dem Iod-Speicherorgan als Hinweis auf die Deiodierung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ und $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$, verdeutlichten einen langsamen Anstieg der Konzentration radioaktiver Substanzen bis auf maximal 0,5 %ID bzw. 1 SUV_{PET} innerhalb einer Stunde.

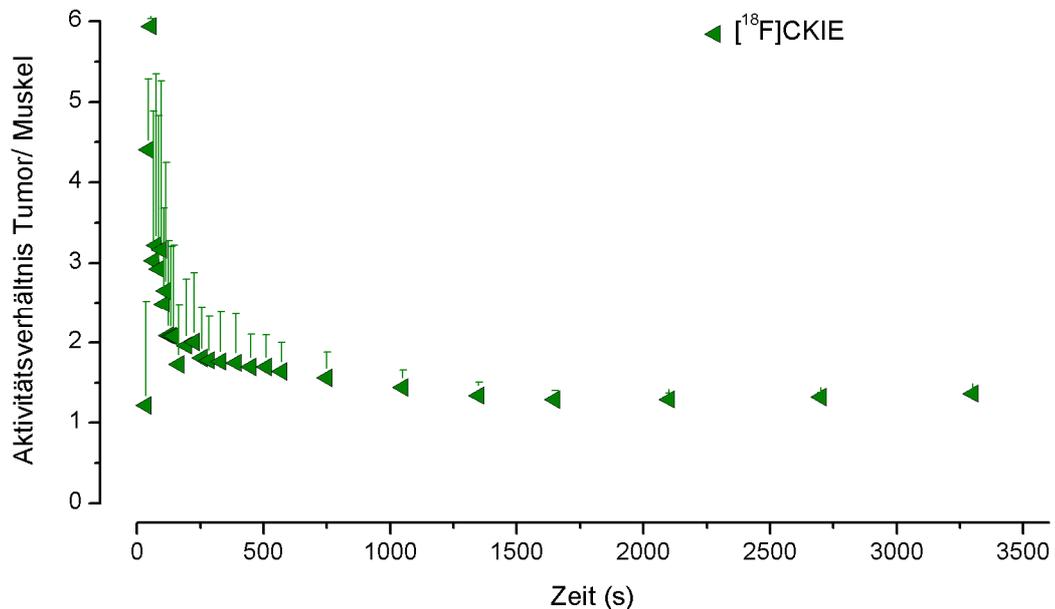


Abbildung 3-35: Charakterisierung der Anreicherung radioaktiver Substanzen im Tumor

Dargestellt ist das zeitabhängige Verhältnis der Aktivität im Bereich des Tumors auf dem rechten Bein und im Muskel des linken Beins FaDu-Tumor-tragender *nu/nu*-NMRI-Mäuse nach einmaliger intravenöser Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 8$).

Zur näheren Charakterisierung der Tumor-spezifischen Akkumulation nach Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ wurde das Verhältnis der Aktivität im Tumor und Muskel ausgewertet. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass aufgrund der Auflösung im PET keine klare Abgrenzung des Tumors möglich ist. Allerdings erlaubt eine volumenidentische Eingrenzung des Tumor-Areals am rechten Bein und des Muskelbereichs im linken Bein der Maus den Vergleich der Anreicherung radioaktiver Substanzen. Aus den PET-Daten wurde nach der schnellen Verteilungsphase des Radiotracers mit maximal 6-facher Aktivität im Tumor verglichen mit dem Muskel, ein konstantes Tumor-zu-Muskel-Verhältnis von 1,5 berechnet (Abbildung 3-35).

4 DISKUSSION

Die Zellzyklus-regulierenden Kinasen Cdk4/6 wurden als kritische Faktoren für die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen identifiziert und demzufolge als vielversprechende Targets für die Entwicklung neuartiger Möglichkeiten zur Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen betrachtet. Dabei ist die selektive Zielerkennung der Cdk4/6 als Mitglieder der Proteinfamilie der Cyclin-abhängigen Kinasen mit hoher Sequenzhomologie eine große Herausforderung. Des Weiteren stellt die vorrangige Lokalisierung der Cdk4/6 im Zellkern hohe Anforderungen an die Wirkstoffe, da sie für die Bindung und Beeinflussung der Kinasen neben der Zellmembran zusätzlich die Kernmembran überwinden müssen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer selektiver Cdk4/6-Inhibitoren zur Inhibierung der Tumorzellproliferation sowie die Untersuchung hinsichtlich ihrer Eignung zur Darstellung der Cdk4/6 in Tumoren *in vivo* mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

4.1 Nachweis und Lokalisierung der Cdk4/6 in Zellen und Geweben

Die Voraussetzung einer funktionellen Bildgebung der Cdk4/6 ist das charakteristische Vorkommen dieser Proteine im interessierenden Zielgewebe in ausreichenden Konzentrationen. In einer Reihe von Tumorentitäten, unter anderem in Adenokarzinomen der Brust und der Lunge [119, 120], in Plattenepithelkarzinomen des Mundraums [121, 122] und lymphoblastischen Leukämien [123] wurde eine verstärkte Proteinbiosynthese der Cdk4/6 im Vergleich zu gesundem Gewebe beobachtet. Der Nachweis der Cdk4/6 in den für diese Arbeit verwendeten Tumorzelllinien und Tumormodellen sowie die Lokalisierung der Cdk4/6 in Zellkompartimenten als Hinweis auf deren katalytische Aktivität war die Grundvoraussetzung für deren Verwendung in experimentellen Untersuchungen.

Die mRNA-Expression und Proteinbiosynthese der Kinasen Cdk4/6 wurde für die humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie HT-29, die aus dem Kopf-Hals-Bereich stammende Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu, die akut monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 und die differenzierten THP-1-Makrophagen, als zelluläres Modell tumorassoziierter Makrophagen, nachgewiesen. Dabei wurden deutliche Unterschiede der Gen-Expression und Proteinkonzentration von Cdk4 bzw. Cdk6 in den einzelnen Zelllinien festgestellt. Der größere Proteinanteil der Cdk6 im Vergleich zur Cdk4 in der Leukämiezelllinie THP-1 und den THP-1-Makrophagen korreliert mit Literaturberichten zum charakteristischen

Vorkommen und der vorrangigen Hyperaktivität der Cdk6 in mesenchymalen, leukämischen Krebserkrankungen [6]. Im Gegensatz dazu wird die vermutete Präferenz der Cdk4-Aktivität in epithelialen Tumoren durch die verstärkte Proteinbiosynthese der Cdk4 im Vergleich zur Cdk6 in der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu bestätigt. Allerdings wurde in FaDu-Zellen insgesamt gesehen die größte Proteinmenge beider Kinasen Cdk4/6 detektiert. Immunzytochemische Untersuchungen zeigten neben der vorrangigen Konzentrierung der Cdk4/6 im Zellkern auch deren Lokalisierung im Zytoplasma der Tumorzellen. Das verstärkte Vorkommen der Cdk4/6 und von funktionalen Cdk4/6-Cyclin D-Komplexen im Zytoplasma wurde bereits in Tumorzellen und in differenzierten Zellen embryonalen Ursprungs gezeigt [124-126]. Die Studien verdeutlichten einerseits die Amplifikation der Cdk4/6 im Zytoplasma als frühzeitigen Marker für die Entwicklung und Transformation von kolorektalen Karzinomen. Andererseits wurden weitreichende zytoplasmatische Funktionen der Cdk4/6 für die Signalübertragung bzw. Koordination der Proliferation und Differenzierung von Zellen in Betracht gezogen [125, 126].

Das Vorkommen der Proteine Cdk4/6 wurde weiterhin in den humanen Xenotransplantat-Tumoren HT-29 und FaDu sowie in ausgewählten Organen und Geweben von *nu/nu*-NMRI-Mäusen belegt. Die Tumore zeigten eine starke immunhistochemische Färbung der Cdk4/6 und charakteristische Verteilungen dieser Proteine im Tumorgewebe. Die offensichtlich geringere Cdk4/6-Proteinkonzentration im Zentralbereich der HT-29-Tumoren könnte die geringe Zellteilungsrate im Inneren des Tumors und deutlich beobachtete Nekrose als Ursache haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Charakterisierung von Tumoren erstmals eine Darstellung der Cdk4/6-Proteine in verschiedenen Organen und Geweben der Maus realisiert. Der direkte quantitative Vergleich der detektierten Cdk4/6-Färbung in den Organen der Maus und den humanen Tumoren ist aufgrund der Speziesunterschiede und daraus gegebenenfalls resultierenden Unterschieden der Antikörperspezifität zwar nicht zulässig; allerdings wurde ein bemerkenswertes Vorkommen der Cdk4/6 im Zellkern der untersuchten murinen Gewebe Lunge, Leber und Niere dokumentiert. Die starke mRNA-Expression der Cdk4 wurde bereits in epithelialen Zellen der Lunge adulter Ratten nachgewiesen [127]. Im Gegensatz dazu war die Cdk4-Expression im Herz und in der Leber adulter Ratten gering. Die differentielle Genexpression der Cdk6 wurde in humanen Gewebeproben analysiert und zeigte ebenso deutlich eine mRNA-Expression in der Lunge [21]. Die Ergebnisse zur Expression und Proteinbiosynthese der Cdk4/6 in proliferierenden und nichtproliferierenden Zellen einiger Gewebe bekräftigen neben den Zellzyklus-relevanten Funktionen dieser Proteinkinasen ihre Bedeutung bei zellulären Prozessen differenzierter,

sich nicht mehr teilender Zellpopulationen. Die sehr geringe Cdk4/6-Proteinbiosynthese im Skelettmuskel identifiziert diesen als Referenzgewebe für die Untersuchungen zur funktionellen Bildgebung der Cdk4/6 bei Tumor-tragenden Mäusen mittels PET.

Die Resultate der Cdk4/6-Charakterisierung in Zellen und Geweben bilden die Voraussetzung für die weitere Verwendung der ausgewählten Tumor- und *in vivo*-Modelle und deren Zweckmäßigkeit zur Charakterisierung potentieller Cdk4/6-Inhibitoren.

4.2 Zelluläre und molekulare Wirksamkeit der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurden Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine als vielversprechende Inhibitoren der Cdk4/6 identifiziert [128] und in den folgenden Jahren im Hinblick auf die Cdk-Selektivität strukturell optimiert. Dabei wurde als Ziel die Identifizierung potenter und selektiver Cdk4/6-Inhibitoren verfolgt, die das Potential zur pharmakologischen Krebsbehandlung haben sollten. VanderWel *et al.* und Toogood *et al.* identifizierten 2005 einige sehr potente und Cdk4/6-selektive Derivate der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine [99, 100]. Die Charakterisierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine hinsichtlich ihrer Kinase-inhibierenden Eigenschaften und Selektivität erfolgte *in vitro* anhand von Substrat-Phosphorylierungs-Assays mit gereinigten Cdk-Cyclin-Komplexen durch Bestimmung der IC₅₀-Werte. Für einige ausgewählte Verbindungen wurde außerdem die Fähigkeit zur Inhibierung der Tumorzellproliferation durch Messung der [¹⁴C]Thymidin-Aufnahme bestimmt. Die Arbeitsgruppe um Toogood wählte das Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivat PD 0332991 zur weiteren präklinischen Evaluierung in humanen Tumorzelllinien und Tumor-tragenden Mäusen aus. Sie zeigten signifikante Inhibierungen der Tumorzellproliferation *in vitro* und *in vivo* infolge eines G₁-Phasenarrests und die Inhibierung der pRb-Serin-780-Phosphorylierung [91]. Die Cdk4/6-selektive inhibitorische Wirkung von PD 0332991 auf das Tumorzellwachstum wurde in den folgenden Jahren für Brust-, Lungen-, und Kolon-Karzinomzelllinien, sowie für lymphoblastische und myeloide Leukämie-Zelllinien beschrieben [91, 104-106, 129, 130]. Derzeit wird PD 0332991 in klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen bzw. mit Mantelzell-Lymphomen getestet. Des Weiteren wird PD 0332991 in Kombination mit Letrozol zur Behandlung von Hormon-Rezeptor-positivem fortgeschrittenem Brustkrebs und in Kombination mit Velcade und Dexamethason bei Patienten mit multiplen Myelomen untersucht (<http://www.clinicaltrials.gov>).

Neben dem wirksamen Cdk4/6-Inhibitor PD 0332991 (IC₅₀ = 9-15 nmol/l) wurde auch das Iod-enthaltende Analogon CK1A (in der Veröffentlichung von VanderWel und Kollegen mit 30 bezeichnet) als sehr vielversprechendes Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivat identifiziert

($IC_{50} = 5 \text{ nmol/l}$ für Cdk4-Cyclin D) [100]. CKIA wurde als Cdk4/6-Inhibitor mit hoher Selektivität gegenüber Cdk1-Cyclin B ($IC_{50} = 1.865 \text{ nmol/l}$) sowie Cdk2-Cyclin A/E ($IC_{50} > 365 \text{ nmol/l}$) und mit Proliferations-inhibierenden Eigenschaften in der humanen Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116 ($EC_{50} = 104 \text{ nmol/l}$) beschrieben. Trotz der auffallend guten und vielversprechenden Ergebnisse hinsichtlich der Proliferationshemmung von Tumorzellen im Vergleich zu anderen von VanderWel *et al.* [100] untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen wurden keine weiterführenden Untersuchungen mit CKIA durchgeführt.

Für die Entwicklung neuer selektiver Cdk4/6-Inhibitoren und die Charakterisierung Positronen-emittierender Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate zur funktionellen Bildgebung der Cdk4/6 wurden ausgehend von CKIA als Leitstruktur die vier Verbindungen CKIB, CKIC, CKID und CKIE synthetisiert [112]. Die biochemische Charakterisierung der fünf Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine hinsichtlich ihrer zellulären Effekte und inhibierenden Wirkung erfolgte in verschiedenen Tumorzelllinien. Die humanen Zelllinien HT-29, FaDu und THP-1 dienten als kontinuierlich proliferierende Zellmodelle; die mit dem Phorbolster TPA aktivierten und differenzierten THP-1-Zellen (THP-1-Makrophagen) als zelluläres Modell nicht mehr proliferierender Zellen.

4.2.1 Hemmung der Zellproliferation

Die Inkubation der Zelllinien mit den untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen führte bereits nach 24 Stunden zur signifikanten Inhibierung der Proliferation von HT-29-, FaDu- und THP-1-Zellen. Ebenso 48 und 72 Stunden nach einmaliger Gabe der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine wurden signifikant verringerte Zellzahlen gegenüber der Kontrolle gemessen. Dabei erzielte die einmalige Gabe von CKIA und CKIB nach 72 Stunden die gleichen inhibitorischen Effekte auf die Zellproliferation wie die tägliche Gabe dieser Verbindungen [114], was auf eine gute Verfügbarkeit und Stabilität der Verbindungen in den Zellen hinweist. Für die verschiedenen Zelllinien wurden charakteristische Unterschiede hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens beobachtet, was einen Einfluss auf die Wirkung von Zellzyklus-Kinase-Inhibitoren haben könnte und berücksichtigt werden sollte. Trotz der unterschiedlichen Verdopplungszeiten von HT-29-, FaDu- oder THP-1-Zellen können geringe Unterschiede der Auswirkungen eines bestimmten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivats auf die Proliferation der verschiedenen Zelllinien abgeleitet werden. Allgemein kann bei gleichen Bedingungen allenfalls eine stärkere Proliferationshemmung der sehr schnell proliferierenden HT-29-Zellen im Vergleich zu den sich langsamer teilenden FaDu- und THP-1-Zellen festgestellt werden. Eine Erklärung dafür ist die aufgrund der kürzeren Verdopplungszeit bereits größere

vorhandene Zellzahl an unbehandelten HT-29-Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zu FaDu- und THP-1-Zellen. Die nichtproliferierenden THP-1-Makrophagen zeigten erwartungsgemäß keine oder geringe Veränderungen ihrer Zellzahl bei Inkubation mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und 1 $\mu\text{mol/l}$ der Verbindungen. Erst bei längerer Inkubation bzw. hohen Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ wurden signifikant verringerte Zellzahlen detektiert.

Die inhibitorischen Effekte der Verbindungen auf die Tumorzellproliferation waren konzentrations- und zeitabhängig. Des Weiteren wurden deutliche Unterschiede der Zellwachstumsinhibierung für die einzelnen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine in den Tumorzellen festgestellt. CKIC und CKID zeigten bei gleichen Bedingungen deutlich geringere Effekte. Während für CKIA, CKIB und CKIE bei Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bereits signifikant verringerte Zellzahlen beobachtet wurden, konnte mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ CKIC oder CKID oftmals kein Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen erzielt werden. Um ähnliche Effekte zu erhalten musste zumeist die 10- bis 100-fache Konzentration an CKIC bzw. CKID im Vergleich zu CKIA, CKIB oder CKIE eingesetzt werden. Mit Ausnahme von 10 $\mu\text{mol/l}$ CKIA und CKIB wurde für alle Verbindungen mindestens die Ausgangs-Zellzahl detektiert, was auf minimale zytotoxische Effekte der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate bei den verwendeten Konzentrationen hinweist.

Die Aktivität intrazellulärer Dehydrogenasen in der Gesamtzellpopulation als Maß für die Vitalität war im Vergleich zur Kontrolle trotz der oftmals geringeren Zellzahl nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen nur wenig verändert. Eine Erklärung dafür könnte die erhöhte Proteinbiosynthese oder Aktivität von Dehydrogenasen sein, infolge der Nutzung von „freier Stoffwechselkapazität“ als Ausgleich für die Inhibierung der Zellzyklusmaschinerie. Erst nach längerer Inkubationsdauer oder hohen Konzentrationen (10 $\mu\text{mol/l}$) an Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen zeigte sich eine drastisch verminderte Vitalität der Gesamtzellpopulation, was wahrscheinlich auf die stark verringerte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zurückzuführen ist.

Insgesamt betrachtet, wurde eine deutliche inhibitorische Wirkung der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate, insbesondere von CKIA, CKIB und CKIE im nanomolaren Konzentrationsbereich, auf die Tumorzellproliferation nachgewiesen, wobei von einer geringen Toxizität für die Zellen ausgegangen wird.

4.2.2 Hemmung der G₁-Phasen-Progression

Die Ergebnisse der Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation der Zellen mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten erklärten die beobachtete Inhibierung der Tumorzellproliferation. Die untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine inhibieren die G₁-Phasen-

Progression und führen konzentrationsabhängig zur Arretierung der Tumorzellen in dieser Zellzyklusphase was die Proliferationshemmung der Tumorzellen zur Folge hat.

Für HT-29-, FaDu- und THP-1-Zellen wurde 24 Stunden nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen eine konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils der Zellen in der G₁-Phase bis ca. 90% beobachtet. Dabei wurden Tumorzell-spezifische Unterschiede festgestellt. Die Zellzyklusanalysen zeigten bei gleichen Bedingungen deutlich geringere Effekte auf den Anteil der FaDu-Zellen in der G₁-Phase im Vergleich zu HT-29- und THP-1-Zellen. Dies erklärt einerseits die erhaltenen Effekte zur stärkeren Hemmung der Proliferation von HT-29- verglichen mit FaDu-Zellen, allerdings steht dies auch im Widerspruch zum Verhalten der THP-1-Zellen mit ähnlichen Effekten der Proliferationshemmung wie bei FaDu-Zellen. Ebenfalls auffällig für die THP-1-Zellen war der entgegen dem Trend wirkende geringere Anteil an Zellen in der G₁-Phase bei hohen Konzentrationen CKIA und CKIE. Für 1 µmol/l CKIA wurde ein ähnlicher Anteil der Zellen in der G₁-Phase wie für die unbehandelten THP-1-Zellen beobachtet. Allerdings war der Anteil an THP-1-Zellen in der G₂/M-Phase nach Inkubation mit 1 µmol/l CKIA nahezu doppelt so hoch wie für die unbehandelten Zellen. Ähnliche Phänomene wurden auch von Toogood *et al.* für andere Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate in einer humanen Brust-Karzinom-Zelllinie nachgewiesen [99]. Das Zellzyklusphasenprofil der THP-1-Zellen, insbesondere die Zunahme des G₂/M-Phasenanteils weist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Inhibierung anderer Zellzyklus-Kinasen wie beispielsweise der Cdk2 und Cdk1 als Konsequenz der begrenzten Selektivität bei hohen Konzentrationen der Inhibitoren hin. Von Gabrielli *et al.* wurde die Bedeutung von Cdk4-Cyclin D3-Komplexen für den Übergang der G₂/M-Phase beschrieben [131], was eine zweite Erklärung für die erhöhte Population an THP-1-Zellen in der G₂/M-Phase bei hohen Konzentrationen an CKIA and CKIE sein könnte. Im Gegensatz zu den proliferierenden Zelllinien veränderte sich die Zellzyklusphasenverteilung der THP-1-Makrophagen selbst bei hohen Konzentrationen an Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen nur wenig. Überraschenderweise wurden jedoch auch für THP-1-Makrophagen signifikante Zunahmen des Anteils in der G₁-Phase um maximal 15% beobachtet, was im Widerspruch zu den nichtproliferierenden Eigenschaften dieser Zellen steht. Allerdings müssen die in dieser Arbeit verwendeten THP-1-Makrophagen als ein zelluläres Modell verstanden werden, die nur eingeschränkt die Eigenschaften natürlich vorkommender Makrophagen wiedergeben. Die offensichtlich bestehende Dynamik der Zellzyklusmaschinerie als Reaktion auf die Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine kann bedingt durch die Tetraploidie der THP-1-Makrophagen auf den komplizierten und starren Auswertalgorithmus der Histogrammdata zurückgeführt werden.

Die Zellzyklusanalysen identifizierten deutliche qualitative und quantitative Unterschiede der verschiedenen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate und bestätigen die relativen Effekte der einzelnen Verbindungen zur Inhibierung der Zellproliferation. CKIA, CKIB und CKIE zeigten im Gegensatz zu CKIC und CKID bereits bei Konzentrationen unter 1 µmol/l einen vollständigen Arrest der Zellen in der G₁-Phase, vergleichbar mit den durch 72 Stunden Serumentzug erhaltenen G₁-Phasenanteilen der Zellen. Die Kalkulation der halbmaximalen Effektkonzentrationen EC₅₀ für die einzelnen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate aus den Zellzyklusdaten der HT-29-Zellen identifizierte CKIA mit 72 nmol/l als potenteste Zellzyklus-inhibierende Verbindung, gefolgt von CKIB (EC₅₀ 172 nmol/l) und CKIE (EC₅₀ 214 nmol/l). Die Fähigkeit der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine CKIC und CKID zur Zellzyklusinhibierung ist deutlich niedriger (EC₅₀ > 1 µmol/l). Die EC₅₀-Werte können bei Berücksichtigung der spezifischen Effekte auf die Affinität der Verbindungen zu Cdk4/6 zurückgeführt werden.

Obwohl ein direkter Vergleich der Ergebnisse aufgrund von Variationen in der Messmethode und den Bedingungen nicht möglich ist, korreliert der für CKIA erhaltene EC₅₀-Wert sehr gut mit dem von VanderWel *et al.* bestimmten IC₅₀-Wert für CKIA von 104 nmol/l für die Wachstumsinhibierung der humanen Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116 [100]. Dies bestätigt die sehr gute Eignung der durchflusszytometrischen Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung als schnelle und reproduzierbare Methode zur Evaluierung und Klassifizierung selektiver Zellzyklus-inhibitorischer Verbindungen. Die effektive Konzentration einer Verbindung in Tumorzellen ist abhängig von der Zelllinie und Organherkunft. Insbesondere im Vergleich zu *in vitro*-Kinase-Assays, die keine Rückschlüsse auf die Eigenschaften in Zellen zulassen, können mit Hilfe der Durchflusszytometrie aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. So kann anhand dieser Methode die Wirkung im zellulären System mit funktionaler Zellmembran- und Kernmembran-Barriere beurteilt werden.

4.2.3 Hemmung des Cdk4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalwegs

Die molekularen Ursachen der Wachstumshemmung und des Zellzyklusarrests sollten durch die Untersuchung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-abhängigen Effekte auf den von den Cdk4/6-Cyclin D-Komplexen ausgelösten Signalweg geklärt werden. Basierend auf den derzeit verstandenen Funktionen der Cdk4/6 für die Zellzyklusprogression sollte der G₁-Phasenarrest auf eine Inhibierung der Phosphorylierung funktionaler Retinoblastom-Proteine (pRb) zurückzuführen sein. Für einige Tumoren sind Mutationen des *rb*-Tumorsuppressor-Gens beschrieben [132, 133]. Die Mutationen resultieren in der Bildung von nichtfunktionalen pRb-Proteinen, welche die Regulierung durch die Cdk-induzierte

Phosphorylierung umgehen und somit eine wirkungslose Behandlung dieser Tumorzellen mit Cdk4/6-Inhibitoren zur Folge hätten [19]. Die Charakterisierung der HT-29-, FaDu- und THP-1-Zelllinien identifizierten einen normalen pRb-Status [132, 134-136], was auf die Existenz von funktionalem pRb-Protein in diesen Zellen hinweist.

Für pRb sind mehr als 10 regulatorische Phosphorylierungsstellen *in vivo* beschrieben worden [137], wobei die Aminosäuren Serin-780 und Serin-795 effizient und spezifisch durch Cdk4/6-Cyclin D-Komplexe phosphoryliert werden, nicht jedoch durch Cdk2-Cyclin E/A [30, 31]. Die Detektion der pRb-Serin-780-Phosphorylierung 24 Stunden nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten erfolgte mit spezifischen Antikörpern, bei Identifizierung einer charakteristischen Bande für pRb bei ca. 110 kDa. In allen untersuchten Zelllinien wurde eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibierung der pRb-Phosphorylierung an Serin-780 gezeigt. Exemplarische, nicht abgebildete Experimente zur Phosphorylierung des pRb an Serin-795 demonstrierten ebenfalls die inhibierenden Eigenschaften der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine auf die Cdk4/6-Aktivität. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Zelllinien war besonders die größere Proteinmenge an pRb in FaDu-Zellen auffällig. Die übermäßige Proteinbiosynthese des pRb und größere Menge an phosphoryliertem pRb-Serin-780 in FaDu-Zellen könnte eine Erklärung für die bei gleichen Bedingungen beobachteten geringeren Effekte der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine im Vergleich zu den anderen untersuchten Tumorzelllinien sein. In Übereinstimmung mit den zuvor diskutierten Ergebnissen der Wachstums- und G₁-Phasen-Inhibierung wurden ebenso in Bezug auf die Inhibierung der Cdk4/6-Aktivität qualitative Unterschiede der einzelnen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine beobachtet. CKIA, CKIB und CKIE zeigten wiederholt deutlich stärkere Wirkung im Vergleich zu CKIC und CKID. Nach Inkubation mit hohen Konzentrationen an CKIA und CKIE wurde neben der verminderten pRb-Phosphorylierung eine geringere Gesamtproteinmenge an pRb in allen Zelllinien beobachtet. Die Einschränkung der pRb-Proteinbiosynthese konnte auch in einer humanen Brust-Karzinom-Zelllinie nach Inkubation mit dem Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivat PD 0183812 beobachtet werden, wurde jedoch nicht diskutiert [103]. Die Abnahme der Proteinmenge an pRb in den Zellen kann im Hinblick auf die Zellzyklus-Inhibierung nicht vollständig plausibel erklärt werden, da weniger pRb zur Bindung von E2F-Transkriptionsfaktoren und damit zur Repression der Genexpression zur Verfügung steht.

Die Phosphorylierung des pRb an verschiedenen Aminosäuren erfolgt im Fortgang des Zellzyklus chronologisch durch verschiedene Cdk-Cyclin-Komplexe je nach Phasenabschnitt. Im Anschluss an die Cdk4/6-vermittelte pRb-Phosphorylierung werden weitere Serin-Reste wie beispielsweise Serin-807 und Serin-811 durch Cdk2-Cyclin-

Komplexe phosphoryliert [138, 139]. Ergänzend zur Cdk4/6-spezifischen pRb-Phosphorylierung wurde beispielhaft für CKIA und CKIB die Inhibierung der Phosphorylierung von Serin-807 und Serin-811 in HT-29- und FaDu-Zellen gezeigt. Als Interpretation dieses Ergebnisses könnte einerseits die direkte Inhibierung der Cdk2-Cyclin-Komplexe durch CKIA und CKIB angeführt werden. Aufgrund der 80-fach höheren Selektivität von CKIA für Cdk4 im Vergleich zu Cdk2-Komplexen aus den Kinase-Assays nach VanderWel *et al.* [100] wird dies bei den verwendeten Konzentrationen jedoch als eher unwahrscheinlich betrachtet. Vielmehr wird eine Inhibierung der G₁-Phase bzw. der gesamten Zellzyklusprogression durch das Ausbleiben der Cdk4/6-vermittelten pRb-Phosphorylierung in den Tumorzellen angenommen. Als Konsequenz der verminderten pRb-Phosphorylierung wurde ein inhibierender Einfluss auf die Transkription von Genen durch Bindung von E2F-Transkriptionsfaktoren beschrieben [33]. Dabei regulieren die DNA-bindenden E2F-Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl von Genen [34], die für aktive Komponenten der DNA-Replikation, wie beispielsweise der DNA-Polymerase α und deren Cofaktor PCNA zur Entwindung der DNA, sowie der Zellzyklus-Kontrolle, wie unter anderem Cyclin E zur Aktivierung der Cdk2 oder E2F-1 selbst kodieren [140]. Die verminderte Phosphorylierung des pRb durch Inhibierung der Cdk4 könnte demnach zur Hemmung der mRNA-Expression von Cyclin E führen, welches im Fortgang der G₁-Phase essentiell für die Aktivierung der Cdk2 ist. Die geringe Genexpression des Cyclin E limitiert die Aktivität der Cdk2 in der G₁-Phase und inhibiert die weitere Phosphorylierung des pRb.

Exemplarisch für den Einfluss der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate CKIA, CKIB und CKIE auf die E2F-gesteuerte Genexpression im Cdk4/6-aktivierten Signalweg wurde die mRNA-Expression von E2F-1 und PCNA bestimmt. In allen Zelllinien wurde nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante konzentrationsabhängige Einschränkung der mRNA-Transkription von E2F-1 und PCNA nachgewiesen. Das relative Ausmaß der Inhibierung der mRNA-Expression in den einzelnen Zelllinien korreliert mit den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen zur pRb-Phosphorylierung und der Zellzyklusphasenverteilung. Die deutlich verminderte E2F-1-Expression in den Zellen könnte zudem eine Ursache für die insgesamt gefundene Inhibierung der pRb-Proteinbiosynthese bei hohen Konzentrationen an CKIA und CKIE sein. Der geringere Anteil an E2F-1-Protein als Folge der geringeren mRNA-Expression könnte sich rückkoppelnd auf die Synthese des pRb in den Zellen auswirken. Dies wurde allerdings noch nicht in der Literatur beschrieben und müsste nachgewiesen werden. Des Weiteren kann vermutet werden, dass auch die Transkription anderer E2F-kontrollierter Gene im

Signalweg durch die Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-vermittelte Inhibierung der Cdk4/6 negativ beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse zur Wirkung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine auf den Cdk4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalweg in Zellen zeigen die Unterbrechung der E2F-Kaskade zur Aktivierung der Gentranskription als Konsequenz der Inhibierung der Cdk4/6-spezifischen pRb-Phosphorylierung.

Zusammenfassend betrachtet, wurde die antiproliferative Aktivität der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate infolge der Initiierung des G₁-Phasenarrests und spezifischen Inhibierung des Cdk4/6-Cyclin D-pRb-E2F-Signalwegs in den Zellen hervorgerufen. Schlussfolgernd aus den biochemischen Aktivitäten und biologischen Effekten wurde erstmals für CKIA, CKIB und CKIE eine klare Inhibierung ihrer Zielenzyme Cdk4/6 in Zellen gezeigt, wobei bei niedrigen Konzentrationen bis in den Bereich der EC₅₀-Werte ein hohes Maß an Selektivität für diese Kinasen in der zellulären Umgebung angenommen wird. Dies war die Voraussetzung für radiopharmakologische Untersuchungen mit den ausgewählten radiomarkierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE *in vitro* und *in vivo*.

4.3 ¹²⁴I- und ¹⁸F-markierte Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine als Radiotracer für die funktionelle Bildgebung der Cdk4/6

Basierend auf den Strukturen der Verbindungen CKIA, CKIB und CKIE wurden geeignete Strategien zur Radiomarkierung entwickelt (Dissertation Lena Köhler [112]). Die Iod-enthaltenden Verbindungen CKIA und CKIB bieten die Möglichkeit einer isotopen Markierung mit dem Positronen-emittierenden Nuklid ¹²⁴I, was aufgrund seiner Halbwertszeit von 4,18 Tagen eine ausgedehnte radiopharmakologische Charakterisierung und PET-Bildgebungsstudien im erweiterten Zeitrahmen erlaubt. Allerdings sind die im Vergleich zu anderen Positronenemittern geringeren spezifischen Aktivitäten, die recht hohe Positronenenergie und der geringe Anteil der Positronenemission des ¹²⁴I mit Nachteilen verbunden, was sich vor allem in der schlechten räumlichen Auflösung der PET-Bilder äußert [109]. Für die Entwicklung von PET-Radiopharmaka wird ¹⁸F unter anderem aufgrund der geringen Reichweite bei hohem Anteil der Emission der Positronen und günstigen Halbwertszeit von ca. 110 Minuten als optimales PET-Nuklid angesehen. Mit [¹⁸F]CKIE wurde die Synthese eines ¹⁸F-markierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidins mit ähnlichen Cdk4/6-inhibierenden Eigenschaften wie CKIA und CKIB realisiert. Alle radiomarkierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine

wurden in einer angemessenen Zeit, mit hohen reproduzierbaren radiochemischen Ausbeuten, guten Reinheiten und ausreichenden spezifischen Aktivitäten für die radiopharmakologische Charakterisierung zur Verfügung gestellt [112].

Die Radiomarkierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine CKIA, CKIB und CKIE ermöglichte erstmals die quantitative und bildhafte Verfolgung der metabolischen Wege dieser vielversprechenden Cdk4/6-inhibierenden Verbindungen *in vivo*. Die radiopharmakologischen Eigenschaften von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurden in Untersuchungen zur zellulären Radiotracer-Aufnahme, der metabolischen Stabilität und der Bioverteilung bei Ratten sowie abschließend in Kleintier-PET-Untersuchungen bei FaDu-Tumor-tragenden Mäusen charakterisiert.

4.3.1 *In vitro*-Untersuchungen mit den radiomarkierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen

Stabilität

Für die Anwendung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine als Radiotracer *in vivo* sind neben der biologisch-biochemischen Wirkungsweise auch die radiopharmakologischen Eigenschaften *in vitro* ausschlaggebend. Die sehr guten Stabilitäten der Radiotracer [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE in den Lösungsmitteln und Puffersystemen waren Voraussetzung für die zellulären Untersuchungen und geeignet für die nachfolgenden innerhalb weniger Stunden durchgeführten Bildgebungsstudien *in vivo* mittels PET. *Ex vivo*-Stabilitätsuntersuchungen in Rattenplasma lieferten keine Hinweise auf einen schnellen enzymatischen Abbau oder die Deiodierung/ Defluorierung der radiomarkierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine, was vielversprechend für die Anwendung *in vivo* war.

*Zelluläre Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine*

Die Radiotracer-Studien verdeutlichten eine schnelle und sehr beachtliche Aufnahme von [¹²⁴I]CKIA und [¹²⁴I]CKIB bis ca. 1300 %ID/ mg Protein nach 2 Stunden in die humanen Zelllinien bei 37 °C. Die initialen Aufnahmekinetiken beider ¹²⁴I-markierten Verbindungen sind vergleichbar. In der späteren Aufnahmephase (über 1 Stunde) wurde für [¹²⁴I]CKIB eine Sättigung erreicht, während die Aufnahme für [¹²⁴I]CKIA bis 5 Stunden weiter anstieg. Diese Beobachtung ist konsistent zur inhibitorischen Wirksamkeit der beiden Verbindung CKIA und CKIB. Die zelluläre Aufnahme von [¹⁸F]CKIE war bei 37 °C deutlich geringer (maximal 50 %ID/ mg Protein nach 2 Stunden), was auch anhand der initialen Kinetik deutlich wurde. Ungeachtet der quantitativen Unterschiede der einzelnen Radiotracer zeigte keine der radiomarkierten Verbindung signifikante Unterschiede in der zeitabhängigen Aufnahme zwischen den verschiedenen Zelllinien HT-29, FaDu und den THP-1-Makrophagen. Die Möglichkeit einer Tumorzell-spezifischen Bildgebung mit Hilfe

der untersuchten Radiotracer infolge von Konzentrationsunterschieden der Cdk4/6 ist daher fraglich. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass das zelluläre Modell der aus der Tumorzelllinie THP-1 differenzierten Makrophagen durchaus Tumorzell-typische molekulare Charakteristika aufweisen kann und nur bedingt Eigenschaften natürlich vorkommender Makrophagen *in vivo* wiedergibt.

Bei einem Vergleich der Aufnahmezeiten der einzelnen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate wurden Hinweise auf strukturelle Einflüsse der Verbindungen gefunden. Die offensichtlichen quantitativen Unterschiede der Aufnahmen der ¹²⁴I-markierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine im Vergleich zu [¹⁸F]CKIE sind auf die strukturellen Unterschiede des CKIE - die Carboxymethyl-Seitenkette anstelle des Iod und den zusätzlichen Fluorethyl-Substituenten - zurückzuführen. Die strukturelle Divergenz des CKIE geht auch einher mit einer geringeren Lipophilie ($\log D_{7,4}$) im Vergleich zu CKIA. Allerdings wurde für [¹²⁴I]CKIB der geringste Lipophilie-Wert ermittelt, weshalb die deutlich geringere Aufnahme des [¹⁸F]CKIE nicht unmittelbar auf die Lipophilie-Eigenschaften zurückgeführt werden kann. Vielmehr muss die strukturelle Divergenz mit einem Einfluss auf spezifische Transportprozesse in Zusammenhang gebracht werden.

Die signifikant geringeren Aufnahmewerte aller untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine bei 4°C weisen auf energieabhängige Mechanismen hin. Dabei muss über den Beitrag verschiedener energieabhängiger Transportproteine mit unterschiedlichen Affinitäten zur Aufnahme von [¹²⁴I]CKIA und [¹²⁴I]CKIB bzw. [¹⁸F]CKIE diskutiert werden. Allerdings kann auch die Möglichkeit der passiven oder erleichterten Diffusion dieser Verbindungen durch die Zellmembran aufgrund der geringfügigen Zunahme der Radiotracer-Aufnahme bei 4°C nicht komplett ausgeschlossen werden.

Die Blockierung der Aufnahme von [¹⁸F]CKIE mit nichtradioaktivem CKIE bei 37°C bis auf Werte, die in einfachen Aufnahmeexperimenten bei einer Temperatur von 4°C erhalten wurden, unterstützen die Vermutung spezifischer Transportprozesse für die Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine.

Die schnelle und spezifische Aufnahme von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE in die Tumorzellen bei 37°C ist eine wichtige Voraussetzung zur Charakterisierung der Radiotracer *in vivo*, allerdings deutet die Zelltyp-unabhängige Anreicherung auf eine geringe Abhängigkeit der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Akkumulation vom Cdk4/6-Status der Zellen hin. Vielmehr scheinen Transportprozesse geschwindigkeitsbestimmend für die Aufnahme der untersuchten Radiotracer in die Zellen zu sein.

*Mechanistischer Transport der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine*

In der Literatur sind keine Informationen zu spezifischen Transportvorgängen für Verbindungen aus der Klasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine veröffentlicht. Experimente unter Energiemangel-Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit lieferten überraschende Ergebnisse zum Aufnahmemechanismus der Radiotracer. Die Blockade energieabhängiger Prozesse durch Natriumazid und Valinomycin als Inhibitoren der ATP-Synthese beeinflusste die Radiotraceraufnahme von [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE kaum. Azidionen blockieren irreversibel die Sauerstoffbindungsstelle im aktiven Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase und inhibieren somit die ATP-Synthese in den Mitochondrien der Zellen. Valinomycin ist ein Ionophor, das selektiv Kaliumionen bindet und durch die Zellmembran transportiert [141]. Durch den Transport bricht das Membranpotential und somit auch die ATP-Synthese in den Zellen zusammen, was wiederum zur Inhibierung aktiver Energie-verbrauchender Transportprozesse führt. Als Konsequenz der gezeigten Resultate ist die aktive energieabhängige Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine über beispielsweise Protonengradienten- bzw. ATP-gekoppelte Transporter, die Internalisierung über rezeptorvermittelte Endozytose und die Akkumulation als Folge energieabhängiger intrazellulärer Folgereaktionen unwahrscheinlich. Die Mechanismen der temperaturabhängigen Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine bleiben unverstanden. Gleichzeitig zu den energieabhängigen Studien wurde ausgehend von einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine mit ATP, impliziert durch die Wechselwirkung des Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivats PD 0332991 mit Strukturelementen am Eingang der ATP-Bindungstasche der Cdk6 [102], die Aufnahme über spezifische Transportproteine untersucht. Dabei können Nukleosid-Transporter für die aktive Aufnahme dieser Verbindungen vermutet werden. Nukleosid-Transporter vermitteln den Transport physiologischer Nukleoside in die Zellen und wurden bereits in Zusammenhang mit der Aufnahme antitumorale Nukleosid-ähnlicher Wirkstoffe beschrieben [142]. Unter den Nukleosid-Transportern werden zwei Gruppen unterschieden: die ENT (*equilibrative nucleoside transporters*), welche die erleichterte Diffusion von Purin- und Pyrimidin-Nukleosiden/ Nukleobasen mit dem Konzentrationsgefälle vermitteln, und die CNT (*concentrative nucleoside transporters*), die den an einen elektrochemischen Natriumionen-Gradienten gekoppelten Transport von Nukleosiden entgegen des Konzentrationsgefälles ermöglichen [143]. Die Untersuchung der Rolle von CNT für die Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine gestaltet sich, ungeachtet der Indizien aus Experimenten zum energieabhängigen Transport, aufgrund des Fehlens von spezifischen pharmakologischen Inhibitoren für diese Nukleosid-Transporter schwierig. Der mögliche Beitrag von ENT konnte zumindest ansatzweise mit Hilfe des Vasodilator-Wirkstoffs

Dipyridamol, einem nicht-nukleosidischen Inhibitor des ENT1 und ENT2 untersucht werden [144, 145]. ENT3 und ENT4 dagegen sind unempfindlich gegenüber diesem Inhibitor [143]. Aus den Experimenten mit Dipyridamol ergaben sich kontroverse Ergebnisse mit geringem Einfluss auf die Aufnahme von [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE, was auf einen untergeordneten Beitrag der ENT zum Transport der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine schließen lässt.

In Zusammenhang mit dem Transport von Nukleosid-Analoga wurde außerdem das Transmembranprotein MRP5 (*multidrug resistance protein 5*) beschrieben [146]. MRP5 gehört ebenso wie MDR1 P-Glycoprotein (*multidrug resistance 1 P-glycoprotein*) zur prominenten Proteinfamilie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette proteins*), die hauptverantwortlich für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber einem breiten Spektrum antitumoraler Wirkstoffe während der Chemotherapie sind. ABC-Transporter transportieren energieabhängig und sehr effizient Wirkstoffe entgegen ihres Konzentrationsgradienten aus Zellen hinaus und verhindern somit die Akkumulation therapeutisch-wirksamer Konzentrationen dieser Medikamente in den Zellen [147]. Untersuchungen zum Einfluss der ABC-Transporter auf die zelluläre Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine wurden mit Hilfe der Inhibitoren Verapamil und Sulfinpyrazon durchgeführt. Verapamil ist ein universeller Kalziumkanal-Blocker und Inhibitor des primär aktiven Efflux-Transporters MDR1 P-Glycoprotein [147, 148]. Das Pyrazolidin-Derivat Sulfinpyrazon wurde unter anderem als Inhibitor des Transporters MRP5 beschrieben [146, 149]. Die Inkubation der Zellen mit Verapamil bzw. Sulfinpyrazon hatte kaum bzw. keine Auswirkungen auf die Aufnahme der Radiotracer [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE. Aufgrund dessen kann einerseits geschlussfolgert werden, dass kein aktiver zellulärer Austransport der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine über ABC-Transporter stattfindet. Dieser Befund ist für eine perspektivische therapeutische Anwendung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine zur Tumorbehandlung von großem Vorteil. Des Weiteren kann ausgeschlossen werden, dass MRP5 in Beziehung mit dem Eintransport dieser Verbindungen in Zellen steht.

Die tatsächlich verantwortlichen Mechanismen zur Aufnahme der untersuchten Radiotracer bleiben weiterhin unverstanden und müssen in noch folgenden Untersuchungen identifiziert werden.

4.3.2 *In vivo*-Untersuchungen mit den radiomarkierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen

Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung bei Nagetieren

Anhand der Untersuchungen zur Stabilität und Bioverteilung von [^{124}I]CKIA, [^{124}I]CKIB und [^{18}F]CKIE bei Ratten bzw. der PET-Untersuchungen bei Mäusen wurden erstmals *in vivo*-Interaktionen und -Kinetiken sowie der Metabolismus im Blut zirkulierender

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate charakterisiert. Als grundlegende Stoffwechseleigenschaft aller drei Radiotracer wurde eine sehr schnelle, innerhalb weniger Minuten stattfindende Eliminierung aus dem Blut und die dem lipophilen Charakter der Verbindungen geschuldete primäre Resorption in die Leber identifiziert. Die Leber ist als zentrales Organ im Intermediärstoffwechsel zugleich verantwortlich für die Entgiftung und Eliminierung körperfremder Wirkstoffe. Dabei werden lipophile Xenobiotika in der Leber transformiert und in wasserlöslicher Form exkretorischen Organen zugeführt [150]. Interessanterweise erfolgt für [¹⁸F]CKIE eine deutlich schnellere Abnahme der Aktivität in der Leber als für [¹²⁴I]CKIA bzw. [¹²⁴I]CKIB, was auf einen schnellen Abbau des [¹⁸F]CKIE in der Leber hinweist. Die Ausscheidung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine und ihrer Metaboliten erfolgt vorwiegend hepatobiliär über den Darm. Allerdings wurde ebenso eine anteilige Aufnahme in die Nieren und renale Ausscheidung über die Blase beobachtet.

Untersuchungen zur Stabilität der Radiotracer verdeutlichten die Metabolisierung von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE im Blut von Ratten. Anhand der Chromatogramme wurden im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen hydrophilere Metaboliten detektiert, die jedoch nicht näher charakterisiert wurden. Spekulativ wird ein enzymatischer Abbau der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine und die Umwandlung in exkretierbare Stoffwechselprodukte durch Hydrolasen bzw. Oxidoreduktasen angenommen. Des Weiteren muss die Dehalogenierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate durch ubiquitär im Organismus vorkommende Dehalogenasen betrachtet werden. Eine Radiodeiodierung der Verbindungen [¹²⁴I]CKIA und [¹²⁴I]CKIB sollte mit einer ansteigenden Aktivität aufgrund der Aufnahme von freiem [¹²⁴I]Iodid über Natrium-Iodid-Symporter in die Schilddrüse korrelieren [151]. Die Ergebnisse der Bioverteilung und Zeit-Aktivitäts-Kurven aus den PET-Untersuchungen zeigten zwar einen langsamen zeitabhängigen Anstieg der Konzentration radioaktiver Metaboliten in der Schilddrüse, allerdings scheint dieser katabole Weg nicht hauptverantwortlich für den Metabolismus dieser Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine zu sein. Die erhöhte *in vivo*-Stabilität von Iod-Kohlenstoff-Bindungen an konjugierten Systemen im Vergleich zu aliphatischen Verbindungen wurde bereits für andere Radioiod-markierte Tracer beschrieben [152]. Die Radiodefleurierung von [¹⁸F]CKIE kann anhand der Einlagerung des [¹⁸F]Fluorids in Skelettknochen und die Aufnahme in die Magenwand über Halogenidionen-Transporter charakterisiert werden [153]. Aus den Bioverteilungsstudien wurden keine Hinweise auf eine Defleurierung des [¹⁸F]CKIE entnommen. Die Autoradiogramme und PET-Aufnahmen 60 Minuten nach Injektion des Radiotracers zeigten allerdings Anreicherungen radioaktiver Substanzen im Skelett und in der Magenwand von Mäusen, was für eine Defleurierung als Bestandteil des Metabolismus von [¹⁸F]CKIE *in vivo* spricht.

Die Charakterisierung der Radiotracer wiesen kaum offenkundige Unterschiede der *in vivo*-Eigenschaften von [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB auf. Im Vergleich zu den ^{124}I -markierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen wurden für [^{18}F]CKIE allerdings charakteristische Unterschiede der Verteilung in einigen Organen festgestellt. Auffällig im Gegensatz zu den Ergebnissen für [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB war die Anreicherung radioaktiver Substanzen im Gehirn nach Injektion von [^{18}F]CKIE bei Mäusen und Ratten. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von [^{18}F]CKIE wird infolge der geringen Strukturunterschiede im Vergleich zu [^{124}I]CKIA bzw. [^{124}I]CKIB als unwahrscheinlich betrachtet. Vielmehr wird ein Metabolit von [^{18}F]CKIE als Ursache für die detektierte Aktivität im Gehirn angenommen. Sehr wahrscheinlich ist die Hydrolyse des [^{18}F]CKIE und die Entstehung von [^{18}F]Fluorethanol oder einem ähnlichen Derivat dieses Metaboliten, die als hirngängig beschrieben wurden [154, 155]. Als Zwischenprodukte infolge weiterer oxidativer Metabolisierungsprozesse sind die Bildung von [^{18}F]Fluoracetaldehyd durch die Leberenzyme Alkoholdehydrogenase bzw. Katalase sowie anschließende Reaktionen zu [^{18}F]Fluoracetat und [^{18}F]Fluorzitrat denkbar [156]. Bei einem Nachweis der primären Metabolisierung von CKIE zu Fluorethanol und Fluorzitrat ist die nachgewiesene Toxizität dieser Verbindungen bei Ratten eine entscheidende Limitation für die Anwendung von CKIE, insbesondere als Therapeutikum zur Tumorbehandlung [157]. Die Metabolisierung von [^{18}F]CKIE in der Leber und der Übertritt der Metaboliten in das Blut der Tiere, könnten gleichzeitig eine Erklärung für die schnellere Abnahme der Aktivität in der Leber im Vergleich zu [^{124}I]CKIA bzw. [^{124}I]CKIB sein.

Die beobachtete Anreicherung radioaktiver Substanzen im Bereich der Haut könnte ebenfalls die Metabolisierung des [^{18}F]CKIE und Konzentrierung der lipophilen Metaboliten in den Fettschichten bzw. im Lymphsystem der Haut als Ursache haben.

Weiterhin auffällig ist die aus den Bioverteilungsstudien in Ratten, nicht jedoch aus den PET-Aufnahmen in Mäusen ersichtliche hohe Anreicherung radioaktiver Substanzen in den Lungen nach Injektion von [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB. Dieses Phänomen könnte einerseits auf molekulare und physiologische Unterschiede der Tierspezies zurückzuführen sein. Unabhängig davon besitzt die Lunge eine komplexe Gewebsarchitektur von Alveolen mit einer enorm großen Oberfläche. Die Alveolen sind von einem dichten Netz der Lungenkapillaren umwoben und ermöglichen einen regen Stoffaustausch [158]. Deshalb könnte andererseits die hohe Lungenakkumulation nach Injektion von [^{124}I]CKIA und [^{124}I]CKIB durch Lipophilie-bedingte Diffusionseffekte der Radiotracer begründet werden. Genaue Rückschlüsse auf mechanistische Prozesse können jedoch nicht gezogen werden.

Auf der Basis der erhaltenen *in vivo*-Daten müssen die kurze biologische Halbwertszeit und schnelle Eliminierung der Radiotracer aus dem Blut als limitierende Faktoren für die Anreicherung im Zielgewebe und Bildgebung der Cdk4/6 in Tumoren mittels PET angesehen werden. Allerdings sollte in Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse in die klinische Anwendung der schnelle Metabolismus der Nagetiere im Vergleich zum menschlichen Organismus berücksichtigt werden.

Anreicherung im Tumorgewebe

Bei den PET-Untersuchungen mit [¹²⁴I]CKIA und [¹²⁴I]CKIB in FaDu-Tumor-tragenden Mäusen wurden nur marginale Anreicherungen radioaktiver Substanzen im Bereich des Tumors festgestellt. Zudem wird eine klare Zuordnung und Quantifizierung der Aktivität im Partialvolumen durch die schlechte Auflösung der PET-Bilder aufgrund der hohen mittleren Positronenenergie des ¹²⁴I erschwert. Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung auf die Angabe des Tumor-zu-Muskel-Verhältnisses verzichtet.

Für [¹⁸F]CKIE konnte 60 Minuten nach Injektion in FaDu-Tumor-tragende Mäuse eine Akkumulation im Tumorgewebe beobachtet werden. Insbesondere im proliferierenden Randbereich des Tumors wurden anhand der PET- und Autoradiographie-Untersuchungen Anreicherungen radioaktiver Substanzen detektiert. Im Gegensatz dazu zeigte der nekrotische Zentralbereich des Tumors keine Anreicherung. Dies veranschaulicht eine mögliche Akkumulation des Radiotracers [¹⁸F]CKIE in Zellzyklus-aktiven Zellen des Tumors und kann in Hinblick auf die Bildgebung der Cdk4/6 positiv gewertet werden. Die nahezu ubiquitäre Verteilung des Raditracers bzw. seiner Metaboliten und das konstante, geringe Verhältnis der Aktivität im Tumor und im Skelettmuskel weisen dagegen auf eine unspezifische Anreicherung hin. Dabei könnten die ausgeprägte Angiogenese und die ungeordnete, poröse Gefäßstruktur im Tumorgewebe ausschlaggebend für eine höhere Anreicherung der radioaktiven Substanzen im Vergleich zum Muskel sein. Die defekte Endothelschicht der Blutgefäße in Tumoren soll für die gesteigerte passive Diffusion von Molekülen als Tumorcharakteristisches Phänomen verantwortlich sein.

Schlussfolgernd aus den Ergebnissen für [¹²⁴I]CKIA und [¹²⁴I]CKIB sowie für [¹⁸F]CKIE wird keine Cdk4/6-spezifische Aufnahme in das Tumorgewebe oder andere Organe angenommen. Es bleibt zu klären, ob eine längere Verweildauer und höhere Stabilität der Radiotracer die Chance der Cdk4/6-abhängigen Gewebeanreicherung erhöht hätten oder transportmechanistische Effekte allein ausschlaggebend für die Anreicherung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine in Zellen und Geweben sind.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Zellzyklus-regulierenden Kinasen Cdk4/6 sind sowohl aus therapeutischer, als auch aus diagnostischer Sicht attraktive Zielmoleküle für neuartige Entwicklungen in der Tumorforschung. Die Grundlage beider Anwendungskonzepte bildet die Identifizierung von Substanzen mit einer möglichst hohen Spezifität und Selektivität für die Cdk4/6. Die entscheidenden Kriterien zur Anwendbarkeit dieser Wirkstoffe unterscheiden sich jedoch für den therapeutischen und diagnostischen Ansatz. Das therapeutische Konzept verlangt die effektive funktionelle Beeinflussung der Cdk4/6 im Tumor. Für die Bildgebung ist nicht die inhibitorische Wirksamkeit, sondern vielmehr die Cdk4/6-spezifische Anreicherung im Tumor ausschlaggebend [159].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen einerseits die Eignung und Effektivität der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine CKIA, CKIB und CKIE hinsichtlich der Inhibierung der Cdk4/6-vermittelten Zellzyklusprogression. Die daraus resultierende Hemmung der Tumorzellproliferation belegt die Brauchbarkeit dieser Substanzen für die Therapie von Tumoren. Andererseits zeigen die radiopharmakologischen Untersuchungen deutliche Limitationen dieser Verbindungen als Radiotracer für die nicht-invasive *in vivo*-Bildgebung der Cdk4/6. Die schnelle Eliminierung aus dem Blut sowie unspezifische Tumoranreicherung der radioaktiv markierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE im Mausmodell erfordern eine kritische Bewertung des Nutzens dieser Radiotracer für die klinische Anwendung zur Diagnose von Tumoren. Die vorangestellte Hypothese zur Eignung selektiver, therapeutisch vielversprechender Cdk4/6-Inhibitoren für die funktionelle Charakterisierung der Cdk4/6 in Tumoren *in vivo* mittels Positronen-Emissions-Tomographie muss zumindest für die untersuchten Vertreter aus der Verbindungsklasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine revidiert werden.

Aus den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich Ansätze fortführender Untersuchungen und zukünftiger Forschung ableiten:

Die Inhibierung der Tumorzellproliferation *in vitro* durch pharmakologisch relevante Konzentrationen an CKIA, CKIB und CKIE unterstützt die weiterführende Evaluierung dieser Cdk4/6-Inhibitoren zur Tumorthherapie. Die Testung des therapeutischen Potentials von CKIA, CKIB und CKIE zur Behandlung von Tumorerkrankungen *in vivo* sollte perspektivisch in Untersuchungen mit Tumor-tragenden Tiermodellen realisiert werden. In Hinblick auf die Evaluierung der Cdk4/6-inhibierenden Verbindungen muss dabei die unterschiedliche Abhängigkeit der jeweiligen humanen Tumorentität von der Cdk4/6-Kinaseaktivität berücksichtigt werden. Interessant wäre insbesondere ein Vergleich der therapeutischen Effektivität dieser Cdk4/6-Inhibitoren zwischen stark Cdk4/6-

synthetisierenden Tumorentitäten und Tumoren mit moderater Cdk4/6-Proteinbiosynthese. Unter Berücksichtigung des Erfolgs des bereits in klinischen Studien evaluierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidins PD 0332991 zur Tumorbehandlung sollte bei einem erfolgreichen Abschluss der tierexperimentellen Studien später ebenfalls die klinische Evaluierung von CKIA, CKIB bzw. CKIE in Betracht gezogen werden.

In Hinblick auf die Interpretation der therapeutischen Studien sind parallel dazu fortführende Untersuchungen zu Mechanismen der Aufnahme der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine von großer Bedeutung. Die Identifizierung der spezifischen Transportprozesse trügen zum besseren Verständnis der effektiven Wirksamkeit verschiedener Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine bei und könnte Informationen für das Design neuer potenter Cdk4/6-Inhibitoren liefern. Des Weiteren ermöglicht die Aufklärung der Aufnahmemechanismen eine Bewertung der spezifischen Tumoranreicherung von Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivaten in Abhängigkeit des Vorkommens möglicher Transportproteine in den Zellen. Zur Vervollständigung sollte außerdem die Bindungsaffinität zu Transportproteinen sowie zur Cdk4/6 anhand von Dissoziationskonstanten quantitativ erfasst werden.

Trotz nachteiliger Charakteristika für eine Cdk4/6-Bildgebung *in vivo*, konnten basierend auf den Bioverteilungs- und PET-Untersuchungen mit den radioaktiv markierten Verbindungen [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE erstmals Interaktionen dieser Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate mit Organen, deren pharmakologische Eigenschaften und das metabolische Verhalten bei Nagetieren analysiert werden. Die weitere Charakterisierung der Pharmakologie und des Metabolismus von Vertretern dieser Verbindungsklasse kann wichtige Hinweise für die Optimierung und funktionelle Derivatisierung der Strukturen hinsichtlich Stabilität, Blutzirkulation und Gewebespezifischer Wechselwirkung geben. Außerdem können die Ergebnisse der radiopharmakologischen Untersuchungen mit Radiotracer für die Evaluierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine in Hinblick auf die therapeutische Anwendung relevant sein und zum besseren Verständnis der effektiven Wirkung im Organismus beitragen. Dabei müssen jedoch die auftretenden Effekte bei unterschiedlicher Applikationsart (intravenös vs. oral) und bei Verabreichung unterschiedlicher Stoffmengen von Radiotracer (nanomol) bzw. Therapeutika (micro- bis millimol) berücksichtigt werden. Beispielsweise könnte die Substratsättigung von Stoffwechsellenzymen eine Verbesserung der biologischen Halbwertszeit und Blutzirkulation zur Folge haben.

Die Untersuchung optimierter Cdk4/6-selektiver Inhibitoren für die Charakterisierung und Therapie von Tumoren bleibt weiterhin ein interessanter Aspekt in der Tumorforschung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4/6) wurden als essentielle Enzyme für die Regulation des Zellzyklus mit kritischem Beitrag zur gestörten Zellproliferation während der Kanzerogenese identifiziert. Als Konsequenz davon erwiesen sich die Cdk4/6 als attraktive Zielproteine für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte zur pharmakologischen Tumorbehandlung. Verbindungen aus der Substanzklasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine zeigten vielversprechende inhibitorische Wirkungen auf die Aktivität der Cdk4/6 bei gleichzeitiger herausragender Selektivität gegenüber anderen Cdk. Anschließende Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* verdeutlichten das Potential einiger Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine zur Inhibierung des Tumorzellwachstums. Die Weiterentwicklung und Nutzung selektiver Cdk4/6-Inhibitoren zur funktionellen Charakterisierung der Cdk4/6 in Tumoren *in vivo* mit Hilfe der nicht-invasiven Bildgebungstechnik Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein neuer vielversprechender Forschungsansatz und von großem Interesse für die Evaluierung neuer Strategien zur Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die biochemische und radiopharmakologische Charakterisierung neuer potentieller Cdk4/6-Inhibitoren aus der Verbindungsklasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine und deren Bewertung hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit zur gezielten Cdk4/6-Inhibierung in ausgewählten Tumorzelllinien sowie ihres Potentials zur funktionellen Bildgebung der Cdk4/6 in Tumoren mittels PET am Tiermodell.

Die biochemische Charakterisierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine CKIA, CKIB, CKIC, CKID und CKIE hinsichtlich ihrer zellulären und molekularen Wirkung erfolgte in den kontinuierlich proliferierenden humanen Tumorzelllinien HT-29, FaDu und THP-1 und in differenzierten THP-1-Makrophagen. Die Zweckmäßigkeit der untersuchten Zelllinien zur Charakterisierung potentieller Cdk4/6-Inhibitoren wurde anhand von Studien zur mRNA-Expression und Proteinbiosynthese der Kinasen Cdk4/6 nachgewiesen. Des Weiteren wurde das Vorkommen der Cdk4/6 in den humanen Xenograft-Tumoren HT-29 und FaDu, sowie in ausgewählten Organen und Geweben von *nu/nu*-NMRI-Mäusen charakterisiert. *In vitro* wurden für alle untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine signifikante, konzentrations- und zeitabhängige inhibitorische Effekte auf die Tumorzellproliferation beobachtet. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen 24 Stunden nach Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils der

HT-29-, FaDu- und THP-1-Zellen in der G₁-Phase bis auf 90%. Für die nicht-prolierierenden THP-1-Makrophagen wurden bei Inkubation mit den Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen geringe Veränderungen ihrer Zellzahl und Zellzyklusphasenverteilung detektiert. Die zellulären Studien identifizierten deutliche qualitative und quantitative Unterschiede der untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate. Nanomolare Konzentrationen von CKIA, CKIB bzw. CKIE erzielten bereits 24 Stunden nach Inkubation deutliche Effekte, während für CKIC und CKID die 10- bis 100-fache Konzentration eingesetzt werden musste, um eine ähnliche Wirkung zu erhalten. Die molekularen Ursachen der Wachstumshemmung und des Zellzyklusarrests wurden durch Untersuchungen zur Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-abhängigen Beeinflussung des Cdk4/6-Cyclin D-Retinoblastom-E2F-Signalwegs geklärt. In allen Zelllinien wurde eine deutliche Inhibierung der Cdk4/6-spezifischen Phosphorylierung der Aminosäure Serin-780 des Retinoblastom-Proteins (pRb) beobachtet. Als Konsequenz dieser Inhibierung wurde für CKIA, CKIB und CKIE die signifikante konzentrationsabhängige Unterbrechung der Genexpression von E2F-1 und PCNA nachgewiesen.

Die Radiomarkierung der Cdk4/6-Inhibitoren CKIA und CKIB mit ¹²⁴I bzw. von CKIE mit ¹⁸F ermöglichte erstmals die Charakterisierung von *in vivo*-Interaktionen und des Metabolismus im Blut zirkulierender Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate. Die radiopharmakologischen Eigenschaften von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE wurden in Untersuchungen zur zellulären Radiotracer-Aufnahme, der metabolischen Stabilität und der Bioverteilung bei Ratten sowie abschließend in Kleintier-PET-Untersuchungen bei FaDu-Tumor-tragenden *nu/nu*-NMRI-Mäusen analysiert.

In vitro-Experimente mit [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE verdeutlichten eine hohe Stabilität und schnelle Aufnahme der Radiotracer in humane Tumorzellen bei 37°C. Allerdings deutet die Zelltyp-unabhängige Anreicherung auf eine geringe Abhängigkeit der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Akkumulation vom Cdk4/6-Status der Zellen hin. Die signifikant geringeren Aufnahmewerte aller untersuchten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine bei 4°C und die Blockierung der Aufnahme von [¹⁸F]CKIE mit nichtradioaktivem CKIE unterstützen die Vermutung spezifischer Transportmechanismen für die Aufnahme der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine.

Untersuchungen von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE *in vivo* identifizierten eine schnelle, innerhalb weniger Minuten stattfindende Eliminierung aus dem Blut und die primäre Aufnahme in die Leber als grundlegende Stoffwechseleigenschaft aller drei Radiotracer. Aus den PET-Untersuchungen mit [¹²⁴I]CKIA und [¹²⁴I]CKIB bei FaDu-Tumor-tragenden Mäusen wurden nur marginale Anreicherungen der radioaktiven Substanzen im Bereich des Tumors festgestellt. Für [¹⁸F]CKIE wurde eine Akkumulation im

proliferierenden Randbereich des Tumors beobachtet. Die schnelle Metabolisierung von [¹⁸F]CKIE im Blut sowie das konstante, geringe Verhältnis der Aktivität im Tumor zur Aktivität im Skelettmuskel wiesen allerdings auf eine unspezifische Anreicherung hin.

Schlussfolgernd aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde die Effektivität der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine CKIA, CKIB und CKIE hinsichtlich der Inhibierung der Cdk4/6-vermittelten Zellzyklusprogression gezeigt. Die antiproliferative Aktivität der Substanzen unterstützt eine weiterführende Evaluierung dieser Cdk4/6-Inhibitoren zur pharmakologischen Tumorthherapie.

Auf der Basis der erhaltenen radiopharmakologischen Ergebnisse werden die kurze biologische Halbwertszeit und unspezifische Tumoranreicherung von [¹²⁴I]CKIA, [¹²⁴I]CKIB und [¹⁸F]CKIE als limitierende Faktoren für die Eignung dieser Verbindungen als Radiotracer zur nicht-invasiven Bildgebung der Cdk4/6 im Zielgewebe mittels PET angesehen. Es bleibt zu klären, ob eine längere Verweildauer und höhere Stabilität radiomarkierter Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine im Blut die Chance der Cdk4/6-spezifischen Gewebeanreicherung erhöhen oder Transport-mechanistische Effekte allein ausschlaggebend für die Anreicherung in Zellen und Geweben sind.

Die Untersuchung optimierter Cdk4/6-selektiver Inhibitoren für die Charakterisierung und Therapie von Tumoren bleibt weiterhin ein interessanter Aspekt in der Tumorforschung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100** (2000) 57-70.
- [2] Norbury, C.; Nurse, P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61** (1992) 441-70.
- [3] Pines, J. Protein kinases and cell cycle control. *Semin Cell Biol* **5** (1994) 399-408.
- [4] Malumbres, M.; Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30** (2005) 630-41.
- [5] Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13** (1997) 261-91.
- [6] Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9** (2009) 153-66.
- [7] Cruz, J. C.; Tsai, L. H. A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **14** (2004) 390-4.
- [8] Zhang, J.; Cicero, S. A.; Wang, L.; Romito-Digiacomio, R. R.; Yang, Y.; Herrup, K. Nuclear localization of Cdk5 is a key determinant in the postmitotic state of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008) 8772-7.
- [9] Lolli, G.; Johnson, L. N. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* **4** (2005) 572-7.
- [10] Akoulitchev, S.; Chuikov, S.; Reinberg, D. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407** (2000) 102-6.
- [11] Garriga, J.; Grana, X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* **337** (2004) 15-23.
- [12] Kasten, M.; Giordano, A. Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* **20** (2001) 1832-8.
- [13] Hu, D.; Valentine, M.; Kidd, V. J.; Lahti, J. M. CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *J Cell Sci* **120** (2007) 2424-34.
- [14] Yokoyama, H.; Gruss, O. J.; Rybina, S.; Caudron, M.; Schelder, M.; Wilm, M.; Mattaj, I. W.; Karsenti, E. Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *J Cell Biol* **180** (2008) 867-75.
- [15] Chen, H. H.; Wang, Y. C.; Fann, M. J. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **26** (2006) 2736-45.
- [16] Chen, H. H.; Wong, Y. H.; Genevriere, A. M.; Fann, M. J. CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **354** (2007) 735-40.
- [17] Motokura, T.; Arnold, A. Cyclins and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1155** (1993) 63-78.
- [18] Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **374** (1995) 131-4.
- [19] Shapiro, G. I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* **24** (2006) 1770-83.
- [20] Hanks, S. K. Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987) 388-92.
- [21] Meyerson, M.; Enders, G. H.; Wu, C. L.; Su, L. K.; Gorka, C.; Nelson, C.; Harlow, E.; Tsai, L. H. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* **11** (1992) 2909-17.
- [22] Ciemerych, M. A.; Sicinski, P. Cell cycle in mouse development. *Oncogene* **24** (2005) 2877-98.

- [23] Meyerson, M.; Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* **14** (1994) 2077-86.
- [24] De Bondt, H. L.; Rosenblatt, J.; Jancarik, J.; Jones, H. D.; Morgan, D. O.; Kim, S. H. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363** (1993) 595-602.
- [25] Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massague, J.; Pavletich, N. P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376** (1995) 313-20.
- [26] Sridhar, J.; Akula, N.; Pattabiraman, N. Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *AAPS J* **8** (2006) E204-21.
- [27] Brown, N. R.; Noble, M. E.; Lawrie, A. M.; Morris, M. C.; Tunnah, P.; Divita, G.; Johnson, L. N.; Endicott, J. A. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem* **274** (1999) 8746-56.
- [28] Blain, S. W. Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* **7** (2008) 892-8.
- [29] Kato, J. Y.; Matsuoka, M.; Strom, D. K.; Sherr, C. J. Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* **14** (1994) 2713-21.
- [30] Kitagawa, M.; Higashi, H.; Jung, H. K.; Suzuki-Takahashi, I.; Ikeda, M.; Tamai, K.; Kato, J.; Segawa, K.; Yoshida, E.; Nishimura, S.; Taya, Y. The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J* **15** (1996) 7060-9.
- [31] Connell-Crowley, L.; Harper, J. W.; Goodrich, D. W. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell* **8** (1997) 287-301.
- [32] Grafstrom, R. H.; Pan, W.; Hoess, R. H. Defining the substrate specificity of cdk4 kinase-cyclin D1 complex. *Carcinogenesis* **20** (1999) 193-8.
- [33] Harbour, J. W.; Dean, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14** (2000) 2393-409.
- [34] Nevins, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10** (2001) 699-703.
- [35] Manenti, S.; Yamauchi, E.; Sorokine, O.; Knibiehler, M.; Van Dorsselaer, A.; Taniguchi, H.; Ducommun, B.; Darbon, J. M. Phosphorylation of the myristoylated protein kinase C substrate MARCKS by the cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complex in vitro. *Biochem J* **340** (1999) 775-82.
- [36] Liu, E.; Li, X.; Yan, F.; Zhao, Q.; Wu, X. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J Biol Chem* **279** (2004) 17283-8.
- [37] Matsuura, I.; Denissova, N. G.; Wang, G.; He, D.; Long, J.; Liu, F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* **430** (2004) 226-31.
- [38] Gladden, A. B.; Diehl, J. A. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem* **96** (2005) 906-13.
- [39] Martin, N. G.; McAndrew, P. C.; Eve, P. D.; Garrett, M. D. Phosphorylation of cyclin dependent kinase 4 on tyrosine 17 is mediated by Src family kinases. *FEBS J* **275** (2008) 3099-109.
- [40] Sherr, C. J.; Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13** (1999) 1501-12.
- [41] Kohoutek, J.; Dvorak, P.; Hampl, A. Temporal distribution of CDK4, CDK6, D-type cyclins, and p27 in developing mouse oocytes. *Biol Reprod* **70** (2004) 139-45.
- [42] Savatier, P.; Lapillonne, H.; van Grunsven, L. A.; Rudkin, B. B.; Samarut, J. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **12** (1996) 309-22.

- [43] Faast, R.; White, J.; Cartwright, P.; Crocker, L.; Sarcevic, B.; Dalton, S. Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16(INK4a). *Oncogene* **23** (2004) 491-502.
- [44] Rane, S. G.; Dubus, P.; Mettus, R. V.; Galbreath, E. J.; Boden, G.; Reddy, E. P.; Barbacid, M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* **22** (1999) 44-52.
- [45] Tsutsui, T.; Hesabi, B.; Moons, D. S.; Pandolfi, P. P.; Hansel, K. S.; Koff, A.; Kiyokawa, H. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* **19** (1999) 7011-9.
- [46] Mettus, R. V.; Rane, S. G. Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice. *Oncogene* **22** (2003) 8413-21.
- [47] Moons, D. S.; Jirawatnotai, S.; Parlow, A. F.; Gibori, G.; Kineman, R. D.; Kiyokawa, H. Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* **143** (2002) 3001-8.
- [48] Malumbres, M.; Sotillo, R.; Santamaria, D.; Galan, J.; Cerezo, A.; Ortega, S.; Dubus, P.; Barbacid, M. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118** (2004) 493-504.
- [49] Kozar, K.; Ciemerych, M. A.; Rebel, V. I.; Shigematsu, H.; Zagozdzon, A.; Sicinska, E.; Geng, Y.; Yu, Q.; Bhattacharya, S.; Bronson, R. T.; Akashi, K.; Sicinski, P. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118** (2004) 477-91.
- [50] Barriere, C.; Santamaria, D.; Cerqueira, A.; Galan, J.; Martin, A.; Ortega, S.; Malumbres, M.; Dubus, P.; Barbacid, M. Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Mol Oncol* **1** (2007) 72-83.
- [51] Berthet, C.; Klarmann, K. D.; Hilton, M. B.; Suh, H. C.; Keller, J. R.; Kiyokawa, H.; Kaldis, P. Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev Cell* **10** (2006) 563-73.
- [52] Santamaria, D.; Barriere, C.; Cerqueira, A.; Hunt, S.; Tardy, C.; Newton, K.; Caceres, J. F.; Dubus, P.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448** (2007) 811-5.
- [53] Janzen, V.; Forkert, R.; Fleming, H. E.; Saito, Y.; Waring, M. T.; Dombkowski, D. M.; Cheng, T.; DePinho, R. A.; Sharpless, N. E.; Scadden, D. T. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* **443** (2006) 421-6.
- [54] Horsley, V.; Aliprantis, A. O.; Polak, L.; Glimcher, L. H.; Fuchs, E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* **132** (2008) 299-310.
- [55] Jablonska, B.; Aguirre, A.; Vandenbosch, R.; Belachew, S.; Berthet, C.; Kaldis, P.; Gallo, V. Cdk2 is critical for proliferation and self-renewal of neural progenitor cells in the adult subventricular zone. *J Cell Biol* **179** (2007) 1231-45.
- [56] Atanasoski, S.; Boentert, M.; De Ventura, L.; Pohl, H.; Baranek, C.; Beier, K.; Young, P.; Barbacid, M.; Suter, U. Postnatal Schwann cell proliferation but not myelination is strictly and uniquely dependent on cyclin-dependent kinase 4 (cdk4). *Mol Cell Neurosci* **37** (2008) 519-27.
- [57] Li, C.; Li, X.; Chen, W.; Yu, S.; Chen, J.; Wang, H.; Ruan, D. The different roles of cyclinD1-CDK4 in STP and mGluR-LTD during the postnatal development in mice hippocampus area CA1. *BMC Dev Biol* **7** (2007) 57.
- [58] Jirawatnotai, S.; Aziyu, A.; Osmundson, E. C.; Moons, D. S.; Zou, X.; Kineman, R. D.; Kiyokawa, H. Cdk4 is indispensable for postnatal proliferation of the anterior pituitary. *J Biol Chem* **279** (2004) 51100-6.
- [59] Martin, J.; Hunt, S. L.; Dubus, P.; Sotillo, R.; Nehme-Pelluard, F.; Magnuson, M. A.; Parlow, A. F.; Malumbres, M.; Ortega, S.; Barbacid, M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* **22** (2003) 5261-9.

- [60] Tsujioka, Y.; Takahashi, M.; Tsuboi, Y.; Yamamoto, T.; Yamada, T. Localization and expression of cdc2 and cdk4 in Alzheimer brain tissue. *Dement Geriatr Cogn Disord* **10** (1999) 192-8.
- [61] Busser, J.; Geldmacher, D. S.; Herrup, K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* **18** (1998) 2801-7.
- [62] Alvira, D.; Tajés, M.; Verdaguer, E.; de Arriba, S. G.; Allgaier, C.; Matute, C.; Trullas, R.; Jimenez, A.; Pallas, M.; Camins, A. Inhibition of cyclin-dependent kinases is neuroprotective in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience* **146** (2007) 350-65.
- [63] Deshpande, A.; Sicinski, P.; Hinds, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24** (2005) 2909-15.
- [64] Wolfel, T.; Hauer, M.; Schneider, J.; Serrano, M.; Wolfel, C.; Klehmann-Hieb, E.; De Plaen, E.; Hankeln, T.; Meyer zum Buschenfelde, K. H.; Beach, D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269** (1995) 1281-4.
- [65] Zuo, L.; Weger, J.; Yang, Q.; Goldstein, A. M.; Tucker, M. A.; Walker, G. J.; Hayward, N.; Dracopoli, N. C. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12** (1996) 97-9.
- [66] Sotillo, R.; Dubus, P.; Martin, J.; de la Cueva, E.; Ortega, S.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J* **20** (2001) 6637-47.
- [67] Rane, S. G.; Cosenza, S. C.; Mettus, R. V.; Reddy, E. P. Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol Cell Biol* **22** (2002) 644-56.
- [68] Sotillo, R.; Garcia, J. F.; Ortega, S.; Martin, J.; Dubus, P.; Barbacid, M.; Malumbres, M. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001) 13312-7.
- [69] Tormo, D.; Ferrer, A.; Gaffal, E.; Wenzel, J.; Basner-Tschakarjan, E.; Steitz, J.; Heukamp, L. C.; Gutgemann, I.; Buettner, R.; Malumbres, M.; Barbacid, M.; Merlino, G.; Tuting, T. Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am J Pathol* **169** (2006) 665-72.
- [70] Easton, J.; Wei, T.; Lahti, J. M.; Kidd, V. J. Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Res* **58** (1998) 2624-32.
- [71] Corcoran, M. M.; Mould, S. J.; Orchard, J. A.; Ibbotson, R. E.; Chapman, R. M.; Boright, A. P.; Platt, C.; Tsui, L. C.; Scherer, S. W.; Oscier, D. G. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* **18** (1999) 6271-7.
- [72] Hayette, S.; Tigaud, I.; Callet-Bauchu, E.; Ffrench, M.; Gazzo, S.; Wahbi, K.; Callanan, M.; Felman, P.; Dumontet, C.; Magaud, J. P.; Rimokh, R. In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood* **102** (2003) 1549-50.
- [73] Ortega, S.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1602** (2002) 73-87.
- [74] Rodriguez-Puebla, M. L.; Miliani de Marval, P. L.; LaCava, M.; Moons, D. S.; Kiyokawa, H.; Conti, C. J. Cdk4 deficiency inhibits skin tumor development but does not affect normal keratinocyte proliferation. *Am J Pathol* **161** (2002) 405-11.
- [75] Miliani de Marval, P. L.; Macias, E.; Rounbehler, R.; Sicinski, P.; Kiyokawa, H.; Johnson, D. G.; Conti, C. J.; Rodriguez-Puebla, M. L. Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Mol Cell Biol* **24** (2004) 7538-47.

- [76] Yu, Q.; Sicinska, E.; Geng, Y.; Ahnstrom, M.; Zagodzdon, A.; Kong, Y.; Gardner, H.; Kiyokawa, H.; Harris, L. N.; Stal, O.; Sicinski, P. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell* **9** (2006) 23-32.
- [77] Reddy, H. K.; Mettus, R. V.; Rane, S. G.; Grana, X.; Litvin, J.; Reddy, E. P. Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* **65** (2005) 10174-8.
- [78] Landis, M. W.; Pawlyk, B. S.; Li, T.; Sicinski, P.; Hinds, P. W. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* **9** (2006) 13-22.
- [79] Villalonga, P.; Rius, E.; Bachs, O.; Agell, N. [Lys61]N-Ras is able to induce full activation and nuclear accumulation of Cdk4 in NIH3T3 cells. *Oncogene* **19** (2000) 690-9.
- [80] Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst* **92** (2000) 376-87.
- [81] Fischer, P. M. The use of CDK inhibitors in oncology: a pharmaceutical perspective. *Cell Cycle* **3** (2004) 742-6.
- [82] Carlson, B. A.; Dubay, M. M.; Sausville, E. A.; Brizuela, L.; Worland, P. J. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **56** (1996) 2973-8.
- [83] Kaur, G.; Stetler-Stevenson, M.; Sebers, S.; Worland, P.; Sedlacek, H.; Myers, C.; Czech, J.; Naik, R.; Sausville, E. Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* **84** (1992) 1736-40.
- [84] McClue, S. J.; Blake, D.; Clarke, R.; Cowan, A.; Cummings, L.; Fischer, P. M.; MacKenzie, M.; Melville, J.; Stewart, K.; Wang, S.; Zhelev, N.; Zheleva, D.; Lane, D. P. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* **102** (2002) 463-8.
- [85] Nutley, B. P.; Raynaud, F. I.; Wilson, S. C.; Fischer, P. M.; Hayes, A.; Goddard, P. M.; McClue, S. J.; Jarman, M.; Lane, D. P.; Workman, P. Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse. *Mol Cancer Ther* **4** (2005) 125-39.
- [86] Misra, R. N.; Xiao, H. Y.; Kim, K. S.; Lu, S.; Han, W. C.; Barbosa, S. A.; Hunt, J. T.; Rawlins, D. B.; Shan, W.; Ahmed, S. Z.; Qian, L.; Chen, B. C.; Zhao, R.; Bednarz, M. S.; Kellar, K. A.; Mulheron, J. G.; Batorsky, R.; Roongta, U.; Kamath, A.; Marathe, P.; Ranadive, S. A.; Sack, J. S.; Tokarski, J. S.; Pavletich, N. P.; Lee, F. Y.; Webster, K. R.; Kimball, S. D. N-(cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidine-carboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent. *J Med Chem* **47** (2004) 1719-28.
- [87] Iorns, E.; Turner, N. C.; Elliott, R.; Syed, N.; Garrone, O.; Gasco, M.; Tutt, A. N.; Crook, T.; Lord, C. J.; Ashworth, A. Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. *Cancer Cell* **13** (2008) 91-104.
- [88] Chandramouli, A.; Shi, J.; Feng, Y.; Holubec, H.; Shanas, R. M.; Bhattacharyya, A. K.; Zheng, W.; Nelson, M. A. Haploinsufficiency of the *cdc2l* gene contributes to skin cancer development in mice. *Carcinogenesis* **28** (2007) 2028-35.
- [89] McInnes, C.; Wang, S.; Anderson, S.; O'Boyle, J.; Jackson, W.; Kontopidis, G.; Meades, C.; Mezna, M.; Thomas, M.; Wood, G.; Lane, D. P.; Fischer, P. M. Structural determinants of CDK4 inhibition and design of selective ATP competitive inhibitors. *Chem Biol* **11** (2004) 525-34.
- [90] Lee, Y. M.; Sicinski, P. Targeting cyclins and cyclin-dependent kinases in cancer: lessons from mice, hopes for therapeutic applications in human. *Cell Cycle* **5** (2006) 2110-4.
- [91] Fry, D. W.; Harvey, P. J.; Keller, P. R.; Elliott, W. L.; Meade, M.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X.; Leopold, W. R.; Pryer, N. K.; Toogood, P. L. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* **3** (2004) 1427-38.

- [92] Soni, R.; Muller, L.; Furet, P.; Schoepfer, J.; Stephan, C.; Zumstein-Mecker, S.; Fretz, H.; Chaudhuri, B. Inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by fascaplysin, a marine natural product. *Biochem Biophys Res Commun* **275** (2000) 877-84.
- [93] Soni, R.; O'Reilly, T.; Furet, P.; Muller, L.; Stephan, C.; Zumstein-Mecker, S.; Fretz, H.; Fabbro, D.; Chaudhuri, B. Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *J Natl Cancer Inst* **93** (2001) 436-46.
- [94] Honma, T.; Yoshizumi, T.; Hashimoto, N.; Hayashi, K.; Kawanishi, N.; Fukasawa, K.; Takaki, T.; Ikeura, C.; Ikuta, M.; Suzuki-Takahashi, I.; Hayama, T.; Nishimura, S.; Morishima, H. A novel approach for the development of selective Cdk4 inhibitors: library design based on locations of Cdk4 specific amino acid residues. *J Med Chem* **44** (2001) 4628-40.
- [95] Kubo, A.; Nakagawa, K.; Varma, R. K.; Conrad, N. K.; Cheng, J. Q.; Lee, W. C.; Testa, J. R.; Johnson, B. E.; Kaye, F. J.; Kelley, M. J. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin Cancer Res* **5** (1999) 4279-86.
- [96] Zhu, G.; Conner, S. E.; Zhou, X.; Shih, C.; Li, T.; Anderson, B. D.; Brooks, H. B.; Campbell, R. M.; Considine, E.; Dempsey, J. A.; Faul, M. M.; Ogg, C.; Patel, B.; Schultz, R. M.; Spencer, C. D.; Teicher, B.; Watkins, S. A. Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *J Med Chem* **46** (2003) 2027-30.
- [97] Joshi, K. S.; Rathos, M. J.; Joshi, R. D.; Sivakumar, M.; Mascarenhas, M.; Kamble, S.; Lal, B.; Sharma, S. In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Mol Cancer Ther* **6** (2007) 918-25.
- [98] Horiuchi, T.; Chiba, J.; Uoto, K.; Soga, T. Discovery of novel thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl hydrazone-based inhibitors of Cyclin D1-CDK4: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett* **19** (2009) 305-8.
- [99] Toogood, P. L.; Harvey, P. J.; Repine, J. T.; Sheehan, D. J.; VanderWel, S. N.; Zhou, H.; Keller, P. R.; McNamara, D. J.; Sherry, D.; Zhu, T.; Brodfuehrer, J.; Choi, C.; Barvian, M. R.; Fry, D. W. Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J Med Chem* **48** (2005) 2388-406.
- [100] VanderWel, S. N.; Harvey, P. J.; McNamara, D. J.; Repine, J. T.; Keller, P. R.; Quin, J., 3rd; Booth, R. J.; Elliott, W. L.; Dobrusin, E. M.; Fry, D. W.; Toogood, P. L. Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J Med Chem* **48** (2005) 2371-87.
- [101] Park, H.; Yeom, M. S.; Lee, S. Loop flexibility and solvent dynamics as determinants for the selective inhibition of cyclin-dependent kinase 4: comparative molecular dynamics simulation studies of CDK2 and CDK4. *Chembiochem* **5** (2004) 1662-72.
- [102] Lu, H.; Schulze-Gahmen, U. Toward understanding the structural basis of cyclin-dependent kinase 6 specific inhibition. *J Med Chem* **49** (2006) 3826-31.
- [103] Fry, D. W.; Bedford, D. C.; Harvey, P. H.; Fritsch, A.; Keller, P. R.; Wu, Z.; Dobrusin, E.; Leopold, W. R.; Fattaey, A.; Garrett, M. D. Cell cycle and biochemical effects of PD 0183812. A potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *J Biol Chem* **276** (2001) 16617-23.
- [104] Saab, R.; Bills, J. L.; Miceli, A. P.; Anderson, C. M.; Khoury, J. D.; Fry, D. W.; Navid, F.; Houghton, P. J.; Skapek, S. X. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 activity arrests proliferation in myoblasts and rhabdomyosarcoma-derived cells. *Mol Cancer Ther* **5** (2006) 1299-308.
- [105] Baughn, L. B.; Di Liberto, M.; Wu, K.; Toogood, P. L.; Louie, T.; Gottschalk, R.; Niesvizky, R.; Cho, H.; Ely, S.; Moore, M. A.; Chen-Kiang, S. A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. *Cancer Res* **66** (2006) 7661-7.

- [106] Menu, E.; Garcia, J.; Huang, X.; Di Liberto, M.; Toogood, P. L.; Chen, I.; Vanderkerken, K.; Chen-Kiang, S. A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model. *Cancer Res* **68** (2008) 5519-23.
- [107] Varagnolo, L.; Stokkel, M. P.; Mazzi, U.; Pauwels, E. K. 18F-labeled radiopharmaceuticals for PET in oncology, excluding FDG. *Nucl Med Biol* **27** (2000) 103-12.
- [108] Ruhlmann, J.; Oehr, P.; Biersack, H.-J. PET in der Onkologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1998).
- [109] Vallabhajosula, S. (18)F-labeled positron emission tomographic radiopharmaceuticals in oncology: an overview of radiochemistry and mechanisms of tumor localization. *Semin Nucl Med* **37** (2007) 400-19.
- [110] Pauwels, E. K.; Ribeiro, M. J.; Stoot, J. H.; McCready, V. R.; Bourguignon, M.; Maziere, B. FDG accumulation and tumor biology. *Nucl Med Biol* **25** (1998) 317-22.
- [111] Kubota, R.; Yamada, S.; Kubota, K.; Ishiwata, K.; Tamahashi, N.; Ido, T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J. Nucl. Med.* **33** (1992) 1972-80.
- [112] Köhler, L. Dissertation, "Radiotracer für die molekulare Bildgebung des Zellzyklus: Radiomarkierung von Inhibitoren der Cdk4/6 mit den Radionukliden Iod-124 und Fluor-18", TU Dresden (2010 eingereicht).
- [113] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970) 680-5.
- [114] Graf, F.; Koehler, L.; Kniess, T.; Wuest, F.; Mosch, B.; Pietzsch, J. Cell Cycle Regulating Kinase Cdk4 as a Potential Target for Tumor Cell Treatment and Tumor Imaging. *J Oncol* **2009** (2009) 106378.
- [115] Koehler, L.; Graf, F.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Wuest, F. Radiosynthesis and radiopharmacological evaluation of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) inhibitors. *Eur J Med Chem* **45** (2009) 727-737.
- [116] Haase, C.; Bergmann, R.; Fuechtner, F.; Hoepping, A.; Pietzsch, J. L-type amino acid transporters LAT1 and LAT4 in cancer: uptake of 3-O-methyl-6-¹⁸F-fluoro-L-dopa in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *J. Nucl. Med.* **48** (2007) 2063-71.
- [117] Wuest, F.; Kniess, T.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Synthesis and evaluation in vitro and in vivo of a ¹¹C-labeled cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor. *Bioorg Med Chem* **16** (2008) 7662-70.
- [118] Wilson, A. A.; Jin, L.; Garcia, A.; DaSilva, J. N.; Houle, S. An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl Radiat Isot* **54** (2001) 203-8.
- [119] An, H. X.; Beckmann, M. W.; Reifenberger, G.; Bender, H. G.; Niederacher, D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Pathol* **154** (1999) 113-8.
- [120] Igarashi, K.; Masaki, T.; Shiratori, Y.; Rengifo, W.; Nagata, T.; Hara, K.; Oka, T.; Nakajima, J.; Hisada, T.; Hata, E.; Omata, M. Activation of cyclin D1-related kinase in human lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* **81** (1999) 705-11.
- [121] Timmermann, S.; Hinds, P. W.; Munger, K. Elevated activity of cyclin-dependent kinase 6 in human squamous cell carcinoma lines. *Cell Growth Differ* **8** (1997) 361-70.
- [122] Baldwin, C.; Garnis, C.; Zhang, L.; Rosin, M. P.; Lam, W. L. Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. *Cancer Res* **65** (2005) 7561-7.
- [123] Chilosi, M.; Doglioni, C.; Yan, Z.; Lestani, M.; Menestrina, F.; Sorio, C.; Benedetti, A.; Vinante, F.; Pizzolo, G.; Inghirami, G. Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Am J Pathol* **152** (1998) 209-17.

- [124] Zhao, P.; Mao, X.; Talbot, I. C. Aberrant cytological localization of p16 and CDK4 in colorectal epithelia in the normal adenoma carcinoma sequence. *World J Gastroenterol* **12** (2006) 6391-6.
- [125] Bryja, V.; Pachernik, J.; Vondracek, J.; Soucek, K.; Cajanek, L.; Horvath, V.; Holubcova, Z.; Dvorak, P.; Hampl, A. Lineage specific composition of cyclin D-CDK4/CDK6-p27 complexes reveals distinct functions of CDK4, CDK6 and individual D-type cyclins in differentiating cells of embryonic origin. *Cell Prolif* **41** (2008) 875-93.
- [126] Kohrt, D. M.; Cray, J. I.; Gocheva, V.; Hinds, P. W.; Grossel, M. J. Distinct subcellular distribution of cyclin dependent kinase 6. *Cell Cycle* **8** (2009) 2837-43.
- [127] Breslin, J. S.; Phillips, K. S.; Weaver, T. E. Expression of the cyclin-dependent kinase cdk4 in perinatal and adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **9** (1993) 533-40.
- [128] Barvian, M.; Boschelli, D. H.; Cossrow, J.; Dobrusin, E.; Fattaey, A.; Fritsch, A.; Fry, D.; Harvey, P.; Keller, P.; Garrett, M.; La, F.; Leopold, W.; McNamara, D.; Quin, M.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Toogood, P.; Wu, Z.; Zhang, E. Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* **43** (2000) 4606-16.
- [129] Wang, L.; Wang, J.; Blaser, B. W.; Duchemin, A. M.; Kusewitt, D. F.; Liu, T.; Caligiuri, M. A.; Briesewitz, R. Pharmacologic inhibition of CDK4/6: mechanistic evidence for selective activity or acquired resistance in acute myeloid leukemia. *Blood* **110** (2007) 2075-83.
- [130] Finn, R. S.; Dering, J.; Conklin, D.; Kalous, O.; Cohen, D. J.; Desai, A. J.; Ginther, C.; Atefi, M.; Chen, I.; Fowst, C.; Los, G.; Slamon, D. J. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* **11** (2009) R77.
- [131] Gabrielli, B. G.; Sarcevic, B.; Sinnamon, J.; Walker, G.; Castellano, M.; Wang, X. Q.; Ellem, K. A. A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J Biol Chem* **274** (1999) 13961-9.
- [132] Horowitz, J. M.; Park, S. H.; Bogenmann, E.; Cheng, J. C.; Yandell, D. W.; Kaye, F. J.; Minna, J. D.; Dryja, T. P.; Weinberg, R. A. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (1990) 2775-9.
- [133] Lee, E. Y.; To, H.; Shew, J. Y.; Bookstein, R.; Scully, P.; Lee, W. H. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* **241** (1988) 218-21.
- [134] Bartek, J.; Vojtesek, B.; Grand, R. J.; Gallimore, P. H.; Lane, D. P. Cellular localization and T antigen binding of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **7** (1992) 101-8.
- [135] Liggett, W. H., Jr.; Sewell, D. A.; Rocco, J.; Ahrendt, S. A.; Koch, W.; Sidransky, D. p16 and p16 beta are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* **56** (1996) 4119-23.
- [136] Browne, S. J.; MacFarlane, M.; Cohen, G. M.; Paraskeva, C. The adenomatous polyposis coli protein and retinoblastoma protein are cleaved early in apoptosis and are potential substrates for caspases. *Cell Death Differ* **5** (1998) 206-13.
- [137] Lees, J. A.; Buchkovich, K. J.; Marshak, D. R.; Anderson, C. W.; Harlow, E. The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *EMBO J* **10** (1991) 4279-90.
- [138] Knudsen, E. S.; Wang, J. Y. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem* **271** (1996) 8313-20.
- [139] Lundberg, A. S.; Weinberg, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18** (1998) 753-61.
- [140] Helin, K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* **8** (1998) 28-35.
- [141] Pressman, B. C. Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* **45** (1976) 501-30.

- [142] Baldwin, S. A.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* **5** (1999) 216-24.
- [143] Zhang, J.; Visser, F.; King, K. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev* **26** (2007) 85-110.
- [144] Visser, F.; Baldwin, S. A.; Isaac, R. E.; Young, J. D.; Cass, C. E. Identification and mutational analysis of amino acid residues involved in dipyridamole interactions with human and *Caenorhabditis elegans* equilibrative nucleoside transporters. *J Biol Chem* **280** (2005) 11025-34.
- [145] Visser, F.; Vickers, M. F.; Ng, A. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *J Biol Chem* **277** (2002) 395-401.
- [146] Wijnholds, J.; Mol, C. A.; van Deemter, L.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Baas, F.; Beijnen, J. H.; Scheper, R. J.; Hatse, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Borst, P. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (2000) 7476-81.
- [147] Borowski, E.; Bontemps-Gracz, M. M.; Piwkowska, A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol* **52** (2005) 609-27.
- [148] Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **41** (1981) 1967-72.
- [149] Hollo, Z.; Homolya, L.; Hegedus, T.; Sarkadi, B. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett* **383** (1996) 99-104.
- [150] Jungermann, K.; Kietzmann, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* **16** (1996) 179-203.
- [151] Chung, J. K. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J. Nucl. Med.* **43** (2002) 1188-200.
- [152] Coenen, H. H.; Mertens, J.; Mazière, B. Radioiodination reactions for pharmaceuticals: Compendium for effective synthesis strategies, Springer-Verlag Dordrecht (Niederlande), (2006).
- [153] Schiepers, C.; Nuyts, J.; Bormans, G.; Dequeker, J.; Bouillon, R.; Mortelmans, L.; Verbruggen, A.; De Roo, M. Fluoride kinetics of the axial skeleton measured in vivo with fluorine-18-fluoride PET. *J. Nucl. Med.* **38** (1997) 1970-6.
- [154] Tewson, T. J.; Welch, M. J. Preparation and preliminary biodistribution of "no carrier added" fluorine-18 fluoroethanol. *J. Nucl. Med.* **21** (1980) 559-64.
- [155] Zoghbi, S. S.; Shetty, H. U.; Ichise, M.; Fujita, M.; Imaizumi, M.; Liow, J. S.; Shah, J.; Musachio, J. L.; Pike, V. W.; Innis, R. B. PET imaging of the dopamine transporter with 18F-FECNT: a polar radiometabolite confounds brain radioligand measurements. *J. Nucl. Med.* **47** (2006) 520-7.
- [156] Treble, D. H. The metabolism of 2-fluoroethanol. *Biochem J* **82** (1962) 129-34.
- [157] Saunders, B. C. Toxic Properties of Omega-Fluoro-Carboxylic Acids and Derivatives. *Nature* **160** (1947) 179-181.
- [158] Silbernagel, S.; Despopoulos, A. Taschenatlas der Physiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1991).
- [159] Shields, A. F. Positron emission tomography measurement of tumor metabolism and growth: its expanding role in oncology. *Mol Imaging Biol* **8** (2006) 141-50.

7 VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE

Publikationen

Oswald, J.; **Treite, F.**; Haase, C.; Schwenger, B.; Mäding, P.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Experimental hypoxia is a potent stimulus for radiotracer uptake *in vitro*: Comparison of different tumor cells and primary endothelial cells. *Cancer Lett* **254** (2007) 102-110.

Graf, F.; Koehler, L.; Kniess, T.; Wuest, F.; Mosch, B.; Pietzsch, J. Cell cycle regulating kinase Cdk4 as a potential target for tumor cell treatment and tumor imaging. *J Oncol* Article ID **106378** (2009) 1-12.

Graf, F.; Koehler, L.; Mosch, B.; Steinbach, J.; Pietzsch, J. Cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6: targets for cancer treatment and visualization. *OncoPost & OncoPeople The official Newspaper of the ECCO 15 – 34th ESMO Congress* **3** (2009) 10.

(www.ecco-org.eu/Conferences-and-Events/ECCO-15-ESMO-34/Congress-Newspaper/Wednesday/Graf/page.aspx/1842)

Koehler, L.; **Graf, F.**; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Wuest, F. Radiosynthesis and radiopharmacological evaluation of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) inhibitors. *Eur J Med Chem* **45** (2010) 727-737.

Graf, F.; Mosch, B.; Koehler, L.; Bergmann, R.; Wuest, F.; Pietzsch, J. Cyclin-dependent kinase 4/6 (Cdk4/6) inhibitors: perspectives in cancer therapy and imaging. *Mini Rev Med Chem* **10/6** (2010) 527-539.

Vorträge

Oswald, J.; **Treite, F.**; Haase, C.; Bergmann, R.; Schwenger, B.; Pietzsch, J. Expression of VEGF and VEGF receptors and radiotracer uptake in tumor cells and primary endothelial cells under experimental hypoxia. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM), 30.09.-04.10.2006, Athen, Griechenland, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **33** (2006), Suppl 2: S661.

Koehler, L.; **Graf, F.**; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Wuest, F. Synthesis and radioiodination of two Cdk4 inhibitors. 16. Arbeitstagung der AG Radiochemie/Radiopharmazie der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 25.-27.09.2008, Münster, Deutschland

Graf, F.; Koehler, L.; Wuest, F.; Mosch, B.; Pietzsch, J. Biological, biochemical and radiopharmacological properties of two Cdk4 inhibitors. 16. Arbeitstagung der AG Radiochemie/Radiopharmazie der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 25.-27.09.2008, Münster, Deutschland

Graf, F.; Koehler, L.; Mosch, B.; Pietzsch, J. New fluorine-18 radiolabeled Cdk4/6 inhibitors: potential radiotracers for tumor imaging by positron emission tomography. ECCO 15 – 34th ESMO Multidisciplinary Congress, 20.-24.09.2009, Berlin, Deutschland, *Eur J Cancer Supplements* 7/2 (2009) 120 (O1201).

Poster

Treite, F.; Oswald, J.; Haase, C.; Mäding, P.; Schwenzer, B.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Experimental hypoxia as a potent stimulus for radiotracer uptake *in vitro*: Comparison of different tumor cells and primary endothelial cells. 17th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 30.04-04.05.2007, Aachen, Deutschland, *J Label Compd Radiopharm* 50 (2007), Suppl 1: S421.

Treite, F.; Koehler, L.; Mosch, B.; Pietzsch, J. Cell cycle regulating kinase Cdk4 as a potential target for tumour visualisation *in vivo*. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM), 11.-15.10.2008, München, Deutschland, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (2008), Suppl 2: S325.

Koehler, L.; **Graf, F.;** Bergmann, R.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Wuest, F. Imaging of the cell cycle: Synthesis and radiopharmacological evaluation of ¹²⁴I-labeled Cdk4 inhibitors. 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS), 12.-17.07.2009, Edmonton, Kanada, *J Label Compd Radiopharm* 52 (2009), Suppl 1: S406.

Graf, F.; Koehler, L.; Mosch, B.; Pietzsch, J. Radiolabeled Cdk4/6 inhibitors for molecular imaging of Cdk4/6 in tumors by positron emission tomography. 5th International Conference On Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention, 20.-24.10.2009, Versailles, Frankreich, *Cancer Microenviron* 2 (2009), Suppl 1: S185 (P180).

8 DANKSAGUNG

Danken möchte ich all den Personen, die mich während meiner Studien- und Promotionszeit begleiteten, mich aufrichtig unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jörg Steinbach und Herrn PD Dr. Jens Pietzsch danke ich für die Bereitstellung meiner sehr interessanten und herausfordernden Promotionsthematik und die stete Unterstützung bei der Fortführung der Arbeiten am Institut für Radiopharmazie. Darüber hinaus bin ich dankbar über die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Austausch durch die Teilnahme bei nationalen bzw. internationalen Kongressen, Symposien und Weiterbildungen.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jens Pietzsch für seine engagierte Betreuung, die wertvollen Impulse und konstruktiven Ratschläge danken, die maßgeblich für die Anfertigung dieser Arbeit waren.

Herrn Prof. Dr. Frank Wüst danke ich für sein stetes Interesse und die Unterstützung meiner Arbeiten, auch aus dem weit entfernten Kanada.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée und seiner Arbeitsgruppe an der TU Dresden für das Interesse an der Thematik und die Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank an Frau Lena Köhler für die Synthese und Radiomarkierung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine, sowie Frau Regina Herrlich, Frau Mareike Barth und Herrn Dr. Ralf Bergmann für die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Radiopharmazie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Einführung in neue experimentelle Methoden und praktische Zusammenarbeit. Die schönen und aufregenden Stunden im Labor werde ich stets in Erinnerung behalten. Insbesondere gilt mein Dank Mitarbeitern der Abteilung für Radiopharmazeutische Biologie: Frau Dr. Susan Hoppmann, Frau Dr. Birgit Mosch, Frau Dr. Cathleen Haase-Kohn, Susann Wolf, Bettina Reißweber, Christin Neuber, Alin Berndt, Mareike Barth, Nicole Ewald, Catharina Heinig, Aline Morgenegg, Regina Herrlich, Andrea Suhr, Sonja Lehnert und Sebastian Meister.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an Birgit und Susan richten: für die anregenden Diskussionen zu meinen Ergebnissen und das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke meinen Freunden für ihr Interesse am Fortgang meiner Untersuchungen und ihre Motivation, vor allem in schwierigen Momenten.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, meinem lieben Bruder Philipp und meinem Ehemann Christian, für ihre Liebe und Unterstützung sowie den Mut und die Hoffnung, die sie mir während all der Jahre in allen Lebensbereichen geschenkt haben.

9 VERSICHERUNG UND ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Radiopharmazie, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jörg Steinbach im Zeitraum von September 2006 bis Februar 2010 angefertigt.

Bisherige erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften an der Technischen Universität Dresden vom 20. März 2000 in der Fassung vom 16. April 2003 sowie gemäß der Änderungssatzung vom 17. Juli 2008 an.

Dresden, den 15. Februar 2010

Franziska Graf