

**Biochemische Charakterisierung und Wirkoptimierung  
potentieller Chemotherapeutika auf Basis der  
natürlichen Chinone Doxorubicin und Thymochinon**

vorgelegt von

**Katharina Effenberger-Neidnicht**

(Dipl.-Biochem. Univ.)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth.

**Bayreuth, 2011.**



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 28.03.2011

---

(Katharina Effenberger-Neidnicht)



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2007 bis März 2011 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Schobert am Lehrstuhl für Organische Chemie der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.

Dissertation eingereicht am: 28.03.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. S. Clemens

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Rainer Schobert (Erstgutachter)

Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Matthias Ullman (Vorsitzender)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Naturstoffe in der Wirkstoffentwicklung.....	1
1.2	Bioaktive Chinone und ihre Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung.....	3
1.3	Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion.....	7
1.4	Biotransformation und Metabolisierung von Wirkstoffen.....	10
1.5	Resistenzmechanismen und gezielte Verabreichung von Wirkstoffen.....	12
1.6	Zielsetzung.....	12
2	Materialien.....	13
2.1	Zelllinien.....	13
2.1.1	518A2: Melanom-Zellen.....	13
2.1.2	HF: nicht-maligne Fibroblasten.....	13
2.1.3	HL-60: Leukämie-Zellen .....	14
2.1.4	HT-29: Kolonkarzinom-Zellen.....	14
2.1.5	KB-V1: Zervixkarzinom-Zellen.....	15
2.1.6	MCF-7: Mammakarzinom-Zellen.....	16
2.1.7	PtK2: nicht-maligne Nierenzellen.....	17
2.2	Testsubstanzen.....	18
2.2.1	Doxorubicin (13) und seine Derivate.....	19
2.2.1.1	Fettsäurederivate.....	21
2.2.1.2	Terpenderivate.....	23
2.2.2	Thymochinon (17) und seine Derivate.....	24
2.2.2.1	Fettsäurederivate.....	25
2.2.2.2	Terpenderivate.....	28
2.3	Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	33
2.3.1	Zellkulturmedien und Puffer.....	33
2.3.2	Chemikalien.....	37
2.3.3	Geräte .....	41
2.3.4	Verbrauchsmaterialien.....	42

3 Methoden.....	43
3.1 Zellkultivierung.....	43
3.2 Kryokonservierung.....	44
3.3 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test.....	44
3.3.1 Effektivität.....	46
3.3.2 MDR-Sensitivität .....	47
3.3.3 Selektivität.....	50
3.4 Nachweis von Apoptose.....	50
3.4.1 Morphologie.....	51
3.4.2 DNA-Fragmentierung.....	52
3.4.2.1 TUNEL-Test.....	53
3.4.2.2 Gelelektrophorese.....	54
3.4.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten.....	55
3.4.3.1 Caspase-Aktivitätstest.....	58
3.4.3.2 Western Blot-Analyse.....	59
3.4.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid.....	61
3.4.4.1 Western Blot-Analyse.....	63
3.4.4.2 Quantitative real time-PCR.....	63
3.4.5 Mitochondrienmembranpotential.....	65
3.4.6 Calciumkonzentrationsbestimmung.....	67
3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen.....	70
3.4.7.1 NBT-Test.....	70
3.4.7.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein.....	73
3.4.7.3 Involvierung redox-sensitiver Kinasen.....	73
3.4.8 Nachweis von Ceramid-Bildung.....	74
3.5 Wechselwirkung mit der DNA: Bandenretardationstest.....	76
3.6 Zellzyklus-Analyse.....	78
3.7 Zelluläre Aufnahme und Verteilung .....	80
3.7.1 Doxorubicinderivate.....	80
3.7.1.1 Fluoreszenzspektren.....	81

3.7.1.2 Zelluläre Aufnahme: Influx.....	81
3.7.1.3 Wirkstoff-Ausschleusung: Efflux.....	82
3.7.1.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen.....	83
3.7.1.5 Verteilung im Gewebe: Mausmodell.....	84
3.7.2 Thymochinonderivate: Markierung und Visualisierung.....	85
4 Ergebnisse und Diskussion: Doxorubicin (13) und seine Derivate.....	88
4.1 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test.....	88
4.1.1 Effektivität.....	88
4.1.2 MDR-Sensitivität.....	90
4.1.3 Selektivität.....	93
4.2 Nachweis von Apoptose.....	94
4.2.1 Morphologie.....	94
4.2.2 DNA-Fragmentierung.....	95
4.2.2.1 TUNEL-Test.....	95
4.2.2.2 Gelelektrophorese.....	95
4.2.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten.....	97
4.2.3.1 Caspase-Aktivitätsbestimmung.....	97
4.2.3.2 Western Blot-Analyse.....	99
4.2.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid.....	100
4.2.4.1 Western Blot-Analyse.....	100
4.2.4.2 Quantitative real time-PCR.....	101
4.2.5 Mitochondrienmembranpotential.....	102
4.2.6 Calciumkonzentrationsbestimmung.....	108
4.2.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen .....	109
4.2.7.1 NBT-Test .....	110
4.2.7.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein.....	111
4.2.8 Involvierung redox-sensitiver Kinasen.....	111
4.2.9 Nachweis von Ceramid-Bildung.....	113
4.3 Wechselwirkung mit der DNA: Bandenretardationstest.....	116
4.4 Zellzyklus-Analyse.....	117

4.5 Zelluläre Aufnahme und Verteilung.....	121
4.5.1 Fluoreszenzspektren.....	121
4.5.2 Zelluläre Aufnahme: Influx.....	123
4.5.3 Wirkstoff-Ausschleusung: Efflux.....	124
4.5.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen.....	125
4.5.5 Verteilung im Gewebe: Mausmodell.....	128
4.6 Zusammenfassende Diskussion.....	130
5 Ergebnisse und Diskussion: Thymochinon (17) und seine Derivate.....	132
5.1 Bestimmung der Wirksamkeit .....	132
5.1.1 MTT-Test: Fettsäurederivate.....	132
5.1.1.1 Effektivität.....	132
5.1.1.2 MDR-Sensitivität.....	134
5.1.1.3 Selektivität.....	136
5.1.2 MTT-Test: Terpendervative.....	137
5.1.2.1 Effektivität.....	137
5.1.2.2 MDR-Sensitivität.....	139
5.1.2.3 Selektivität.....	141
5.2 Nachweis von Apoptose.....	143
5.2.1 Morphologie.....	143
5.2.2 DNA-Fragmentierung.....	144
5.2.2.1 TUNEL-Test.....	144
5.2.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten.....	145
5.2.3.1 Caspase-Aktivitätstest.....	145
5.2.4 Apoptose-Regulationsproteinen: Bcl-2, Bax und Bid.....	147
5.2.4.1 Quantitative real time-PCR.....	147
5.2.5 Mitochondrienmembranpotential.....	148
5.2.6 Calciumkonzentrationsbestimmung.....	149
5.2.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen.....	150
5.2.7.1 NBT-Test .....	151
5.2.7.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein.....	152

5.2.7.3 Involvierung redox-sensitiver Kinasen.....	152
5.2.8 Nachweis von Ceramid-Bildung.....	154
5.3 Wechselwirkung mit der DNA: Bandenretardationstest.....	155
5.4 Zellzyklus-Analyse.....	156
5.5 Zelluläre Aufnahme und Verteilung: Markierung und Visualisierung.....	158
5.6 Zusammenfassende Diskussion.....	163
6 Ergebnisse und Diskussion: Kombination von Doxorubicin (13) und Thymochinon (17).....	165
6.1 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test.....	165
6.1.1 Effektivität.....	165
6.1.2 MDR-Sensitivität.....	167
6.1.3 Selektivität.....	167
6.2 Nachweis von Apoptose.....	168
6.2.1 Morphologie und DNA-Fragmentierung.....	168
6.2.2 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten.....	168
6.2.2.1 Caspase-Aktivitätstest.....	168
6.2.3 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid.....	169
6.2.3.1 Quantitative real time-PCR.....	169
6.2.4 Mitochondrienmembranpotential.....	170
6.2.5 Calciumkonzentrationsbestimmung.....	171
6.2.6 Nachweis von Sauerstoffradikalen.....	172
6.2.6.1 NBT-Test .....	172
6.2.6.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein.....	173
6.2.6.3 Involvierung redox-sensitiver Kinasen.....	173
6.2.7 Nachweis von Ceramid-Bildung.....	174
6.3 Zellzyklus-Analyse.....	174
6.4 Zusammenfassende Diskussion.....	176
7 Zusammenfassung.....	178
8 Summary.....	181
9 Anhang.....	184

9.1 MTT: Doxorubicin (13) und seine Derivate.....	184
9.2 MTT: Thymochinon (17) und seine Derivate.....	188
9.3 MTT: Doxorubicin (13) und Thymochinon (17).....	196
9.4 Apoptose: Doxorubicin (13) und seine Derivate.....	197
9.5 Apoptose: Thymochinon (17) und seine Derivate.....	204
9.6 Apoptose: Doxorubicin (13) und Thymochinon (17).....	207
9.7 ROS-Produktion: Doxorubicin (13) und seine Derivate .....	209
9.8 ROS-Produktion: Thymochinon (17) und seine Derivate .....	210
9.9 ROS-Produktion: Doxorubicin (13) und Thymochinon (17).....	212
9.10 Zelluläre Aufnahme und Verteilung: Doxorubicin (13) und seine Derivate..	213
9.11 Abkürzungsverzeichnis.....	215
9.12 Lebenslauf.....	219
9.13 Publikationsliste.....	222
9.14 Literaturverzeichnis.....	230
9.15 Danksagung.....	249

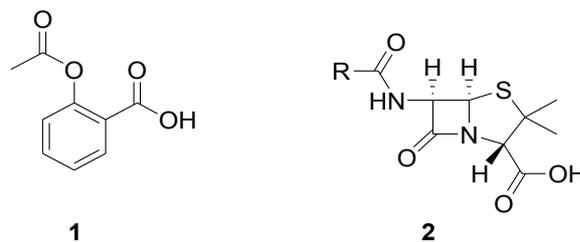




## 1 Einleitung

### 1.1 Naturstoffe in der Wirkstoffentwicklung

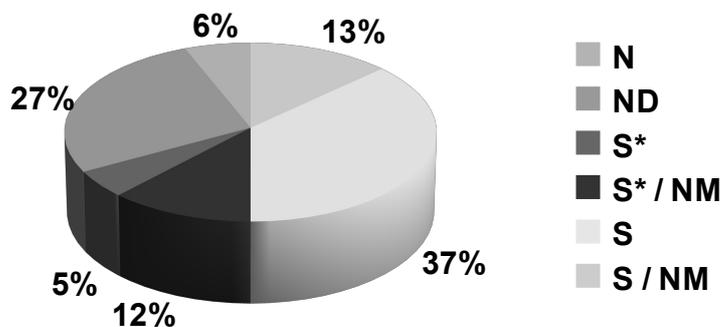
Seit jeher greift der Mensch auf die Natur zurück, um seine Grundbedürfnisse zu befriedigen; nicht zuletzt bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organisation*) vertrauen 65% der Weltbevölkerung bei der allgemeinen Gesundheitsversorgung vor allem auf traditionelle pflanzliche Medizin.<sup>[1-2]</sup> Der schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkstoff **Acetylsalicylsäure (1, ASS, vgl. Abbildung 1-1)** ist unter seinem Handelsnamen Aspirin<sup>®</sup> weltweit bekannt und steht seit 1977 auf der „Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO“. Er fand seinen Ursprung bereits in der Antike, als Extrakte von Weidenbaumrinden (*Salicaceae*), die Salicylsäure und verwandte Substanzen wie Salicin enthalten, gegen Fieber und Schmerzen aller Art eingesetzt wurden. Noch heute werden Weidenbaumrindenextrakte als homöopathisches Mittel gegen Rheuma, Neuralgien und Schwindel angewendet.<sup>[3]</sup>



**Abbildung 1-1:** Strukturformeln von Acetylsalicylsäure (**1**) und Penicillin (**2**).

Doch nicht nur pflanzliche Inhaltsstoffe sind bei der Entwicklung neuer Medikamente interessant: Im Jahre 1928 entdeckte Alexander Fleming in einer mit dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* verunreinigten Bakterienkultur den Wirkstoff Penicillin (**2**) und eröffnete somit das Zeitalter der Antibiotika. Obwohl immer mehr Bakterienstämme Resistenzen gegen verschiedene Wirkstoffe aufweisen, werden Penicilline (**2**) auch heute noch weltweit erfolgreich als Antibiotikum eingesetzt (vgl. Abbildung 1-1).<sup>[4]</sup>

Aber auch bei der Entwicklung von Wirkstoffen und Therapien für die Behandlung von Krebserkrankungen setzt man auf die große molekulare und mechanistische Vielfalt der Natur. Unzählige pflanzliche, mikrobielle und marine Naturstoffe – sogenannte Sekundärstoffe – stehen hierfür Pate. David Newman und Gordon Cragg haben eine Vielzahl der Wirkstoffe, die zwischen 1981 und 2008 isoliert oder synthetisiert wurden, nach ihrer Herkunft eingeteilt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 1-2 zusammengefasst und verdeutlichen den enormen Zuwachs potentieller Chemotherapeutika aus natürlichen Quellen während dieser Zeit.<sup>[5]</sup>



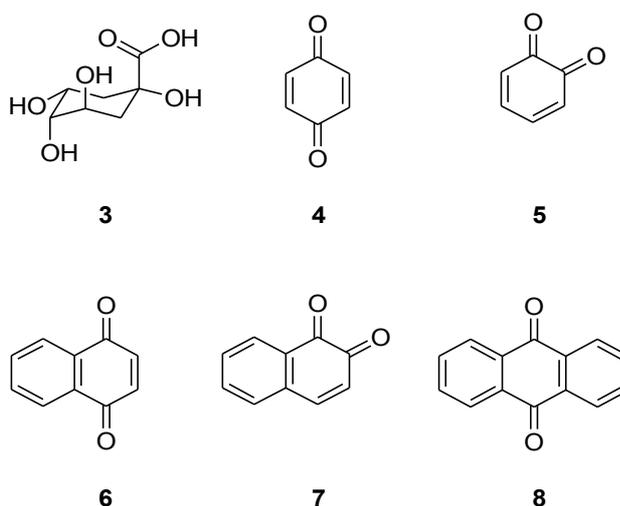
**Abbildung 1-2:** Einteilung der zwischen 1981 und 2008 entdeckten potentiellen Chemotherapeutika nach der Herkunft (%): N – unveränderter Naturstoff, ND – Naturstoff-Derivat, S – totalsynthetische Verbindung (aus Random-Screening), S\* - semisynthetische Verbindung mit Naturstoff-Pharmakophor, NM – „Naturstoff-Imitat“ mit ähnlichen Eigenschaften wie der Naturstoff (*Mimic*).<sup>[5]</sup>

Es wird dabei unterschieden zwischen reinen Naturstoffen (N) und Naturstoff-Derivaten (ND), semisynthetischen (S\*) bzw. totalsynthetischen (S) Verbindungen, sowie solchen, die als „Naturstoff-Imitate“ (NM, *Mimic*) dienen und das Substrat des nachgeahmten Naturstoffs kompetitiv hemmen. Nur etwa 37% aller potentiellen Chemotherapeutika werden totalsynthetisch hergestellt. Der Rest, also über 60%, stammt aus natürlichen Quellen oder aus natürlichen Leitstrukturen, die dann chemisch modifiziert werden, um die gewünschte Wirkung zu verbessern oder unerwünschte Eigenschaften zu minimieren.<sup>[5-7]</sup>

## 1.2 Bioaktive Chinone und ihre Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung

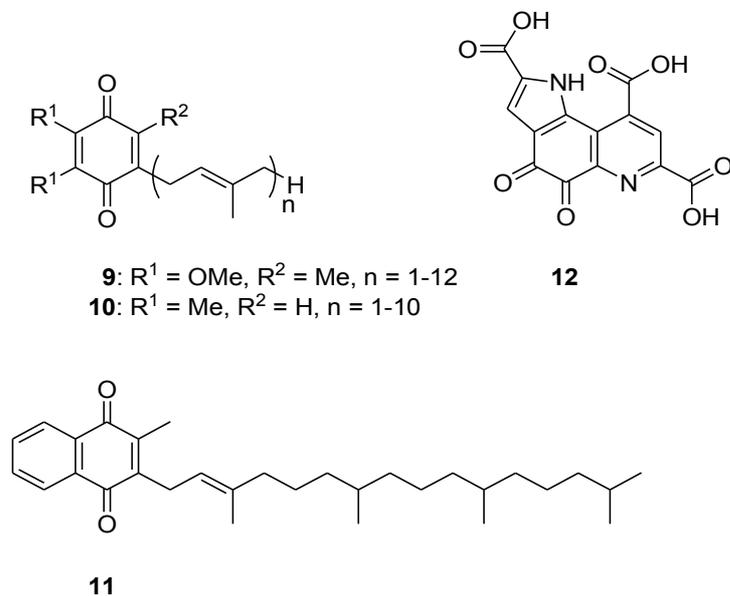
Das Gebiet der Naturstoffe umfasst im Allgemeinen alle organischen Verbindungen, die von natürlichen Quellen isoliert werden. Die pharmakologisch interessantesten und damit für die Wirkstoffentwicklung potentiellen Verbindungen lassen sich jedoch meist nur unter bestimmten Stoffklassen finden, zu denen vor allem Terpene und Alkaloide zählen, aber auch Lignane, Polyketide, Chinone und Steroide.<sup>[8]</sup> In der folgenden Arbeit wird die strukturell sehr vielseitige und biologisch interessante Stoffklasse der Chinone näher betrachtet.

Der Begriff „Chinon“ beschreibt eine Verbindungsklasse, die häufig in Naturstoffen vorkommt und vielfältige Eigenschaften aufweist. Er leitet sich von dem Namen der Chinasäure (**3**) ab, einer Zwischenstufe im Shikimatweg, welche wichtig für die Biogenese von Aromaten ist. Im Allgemeinen werden Chinone nach dem jeweiligen Aromaten benannt, von dem sie sich durch Oxidation ableiten. So erhält man *para*-Benzochinon (**4**) und *ortho*-Benzochinon (**5**) aus Benzol, *para*-Naphthochinon (**6**) und *ortho*-Naphthochinon (**7**) aus Naphthalin sowie Anthrachinon (**8**) aus Anthracen (vgl. Abbildung 1-3).<sup>[9]</sup>



**Abbildung 1-3:** Strukturformeln der Chinasäure (**3**) sowie von *para*-Benzochinon (**4**), *ortho*-Benzochinon (**5**), *para*-Naphthochinon (**6**), *ortho*-Naphthochinon (**7**) und Anthrachinon (**8**).

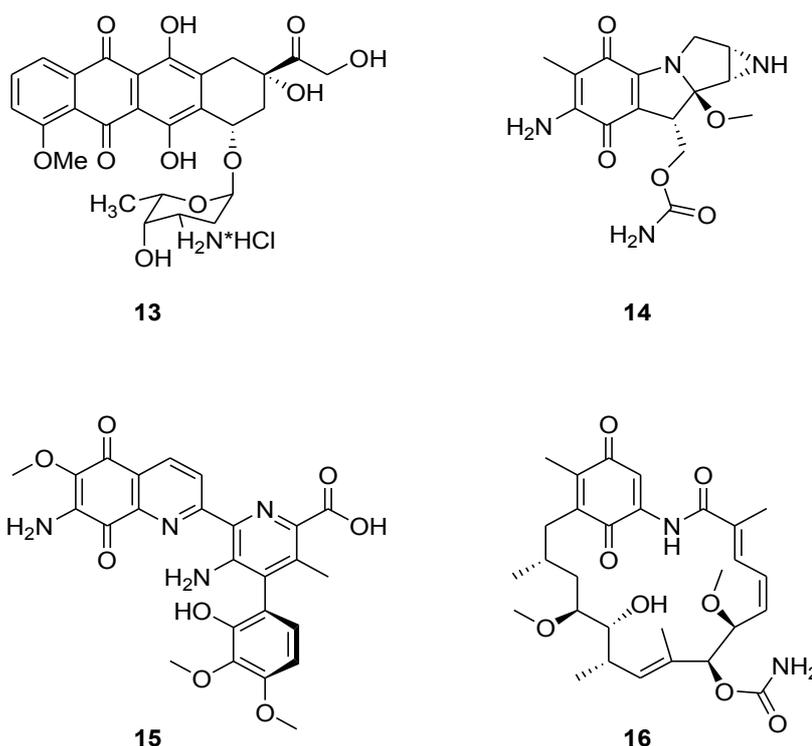
Aufgrund des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems zeichnen sich die meisten Chinone durch eine intensive Färbung (meist gelb, orange, rot) aus. Chinone bilden aber nicht nur eine große Gruppe von natürlichen Pigmenten, sie sind zudem auch für eine Vielzahl biochemischer Prozesse von Bedeutung. Die Ubichinone (**9**, ubiquitär, allgegenwärtig, z.B. Coenzym Q<sub>10</sub>, n = 10) kommen beispielsweise in nahezu allen aeroben Organismen vor und spielen eine bedeutende Rolle für den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette und die zelluläre Energieproduktion (vgl. Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4:** Strukturformeln der Ubichinone (**9**) und Plastochinone (**10**) sowie von Phyllochinon bzw. Vitamin K<sub>1</sub> (**11**) und Coenzym PQQ (**12**).

Die eng verwandten Plastochinone (**10**) (z.B. Coenzym PQ<sub>9</sub>, n = 9) sowie das Phyllochinon (**11**) – besser bekannt als Vitamin K<sub>1</sub> – befinden sich in den Chloroplasten von grünen Pflanzen und werden dort für den Elektronentransport während der Photosynthese gebraucht. Bei dem strukturell etwas anspruchsvolleren Coenzym PQQ (**12**, *pyrroloquinoline quinone*) handelt es sich nicht wie bei **9-11** um ein *para*-Chinon, sondern um ein heterozyklisches *ortho*-Chinon. Es dient verschiedenen Dehydrogenasen als Cofaktor und ist weiterhin an verschiedenen Elektronentransportprozessen beteiligt (vgl. Abbildung 1-4).<sup>[9-10]</sup>

Ein großer Teil der natürlich vorkommenden Chinone zeigt zudem Antitumor-Aktivität. Beispielsweise wird das auch unter dem Namen Adriamycin<sup>®</sup> bekannte Anthrachinon Doxorubicin (**13**) – ein Sekundärmetabolit von *Streptomyces peuceitius* var. *caesius* – in Form des Hydrochloridsalzes bei der Behandlung verschiedenster Krebserkrankungen wie etwa Leukämien, Lymphomen, Sarkomen und Karzinomen eingesetzt (vgl. Abbildung 1-5).



**Abbildung 1-5:** Strukturformeln der aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten isolierten bioaktiven Chinone Doxorubicin (**13**), Mitomycin (**14**), Streptonigrin (**15**) sowie Geldanamycin (**16**).

Die zytostatische Wirkung von Doxorubicin (**13**) wurde erstmals 1969 durch Aurelio Di Marco beschrieben, die genauen Wirkmechanismen sind jedoch noch nicht endgültig geklärt. Es ist aber bekannt, dass es aufgrund seines planaren tetrazyklischen Systems in die DNA interkaliert, somit die Assoziation der Enzyme DNA-Helikase, DNA-Topoisomerase II und DNA-Polymerase verhindert und schließlich zur Störung der Replikation und zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt (vgl. 2.2.1 Doxorubicin (**13**) und seine Derivate). Die Interkalation wird dabei über die Hydroxylgruppen sowie den glykosidisch gebundenen Desoxyaminosucker stabilisiert.<sup>[11-12]</sup>

Auch aus anderen *Streptomyces*-Arten wurden wirksame chinoide Chemotherapeutika isoliert; einige Beispiele hierfür sind ebenfalls in Abbildung 1-5 aufgeführt: Mitomycin (**14**) wurde bereits 1958 aus *Streptomyces caespitosus* isoliert, zeigt zytostatische Wirkung gegenüber gram-positiven Bakterien und Viren, wird aber hauptsächlich in der Krebstherapie eingesetzt. Es interkaliert wie Doxorubicin (**13**) in die DNA, verknüpft diese jedoch kovalent und führt durch die Verhinderung der Replikation zum programmierten Zelltod (Apoptose).<sup>[13]</sup> Das Aminochinon Streptonigrin (**15**) – auch Bruneomycin<sup>®</sup> genannt – wurde ebenfalls aus einem *Streptomyces*-Stamm isoliert, und zwar aus *Streptomyces flocculus*. Es zeigt neben einem breiten Spektrum an biologischen Eigenschaften (antibakteriell, antiviral, fungizid) auch antitumorale Effekte.<sup>[14]</sup> Und schließlich soll der Makrozyklus Geldanamycin (**16**), ein Vertreter der Ansamycine, der erstmals aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde, erwähnt sein. Geldanamycin (**16**) bindet spezifisch an das Hitzeschockprotein Hsp90 und verändert so dessen Funktion. Als Folge werden vor allem Proteine in Krebszellen abgebaut, was wiederum zu deren Zelltod führt.<sup>[5,15]</sup>

Ein weiterer Vertreter der bioaktiven Chinone ist das *para*-Benzochinon Thymochinon (**17**, vgl. Abbildung 1-2), welchem beispielsweise der Thymian (*Thymus vulgaris*) und der Schwarzkümmel (*Nigella sativa*) ihre antioxidativen und antineoplastischen Eigenschaften verdanken. Thymochinon (**17**) hat eine geringe Grundtoxizität und zeigt zudem Antitumor-Aktivität im zellulären und Xenograft-Modell.<sup>[16-19]</sup> Außerdem vermindert **17** die durch Doxorubicin (**13**) bedingte Kardiotoxizität im *in vivo* Maus-Modell, was dieses zu einem potentiellen Kandidaten bezüglich kombinatorischer Chemotherapie macht (vgl. 1.4 Biotransformation und Metabolisierung von Wirkstoffen).<sup>[20-21]</sup>

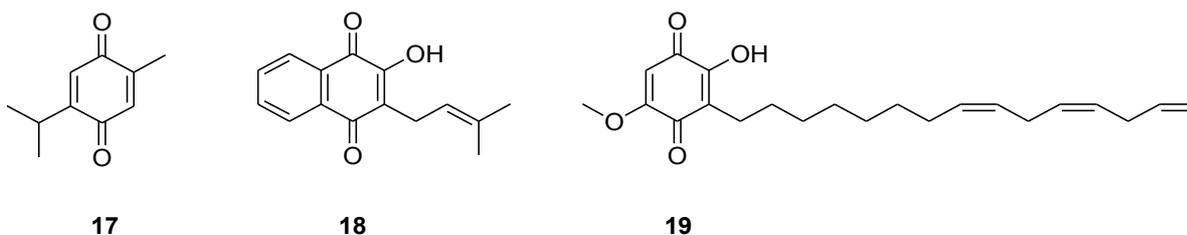
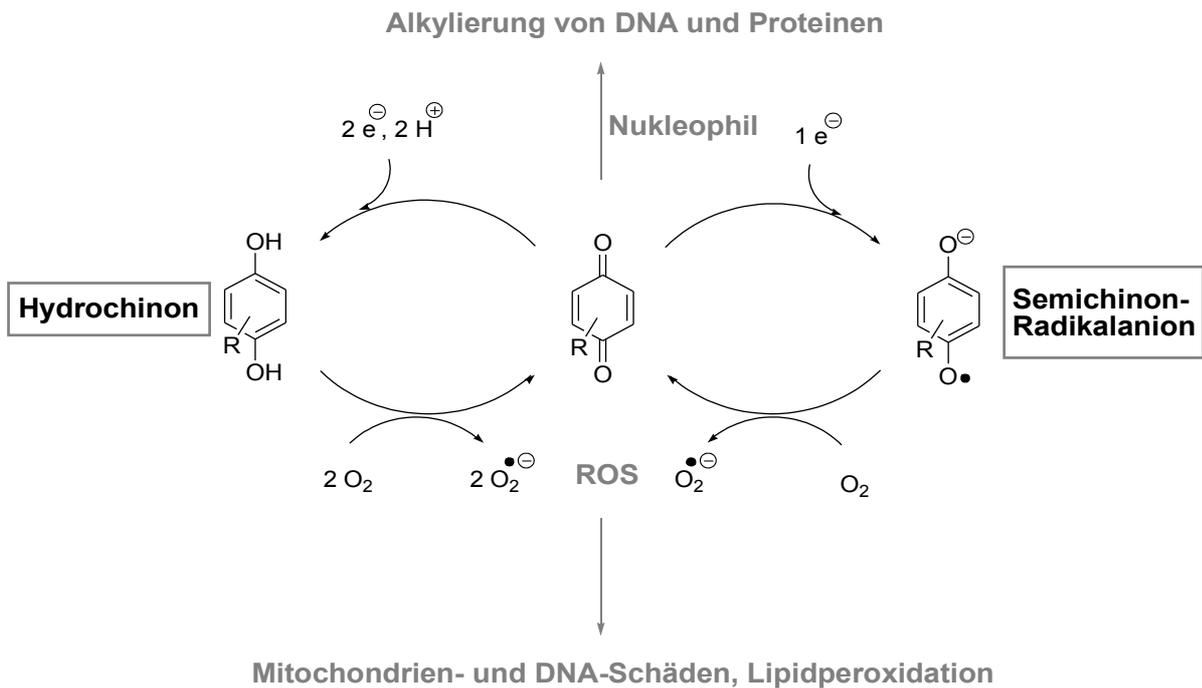


Abbildung 1-6: Strukturformeln der bioaktiven Chinone Thymochinon **17**, Lapachol **18** und Sorgeleon **19**.

Lange galt auch das *para*-Naphthochinon Lapachol (**18**) – erstmals 1882 durch Emanuele Paterno aus *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae) isoliert – wegen seiner antineoplastischen, schmerzlindernden, entzündungshemmenden sowie antitumoralen Eigenschaften als potentiell Chemotherapeutikum. Doch die hohen Dosen, die für eine wirksame Chemotherapie nötig wären, und die daraus resultierenden starken Nebenwirkungen schmälern dessen Potential.<sup>[22-25]</sup> Zuletzt soll das *para*-Benzochinon Sorgeleon (**19**) vorgestellt werden. Es bildet den Großteil des hydrophoben Wurzelextraktes der Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*) und wirkt nach Applikation auf die Wurzeln verschiedener Pflanzenarten wachstumshemmend aufgrund der Inhibierung des Elektronentransports während der Photosynthese (vgl. Abbildung 1-6).<sup>[26-27]</sup>

### 1.3 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion

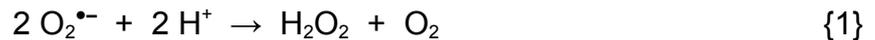
Natürliche Sekundärstoffe sind häufig wichtig für ihren Produzenten, z.B. schützen sie diesen vor Fraßfeinden oder sichern Vorteile bei der Konkurrenz um Nahrungsmittel. Die Art und Weise der Wirksamkeit zeigt wiederum ein breites Spektrum. So sind bioaktive Chinone u.a. in der Lage reaktive Sauerstoffradikale (ROS, *reactive oxygen species*) zu bilden, was oxidativen Stress für den Zielorganismus bzw. die Zielzelle bedeutet. Dies kann auch für ein potentiell Chemotherapeutikum ausgenutzt werden. Nahezu alle Chinone, die für die Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden, erfahren enzymatische Reduktionen und Oxidationen unter der Bildung von ROS. Für einige dieser antitumoralen Chinone führt die enzymatische Reduktion zudem zu einer Bildung von alkylierenden Metaboliten, die wie die reaktiven Sauerstoffradikale zu einer Schädigung von Biomolekülen (DNA, Proteine, Lipide) führen können.<sup>[9-10]</sup> Auch andere Effekte wie etwa die Kardiotoxizität oder Hautirritationen können von der ROS-Bildung herrühren (vgl. 1.4 Biotransformation und Metabolisierung von Wirkstoffen). Abbildung 1-7 fasst die möglichen Redox-Reaktionen noch einmal zusammen.



**Abbildung 1-7:** Redox-Reaktionen bioaktiver Chinone: Generierung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) sowie alkylierender Metabolite, die zur Schädigung von Biomolekülen (DNA, Proteine, Lipide) und somit zum kontrollierten Zelltod (Apoptose) führen können.<sup>[9]</sup>

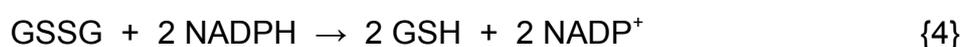
Zum einen kann eine Ein-Elektronen-Reduktion zum entsprechenden Semichinon-Radikalanion erfolgen, welches nun spontan Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und somit unter Bildung des Superoxidradikals ( $O_2^{\bullet-}$ ) zum Chinon reoxidieren kann. Diese Ein-Elektronen-Reaktion wird unter anderem von der NADPH-Cytochrom  $P_{450}$ -Reduktase katalysiert. Andererseits entsteht bei einem Zwei-Elektronen-Transfer durch die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase das entsprechende Hydrochinon, das in Phase-II des Fremdstoffmetabolismus konjugiert und schließlich ausgeschieden werden kann (vgl. 1.4 Biotransformation und Metabolisierung von Wirkstoffen). Die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase ist in vielen Tumoren überexprimiert und wurde lange Zeit als chemoprotektives Enzym angesehen, das die Entgiftung der Zelle katalysiert. Paradoxe Weise ist es auch an der Bioaktivierung von Chinonen und folglich der Alkylierung zellulärer Nucleophile (DNA, Proteine) durch die entsprechenden Metabolite beteiligt. Das Ausscheiden des Hydrochinons ist jedoch nicht zwingend, denn auch bei der Zwei-Elektronen-Reduktion kann es zur Reoxidation und zur Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  kommen (vgl. Abbildung 1-7).<sup>[9-10,28]</sup>

Superoxidradikale können anschließend zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dismutieren {1}. Diese Reaktion verläuft spontan oder wird durch die Superoxiddismutase katalysiert. Wasserstoffperoxid bildet in Gegenwart von Eisen-(II)-Ionen über die klassische Fenton-Reaktion {2} das Hydroxylradikal  $\text{OH}^\bullet$ . Eine ähnliche Reaktion wird auch durch Chinone selbst katalysiert:



Die gebildeten Sauerstoffradikale  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^\bullet$  können nun mit verschiedenen Strukturen der Zelle reagieren. So werden beispielsweise Proteine durch die Oxidation an Sulfurylgruppen oder Lipide durch die Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren geschädigt. Eine weitere Folge der ROS-Produktion sind Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche der DNA, DNA-Protein-Vernetzung, Depurinierung oder Depyrimidinierung.<sup>[28]</sup>

Wie bereits erwähnt, sind Chinone wie die Ubichinone (**9**) am Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette beteiligt, was ebenfalls zur Bildung von ROS führt. Die ROS-Produktion durch diese einfachen Chinone ist jedoch limitiert durch eine verminderte Chinon-Reduktion in intakten Zellen. Außerdem verfügen diese über verschiedene Systeme zur Zellentgiftung.<sup>[9]</sup> So wandelt die oben genannte Superoxiddismutase Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid um. Die Katalase wiederum kann Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umwandeln. Einen weiteren Schutz vor Zellschäden durch Wasserstoffperoxid bietet die Glutathionperoxidase, die unter Verbrauch von Glutathion (GSH) Wasserstoffperoxid zu Wasser abbaut {3}. Das resultierende Disulfid (GSSG) kann anschließend durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert werden {4}:



Erst bei übermäßiger ROS-Produktion reichen diese Schutzmechanismen nicht mehr aus und es kommt zum oxidativen Stress und den bereits beschriebenen Folgeerscheinungen.

Weiterhin gelten Chinone als klassische Michael-Akzeptoren, die kovalente Bindungen mit Nukleophilen ausbilden können (Alkylierung). So kann es auch ohne Bioaktivierung durch bestimmte Enzyme zu einer Schädigung von Biomolekülen kommen. Beispielsweise kann Glutathion unter der Ausbildung eines entsprechenden GS-Addukts alkyliert werden, was zu einer Abnahme des GSH-Spiegels und im Zusammenhang mit der ROS-Produktion zu vermehrtem oxidativen Stress führt.<sup>[9]</sup>

### 1.4 Biotransformation und Metabolisierung von Wirkstoffen

Neben den passenden pharmakologischen Effekten muss ein Wirkstoff auch andere Eigenschaften aufweisen. So muss eine selektive Aufnahme ins Zielgewebe gewährleistet sein und zudem – nach gewünschter Reaktion – wieder eine schnelle Entgiftung des Organismus stattfinden können. Daher unterliegen Xenobiotika, also körperfremde, meist unpolare Stoffe, einer Biotransformation, die zu deren Eliminierung aus dem Stoffwechsel führen soll. Solche Fremdstoffe, zu denen auch Wirkstoffe zählen, werden hauptsächlich in der Leber metabolisiert, aber auch in den Nieren, der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt. Der Wirkstoffmetabolismus über Leberenzyme wird meist als „*first pass effect*“ bezeichnet und kann den Wirkstoff bereits vollständig deaktivieren. Ist dies der Fall, sind höhere Dosen nötig, um den erwünschten therapeutischen Effekt zu erzielen.<sup>[29]</sup>

Die Biotransformation kann in zwei Phasen unterteilt werden: Phase I umfasst alle Umwandlungsreaktionen zur Einführung von funktionellen Gruppen (-OH, -SH) und schließt Oxidations-, Reduktions- und Hydrolyse-Reaktionen ein. In Phase II werden kleine endogene, also körpereigene Moleküle wie Glucuronsäuren, Sulfate oder Aminosäuren an den Wirkstoff angelagert (Konjugatbildung, vgl. 1.3 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion), um diesen hydrophiler zu machen.

Hierbei sind vor allem die funktionellen Gruppen -OH, -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub> und -NR<sub>2</sub> beteiligt. Die resultierenden, wasserlöslichen Metabolite können nun über die Nieren oder die Galle ausgeschieden werden. Auch Methylierungen und Acetalisierungen zählen zu den Reaktionen des Phase II-Typs. Hierbei werden keine polaren Metabolite gebildet, vielmehr wird die biologische Aktivität des Wirkstoffs heruntergeregelt. Eine Verminderung der Wirkung kann auch durch Glutathion erzielt werden, welches stark elektrophile Metabolite abfängt, bevor Biomoleküle wie Proteine, RNA und DNA Schaden nehmen (vgl. 1.4 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion).<sup>[29]</sup>

Ein unerwünschter Nebeneffekt des Wirkstoffmetabolismus ist die Bildung von toxischen Metaboliten, was bei einer Chemotherapie durch die Beeinträchtigung der Schleimhäute in Mund, Rachen und Verdauungstrakt sowie des Nagel- und Haarwachstums zu den üblichen Folgeerscheinungen wie Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall führt. Das Hauptproblem für die klinische Anwendung des tetrazyklischen Anthrachinons Doxorubicin (**13**) stellt jedoch die Kardiotoxizität dar. Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) leiden mehr als andere Zellen unter der Sauerstoffradikalproduktion durch Doxorubicin (**13**), da diese nur eine geringe Menge der schützenden Katalase aufweisen und die Glutathionperoxidase in Gegenwart von **13** inaktiviert wird. So fehlen gleich zwei Systeme der Zellentgiftung, was die Kardiomyozyten anfälliger für die Apoptose macht und eine Herzmuskelerkrankung (Kardiomyopathie) begünstigt. Ein weiterer Grund für die Schwäche der Kardiomyozyten gegenüber Doxorubicin (**13**) ist dessen Einfluss auf deren Eisenhaushalt. Wie bereits erwähnt, bildet sich bei einem Ein-Elektronen-Transfer das Semichinon-Radikalanion und bei dessen Reoxidation das Superoxidradikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (vgl. 1.4 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion). Beide sind in der Lage, in den Kern des Eisen-(III)-Speicherproteins Ferritin vorzudringen und dort Eisen in Form von Fe(II) frei zu setzen, was den Eisenhaushalt enorm beeinflusst. Um diese Nebenwirkungen möglichst gering zu halten, ist die kumulative Dosis von **13** auf 550 mg / m<sup>2</sup> Körperoberfläche limitiert, weshalb meist eine kombinatorische Chemotherapie mit anderen Zytostatika erfolgt.<sup>[30]</sup>

## 1.5 Resistenzmechanismen und gezielte Verabreichung von Wirkstoffen

Die klinische Anwendung vieler Wirkstoffe – auch die von Doxorubicin (**13**) – ist zudem aufgrund von Resistenzen und Mehrfachresistenzen problematisch. Mehrfachresistenz gegenüber Arzneimitteln (MDR, *multidrug resistance*) ist ein Phänomen, bei dem Krebszellen nach der Behandlung mit einem Wirkstoff Resistenzen gegen eine Reihe anderer potentieller Therapeutika zeigen, die sich jedoch strukturell und funktionell von der anfänglich verabreichten Verbindung unterscheiden. Der molekulare Mechanismus, der zur MDR führt, schließt die Aktivierung von Transport-, Detoxifikations- und Reparatur-Systemen sowie die Fehlregulation von Signaltransduktionswegen ein. Die klassische MDR resultiert meist aus der Überexpression von ABC-(*ATP binding cassette*)-Transportproteinen (P-gp, MRP-1, BCRP), die eine Reihe von Xenobiotika unter ATP-(*Adenosin-triphosphat*)-Hydrolyse aus der Zelle transportieren (vgl. 3.3.2 MDR-Sensitivität).<sup>[31]</sup>

Es gibt zwei Hauptstrategien, um die MDR zu überwinden: Erstens durch den Einsatz von spezifischen MDR-Inhibitoren zusätzlich zum bestehenden Wirkstoff; zweitens besteht die Möglichkeit, neue Wirkstoff-Derivate zu synthetisieren, die keine Substrate mehr für die ABC-Transporter darstellen.

## 1.6 Zielsetzung

Bei der Wirkstoffentwicklung wird häufig von einem Naturstoff ausgegangen, der durch gezielte chemische Funktionalisierung dermaßen verändert wird, dass sich die gewünschte Wirkung verbessert oder unerwünschte Effekte verringert werden. So soll zum einen die Wirkung des eher geringfügig toxischen, jedoch potenziellen Chemotherapeutikums Thymochinon (**17**) verbessert werden, zum anderen die Nebenwirkungen des bereits etablierten Wirkstoffs Doxorubicin (**13**) minimiert werden, ohne jedoch einen Verlust der Wirkung zu riskieren. Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe biochemischer Arbeitsmethoden diejenigen Wirkstoff-Kandidaten zu identifizieren und charakterisieren, die diese Kriterien erfüllen.

## 2 Materialien

### 2.1 Zelllinien

#### 2.1.1 518A2: Melanom-Zellen

Die humanen Melanom-Zellen 518A2 – maligne Tumore von Melanozyten (Pigmentzellen der Haut) – wurden von PD Dr. Reinhard Paschke (Biocenter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bezogen. Sie wachsen in adhärenter Zellkultur (DMEM-Medium) mit Epithel-ähnlicher Morphologie (vgl. Abbildung 2-1).<sup>[32]</sup>

Aufgrund der Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 ist sowohl der mitochondriale Mechanismus der Apoptose-Auslösung als auch der Weg über die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 gehemmt.<sup>[33-34]</sup> Außerdem verfügt dieser Zelltyp aufgrund einer p53-Missense-Mutation über ein funktionsloses Transkriptionsprodukt. Da das für das Tumorsuppressorprotein p53 kodierende Gen in 50% aller humanen Tumoren mutiert ist, wird immer eine p53-unabhängige Apoptose-Induktion angestrebt.<sup>[35]</sup> Dennoch zählen die 518A2-Zellen eher zu den sensitiven Zellen; eine vermehrte Produktion von ABC-Transportern, die der Zellentgiftung dienen, ist nicht gegeben.

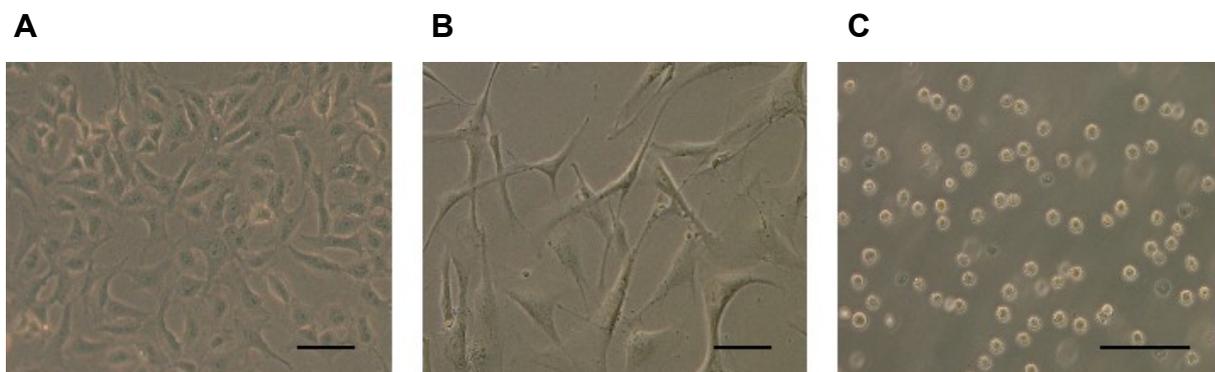
#### 2.1.2 HF: nicht-maligne Fibroblasten

Diese aus der Vorhaut eines gesunden Mannes isolierten Fibroblasten (HF - *human foreskin*) wurden von Prof. Dr. med. Matthias Ocker (Institut für Chirurgische Forschung, Philipps-Universität Marburg) bezogen. Sie wachsen in adhärenter Zellkultur (vgl. Abbildung 2-1, DMEM-Medium). Sie wurden zur Überprüfung der Testsubstanzen auf ihre Tumorselektivität herangezogen: Ein antitumoraler Wirkstoff sollte möglichst selektiv den Tumor bekämpfen, ohne jedoch das umliegende gesunde Gewebe zu beeinflussen. Der therapeutische Index TI – genauer der Quotient aus dem IC<sub>50</sub>-Wert an den Fibroblasten und dem IC<sub>50</sub>-Wert an den Tumorzellen (idealerweise Melanomzellen) – sollte möglichst groß sein.<sup>[36-38]</sup>

### 2.1.3 HL-60: Leukämie-Zellen

Bei den HL-60-Zellen handelt es sich um Leukämie-Zellen, die permanent in Suspensionskultur (vgl. Abbildung 2-1, RPMI-Medium) vermehrt werden können, wobei eine Verdopplungszeit von 36-48 h zu beachten ist. Sie wurden einer 35-jährigen Patientin mit akuter promyelozytischer Leukämie (1976) entnommen und von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen.<sup>[39-40]</sup>

Es sind sogenannte Vorläuferzellen (Promyeloblasten), die sich z.B. nach der Zugabe von Phorbol ester bzw. DMSO zu Granulozyten differenzieren können.<sup>[41]</sup> Wie die 518A2 Melanom-Zellen besitzen auch die HL-60-Zellen aufgrund einer p53-Gendeletion kein funktionstüchtiges p53.<sup>[42]</sup> Sie zählen verglichen mit allen anderen hier verwendeten Zelltypen zu den sensitivsten.



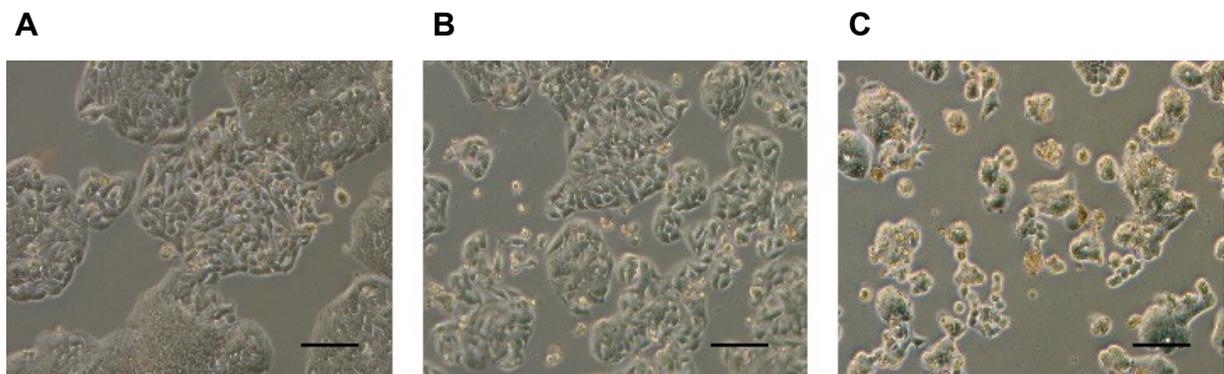
**Abbildung 2-1:** Mikroskopische Aufnahmen der 518A2 Melanom-Zellen (A, 20×), der nicht-malignen Vorhaut-Fibroblasten HF (B, 20×) sowie der HL-60 Leukämie-Zellen (C, 35×); Maßstabsbalken: 100 µm.

### 2.1.4 HT-29: Kolonkarzinom-Zellen

Die HT-29-Zellen wurden 1964 aus dem primären Kolonkarzinom einer 44-jährigen Frau gewonnen. Sie wachsen adhärent in Epithel-ähnlichen Kolonien (vgl. Abbildung 2-2, RPMI-Medium) und sind aufgrund einer Überexpression von MRP-1 und MRP-3 mehrfach resistent gegenüber Arzneimitteln. Sie wurden ebenfalls von Prof. Dr. med. Matthias Ocker bezogen.<sup>[38,43]</sup>

Wie bei vielen Kolonkarzinomen führte auch hier eine p53-Missense-Mutation zu einem funktionslosen Transkriptions-Produkt.<sup>[44]</sup>

Der ausschließlich MRP-1 überexprimierende Subklon HT-29<sup>COLC</sup> wurde durch Zusetzen steigender Mengen an Colchicin zum Medium (62,5 nM Endkonzentration) über einen Zeitraum von 90 Tagen erhalten. Die Doxorubicin-resistente Variante HT-29<sup>DOX</sup> konnte durch Zusetzen von Doxorubicin (**13**, 75 nM Endkonzentration) innerhalb von 30 Tagen bereitgestellt werden.<sup>[45]</sup> Zum Erhalt der Resistenzen wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit Colchicin sowie Doxorubicin (**13**) in den entsprechenden Endkonzentrationen behandelt.

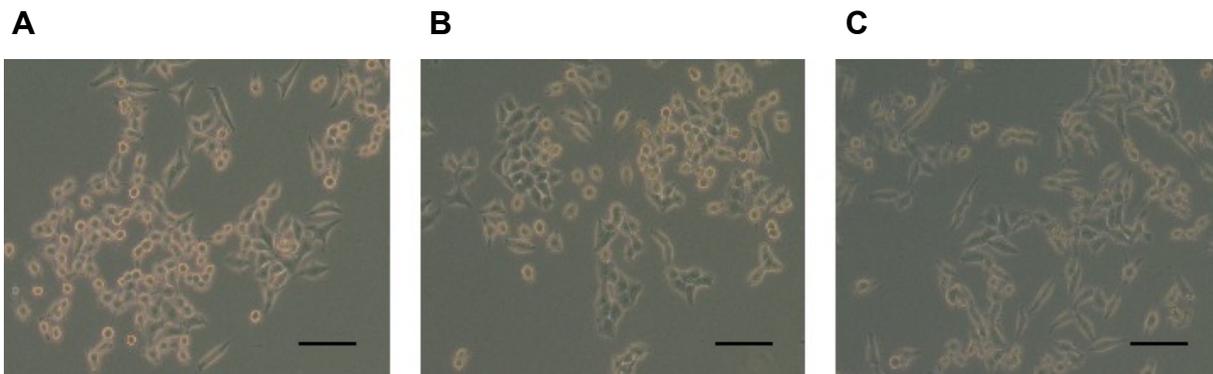


**Abbildung 2-2:** Mikroskopische Aufnahmen der HT-29 Kolonkarzinom-Zellen (A, 20×) und ihren resistenten Varianten HT-29<sup>COLC</sup> (B, 20×) und HT-29<sup>DOX</sup> (C, 20×); Maßstabsbalken: 100 µm.

### 2.1.5 KB-V1: Zervixkarzinom-Zellen

Die Zervixkarzinom-Zelllinie KB-V1 ist ein mehrfach resistenter Subklon der Zelllinie KB-3-1 (1985 isoliert), die sich selbst von HELA-Zellen ableitet. Letztere sind Zellen einer 31-jährigen Frau (1951 isoliert), die das P-Glykoprotein (P-gp) sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene überexprimieren.<sup>[46-47]</sup> Die KB-V1-Zellen wachsen teilweise in loser Form, teilweise als adhärenente Monolayer (vgl. Abbildung 2-3, DMEM-Medium) und wurden von Prof. Dr. Günther Bernhardt (Institut für Pharmazie, Universität Regensburg) bezogen.<sup>[48]</sup>

Der P-gp überexprimierende Subklon KB-V1<sup>VBL</sup> sowie die Doxorubicin-resistente Variante KB-V1<sup>DOX</sup> wurde durch Zusetzen steigender Mengen an Vinblastin bzw. Doxorubicin (**13**) zum Medium (340 nM bzw. 200 nM Endkonzentration) über einen Zeitraum von 90 Tagen erhalten.<sup>[48-49]</sup> Zum Bewahren der Resistenzen wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit Vinblastin bzw. Doxorubicin (**13**) in den entsprechenden Endkonzentrationen behandelt.

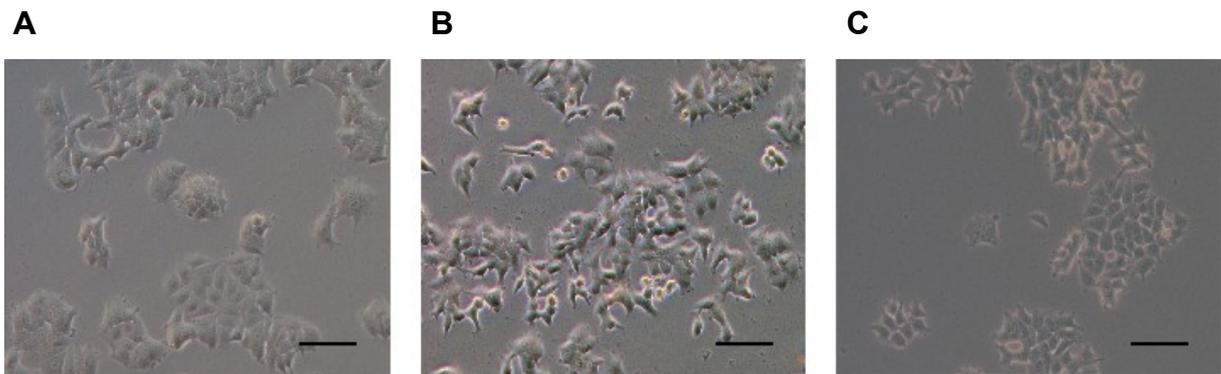


**Abbildung 2-3:** Mikroskopische Aufnahmen der KB-V1 Zervixkarzinom-Zellen (A, 20×) und ihren resistenten Varianten KB-V1<sup>VBL</sup> (B, 20×) und KB-V1<sup>DOX</sup> (C, 20×); Maßstabsbalken: 100 µm.

### 2.1.6 MCF-7: Mammakarzinom-Zellen

Die Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau mit metastasiertem Mammakarzinom nach einer Radio- und Hormontherapie etabliert.<sup>[50]</sup> Die Zellen sind positiv für den cytoplasmatischen Estrogen-Rezeptor und neigen dazu, in adhärennten Kolonien zu wachsen (vgl. Abbildung 2-4, EMEM-Medium). Sie wurde ebenfalls von Prof. Dr. Günther Bernhardt bezogen.<sup>[48]</sup>

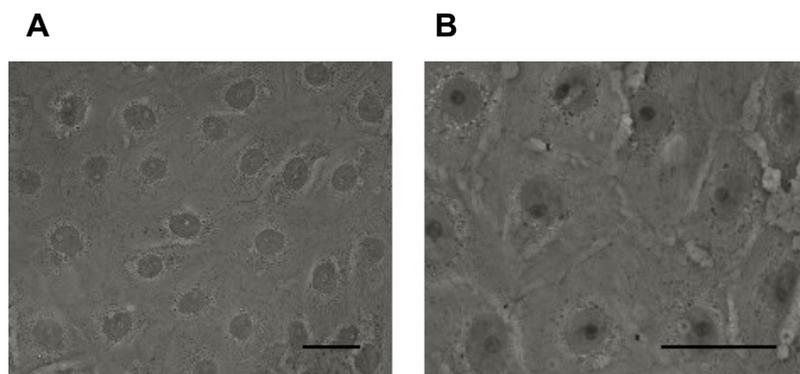
Der BCRP überexprimierende Subklon MCF-7<sup>TOPO</sup> sowie die Doxorubicin-resistente Variante MCF-7<sup>DOX</sup> wurde durch Zusetzen steigender Mengen an Topotecan bzw. Doxorubicin (**13**) zum Medium (550 nM bzw. 55 nM Endkonzentration) innerhalb von 90 Tagen gewonnen.<sup>[48]</sup> Zum Beibehalten der Resistenzen wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit Topotecan und Doxorubicin (**13**) behandelt.



**Abbildung 2-4:** Mikroskopische Aufnahmen der MCF-7 Mammakarzinom-Zellen (A, 20×) und ihren resistenten Varianten MCF-7<sup>TOPO</sup> (B, 20×) und MCF-7<sup>DOX</sup> (C, 20×); Maßstabsbalken: 100 µm.

### 2.1.7 PtK<sub>2</sub>: nicht-maligne Nierenzellen

Bei den PtK<sub>2</sub>-Zellen handelt es sich um Nierenzellen einer männlichen, australischen Beutelratte (Kängururatte, *Potorous tridactylis*). Sie wachsen adhärent mit Epithel-ähnlicher Morphologie (DMEM-Medium) und eignen sich aufgrund ihrer flachen Struktur für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (vgl. Abbildung 2-5). Alle Arbeiten mit dieser Zelllinie erfolgten am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig.



**Abbildung 2-5:** Mikroskopische Aufnahmen der nicht-malignen Nierenzellen PtK<sub>2</sub> (A, B, 20×); Maßstabsbalken: 100 µm.

Zusammenfassend sind alle verwendeten Zelllinien noch einmal in der folgenden Tabelle 2-1 aufgeführt.

## 2 Materialien

**Tabelle 2-1:** Zusammenfassung aller verwendeten Zelllinien nach ihrem Ursprung (Spezies, Gewebe, Morphologie) und ihrer Herkunft.

Zelllinie	Ursprung			Quelle
	Spezies	Gewebe	Morphologie	
518A2	Mensch	Melanom	Epithel	Biocenter Uni HAL/WB
HF	Mensch	Vorhaut	Fibroblasten	Uniklinik ER/N
HL-60	Mensch	Leukämie	Promyeloblasten	DSMZ (ACC 3)
HT-29	Mensch	Kolonkarzinom	Epithel	Uniklinik ER/N (DSMZ: ACC 299)
KB-V1	Mensch	Zervixkarzinom	Epithel	Uni R (DSMZ: ACC 149 )
MCF-7	Mensch	Brustkarzinom	Epithel	Uni R (DSMZ: ACC 115)
PtK <sub>2</sub>	Beutelratte	Niere	Epithel	HZI BS (ATCC: CCL-56)

### 2.2 Testsubstanzen

Alle hier aufgeführten Testsubstanzen mit der Ausnahme des Doxorubicins (**13**), welches von der Ribosepharm GmbH (Gräfelfing, Deutschland) stammt, wurden von Frau Dr. Sandra Breyer synthetisiert. Die Langzeitlagerung erfolgte in 10 mM Stammlösungen in DMSO bei 4°C, die entsprechenden Verdünnungen wurden jeweils direkt vor dem Versuch in PBS-Puffer bzw. Zellkulturmedium hergestellt. Die Wahl des Lösungsmittels fiel auf DMSO, da es in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar ist und häufig als Trägersubstanz und zum Einschleusen von Wirkstoffen durch die Haut eingesetzt wird. In konzentrierter Form gilt DMSO selbst als toxisch, weshalb darauf geachtet wurde, dass die Endkonzentration im zellbasierten Versuch stets unter 0,5-1% DMSO lag.

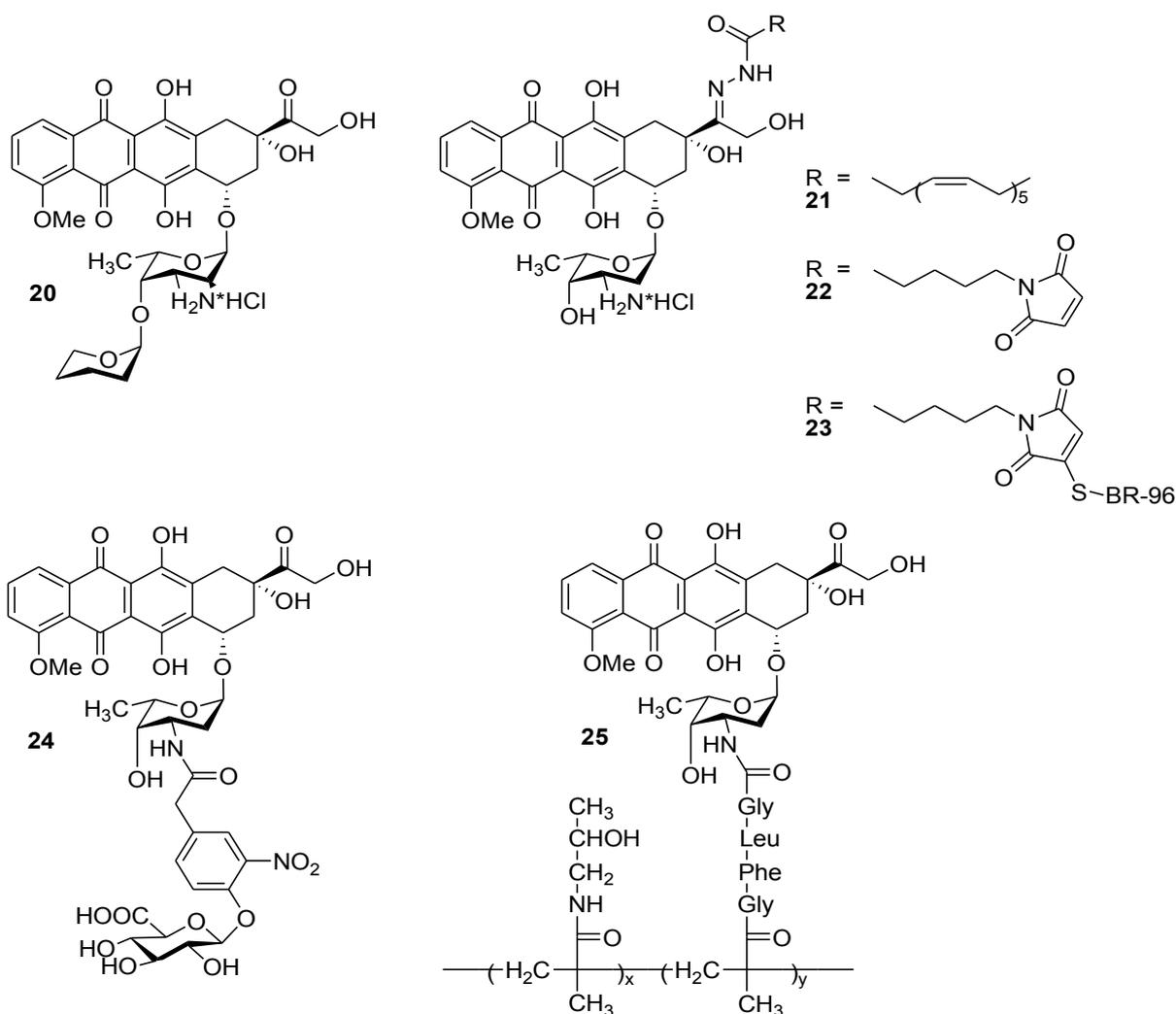
### 2.2.1 Doxorubicin (**13**) und seine Derivate

Wie bereits erwähnt, ist Doxorubicin (**13**) ein etabliertes Chemotherapeutikum, das bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen zum Einsatz kommt (vgl. 1.2 Bioaktive Chinone und ihre Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung). Seine biologische Wirkung beruht hauptsächlich auf der Interkalation in die DNA, der resultierenden Inhibierung der Topoisomerase II und, beim Ausbleiben geeigneter Reparatur-Systeme, auf der Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose).<sup>[11-12]</sup> Wie alle Chinone kann Doxorubicin (**13**) in Phase I des Fremdstoffmetabolismus zum Semichinon-Radikalanion bzw. Hydrochinon reduziert werden und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren (vgl. 1.3 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikal-produktion). Sowohl die resultierenden ROS als auch alkylierende Metabolite haben eine Schädigung von Biomolekülen (DNA, Proteine, Lipide) zur Folge, was für die Zielzelle wiederum mit der Auslösung der Apoptose enden kann.<sup>[9]</sup>

Um sich körperfremden Stoffen wieder zu entledigen, besitzen die meisten Krebszellen eine große Anzahl an ABC-Transportproteinen, was den klinischen Einsatz vieler Chemotherapeutika erschwert (vgl. 1.5 Resistenzmechanismen und gezielte Verabreichung von Wirkstoffen).<sup>[31]</sup> Da die Dosis von Doxorubicin (**13**) zudem aufgrund von starken Nebenwirkungen wie etwa der Kardiotoxizität limitiert ist, werden ständig neue Derivate mit optimiertem Wirkungsspektrum synthetisiert.<sup>[51]</sup>

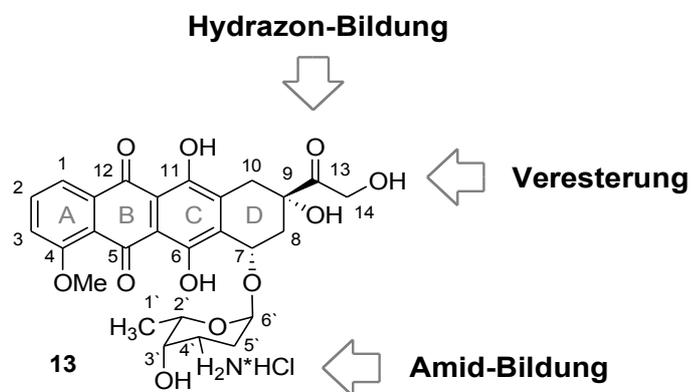
Für deren Synthese stehen viele funktionelle Gruppen am Doxorubicin-Grundgerüst zur Verfügung, die entfernt oder derivatisiert werden können. Durch eine chemische Veränderung wurde bereits eine Vielzahl von Derivaten mit verbesserten Eigenschaften und einer Wirkungssteigerung gegenüber **13** erhalten (vgl. Abbildung 2-6).<sup>[52]</sup> Das 4'-Tetrahydropyranyl-Doxorubicinderivat Pirarubicin (**20**) – auch bekannt unter dem Namen Theprubicin<sup>®</sup> – wird bereits seit Jahren als Chemotherapeutikum eingesetzt, zeigt jedoch wie **13** noch erhebliche Nebenwirkungen. Die Derivate Docosahexaensäure-Doxorubicin-Hydrazon (**21**) sowie 6-Maleimidocaproyl-Doxorubicin-Hydrazon (**22**) zeigten in verschiedenen Untersuchungen gesteigerte Tumorselektivität und Effektivität und befinden sich derzeit in klinischen Studien.<sup>[52-53]</sup>

Auch Konjugate mit monoklonalen Antikörpern wie BR-96-Doxorubicin (**23**) oder Wirkstoffvorläufer wie HMR 1826 (**24**) für die unter dem Namen A.D.E.P.T bekannte **Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy** wurden so hergestellt und versprechen eine tumorspezifischere und wirksamere Therapie. Interessant ist auch der Wirkstoffvorläufer PK 1 (**25**) – bestehend aus einem Acrylamid-Polymer, welches über einen Oligopeptid-Spacer an **13** gebunden ist. Das Polymer **25** selbst zeigt nur geringe Toxizität; im Tumorgewebe jedoch wird durch Proteolyse des Peptid-Spacers kontinuierlich **13** freigesetzt. So liegt stets eine geringe, aber effektive Dosis an **13** im Zielgewebe vor.<sup>[51]</sup> Ein ähnliches Konjugat wurde im Arbeitskreis um Prof. Dr. Axel Müller (Universität Bayreuth) hergestellt und durchläuft nun klinische Studien.<sup>[54]</sup>



**Abbildung 2-6:** Doxorubicinderivate: Pirarubicin (**20**), Doxorubicin-DHA-Hydrason (**21**), Doxorubicin-(6-Maleimidocaproyl)-Hydrason (**22**), BR-96-Doxorubicin (**23**), HMR 1826 (**24**) und PK 1 (**25**).

Für die folgende Arbeit standen unterschiedliche Doxorubicinderivate zur Verfügung, die zunächst durch die Einführung von einfachen, gesättigten Fettsäuren an verschiedene funktionelle Gruppen des Doxorubicin-Grundkörpers erhalten wurden (vgl. Abbildung 2-7). Dabei handelte es sich zum einen um Ester aus der Anknüpfung der Fettsäuren über die primäre Alkoholfunktion an C-14. Andererseits konnten diese Seitenketten als Hydrazone über die Carbonylfunktion am C-13 eingeführt werden. Und schließlich führte die Konjugation verschiedener Fettsäuren über den Desoxyaminosucker zu Säureamiden.<sup>[55-58]</sup>



**Abbildung 2-7:** Derivatisierungsmöglichkeiten an Doxorubicin (13).

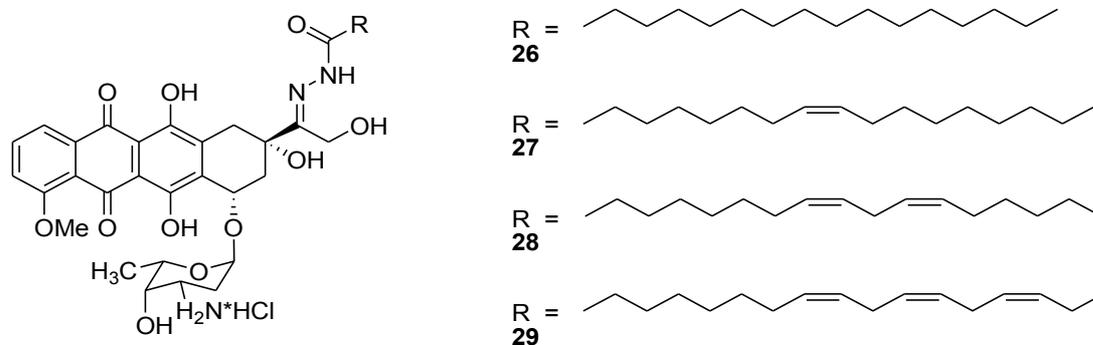
Aus eigenen Vorarbeiten an diesen Doxorubicinderivaten gingen die Hydrazone als die aktivsten der drei verschiedenen Derivatisierungsprodukte hervor und wurden daher systematisch mithilfe von verschiedenen gesättigten und ungesättigten sowie unterschiedlich langen, ggf. Terpen-terminierten, Fettsäuren synthetisiert und analysiert.<sup>[59]</sup>

### 2.2.1.1 Fettsäurederivate

Für essentielle Fettsäuren, meist mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie etwa  $\omega^3$ - (z.B.  $\alpha$ -Linolensäure oder Docosahexaensäure, kurz DHA) und  $\omega^6$ -Fettsäuren (z.B. Linolensäure) sind schon seit längerer Zeit chemoprotektive, antikachektische – einem Schwächezustand entgegenwirkende – und antitumorale Eigenschaften bekannt, was diese für die Optimierung und Funktionalisierung von Wirkstoffen prädestiniert.<sup>[60]</sup>

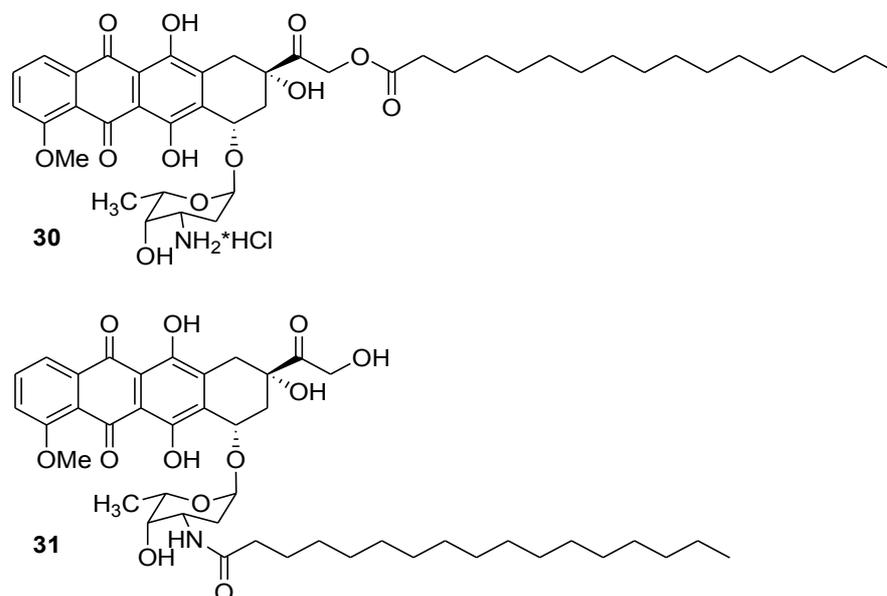
Ihre antitumoralen Effekte beruhen auf der Bindung an entsprechende Rezeptoren auf den Tumorzellen, mit der Folge der Wachstums-Inhibierung über verschiedene Signaltransduktionswege. Für die  $\omega^3$ -Fettsäure DHA konnte bereits ein Synergismus, also ein Zusammenwirken mit verschiedenen Chemotherapeutika festgestellt werden.<sup>[52]</sup>

Es wurden systematisch Doxorubicin-Hydrazon-Derivate mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren synthetisiert und anschließend mithilfe biochemischer Arbeitsmethoden charakterisiert: Dies waren zum einen das Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**26**), ein Derivat der gesättigten Margarinsäure, und zum anderen die Derivate der einfach ungesättigten Ölsäure (9Z)-Octadeca-9-ensäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**27**) sowie der mehrfach ungesättigten Linolsäure (9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**28**) bzw.  $\alpha$ -Linolensäure (9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-triensäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**29**) (vgl. Abbildung 2-8).



**Abbildung 2-8:** Strukturen der Doxorubicin-Fettsäurederivate Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**26**), (9Z)-Octadeca-9-ensäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**27**), (9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**28**) sowie (9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-triensäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**29**).

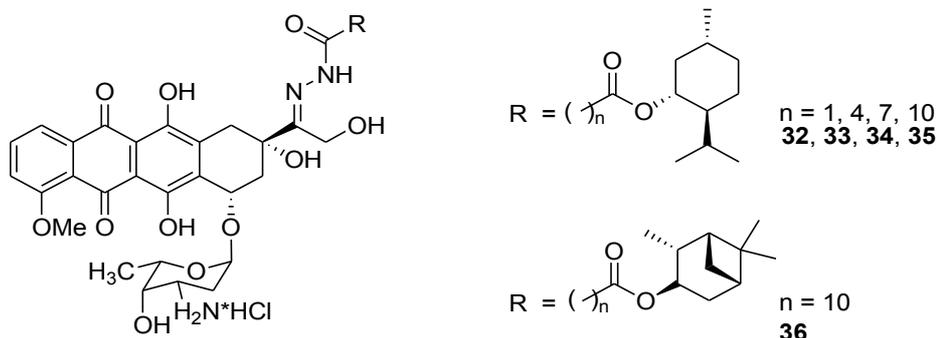
Da die Hydrazone die aktivsten Doxorubicinderivate darstellten, wurden die übrigen Derivatisierungsmöglichkeiten nicht systematisch analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch Ester und Amid der Margarinsäure (Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Ester (**30**) und Doxorubicin-Heptadecansäureamid (**31**)) zu Vergleichszwecken herangezogen (vgl. Abbildung 2-9).



**Abbildung 2-9:** Strukturen der Doxorubicin-Fettsäurederivate Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Ester **30** und Doxorubicin-Heptasäureamid (**31**).

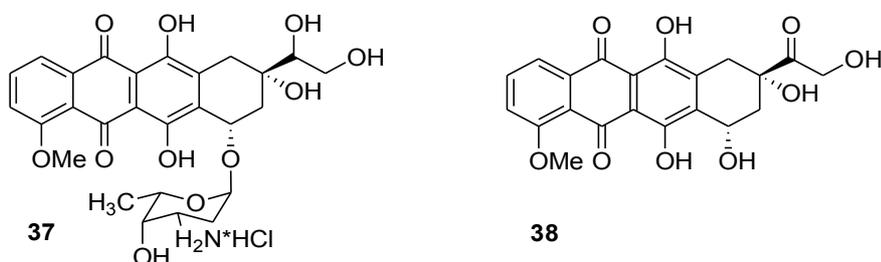
### 2.2.1.2 Terpendervative

In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnten die Membran-modulierenden Eigenschaften verschiedener Terpene ausgenutzt werden, um die zelluläre Aufnahme von entsprechenden Cisplatin-Terpen-Konjugaten im Vergleich zum reinen Cisplatin sowohl in sensitiven als auch resistenten Zellen zu erhöhen.<sup>[61]</sup> Da die MDR-Sensitivität von Doxorubicin (**13**) aufgrund der starken Anfälligkeit gegenüber ABC-Transportproteinen zu den Hauptproblemen der klinischen Anwendung zählt, wurden verschiedene Terpendervative synthetisiert, um eventuelle Kandidaten, die in der Lage sind, solche Resistenzen zu überwinden, zu identifizieren. Dabei handelte es sich ausschließlich um Hydrazonderivate unterschiedlich langer (–)-Menthol- und (–)-Borneol-terminierter Fettsäuren: 2-[(–)-Menthoxycarbonyl]-ethansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**32**), 5-[(–)-Menthoxycarbonyl]-pentansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**33**), 8-[(–)-Menthoxycarbonyl]-octansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**34**), 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**35**) und 11-[(–)-Boryloxycarbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**36**) (vgl. Abbildung 2-10).



**Abbildung 2-10:** Strukturen der Doxorubicin-Terpenderivate 2-[(–)-Menthoxycarbonyl]-ethansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**32**), 5-[(–)-Menthoxycarbonyl]-pentansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**33**), 8-[(–)-Menthoxycarbonyl]-octansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**34**), 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**35**) und 11-[(–)-Bornyloxycarbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**36**).

Da unter physiologischen Bedingungen zu geringen Teilen stets auch die Metabolite Doxorubicinol (**37**) und Doxorubicin-Aglykon (**38**) vorliegen, wurden diese zusätzlich in einigen Tests zu Vergleichszwecken herangezogen (vgl. Abbildung 2-11).<sup>[58-59]</sup>



**Abbildung 2-11:** Strukturen der Doxorubicin-Metabolite Doxorubicinol (**37**) und Doxorubicin-Aglykon (**38**).

### 2.2.2 Thymochinon (17) und seine Derivate

Thymochinon (**17**) zeigt eine Bandbreite von pharmakologisch sehr interessanten Effekten und verleiht dem Schwarzkümmel (*Nigella sativa*) seine antioxidative, entzündungshemmende, antineoplastische und blutdrucksenkende Eigenschaft. Generell ist **17** wenig toxisch; gegen eine Vielzahl von Krebszellen hat sich aber eine geringe, jedoch signifikante Antitumor-Aktivität gezeigt, die als Ausgangspunkt für diese Arbeit dienen soll (vgl. 1.2 Bioaktive Chinone und ihre Bedeutung für die

Wirkstoffentwicklung). Der genaue Wirkmechanismus als Chemotherapeutikum ist noch nicht endgültig geklärt; er beruht aber auf der Induktion von Zellzyklusarresten und der Auslösung von Apoptose – sowohl unabhängig als auch abhängig vom Tumorsuppressor p53. Auch die Inhibierung der Polo-like Kinase 1 (Plk 1) spielt dabei eine wichtige Rolle.<sup>[62]</sup>

Für die Synthese der Thymochinonderivate konnten zwei Anknüpfungspunkte am Thymochinon-Grundgerüst genutzt werden, um Seitenketten einzuführen (vgl. Abbildung 2-12). Einerseits stand wie beim Doxorubicin (**13**) die Carbonylfunktion am C-4 zur Verfügung, um Hydrazone zu synthetisieren; zum anderen konnten die Reste direkt an C-6 oder indirekt über eine dort zusätzlich eingeführte Aminofunktion (3-Aminothymochinon, **39**) angeknüpft werden. Auch hier wurden Vorarbeiten durchgeführt, wobei die direkten Derivate am besten abschnitten und daher systematisch aus verschiedenen gesättigten und ungesättigten sowie unterschiedlich langen Terpen-terminierten Fettsäuren synthetisiert und analysiert wurden.

### Hydrazon-Bildung

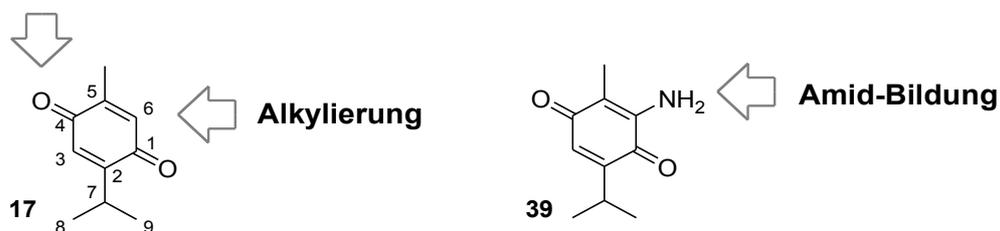
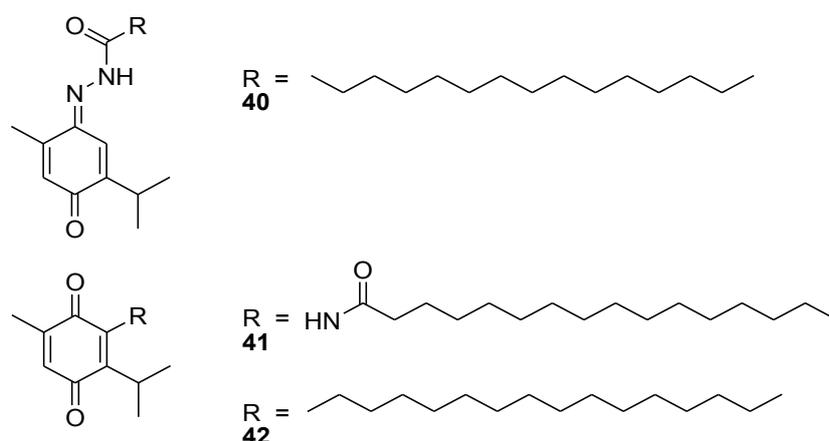


Abbildung 2-12: Derivatisierungsmöglichkeiten an Thymochinon (**17**) bzw. 3-Aminothymochinon (**39**).

#### 2.2.2.1 Fettsäurederivate

Aufgrund der bereits bekannten Eigenschaften essentieller Fettsäuren (vgl. 2.2.1. Doxorubicin (**13**) und seine Derivate) und in Analogie zu den natürlich vorkommenden Chinonen Vitamin K<sub>1</sub> (**11**) und Sorgeleon (**19**) (vgl. Abbildung 1-4, 1-6) wurden verschiedene Thymochinon-Fettsäurederivate synthetisiert und mithilfe geeigneter biochemischer Arbeitsmethoden auf ihre biologische Aktivität hin untersucht.<sup>[9,26]</sup> Interessanterweise sind diejenigen Vertreter der mehrfach unge-

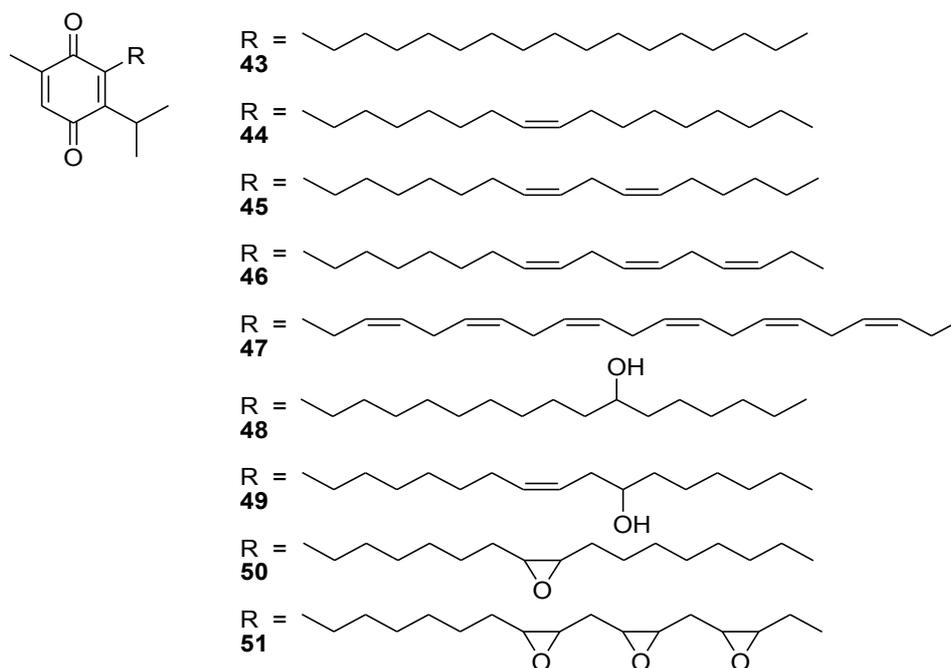
sättigten Fettsäuren, die die größten Effekte erzielten, ihrerseits Bestandteile des Schwarzkümmels.<sup>[62]</sup> Bei den Fettsäurederivaten handelte es sich zunächst um das Hexadecansäure-Thymochinon-Hydrason (**40**) sowie die direkt bzw. indirekt verknüpften Derivate Thymochinon-Hexadecansäureamid (**41**) und 6-Hexadecyl-Thymochinon (**42**) (vgl. Abbildung 2-13), die für erste Vorversuche verwendet wurden.



**Abbildung 2-13:** Strukturen der Thymochinon-Fettsäurederivate Hexadecansäure-Thymochinon-Hydrason (**40**), Thymochinon-Hexadecansäureamid (**41**) und 6-Hexadecyl-Thymochinon (**42**).

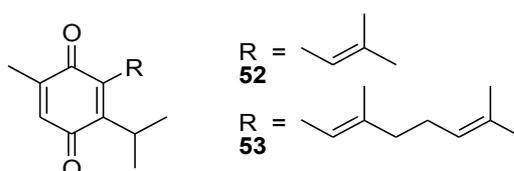
Da sich die direkte Anknüpfungsmethode als ideal herausstellte, wurden folgende Derivate systematisch synthetisiert, um den Einfluss der Doppelbindungen auf die Wirkung zu untersuchen: 6-Heptadecyl-Thymochinon (**43**), 6-(8Z)-Heptadec-8-enyl-Thymochinon (**44**), 6-(8Z,11Z)-Heptadec-8,11-dienyl-Thymochinon (**45**), 6-(8Z,11Z,18Z)-Heptadec-8,11,18-trienyl-Thymochinon (**46**) und 6-(3Z,6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-Henicosa-3,6,9,12,15,18-hexaenyl-Thymochinon (**47**) (vgl. Abbildung 2-14).

Um die Aktivität der eher inaktiven gesättigten bzw. einfach ungesättigten Derivate **43** und **44** zu verbessern, wurde eine weitere Serie von oxofunktionalisierten Fettsäurederivaten synthetisiert: 6-(11-Hydroxyheptadecyl)-Thymochinon (**48**), 6-(8Z)-(11-Hydroxyhepta-dec-8-enyl)-Thymochinon (**49**), 6-[7-(Octyloxiran-2-yl)-heptyl]-Thymochinon (**50**) und 6-[7-{3-(3-(3-Ethyloxiran-2-yl)-methyl)-oxiran-2-yl}-methyl]-oxiran-2-yl-heptyl-Thymochinon (**51**) (vgl. Abbildung 2-14).



**Abbildung 2-14:** Strukturen der Thymochinon-Fettsäurederivate 6-Heptadecyl-Thymochinon (**43**), 6-(8Z)-Heptadec-8-enyl-Thymochinon (**44**), 6-(8Z,11Z)-Heptadec-8,11-dienyl-Thymochinon (**45**), 6-(8Z,11Z,18Z)-Heptadec-8,11,18-trienyl-Thymochinon (**46**), 6-(3Z,6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-Henicosa-3,6,9,12,15,18-hexaenyl-Thymochinon (**47**), 6-(11-Hydroxyheptadecyl)-Thymochinon (**48**), 6-(8Z)-(11-Hydroxyheptadec-8-enyl)-Thymochinon (**49**), 6-(7-(Octyloxiran-2-yl)heptyl)-Thymochinon (**50**) und 6-[7-{3-(3-(3-Ethyloxiran-2-yl)methyl)oxiran-2-yl}methyl]oxiran-2-yl-heptyl-Thymochinon (**51**).

In vielen Naturstoffen tauchen immer wieder Prenyl-Einheiten auf, die nicht minder wichtig für deren Wirkung sind. Auch das bereits vorgestellte Lapachol (**18**) trägt eine solche Seitenkette (vgl. Abbildung 1-6), was die Ideen für die Derivate 6-(3-Methylbut-2-enyl)-Thymochinon (**52**) und 6-(2E,6E)-(3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)-Thymochinon (**53**) lieferte (vgl. Abbildung 2-15).<sup>[23,64-65]</sup> Geraniol zählt eigentlich zu den Terpenen, dennoch gliedern sich die Derivate **52** und **53** an dieser Stelle besser ein, da die Seitenketten als verzweigte Alkylreste angesehen werden können und die Wirkung der resultierenden Derivate wiederum von der Kettenlänge abhängen kann.



**Abbildung 2-15:** Strukturen der Thymochinon-Fettsäurederivate 6-(3-Methylbut-2-enyl)-Thymochinon **52** und 6-(2E,6E)-(3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)-Thymochinon **53**.

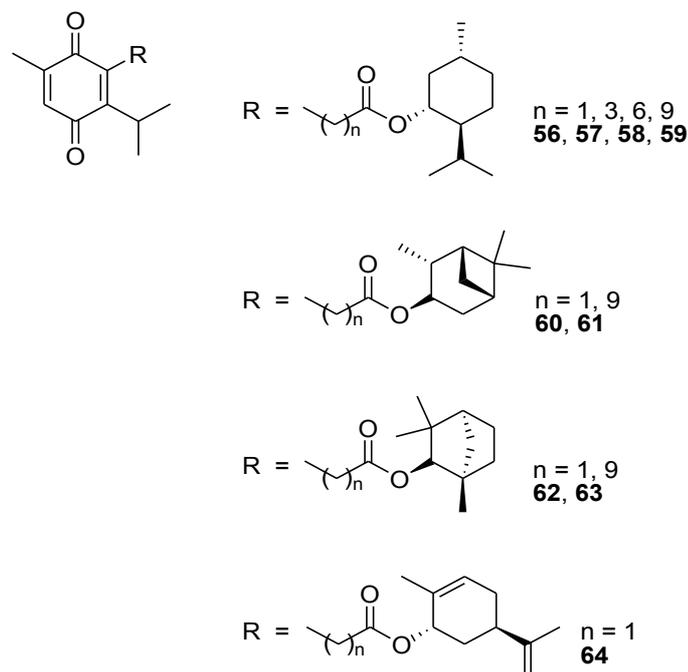
## 2.2.2.2 Terpenderivate

Neben Thymochinon (**17**), zahlreichen Fettsäuren und einigen Alkaloiden findet man vor allem zyklische Terpene wie  $\beta$ -Elemenen (**54**) und  $\beta$ -Caryophyllen (**55**) im Schwarzkümmel-Extrakt (vgl. Abbildung 2-16).<sup>[63,66]</sup>



**Abbildung 2-16:** Strukturen der im Schwarzkümmel (*Nigella sativa*) enthaltenen Terpene  $\beta$ -Elemenen (**54**) und  $\beta$ -Caryophyllen (**55**).

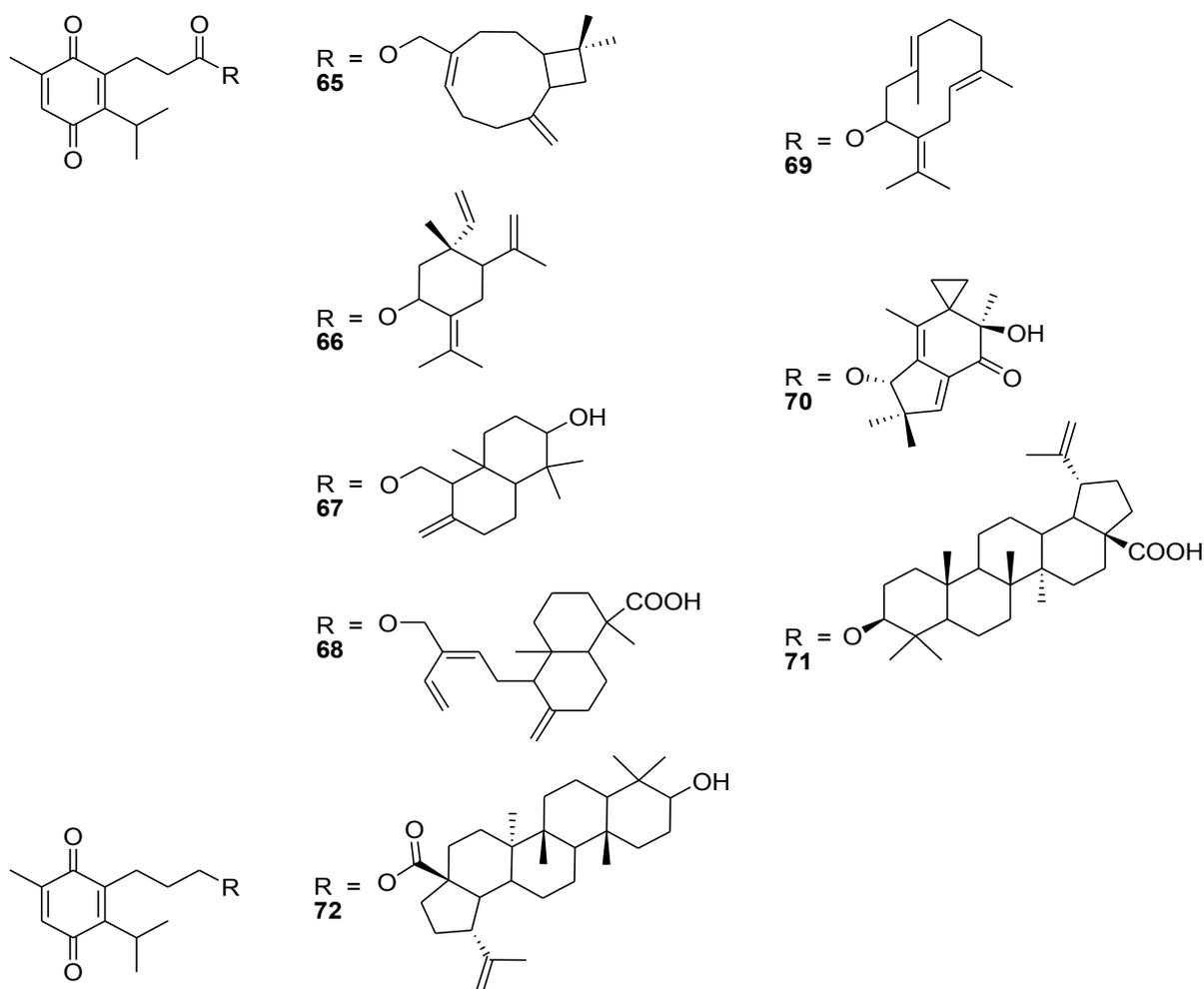
Solche Terpene zeigen selbst sehr interessante Eigenschaften und sind für die Wirkstoffentwicklung und -optimierung von großer Bedeutung (vgl. 2.2.1. Doxorubicin (**13**) und seine Derivate).<sup>[61]</sup> Daher wurden verschiedenste Konjugate mit zyklischen Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpenen hergestellt und auf ihre Antitumoraktivität hin untersucht. Die Monoterpenderivate lagen ausschließlich als Ester-Konjugate vor und wurden mithilfe der kommerziell erhältlichen Terpene (–)-Menthol, (–)-Borneol, (+)-Fenchol und Carveol aufgebaut: 6-[3-(–)-Menthoxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**56**), 6-[5-(–)-Menthoxycarbonyl]-pentyl-Thymochinon (**57**), 6-[8-(–)-Menthoxycarbonyl]-octyl-Thymochinon (**58**), 6-[11-(–)-Menthoxycarbonyl]-undecyl-Thymochinon (**59**), 6-[3-(–)-Borneyloxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**60**), 6-[11-(–)-Borneyloxycarbonyl]-undecyl-Thymochinon (**61**), 6-[3-(+)-Fenchyloxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**62**), 6-[11-(+)-Fenchyloxycarbonyl]-undecyl-Thymochinon (**63**) und 6-[3-Carveyloxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**64**) (vgl. Abbildung 2-17). Für (–)-Menthol stand eine ganze Reihe an Derivaten mit unterschiedlich langen *Spacer*n zwischen dem Thymochinon-Kern und dem (–)-Mentholrest zur Verfügung (**56**, **57**, **58**, **59**). So konnte der Einfluss der *Spacer*-Länge auf die zytotoxische Wirkung der Terpenderivate untersucht werden. Als ideale *Spacer*-Länge stellte sich die kürzeste Variante ( $n=1$ ) heraus, weshalb alle folgenden Derivate nur noch in dieser Form synthetisiert wurden (vgl. Abbildung 2-18).



**Abbildung 2-17:** Strukturen der Thymochinon-Monoterpenderivate 6-[3-(–)-Menthoxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**56**), 6-[5-(–)-Menthoxycarbonyl]-pentyl-Thymochinon (**57**), 6-[8-(–)-Menthoxycarbonyl]-octyl-Thymochinon (**58**), 6-[11-(–)-Menthoxycarbonyl]-undecyl-Thymochinon (**59**), 6-[3-(–)-Bornyloxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**60**), 6-[11-(–)-Bornyloxycarbonyl]-undecyl-Thymochinon (**61**), 6-[3-(+)-Fenchyloxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**62**), 6-[11-(+)-Fenchyloxycarbonyl]-undecyl-Thymochinon (**63**) und 6-(3-Carveyloxycarbonyl)-propyl-Thymochinon (**64**).

Hierbei kamen zum Teil auch nicht kommerziell erhältliche Terpene zum Einsatz: Das ebenfalls im Schwarzkümmel enthaltene  $\beta$ -Elemen (**54**) bzw.  $\beta$ -Caryophyllen (**55**) ist beispielsweise im 6-(3-Hydroxyisocaryophyllen)-propyl-Thymochinon (**65**) bzw. 6-(3-Elemenol)-propyl-Thymochinon (**66**) enthalten.<sup>[63-64]</sup> Und auch andere pflanzliche Sekundärstoffe wurden für die Derivatisierung verwendet; so finden sich bicyclische Terpene wie die aus Wacholderbeeren isolierbaren Communsäuren in den Derivaten 6-(Isodrimen-dioly)-propyl-Thymochinon (**67**) und 6-(3-Hydroxycommunsäure)-propyl-Thymochinon (**68**) wieder.<sup>[67-69]</sup> Weiterhin wurde 6-(3-Germacrol)-propyl-Thymochinon (**69**) aus Germacron, dem Hauptbestandteil des Zdravetsöls (Paul Kaders GmbH, Hamburg, Deutschland), synthetisiert (vgl. Abbildung 2-18).<sup>[70]</sup> Neben pflanzlichen Inhaltsstoffen sind weitere Sekundärstoffe für die Wirkstoffentwicklung von Bedeutung. Illudin M beispielsweise kann in größeren Mengen aus dem giftigen Ölbaumpilz *Omphalotus olearius* gewonnen werden; die Extraktion dazu wurde von

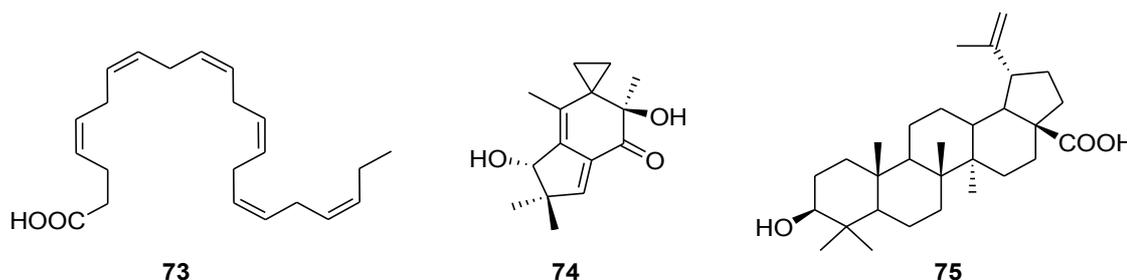
Dipl.-Biol. Sebastian Knauer optimiert. Die antitumorale Wirkung dieses Sesquiterpens ist allerdings nicht sehr spezifisch und richtet sich sowohl gegen Tumorzellen als auch gegen nicht-maligne Zellen. Durch geeignete Derivatisierung kann die Selektivität jedoch gesteigert werden.<sup>[71-72]</sup> Das entsprechende Thymochinonderivat 6-(3-Illudin-M)-propyl-Thymochinon (**70**) verspricht einen additiven Effekt der antitumoralen Wirkung von Illudin M und der chemoprotektiven Eigenschaften von Thymochinon (**17**).



**Abbildung 2-18:** Strukturen der Thymochinon-Terpenderivate 6-(3-Hydroxycaryophyllen)-propyl-Thymochinon (**65**), 6-(3-Elemenol)-propyl-Thymochinon (**66**), 6-(Isodrimen-diolyl)-propyl-Thymochinon (**67**), 6-(3-Hydroxycommunsäure)-propyl-Thymochinon (**68**), 6-(3-Germacrol)-propyl-Thymochinon (**69**), 6-(3-Illudin-M)-propyl-Thymochinon (**70**), 6-(3-Betulinsäure)-propyl-Thymochinon (**71**) und Thymochinon-Betulinsäureester (**72**).

Zuletzt standen zwei Betulinsäurederivate zur Verfügung, wobei die Anknüpfung einmal über die Säurefunktion und einmal über die Alkoholfunktion der Betulinsäure erfolgte: 6-(3-Betulinsäure)-propyl-Thymochinon (**71**) und Thymochinon-Betulinsäure-ester (**72**) (vgl. Abbildung 2-18). Die pentazyklische Triterpen-Carbonsäure Betulinsäure kommt in vielen Pflanzenarten vor – insbesondere in der Rinde von Plantanen-, Birken- und Ebenholzgewächsen – und dient dort als Abwehrstoff gegen Mikroorganismen (Phytoalexin). Sie zeigt antivirale, antiplasmodische und entzündungshemmende Eigenschaften und ist zudem wirksam gegen eine Reihe von Krebsarten, was auf einen möglichen synergistischen Effekt mit dem Thymochinon (**17**) schließen lässt. Die zytotoxische Wirkung scheint dabei abhängig von der Anwesenheit der freien Säurefunktion zu sein, was auch für die Derivate (**71**) und (**72**) überprüft werden soll (vgl. Abbildung 2.18).<sup>[73-74]</sup>

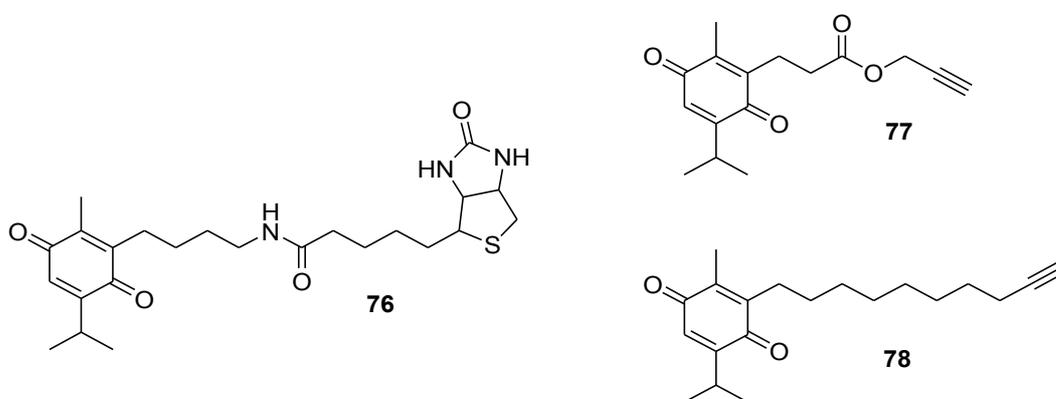
Zur Vervollständigung und für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Seitenketten der aktivsten Derivate (**47**, **70** und **72**) – namentlich Docosahexaensäure (**73**), Illudin M (**74**) und Betulinsäure (**75**) – ebenfalls auf ihre Antitumoraktivität hin untersucht (vgl. Abbildung 2-19).



**Abbildung 2-19:** Strukturen von Docosahexaensäure (**73**), Illudin M (**74**) und Betulinsäure (**75**).

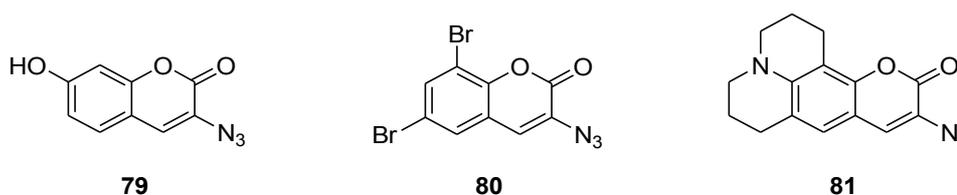
Um Aussagen über den Wirkort von Thymochinon (**17**) innerhalb der Zelle treffen zu können, konnte nicht wie bei Doxorubicin (**13**) auf die intrinsische Fluoreszenz zurückgegriffen werden.<sup>[75]</sup> Daher mussten auch hierfür geeignete Derivate synthetisiert werden, die eine Visualisierung auf Zellbasis ermöglichen. Die Markierung mit Biotin ist dabei eine gängige Methode, die eine Lokalisierung über das Biotin-Streptavidin-System ermöglicht (vgl. 3.7.2 Thymochinonderivate: Markierung und Visualisierung).<sup>[76]</sup> Das Derivat *N*-[4-(Thymochinon)-butyl]-5-(biotin)-

pentanamid (**76**) gehört jedoch einer völlig neuen Verbindungsklasse an und kann nur bedingt mit **17** oder einem seiner Fettsäure- bzw. Terpenderivate verglichen werden (vgl. Abbildung 2-20). Daher wurden die Thymochinonderivate 6-(3-Prop-2-ynyl)-propyl-Thymochinon (**77**) sowie 6-Dec-9-ynyl-Thymochinon (**78**) synthetisiert, die Alkylgruppen tragen und über eine *in vivo* „Klick-Reaktion“ – einer Variante der sogenannten Huisgen-Reaktion – mit Cumarinaziden zu stark fluoreszierenden Produkten reagieren können (vgl. Abbildung 2-20, 2-21 sowie 3.7.2 Thymochinonderivate: Markierung und Visualisierung).<sup>[77]</sup>



**Abbildung 2-20:** Strukturen der für die Visualisierung verwendeten Derivate *N*-[4-(Thymochinon)-butyl]-5-(biotin)-pentanamid (**76**), 6-(3-Prop-2-ynyl)-propyl-Thymochinon (**77**) sowie 6-Dec-9-ynyl-Thymochinon (**78**).

Idealerweise sollten diese Cumarinazide selbst nicht toxisch oder fluoreszent sein und gut von der Zelle aufgenommen und innerhalb dieser verteilt werden, um die Lokalisation der Derivate **77** und **78** möglichst genau zu bestimmen. Für die *in vivo* „Klick-Reaktion“ standen die drei Cumarinazide 7-Hydroxycumarinazid (**79**), 6,8-Dibromocumarinazid (**80**) und 6-6,7,8-Azabicyclo-[3.3.0]-hexyl-cumarinazid (**81**) zur Verfügung (vgl. Abbildung 2-21).<sup>[77]</sup>



**Abbildung 2-21:** Strukturen der für die Visualisierung verwendeten Cumarinazide 7-Hydroxycumarinazid (**79**), 6,8-Dibromocumarinazid (**80**) und 6,7,8-Azabicyclo-[3.3.0]-hexyl-cumarinazid (**81**).

## 2.3 Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.3.1 Zellkulturmedien und Puffer

#### **Medium für die 518A2-, HF- und KB-V1-Zellen**

500 ml D-MEM (Phenolrot-haltig oder -frei)

55 ml FBS (steril filtriert)

5,5 ml *Antibiotic-Antimycotic* (Penicillium G, Na-Salz [10 000 *units* / ml], Streptomycin-Sulfat [10 000 µg / ml], Amphotericin B [25 µg / ml]; steril filtriert)

2,75 ml Gentamycin (steril filtriert)

#### **Medium für die HT-29- und HL-60-Zellen**

500 ml RPMI 1640 (Phenolrot-haltig oder -frei)

55 ml FBS (steril filtriert)

5,5 ml *Antibiotic-Antimycotic* (Penicillium G, Na-Salz [10 000 *units* / ml], Streptomycin-Sulfat [10 000 µg / ml], Amphotericin B [25 µg / ml]; steril filtriert)

2,75 ml Gentamycin (steril filtriert)

#### **Medium für die MCF-7-Zellen**

1× E-MEM (9,6 g Pulver)

2,2 g NaHCO<sub>3</sub>

110 mg Natriumpyruvat

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1000 ml, steril filtriert

55 ml FBS (steril filtriert)

### **Einfriermedium zur Kryokonservierung**

70% des jeweiligen Mediums

20% FBS

10% DMSO

### **PBS-Puffer (1×)**

136 mM NaCl

2,8 mM KCl

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1000 ml, pH 7,4

### **TE-Puffer (1×)**

10 mM Tris

1 mM EDTA

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 250 ml, pH 8,0

### **TBE-Puffer (10×)**

900 mM Tris

900 mM Borsäure

25 mM EDTA

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 500 ml, pH 8,3

### **Ethidiumbromid-Färbelösung**

250 ml 0.5 x TBE-Puffer

5 µg / ml Ethidiumbromid

### **Lysis-Puffer zur Gewinnung des Zellproteins**

50 mM Tris-HCl

1% Triton X-100

1× *EDTA-free protease inhibitor mix*

150 mM NaCl

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 200 ml, pH 7,4

### **Transfer-Puffer (Blotting-Puffer)**

6 mM Tris

48 mM Glycin

5% techn. Methanol

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 4000 ml, pH 8,3

### **AP-Puffer (10×)**

1 M Tris-HCl

1 M NaCl

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1000 ml, pH 7,4

### **AP-T-Puffer**

1× AP-Puffer

0,5% (v / v) Tween-20

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1000 ml

### **Ca<sup>2+</sup>-Puffer I**

120 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O

1,5 mM CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

25 mM HEPES

10 mM Glucose, wasserfrei

H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1000 ml

### **Ca<sup>2+</sup>-Puffer II**

1 ml Ca<sup>2+</sup>-Puffer I

20 mg BSA

5 µl Pluronic F-127 (20% in DMSO)

0,8 µl Fura-1/AM (5 mM in DMSO)

### **Zellzyklus-Analyse-Färbelösung**

40 µl Propidiumiodid-Lösung ( 250 µg / ml)

1 µl RNase (10 mg / ml in Tris, pH 8,0)

160 µl Natriumcitrat (0,125% in PBS-Puffer)

## 2.3.2 Chemikalien

Agarose (MW < 1000 bp)	VWR
Albumin-Fraktion V (BSA)	Roth
<i>Antibiotic-Antimycotic</i>	Gibco
<i>Anti-<math>\beta</math>-Actin Mouse mAb (2F1-1)</i>	Biolegend
<i>Anti-Bax (<math>\Delta</math>21) Rabbit pAb</i>	Santa Cruz
<i>Anti-Bcl-2 (N-19) Mouse mAb</i>	DakoCytomation
<i>Anti-BID/tBID Mouse IgG</i>	BD Pharming
<i>Anti-Caspase-9 (Ab-2) Mouse mAb (1-2)</i>	Calbiochem
<i>Anti-Cytochrome c Mouse mAb (7H8.2C12)</i>	Biolegend
<i>Anti-Golgi (FTCD) Mouse mAb</i>	Sigma
<i>Anti-Mouse Goat IgG, H+L Chain Specific Peroxidase Conjugate</i>	Calbiochem
<i>Anti-Mouse Goat IgG, H+L Alexa Fluor<sup>®</sup> 488</i>	Molecular Probes
<i>Anti-Mouse Goat IgG, H+L Alexa Fluor<sup>®</sup> 594</i>	Molecular Probes
<i>Anti-Rabbit Goat IgG, H+L Chain Specific Peroxidase Conjugate</i>	Calbiochem
Bradford-Reagenz	Sigma
Betulinsäure	PD Dr. Reinhard Paschke, Universität Halle-Wittenberg
Borsäure	Roth
<i>Caspase-Glo-Assay (Caspase-3/7, -8, -9)</i>	Promega
Caspase-8-Inhibitor	Santa Cruz
Chemilumineszenz-Substrat (Roti-Lumin)	Roth
<i>Click-iT Reaction Buffer Kit</i>	Molecular Probes

## 2 Materialien

---

Chlorpromazin	Calbiochem
Colchicin	Roth
DAPI-HCl (1 µg / ml)	Sigma
DHA	KD-Pharma, Bexbach
Digitonin	Calbiochem
D-MEM, RPMI 1640 (Phenolrot-haltig oder -frei)	Gibco
DMSO	Fluka
DNA <i>Loading Dye</i> (6×)	Fermentas
Doxorubicin	Ribosepharma, Gräfelfing
Doxorubicin-, Thymochinderivate und Cumarinazide	Dr. Sandra Breyer, Universität Bayreuth
<i>DTT-Reducer</i> (10×)	C.B.S. Scientific
EDTA	BDH Prolabo
EGTA	Calbiochem
<i>EDTA-free protease inhibitor mix (Cocktail Set III)</i>	Calbiochem
E-MEM	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid-Lösung (1% in H <sub>2</sub> O)	Merck
<i>FACS-Flow, -Rinse, -Clean</i>	BD Biosciences
FBS	Gibco
Fumitremorgin C	Calbiochem
Fumonisin B1	Santa Cruz
Fura-2/AM	Sigma
<i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i>	Fermentas
Gentamycin (50 mg / ml)	Roth

---

Glucose	Grüssing
Glycin	Merck
HEPES	Roth
Hoechst 33342 (5 µg / ml)	Sigma
Hs_Bax_2_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	Qiagen
Hs_Bcl2_1_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	Qiagen
Hs_Gapgh_2_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	Qiagen
Illudin M	Dipl.-Biol. Sebastian Knauer, Universität Bayreuth
<i>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i>	Roche
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
<i>LDS Sample buffer (4×)</i>	C.B.S. Scientific
L-Glutathion (GSH), reduziert	Fluka
<i>LightCycler DNA Fast Start Master SYBR Green</i>	Roche
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Alfa Aesar
NaCl	Riedel-de Haën
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka
Natriumpyruvat	Gibco
Natriumcitrat	Roth
NBT	Roth, ABCR
<i>MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit</i>	Epicentre Biotechnologies
MgCl <sub>2</sub>	Fluka
<i>Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit</i>	Stratagene
MK571	Sigma

MTT	Roth, ABCR
pBR322, Plasmid-DNA	Roth
PD 98059 (ERK-Inhibitor)	LC Laboratories
<i>peqGOLD RNA pure</i>	PEQLAB
PKC 412 (PKC-Inhibitor, Staurosporin-Analogon)	LC Laboratories
Pluronic F-127	Sigma
<i>Prolong Antifade Gold</i>	Molecular Probes
Propidiumiodid-Lösung (250 µg /ml in H <sub>2</sub> O)	Millipore
Propofol	SAFC
SB 202190 (p38-MAPK-Inhibitor)	LC Laboratories
SDS	Roth
<i>SDS reducing running buffer (20×)</i>	C.B.S. Scientific
SP 600125 (JNK-Inhibitor)	LC Laboratories
<i>Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>Superscript II Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen
<i>Tissue Freezing Medium</i>	Jung
Topotecan	Sigma
Tris	VWR
Triton-X-100	Roth
Trypsin / EDTA-Lösung (1× HBSS)	Gibco
<i>TUNEL Enzyme</i>	Roche
Tween-20	Sigma
Verapamil-HCl	Prof. Dr. med. Matthias Ocker, Uni-Klinik Marburg
Vinblastin-Sulfat	Calbiochem

## 2.3.3 Geräte

-80°C Deep Freezer VX490 Juoan	Thermo Scientific
<i>2800 Frigocut-E Cryostat</i>	Reichert-Jung
Absorptions-Plattenreader, PowerWave340	BIO-TEK
Absorptions-Spektrophotometer, UV-160A UV-VIS	SHIMADZU
Autoklav, Varioklav 135	H+P
CO <sub>2</sub> -Inkubator, HERACELL 240	Heraeus
<i>Cryo 1°C Freezing Container</i>	Nalgene
Cytomics FC500 (Software: <i>CXP Cytometer 2.2</i> )	Beckman Coulter
FACS-Calibur (Software: <i>CellQuest</i> )	BD Biosciences
Fluoreszenz-Mikroskop, <i>AxioPlan / AxioCam Mrc5</i> bzw. <i>Axiovert 135</i> (Software: <i>AxioVision 3.1</i> )	Zeiss
Fluoreszenz-Plattenreader, Tecan <i>Infinite F200</i>	TECAN
Fluoreszenz-Plattenreader, Tecan <i>Genios Plus</i>	TECAN
Fluoreszenz-Spektrophotometer, SFM 25	KONTRON Instruments
Geldokumentation	LTF Labortechnik
Geldokumentation, <i>ImageQuant Las 4000 IR</i>	GE Healthcare
Horizontale Gelkammer, SGU-020T-02	Roth
Laborzentrifuge, Heraeus Multifuge X3 FR	Heraeus
<i>LightCycler 2.0 System</i> (Software: <i>Version 3.5</i> )	Roche Diagnostic
Neubauer-Zählkammer	Brand
Mikroliterpipetten (100-1000 µl, 10-100 µl, 0.5-10µl)	Eppendorf
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph
Stromquelle, 2197 <i>Power Supply</i>	LKB Bromma

## 2 Materialien

---

Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge, <i>mini spin</i> bzw. <i>centrifuge</i> 5417R	Eppendorf
Ultraschall- und Heizbad, SONOREX SUPER 10 P	BANDELIN
Ultraturrax	Janke+Kunkel IKA Labortechnik
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Vertikale Gelkammer, DCX-700 <i>Dual Cool System</i>	C.B.S. Scientific
Vertikalstromwerkbank (AURA <i>Vertical</i> S.D.4)	Nunc
Vortexer VF2	Janke+Kunkel IKA Labortechnik

### 2.3.4 Verbrauchsmaterialien

4- / 6- / 24- / 96- <i>Well</i> -Mikrotiterplatten	Greiner bio-one Cellstar, Nunc
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Fertiggele, (denat.: Proteine, nativ: DNA)	C.B.S. Scientific, Serva
Kryoröhrchen, <i>Cryovial</i> (2 ml, steril)	Roth
Objektträger und Deckgläschen	AL
Pasteurpipetten (10 cm, 20 cm, Glas)	Brand
Petrischalen (10 cm, steril, PV)	Sarstedt
Pipettenspitzen für Mikroliterpipetten	Roth
PVDF-Transfermembran	Roth
Serologische Pipetten (10 ml, 5 ml, 2 ml, steril, PV)	Roth
Sterilfilter (0,45 µm, 0,22 µm, steril, PVDF)	Roth
<i>Superfrost/Plus</i> -Objektträger	Fisher Scientific
Zellkulturflaschen (175 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one Cellstar, Nunc
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml, steril, PV)	VWR

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte unter einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer sterilen Vertikalstromwerkbank durchgeführt. Außerdem wurden die für die Zellkulturarbeiten benötigten Medien stets auf 37°C vorgewärmt.

Die adhärenenten Zellen (518A2, HF, HT-29, KB-V1, MCF-7 sowie PtK<sub>2</sub>) wurden alle 3-6 d (bei 80-90% Konfluenz) passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS-Puffer gewaschen und der Überstand wiederum abgesaugt. Nach der Zugabe einer auf 37°C vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen 2-5 min lang (je nach Zelllinie) im Inkubator behandelt. Das Ablösen der Zellen wurde in einzelnen Fällen durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche mechanisch beschleunigt. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zusetzen von frischem Zellkulturmedium gestoppt. Nach Überführung der Zellsuspension in sterile Zentrifugenröhrchen erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 150 g und 4°C (Heraeus Multifuge X3 FR). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in etwas Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Axiovert 135, Achrostigmat-Objektive 10×, 20× und 32×). Für die Subkultivierung wurden die Zellen mit einer Endzellkonzentration von  $1 \cdot 10^4$  bis  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> in die entsprechenden Zellkulturflaschen gegeben. Bei Bedarf wurde das verbrauchte Medium zwischen den Passagen durch frisches ersetzt.<sup>[78]</sup>

Die Suspensionszellen (HL-60) wurden in der Regel alle 2 d mit frischem Zellkulturmedium auf  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro ml verdünnt. Bei Bedarf, spätestens aber nach 14 d wurde das verbrauchte Zellkulturmedium nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 150 g und 4°C (Heraeus Multifuge X3 FR) verworfen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen wieder auf  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro ml verdünnt. Die maximale Zelldichte sollte einen Wert von  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml nicht überschreiten.<sup>[78]</sup>

### 3.2 Kryokonservierung

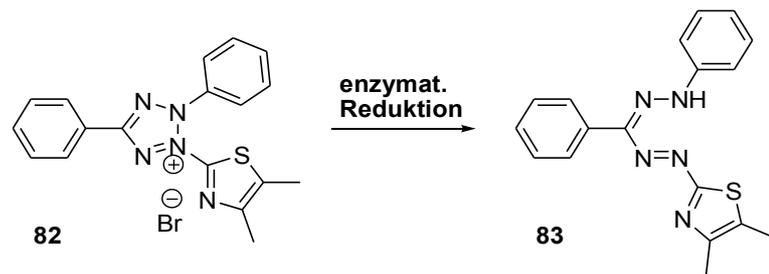
Zur Kryokonservierung der Zellen wurden 1,8 ml einer  $2\text{-}3\cdot 10^6$  Zellen pro ml dichten Zellsuspension in einem speziellen Einfriermedium in Kryoröhrchen vorgelegt, 1 h auf Eis aufbewahrt, anschließend in einen mit Isopropanol gefüllten *Cryo 1°C Freezing-Container* überführt und darin für 24 h im  $-80^\circ\text{C}$ -Schrank gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$ .

Zum Reaktivieren der kryokonservierten Zellen wurden diese bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, schnell in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min lang bei 150 g und  $4^\circ\text{C}$  (Heraeus Multifuge X3 FR) zentrifugiert, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in die entsprechenden Zellkulturflaschen gegeben. Nach 24 h wurde noch einmal das Medium gewechselt, danach erfolgte die Kultivierung wie bereits beschrieben (vgl. 3.1 Zellkultivierung).<sup>[78]</sup>

### 3.3 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test

Die Bestimmung der Wirksamkeit der Testsubstanzen erfolgte mithilfe des MTT-Tests. Dabei wird das gelbe, wasserlösliche MTT (**82**, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) zum violetten, wasserunlöslichen Formazan (**83**) umgesetzt, das kolorimetrisch nachgewiesen werden kann.

Die zelluläre Reduktion von MTT (**82**) erfolgt nicht wie früher angenommen ausschließlich durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase, sondern hängt auch von der Bereitstellung der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ab (vgl. Abbildung 3-1). Die Menge an umgesetztem MTT (**82**) ist also eher ein Maß für die Glykolyserate der Zelle *per se* und nicht ausschließlich für die Zellatmung.<sup>[79-81]</sup>

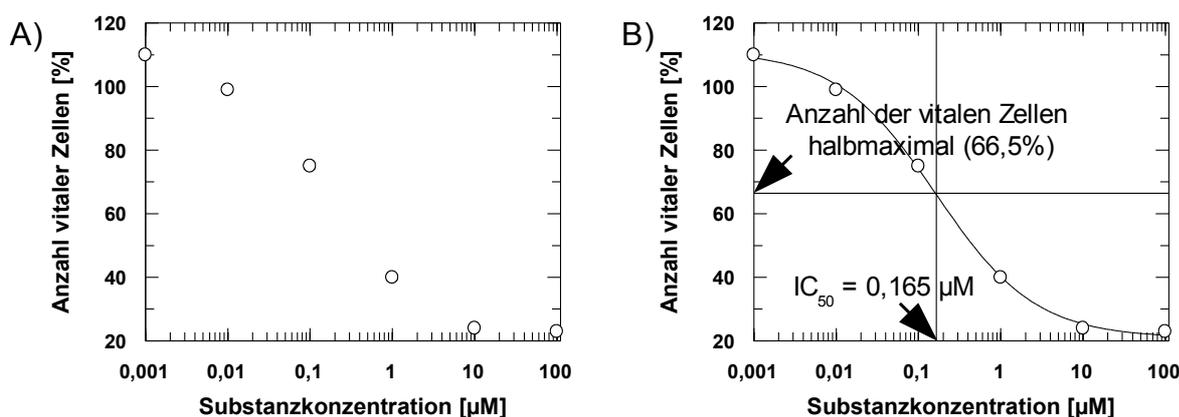


**Abbildung 3-1.** Zelluläre Reduktion von MTT (**82**) zu Formazan (**83**) durch Enzyme des Mitochondriums sowie des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

Formazan (**83**) absorbiert in einem Wellenlängenbereich von 550 bis 570 nm. Um nun eine Absorption resultierend durch Zelltrümmer von der durch **83** zu separieren, wurde der Absorptionswert bei 630 nm von dem bei 570 nm subtrahiert. Die erhaltene Differenz ist direkt proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen und wird zur Bestimmung der Wirksamkeit gegen die logarithmisch skalierte Substanzkonzentration aufgetragen (vgl. Abbildung 3-2). Die einzelnen  $IC_{50}$ -Werte (*inhibitory concentration, IC*), also diejenigen Substanzkonzentrationen, bei denen die Zellzahl auf 50% abgesunken ist, wurden anhand der nicht-linearen Regressionsfunktion des 4-Parameter-Hill-Modells {5} ermittelt, wobei der jeweils beste Fit der Funktion der Methode der kleinsten Fehlerquadrate genügte.<sup>[82-83]</sup> Sämtliche Berechnungen wurden mit dem Grafikprogramm GraFit (*ERITHACUS Software*) durchgeführt und anschließend gemittelt, da zumeist drei bis sechs Einzelmessungen zugrunde lagen.

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^d} + b \quad \text{mit:} \quad \{5\}$$

$y$	... Anzahl der vitalen Zellen [%],
$x$	... Substanzkonzentration [ $\mu\text{M}$ ],
$a = (\text{max} \cdot 1,05 - \text{min} \cdot 0,95)$	... gewichtete Spanne von $y$ ,
$b = (\text{min} \cdot 0,95)$	... Hintergrund,
$c = (e^{-IC})^{(-d)}$	... $IC_{50}$ -Wert,
$d$	... Anstieg.



**Abbildung 3-2.** Bestimmung der Wirksamkeit: A) Auftragung der Anzahl der vitalen Zellen gegen die logarithmisch skalierte Substanzkonzentration und B) Ermittlung des  $\text{IC}_{50}$ -Werts, also derjenigen Substanzkonzentration, bei der die Anzahl der vitalen Zellen halbmaximal ist, mithilfe des 4-Parameter-Hill-Modells.

### 3.3.1 Effektivität

Für den MTT-Test an den adhärennten Zellen (518A2, HCT-116, HT-29, KB-V1 sowie MCF-7) wurden nach der Trypsinierung (vgl. 3.1 Zellkultivierung) 100  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension ( $5 \cdot 10^4$  Zellen pro ml) in jedes *Well* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Von den Suspensionszellen (HL-60) wurden ebenfalls 100  $\mu\text{l}$  ( $5 \cdot 10^5$  Zellen pro ml) verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank – um ein Anheften der adhärennten Zellen an die Oberfläche der Platten sowie eine Verdopplung der Suspensionszellen zu gewährleisten – erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$  bis 1 nM). Nach 24, 48 bzw. 72 h im Brutschrank wurde eine 0,5%-ige MTT-Lösung (in PBS-Puffer) zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 0,05% (518A2, HL-60, HCT-116) bzw. 0,1% (HT-29, KB-V1, MCF-7) MTT ergab. Nach weiteren 2 h Inkubation wurde die Mikrotiterplatte für 5 min bei 150 g und 4°C (Heraeus Multifuge X3 FR) zentrifugiert, zum Entfernen des Überstandes invertiert und jedes *Well* mit 50  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 10% SDS in 99,4% DMSO und 0,6% Essigsäure versetzt. Nach einer weiteren Inkubation der Mikrotiterplatte für 15 min im Brutschrank erfolgte die Messung der Absorption bei 570 und 630 nm mit Hilfe des F200-Plattenreaders (TECAN). Die Differenz der Absorptionen ergibt bezogen auf einen Referenzwert (DMSO) ein Maß für die Anzahl der vitalen Zellen.<sup>[80-81]</sup>

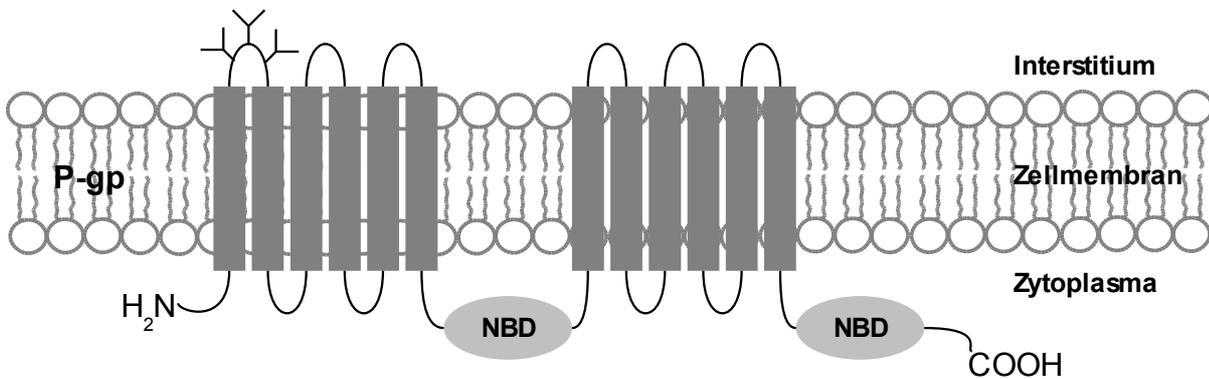
Eine generelle Zelllinienspezifität konnte ermittelt werden, indem die Wirkung aller Testsubstanzen nach der Langzeitinkubation von 72 h – also die entsprechenden  $IC_{50}$ -Werte nach dieser Zeit – logarithmiert und gemittelt wurde und die Wirkung jedes einzelnen Derivates – also jeder einzelne logarithmierte  $IC_{50}$ -Wert – relativ zu dem Mittelwert graphisch dargestellt wurde. Negative Werte zeigen eine im Vergleich zum Mittelwert größere Wirkung des Derivates an, positive Werte dagegen eine im Vergleich zum Mittelwert schlechtere Wirkung.

### 3.3.2 MDR-Sensitivität

Die meisten Krebszellen besitzen eine große Anzahl an ABC-Transportproteinen, um sich von körperfremden Stoffen zu befreien. Daher ist die klinische Anwendung vieler Wirkstoffe limitiert (vgl. 1.5 Resistenzmechanismen und gezielte Verabreichung von Wirkstoffen).<sup>[31]</sup> ABC-(*ATP binding cassette*)-Transportproteine bestehen aus **Transmembrandomänen** (TMD) und **Nukleotidbindungsdomänen** (NBD), wobei die NBDs verschiedene Motive der Peptidfaltung aufweisen, wonach die ABC-Transporter in drei Unterfamilien eingeteilt werden: ABC-B, ABC-C und ABC-G. Zu den wichtigsten Vertretern der Unterfamilien gehört das P-Glycoprotein (ABCB1, P-gp, *permeability glycoprotein*), das MDR-assoziierte Protein (ABC-C1, MRP-1, *multidrug resistance-associated protein 1*) und das Brustkrebs-Resistenzprotein (ABC-G2, BCRP, *breast cancer resistance protein*).

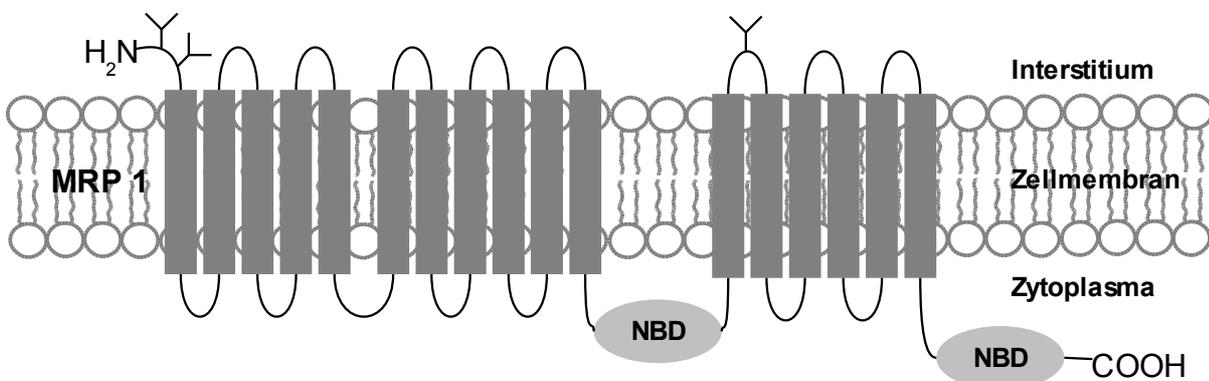
Die bekannteste Efflux-Pumpe in der Zellmembran ist das P-Glycoprotein, das normalerweise in einer Reihe von Organen und Geweben vorkommt und an Entgiftungsprozessen beteiligt ist. Die Amplifikation des Genes *mdr 1* in humanen Tumorzellen hat jedoch den Transport verschiedenster Xenobiotika aus der Zelle zur Folge, was letztlich zu mehrfachresistenten Krebszellen führt.<sup>[84]</sup> Humanes P-gp (170 kDa) besteht aus 1280 Aminosäuren, die zu einem Dimer aus 6 hydrophoben TMDs sowie einer hydrophilen NBD organisiert sind (vgl. Abbildung 3-2). Während die TMDs ausschließlich an der Substraterkennung und -bindung beteiligt sind, geschieht der Transport des Substrates aufgrund der Bewegung der NBDs innerhalb der Zellmembran. Die notwendige Energie für diesen Konformationswechsel der

NBDs wird durch die ATP-Hydrolyse geliefert, wobei zu beachten ist, dass für einen vollständigen Konformationswechsel bis zur Ausgangssituation zwei ATP-Moleküle notwendig sind.<sup>[85-87]</sup>



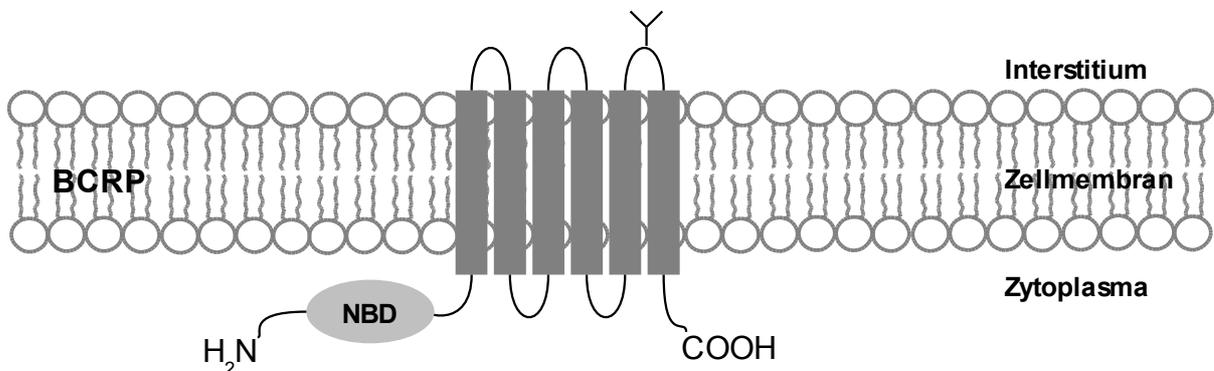
**Abbildung 3-3:** Schematische Darstellung des ABC-Transportproteins P-gp (P-Glycoprotein).

Das MDR-assoziierte Protein 1 (190 kDA) gehört zur größten Unterfamilie der ABC-Transporter und weist ähnliche Eigenschaften wie P-gp auf. Es besteht aus insgesamt 1531 Aminosäuren, die zu drei Membrandomänen (MSD, *membrane spanning domain*) und zwei NBDs zusammengefasst werden. Jede MSD besteht aus mehreren TMDs (MSD1: 5 TMDs, MSD2: 6 TMDs, MSD3: 6 TMDs). Im Gegensatz zu P-gp ist der *N*-Terminus extrazellulär orientiert. MRP-1 ist hauptsächlich für den Transport von hydrophoben Anionen sowie an Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat konjugierte Verbindungen verantwortlich (vgl. 1.4 Biotransformation und Metabolisierung von Wirkstoffen).<sup>[88-89]</sup>



**Abbildung 3-4:** Schematische Darstellung des ABC-Transportproteins MRP-1.

Das Brustkrebs-Resistenzprotein (BCRP, 72 kDa, 655 Aminosäuren) besteht im Gegensatz zu P-gp und MRP-1 aus je nur einer NBD bzw. MSD (6 TMDs). Die Orientierung der Domänen ist im Vergleich zu den anderen Transportern umgekehrt – die NBD befindet sich hier am N-Terminus, die sechs TMDs am C-Terminus. BCRP wird als Halbtransporter bezeichnet, der erst bei Dimerisierung zum Homodimer die volle Wirkung aufweist. Eine Überexpression von BCRP ist wie beim P-gp und MRP-1 durch den vermehrten Efflux von Wirkstoffen mit einem hohen Widerstand gegen eine Vielzahl von Krebsmedikamenten verbunden.<sup>[90-91]</sup>



**Abbildung 3-5:** Schematische Darstellung des ABC-Transportproteins BCRP.

Um die Fähigkeit der Testsubstanzen, MDR zu überwinden, testen zu können, wurden ausgewählte Derivate an resistenten HT-29<sup>COLC</sup>-, KB-V1<sup>VBL</sup>- bzw. MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen in Gegenwart geeigneter Inhibitoren der ABC-Transporter mittels MTT-Test untersucht: Im Falle der P-gp-überexprimierenden KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen wurden 24 µM Verapamil-Hydrochlorid 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen zugesetzt, für die BCRP-reichen MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen wurden 1,2 µM Fumitremorgin C verwendet und bei den MRP-1-überexprimierenden HT-29<sup>COLC</sup>-Zellen wurden 10 µM MK571 zugegeben. Die MTT-Tests wurden wie oben beschrieben durchgeführt (vgl. 3.3.1 Effektivität) und ausgewertet und auf die jeweiligen Ansätze ohne Inhibitorzugabe bezogen. Der resultierende Faktor R(+/-) – also der Quotient aus dem IC<sub>50</sub>-Wert mit Inhibitorzugabe sowie dem IC<sub>50</sub>-Wert ohne Inhibitorzugabe – gibt die Affinität der Testsubstanzen zu den jeweiligen ABC-Transportern an: Je kleiner R(+/-) dabei ist, desto größer ist die Affinität der Testsubstanz zum entsprechenden ABC-Transporter.

Ein idealer Wirkstoff sollte nicht von ABC-Transportern beeinflusst werden, R(+/-) sollte daher nahe 1 liegen.<sup>[90-93]</sup> Auch der Vergleich der elterlichen Zellvariante (HT-29, KB-V1, MCF-7) mit der resistent gemachten (HT-29<sup>COLC</sup>, KB-V1<sup>VBL</sup>, MCF-7<sup>TOPO</sup>) gibt interessante Aufschlüsse über eine eventuelle MDR-Sensitivität. Weiterhin wurde die Wirkung der Doxorubicinderivate in Doxorubicin-resistenten Zellen (HT-29<sup>DOX</sup>, KB-V1<sup>DOX</sup>, MCF-7<sup>DOX</sup>) untersucht.

Zudem ist die Glucuronisierung von Wirkstoffen von entscheidender Bedeutung für die intrinsische Resistenz in Kolonkarzinom-Zellen. HT-29-Zellen beispielsweise überexprimieren neben den ABC-Transportern MRP-1 und MRP-3 auch die **UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs)**, die für das Glucuronisieren von Wirkstoffen und folglich für das Ausschleusen der Metabolite über sogenannte Glucuronid-Transporter auch unabhängig von den bekannten ABC-Transportern verantwortlich sind. Um einen möglichen Einfluss der UGTs auf die Wirkung der Testsubstanzen zu untersuchen, wurde hierbei ebenfalls auf Basis des MTT-Tests ein spezifischer Inhibitor des UGT-Isozyms UGT1A9, nämlich Propofol (2,6-Diisopropylphenol, Endkonzentration 20 µM), 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen zugesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wiederum über den Faktor R(+/-).<sup>[94]</sup>

#### 3.3.3 Selektivität

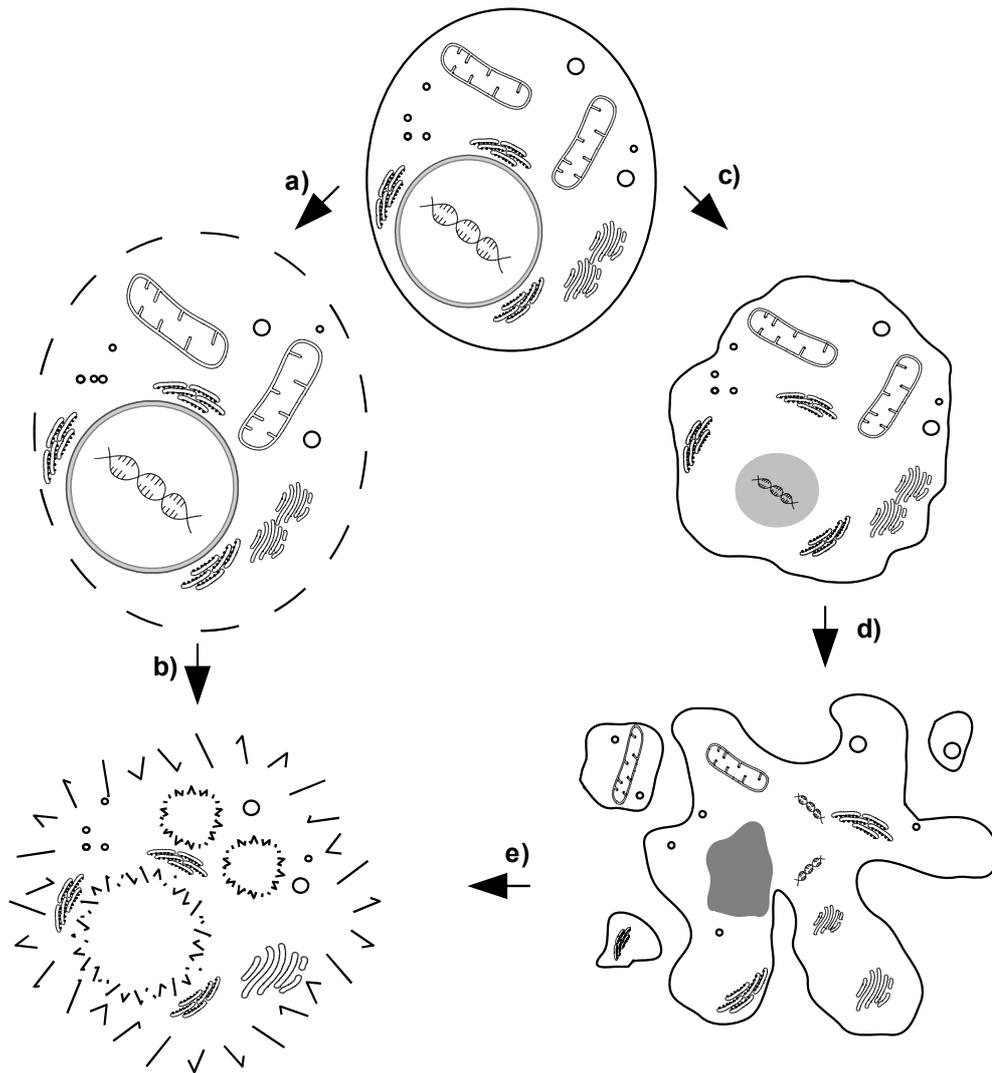
Zur Überprüfung der Testsubstanzen auf ihre Tumorselektivität wurden die Vorhaut-Fibroblasten (HF) herangezogen. Ein antitumoraler Wirkstoff sollte möglichst selektiv den Tumor bekämpfen, ohne jedoch das umliegende gesunde Gewebe zu beeinflussen; der therapeutische Index TI – der Quotient aus dem IC<sub>50</sub>-Wert (72 h) an den nicht-malignen Fibroblasten und dem IC<sub>50</sub>-Wert (72 h) an den 518A2 Melanomzellen – sollte also möglichst groß sein (vgl. 2.1.2 HF: nicht-maligne Fibroblasten). Hierfür wurde der MTT-Test wie oben beschrieben (vgl. 3.3.1 Effektivität) durchgeführt und ausgewertet. Zur Berechnung der Tumorselektivität wurde die maligne Hautkrebszelllinie 518A2 ausgewählt, weil diese keine deutliche Resistenz gegenüber den Testsubstanzen zeigte und aufgrund des gleichen Gewebsursprungs gut mit den Vorhaut-Fibroblasten zu vergleichen war.

### 3.4 Nachweis von Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und essentieller Bestandteil bei der Entwicklung und Erhaltung eines gesunden mehrzelligen Organismus. Sie beschreibt die kontrollierte Antwort auf verschiedenste äußere und zellinterne Anregungen, ist verantwortlich für die Eliminierung gefährlicher bzw. nutzloser Zellen und schafft somit ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung (Proliferation) und Zelltod. Störungen in diesem Gleichgewicht können jedoch zu Krebs, Autoimmun- oder neurodegenerativen Krankheiten führen. Bei Krebszellen beispielsweise ist das „Apoptose-Programm“ gestört: Die Tumorzellen reagieren nicht auf die Zelltod-Signale und teilen sich ungehindert weiter. Ein wesentlicher Grund dafür sind Fehler im Apoptose-Signalweg oder krankhafte Veränderungen in Apoptose-auslösenden Genen. Ein viel versprechendes Therapiekonzept stellt der Eingriff in solche Resistenzmechanismen dar, bei dem mithilfe eines Chemotherapeutikums der Zelltod wieder angeschaltet werden soll.<sup>[95-96]</sup>

#### 3.4.1 Morphologie

Man unterscheidet die Apoptose von der Nekrose, einer unkontrollierten Form des Zelltods, die zur Schädigung des Nachbargewebes führen kann. Bei der Nekrose kommt es durch den Ausfall zellulärer Ionenpumpen zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen mit osmotisch bedingtem Nachströmen von Wasser, zum Anschwellen der Zelle und schließlich zu deren Zerplatzen. Das Freisetzen von Zytoplasma in den Extrazellularraum führt meist zu lokalen Entzündungsreaktionen. Im Gegensatz zur Nekrose durchläuft die Zelle bei der Apoptose ein bestimmtes Muster der strukturellen Veränderung. Es kommt zum Schrumpfen von Zelle und Zellkern, zum Verlust von Zellverbindungen, zur Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und zu einer dichten Packung von Mitochondrien und Ribosomen. Außerdem bilden sich durch Ausstülpungen von Plasma- und Kernmembran Membranbläschen, die die Zelle in mehrere membrangebundene Vesikel unterteilen (vgl. Abbildung 3-6).<sup>[95-96]</sup>



**Abbildung 3-6:** Schematische Darstellung der Apoptose bzw. Nekrose: a) Anschwellen und b) Zerplatzen der Zelle während der Nekrose. c) Schrumpfen der Zelle und d) Bildung von Membranbläschen während der Apoptose. e) Übergang zur sekundären Nekrose beim Ausbleiben der Phagozytose durch benachbarte Zellen oder Makrophagen.

### 3.4.2 DNA-Fragmentierung

Ein typisches Merkmal der Apoptose ist die DNA-Fragmentierung. Diese kann zum einen durch Gelelektrophorese der zellulären DNA untersucht werden, zum anderen aber auch immunohistochemisch durch die enzymatische *in situ*-Färbung der DNA-Fragmente (z.B. TUNEL-Test) und anschließende Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. Durchflusszytometrie.<sup>[95-96]</sup>

### 3.4.2.1 TUNEL-Test

Zum Nachweis von DNA-Fragmentierung wurde unter anderem der TUNEL- (*TdT-mediated dUTP Nick End Labelling*)-Test herangezogen. Hierbei werden die während der Apoptose durch Fragmentierung der DNA-Stränge frei werdenden 3'-OH-Gruppen durch das Enzym TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) mit Fluorescein-markierten Nukleotiden (dUTPs) versehen. Die Detektion der fluoreszierenden DNA-Fragmente erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops.<sup>[97]</sup>

Im Fall der adhärennten Zellen 518A2 wurden 500 µl einer Zellsuspension der Konzentration  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen pro ml in die *Wells* einer 24-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die dicht bewachsenen Zellen für 24 h mit den entsprechenden Substanzen (5 µM Endkonzentration) inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA von den *Wells* abgelöst und mit den losen Zellen aus dem zuvor abgenommen Überstand für 10 min bei 400 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C abzentrifugiert. Die HL-60 Suspensionskulturzellen wurden auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro ml gebracht, ebenfalls für 24 h mit den entsprechenden Derivaten (500 µl, 5 µM Endkonzentration) im Brutschrank inkubiert und abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer wurde das Zellpellet mit 2% Formalin (in PBS-Puffer) für 7 min fixiert, danach erneut gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden je nach Größe des Pellets in 10-30 µl PBS-Puffer resuspendiert, in Spots auf einen Objektträger aufgetragen und nach dem Trocknen mit einer Mischung aus 0,1% Natriumcitrat und 0,1% Triton X-100 (in PBS-Puffer) für 2 min bei 4°C permeabilisiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Färbung der zellulären DNA mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit* nach Anleitung sowie die mikroskopische Analyse der Spots (Axiovert 135, Zeiss, Filterset FITC, Vergrößerung 32×). Die apoptotischen, grün fluoreszierenden Zellen wurden ausgezählt und bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle als prozentualer apoptotischer Anteil von der Gesamtzellzahl angegeben (Axiovision 3.1).

#### 3.4.2.2 Gelelektrophorese

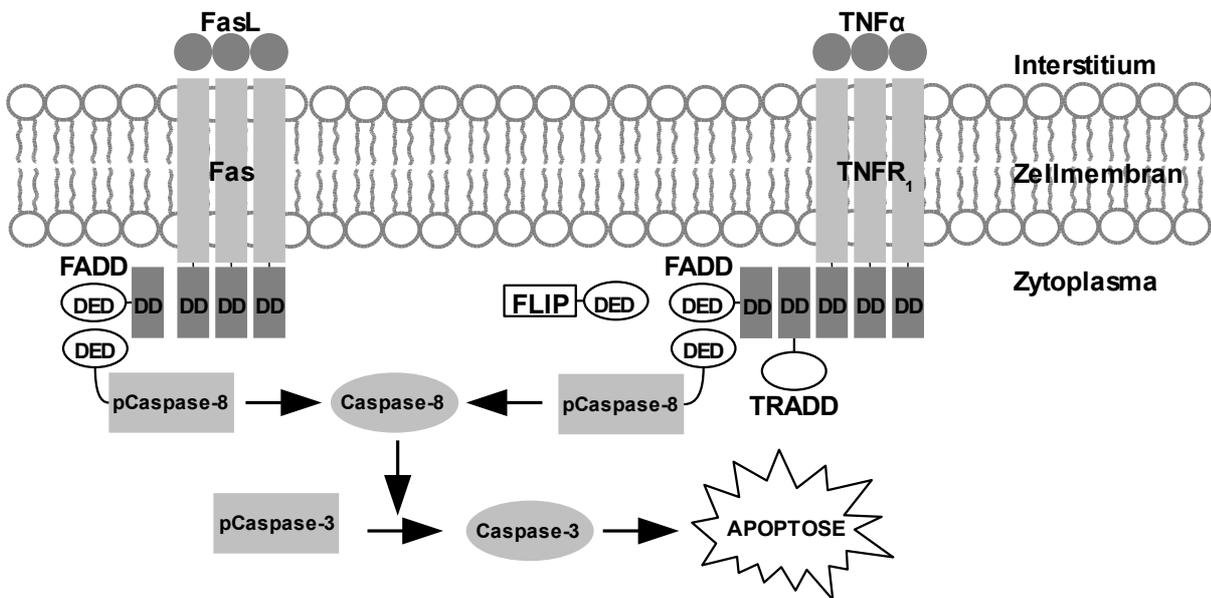
Eine weitere Methode zum Nachweis von DNA-Fragmentierung ist die Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese. Hierfür wurde die genomische DNA mithilfe des *MasterPure Complete DNA Isolation Kits* aus Zellen isoliert, die zuvor mit den entsprechenden Wirkstoffen inkubiert worden waren, und anschließend in einem neutralen *ServaGel* aufgetrennt.

Für die adhärenenten Zellen 518A2 wurden 3 ml einer Zellsuspension ( $1,0 \cdot 10^5$  pro ml) in die *Wells* einer 6-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die dicht bewachsenen Zellen für bis zu 48 h mit den entsprechenden Substanzen (5  $\mu$ M Endkonzentration) inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA abgelöst und mit den losen Zellen aus dem Überstand für 10 min bei 200 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C abzentrifugiert. Die Suspensionszellen HL-60 (3 ml,  $5 \cdot 10^6$  pro ml) wurden ebenfalls bis zu 48 h mit den entsprechenden Derivaten inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte jeweils in 300  $\mu$ l *Tissue and Cell Lysis Solution* – versetzt mit 1  $\mu$ l Proteinase K (50  $\mu$ g /  $\mu$ l) – durch gründliches Schütteln über einen Zeitraum von 15 min bei 65°C. Nach dem Abkühlen der Proben auf 37°C wurde je 1  $\mu$ l RNase A (5 mg / ml) hinzu pipettiert, gründlich gemischt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, mit 150  $\mu$ l *MPC Protein Precipitation Reagent* versetzt und für 10 s energisch geschüttelt (Vortexer). Die Abtrennung von Zelltrümmern und Proteinen erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 g (Eppendorf *centrifuge* 5417R) und 4°C. Durch die Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol zum Überstand wurde die DNA gefällt, in einer folgenden 10-minütigen Zentrifugation bei 10000 g (Eppendorf *centrifuge* 5417R) und 4°C pelletiert, anschließend zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 35  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert. Zur Auftragung auf das neutrale *ServaGel* wurden 5  $\mu$ l *DNA-Loading Dye* hinzu pipettiert; die Elektrophorese erfolgte für 80 min bei 80 V (Stromstärke und Leistung maximal). Das Gel wurde 20 min in eine Ethidiumbromid-Färbelösung gelegt und anschließend mithilfe eines UV-Transilluminator dokumentiert; die durch Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren fluoreszieren bei 302 nm.<sup>[98-99]</sup>

### 3.4.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten

Es sind zwei Hauptmechanismen zur Auslösung von Apoptose bekannt: ein Rezeptor-Ligand-gerichteter Mechanismus und ein mitochondrialer Mechanismus. Beide Wege führen zur Aktivierung von Caspasen (*cysteiny* ***aspartate specific protease***), einer Familie von Proteasen, die Cystein-Aspartat-Bindungen als Substrate erkennen und C-terminal vom Aspartat spalten. Es gibt für Säugetiere insgesamt 14 verschiedene Caspasen, wobei die Caspasen-2, -3 sowie -6 bis -10 für die Apoptose relevant sind. Die Aktivierung verschiedener Initiatorcaspasen (-2, -8, -9, -10) endet mit der Aktivierung von Effektorcaspasen (-3, -6, -7) und durch den Abbau zellulärer Strukturen schließlich mit dem Zelltod (Caspase-Kaskade).<sup>[95-96,100-102]</sup>

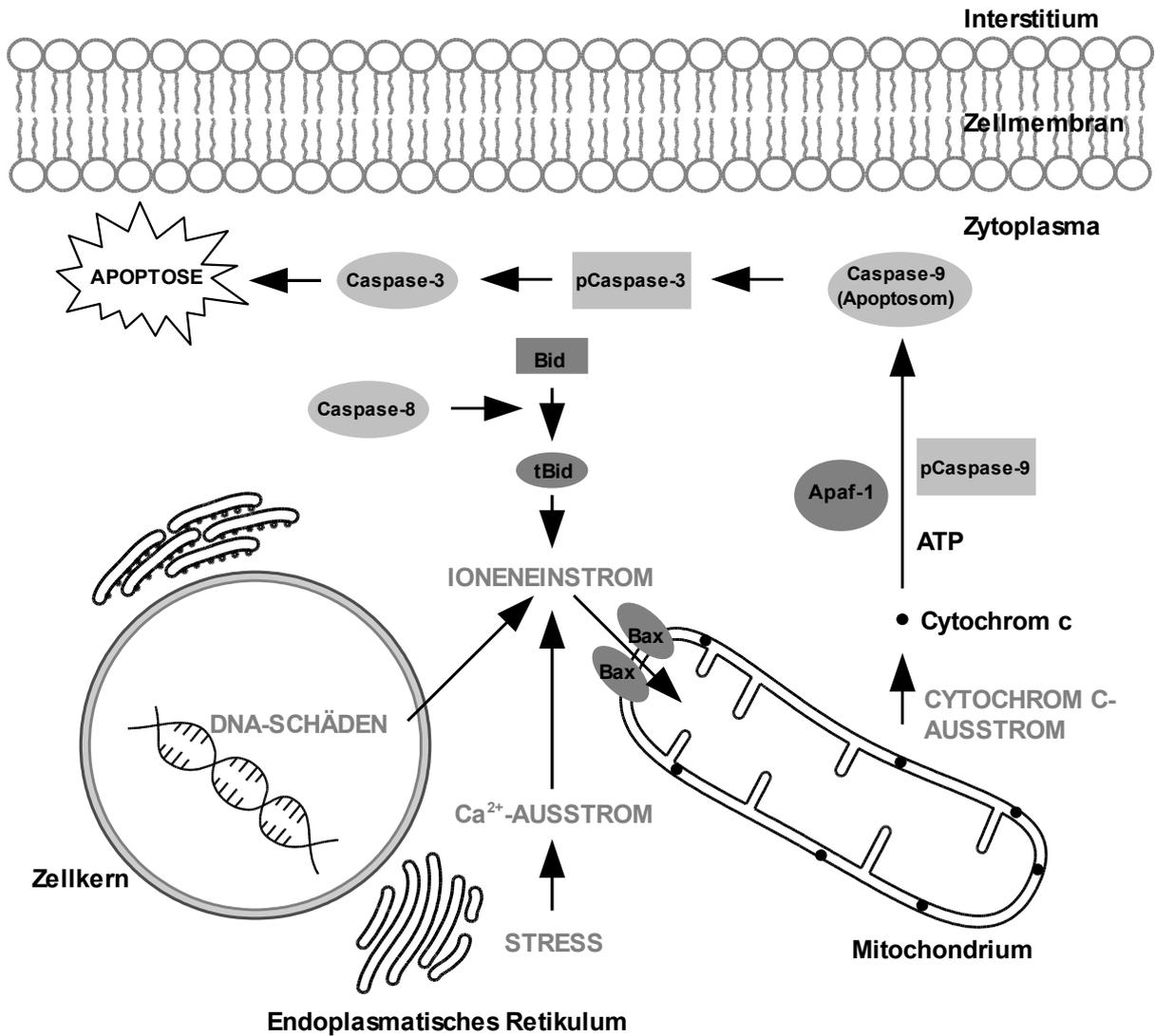
Der Rezeptor-Ligand-gerichtete, extrinsische Mechanismus wird durch die Bindung eines Liganden (TNF: *tumour necrosis factor*, FasL: ***Fas ligand***) an einen entsprechenden, membranständigen Rezeptor (TNFR 1, Fas) eingeleitet und führt zu dessen Trimerisierung durch die Zusammenführung der intrazellulären DDs (***death domain***). Dies erlaubt die Bindung des Proteins FADD (***fas-associated protein with death domain***) und endet mit der Rekrutierung der Initiatorcaspase-8 (vgl. Abbildung 3-6). Die Procaspase-8 besitzt zwei DEDs (***death effector domain***) am N-Terminus, über welche eine Bindung zu FADD möglich wird. Unmittelbar nach der Rekrutierung durch FADD kommt es zur autoproteolytischen Spaltung der Procaspase-8 (pCaspase-8) zur aktiven Caspase-8, die wiederum die Caspase-3 aktivieren kann. Hierbei ist zu beachten, dass für die Bindung von FADD an TNFR 1 zusätzlich noch TRADD (***TNFR-associated protein with death domain***) nötig ist, dass neben der Rekrutierung der Caspase-8 auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und den JNK-Weg bewirkt (vgl. 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen). Ganz ähnlich verläuft auch der Weg über TRAIL (***TNF related apoptosis inducing ligand***) und den entsprechenden Rezeptor TRAIL-R, was aber an dieser Stelle nicht näher betrachtet werden soll. Die Rekrutierung und Aktivierung der Caspase-8 – auch FLICE (***FADD-like interleukin-1 beta converting enzyme***) genannt – kann durch das ebenfalls um FADD konkurrierende Protein FLIP (***FLICE inhibitory protein***) inhibiert werden, was somit die Auslösung der Apoptose verhindert (vgl. Abbildung 3-7).<sup>[96]</sup>



**Abbildung 3-7:** Schematische Darstellung des Rezeptor-Ligand-gerichteten Mechanismus der Apoptose: Rekrutierung der Caspasen-8 und -3 nach der Aktivierung der Rezeptoren durch extrazelluläre Liganden.

Beim mitochondrialen, intrinsischen Weg wird Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt und bildet dort mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor Apaf-1, ATP sowie der Procaspase-9 (46 kDa) einen Multiproteinkomplex, auch Apoptosom genannt (vgl. Abbildung 3-8). Die Aktivierung zur Caspase-9 erfolgt autokatalytisch durch Spaltung in ein Heterodimer aus einem 10 kDa und einem 35 kDa Fragment. Die aktivierte Caspase-9 verlässt den Komplex und aktiviert wiederum die Caspase-3. Die Freisetzung von Cytochrom c wird durch das pro-apoptotische Protein Bax unterstützt und kann entweder durch DNA-Schäden oder durch die Caspase-8 selbst initiiert werden. Ein weiterer Mechanismus, der zur Aktivierung von Caspasen und somit zur Auslösung von Apoptose führen kann, umfasst das Endoplasmatische Retikulum (ER). Hierbei wird das ER durch die Einwirkung entsprechender Wirkstoffe gestresst, was zum Ausstrom der dort gespeicherten Ca $^{2+}$ -Ionen ins Zytoplasma führt und somit die Caspase-Kaskade rund um die Caspase-9 einleitet (vgl. 3.4.6 Calciumkonzentrationsbestimmung sowie Abbildung 3-8). Die Caspase-12 spielt hierbei eine wichtige Rolle, wobei die genaue Wirkungsweise noch nicht ganz bekannt ist. Alle Mechanismen der Apoptose enden schließlich mit der Aktivierung der Effektor-

caspasen-3/7 und -6, dem Abbau zellulärer Strukturen und letztendlich mit dem Zelltod.<sup>[96,101-102]</sup>



**Abbildung 3-8:** Schematische Darstellung des mitochondrialen, intrinsischen Pfades und alternativer Wege der Apoptose: Rekrutierung der Caspasen-9 und -3 nach Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien.

Die Caspase-3 ist vor allem am Abbau der chromosomalen DNA und der zellulären Proteine beteiligt. Sie ist sozusagen für die Apoptose-typischen, morphologischen Veränderungen innerhalb der Zelle verantwortlich (vgl. 3.4.1 Morphologie). Ein wichtiges Zielmolekül der Caspase-3 ist PARP (*poly ADP-ribose polymerase*), die nach der Spaltung durch die Caspase-3 nicht mehr zur Reparatur von DNA-Schäden

befähigt ist. Die Fragmentierung der DNA in „nukleosomale Einheiten“ wird durch die Aktivierung von CAD (*caspase activated DNase*) durch die Caspase-3-bedingte Abspaltung von ICAD (*inhibitor of CAD*) eingeleitet. Ein weiteres Zielmolekül der Caspase-3 ist die Caspase-6, die vor allem für den Abbau von strukturgebenden Proteinen verantwortlich ist. So wird beispielsweise Lamin, ein Protein zur Aufrechterhaltung der Zellkern-Gestalt und Interaktion zwischen dem Chromatin und der Zellkernmembran, von der Caspase-6 abgebaut, was zur Chromatin-kondensation und Zellkernfragmentierung führt.<sup>[101-102]</sup>

Eine Verbindung des Rezeptor-Ligand-gerichteten Wegs zum mitochondrialen Weg ist über Bid möglich, einem Protein der *Bcl-2-(B-cell lymphoma)*-Familie (vgl. Abbildung 3-8). Inaktives Bid wird durch die Caspase-8 aktiviert, zur äußeren Mitochondrienmembran transportiert (tBid) und induziert dort durch das Wechselwirken mit dem pro-apoptotischen Protein Bax die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (vgl. 3.4.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid).<sup>[101-102]</sup>

#### 3.4.3.1 Caspase-Aktivitätstest

Die Aktivität der Caspasen-3, -8 und -9 wurde mithilfe eines luminometrischen Caspase-Assays (Caspase-Glo 3/7, 8 oder 9) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Spaltung eines luminogenen Substrats, welches eine Caspase-spezifische Peptid-Sequenz (Caspase-3/7: DEVD, Caspase-8: LETD, Caspase-9: LEHD) aufweist, und auf der Freisetzung von Aminoluciferin. Letzteres stellt wiederum ein Substrat für die Luciferase dar, dessen Umsetzung zur Lichtproduktion (Lumineszenz) führt, die quantifiziert werden kann. Alle hierfür nötigen Enzyme und Substrate sind im Test-Kit enthalten.<sup>[103]</sup>

Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität wurden 500 µl der 518A2-Zellen ( $1 \cdot 10^5$  pro ml) in die *Wells* einer 24-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die dicht gewachsenen Zellen für bis zu 72 h mit den entsprechenden Substanzen (5 µM

Endkonzentration) inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA von den *Wells* abgelöst und mit den losen Zellen aus dem abgenommen Überstand für 10 min bei 200 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C abzentrifugiert. Die HL-60-Zellen (500 µl,  $5 \cdot 10^5$  pro ml) wurden ebenfalls bis zu 72 h mit den entsprechenden Derivaten inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte jeweils in 200 µl Lysis-Puffer für 15 min bei 4°C. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde für 10 min bei 800 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte mittels Bradford-Reagenz und BSA (*bovine serum albumin*) als Standard. Schließlich wurden für den luminometrischen Caspase-Assay je 15 µg Zellprotein verwendet.<sup>[104]</sup>

#### 3.4.3.2 Western Blot-Analyse

Da eine Verbindung des Rezeptor-Ligand-gerichteten Wegs zum mitochondrialen Weg über die Caspase-8 möglich ist, wurden zudem für die Caspase-9 Western Blot-Analysen mit und ohne gleichzeitige Inhibierung der Caspase-8 durchgeführt. Die autokatalytische Aktivierung zur Caspase-9 endet mit der Spaltung der inaktiven Procaspase-9 (46 kDa) in Heterodimere aus 10 kDa und 35 kDa Fragmente, wobei letzteres die aktive Caspase-9 darstellt, welche sich von der inaktiven Proform aufgrund der Größe unterscheidet und daher elektrophoretisch abgetrennt werden kann.<sup>[103]</sup>

Die Extraktion des Zellproteins erfolgte wie bereits beschrieben (vgl. 3.4.3.1 Caspase-Aktivitätstest). Das aus der Bradford-Bestimmung ermittelte Probenvolumen (15 µg Protein) wurde zu  $\frac{1}{4}$  dieses Volumens mit dem Probenpuffer (4× *LDS Sample buffer*) bzw. zu  $\frac{1}{10}$  mit dem Reduzierungs-Reagenz (10× *DTT-Reducer*) versetzt und für 10 min auf 70°C erhitzt. Die erkalteten Proben wurden auf die Geltaschen von 12%-igen ClearPAGE-Fertiggelen aufgetragen; die unbenutzten Taschen wurden mit 10 µl Probenpuffer gefüllt, um einen gleichbleibenden Widerstand über das gesamte Gel zu erreichen. Als Proteinstandard wurde der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* von Fermentas verwendet.

Letztendlich erfolgte die Auftrennung der Proteinproben im entsprechenden Laufpuffer (1× *SDS reducing running buffer*) für 1,5 h bei gleichbleibender Spannung von 150 V und maximaler Stromstärke und Leistung.<sup>[104-105]</sup>

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine **Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran** transferiert (Western Blot). Diese wurde zuvor 2 min in Methanol, 2 min in H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> sowie 10 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde ebenfalls 30 min in Transfer-Puffer äquilibriert, um SDS und Salze zu entfernen. Dann wurde die Transfer-Einheit aus mit Transfer-Puffer getränkten Blotting-Papieren, der PVDF-Membran und dem Gel nach Anleitung zusammengebaut, in die entsprechende Halterung eingespannt und in die mit Puffer gefüllte Blotting-Kammer gehängt, so dass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet war. Der Transfer erfolgte unter Kühlung für 1,5 h bei einer gleich bleibenden Stromstärke von 225 mA (Spannung und Leistung maximal).<sup>[106]</sup>

Im Anschluss wurde die PVDF-Membran mit 10% Milchpulver in AP-T-Puffer für 1 h bei RT blockiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach zwei Waschschritten von jeweils 5 min mit AP-T-Puffer wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper (*Anti-Caspase-9 (Ab-2) Mouse mAb (1-2)*; Verdünnung 1:1000 in 10% Milch-Puffer) inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit AP-T-Puffer gewaschen. Als sekundärer Antikörper diente ein mit der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiertes Ziegenimmunoglobulin (*Anti-Mouse Goat IgG H+L chain specific peroxidase conjugate*; Verdünnung 1:10000 in 10% Milch-Puffer), welches ebenfalls 1 h auf die Membran einwirkte. Es folgten drei Waschschrritte von je 5 min mit AP-T-Puffer, bevor die Membran mit etwa 6 ml einer frisch hergestellten HRP-Substratlösung (Roti-Lumin) inkubiert wurde. Zur Detektion der immunreaktiven Banden wurde das ECL (*enhanced chemiluminescence*)-System herangezogen. Dabei oxidiert die Peroxidase Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid – beides in der HRP-Substratlösung enthalten – und die auftretende Lumineszenz wurde mit Hilfe der Geldokumentation *Image Quant Las4000 IR* gemessen.<sup>[107]</sup>

Zur Kontrolle der Western Blot-Qualität bzw. der gleichmäßigen Proben-Auftragung auf das Gel wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin verwendet.  $\beta$ -Actin gilt wie GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) als sogenanntes Haushaltsgen (*house-keeping gene*) und wird unabhängig vom Zelltyp und den äußeren Einflüssen exprimiert. Meistens handelt es sich dabei um Gene, die mit dem Grundstoffwechsel der Zelle zusammenhängen, beispielsweise dem Glukose-Stoffwechsel. Hierfür wurden die Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer (10 min) und zweimaliges Waschen mit AP-T-Puffer (20 min) entfernt. Die PVDF-Membran konnte an dieser Stelle wieder mit 10% Milch-Puffer blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper (*Anti- $\beta$ -Actin Mouse mAb (2F1-1)*; Verdünnung 1:500 in 10% Milch-Puffer) und dem entsprechenden sekundären Antikörper behandelt werden.<sup>[108]</sup>

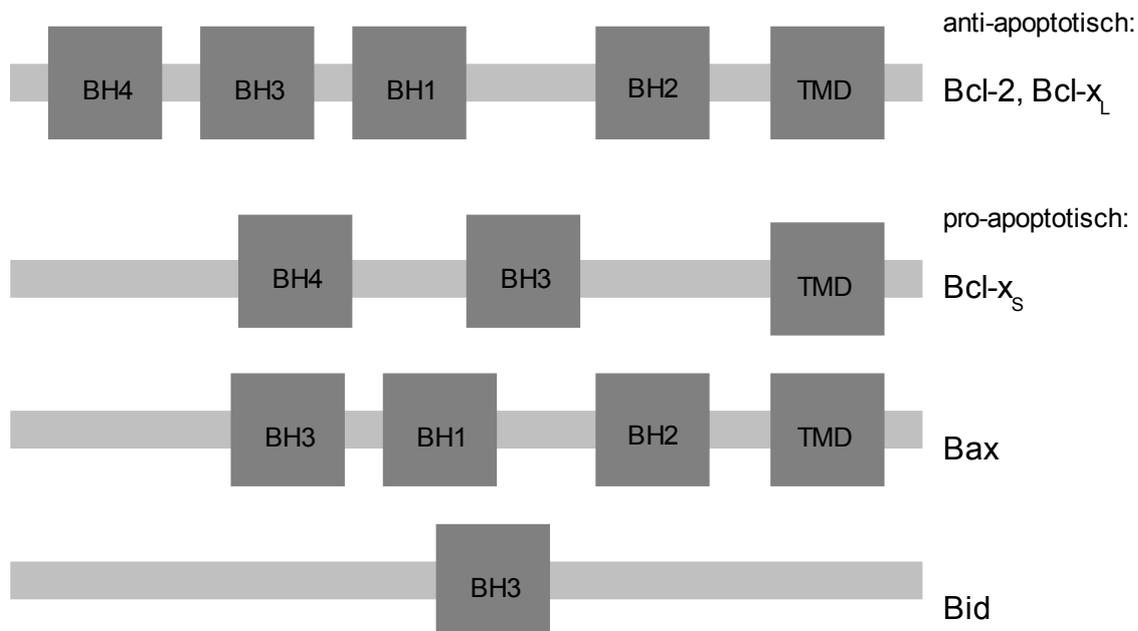
#### 3.4.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid

Die Proteine Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>/-x<sub>S</sub> sowie Bax (*Bcl-2-associated X protein*) gehören zur Familie der *B-cell lymphoma*-Proteine, sind hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und regulieren das Transmembranpotential der Mitochondrien. Wie alle Mitglieder dieser Proteinfamilie bestehen diese aus einer oder mehrerer homologer Domänen (BH1-4, *Bcl-2 homology*), die für die Funktion dieser Proteine und deren Dimerisierung zu Hetero- oder Homodimeren (wichtig dafür: BH3) verantwortlich sind.<sup>[109]</sup>

Während Bax (BH1, BH2, BH3) eine pro-apoptotische Funktion übernimmt, sind Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, BH4) und Bcl-x<sub>L(ong)</sub> Inhibitoren der Apoptose. Bcl-x<sub>S(hort)</sub> dagegen hat seine anti-apoptotische Funktion gänzlich verloren. Bei einem pro-apoptotischen Verhältnis von Bax zu Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> – etwa nach der Induktion der Bax-Expression durch das Tumorsuppressorprotein p53 – bildet sich aufgrund der Oligomerisierung von Bax-Proteinen ein Mega-Kanal (MPT: *mitochondrial permeability transition pore*), durch den verschiedenste Ionen in die Mitochondrien strömen (vgl. Abbildung 3-7).

Durch die folgende Abnahme des Transmembranpotentials der inneren Mitochondrienmembran und das Anschwellen der Mitochondrien bricht die äußere Mitochondrienmembran zusammen, was zur Freisetzung von Cytochrom c führt, welches normalerweise in der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran und im Raum zwischen den Membranen lokalisiert ist und dort wichtige Funktionen in der intrazellulären Elektronentransportkette übernimmt. Im Zytosol ist Cytochrom c an der Bildung des Apoptosoms beteiligt und somit für die Auslösung der Apoptose verantwortlich (vgl. 3.4.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten).<sup>[96]</sup>

Ein weiteres pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie stellt Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) dar. Es zählt zu der *BH3-only*-Unterfamilie, da es nur aus einer BH-Domäne besteht, nämlich BH3. Die Mitglieder dieser Unterfamilie spielen jedoch eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der Apoptose. Inaktives Bid beispielsweise wird nach der Aktivierung durch die Caspase-8 zur äußeren Mitochondrienmembran transportiert, wechselwirkt dort als tBid mit Bax und induziert so die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (vgl. 3.4.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten).<sup>[110]</sup>



**Abbildung 3-9:** Schematische Darstellung der *B-cell lymphoma*-Proteine Bax, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs und Bid.

#### 3.4.4.1 Western Blot-Analyse

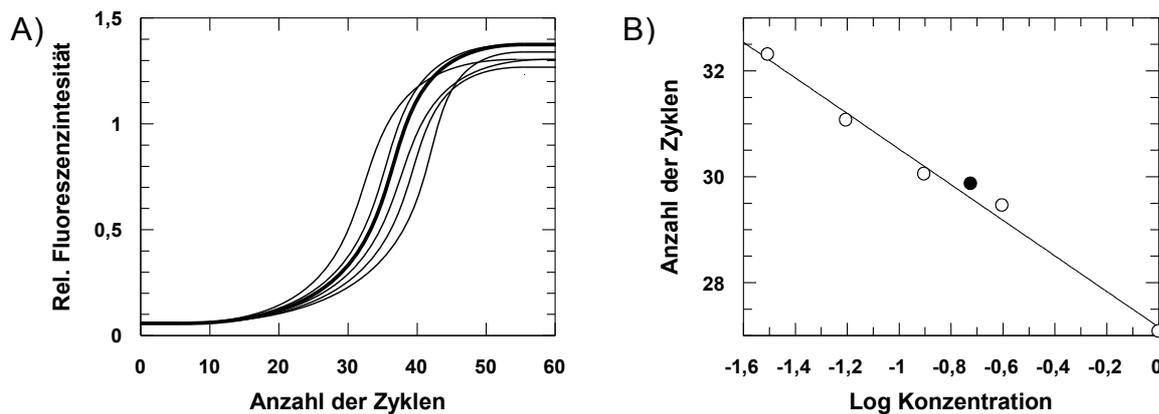
Analog zu dem bereits beschriebenen Verfahren der Western Blot-Analyse für die Caspase-9 wurde auch für die Bax (*Anti-Bax ( $\Delta$ 21) Rabbit pAb*; Verdünnung 1:500 → sekundärer Antikörper: *Anti-Rabbit Goat IgG H+L chain specific peroxidase conjugate*; Verdünnung 1:5000), Bcl-2 (*Anti-Bcl-2 (N-19) Mouse mAb*; Verdünnung 1:750) und Bid (*Anti-Bid/tBid Mouse IgG*; Verdünnung 1:1000) vorgegangen (vgl. 3.4.3.2 Western Blot-Analyse).<sup>[103]</sup>

#### 3.4.4.2 Quantitative *real time*-PCR

Außerdem wurde die mRNA-Expression für bcl-2 und bax mithilfe der quantitativen *real-time*-PCR analysiert. Diese Methode der Nukleinsäurevervielfältigung beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) mit dem Vorteil, dass die DNA gleichzeitig quantifiziert werden kann. Die Quantifizierung erfolgt während eines PCR-Zyklus in Echtzeit (*real time*), wobei Fluoreszenzfarbstoffe wie etwa *SYBR Green* zum Einsatz kommen, die nach der Interkalation in die DNA noch intensiver fluoreszieren. Die Fluoreszenz steigt nun von Zyklus zu Zyklus mit der Zunahme der DNA-Kopien, bis ein gewisser Schwellenwert-Zyklus oder Ct-Wert (*cycle threshold*) erreicht ist, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion). Dieser Wert bezogen auf den ermittelten Ct-Wert von Standards bekannter Konzentrationen lässt auf die Ausgangskonzentration der cDNA bzw. mRNA zurück schließen (vgl. Abbildung 3-10).<sup>[79,111-112]</sup>

Für die Quantifizierung der mRNA von bax und bcl-2 wurden 500  $\mu$ l der 518A2- ( $1,5 \cdot 10^5$  pro ml) bzw. der HL-60-Zellen ( $5 \cdot 10^5$  pro ml) in die *Wells* einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die dicht gewachsenen Zellen für bis zu 72 h mit den entsprechenden Substanzen (5  $\mu$ M Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wurde die gesamte RNA mithilfe des peqGOLD *RNAPure* extrahiert. Die Synthese der cDNA erfolgte in einem 21  $\mu$ l-Ansatz ausgehend von 80 ng Gesamt-RNA mit Hilfe des *Reverse Transcription Systems* von Promega (nach

Herstellerangaben). Danach wurde die quantitative *real time*-PCR mit dem *SYBR GREEN PCR-Kit LightCycler fast start DNA Master* in einem LightCycler 2.0 System von Roche Diagnostics durchgeführt; die Ct-Werte wurden mithilfe der LightCycler Software, Version 3.5 ermittelt. Alle Gene wurden wie auch bei der Western Blot-Analyse auf ein Haushaltsgen, hier das für die GAPDH, normalisiert.<sup>[113]</sup>

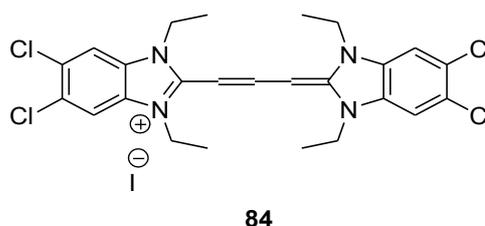


**Abbildung 3-10:** Analyse der PCR-Daten: A) Amplifikation von Proben bekannter (—) und unbekannter (---) Konzentration mittels quantitativer *real time*-PCR: Messung der Fluoreszenz am Ende jedes PCR-Zyklus, relative Fluoreszenz direkt proportional zur Menge an PCR-Produkt; B) Quantifizierung des unbekannten PCR-Produkts (●) mithilfe der Standardkurve (○): Auftragung der Ct-Werte gegen die Log Konzentration der bekannten Proben, Berechnung der DNA-Menge der unbekannt Proben durch Lösen der Geradengleichung.

Die verwendeten Primer wurden alle von Qiagen bezogen: Mm\_gapd\_2\_SG QuantiTect Primer Assay (Cat.No.: QT00309099), HS\_bax\_2\_SG QuantiTect Primer Assay (Cat.No.: QT00031192) und Hs\_bcl2\_1\_SG QuantiTect Primer Assay (Cat.No.: QT00025011). Am Ende jeder PCR-Messung wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt, so dass die Spezifität bestimmt werden konnte. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist so eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt zudem annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments (vgl. Abbildung 3-10).

### 3.4.5 Mitochondrienmembranpotential

Der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials stellt einen wichtigen Schritt bei der Einleitung der Apoptose dar. Hierbei kollabiert der elektrochemische Gradient  $\Delta\Psi$  aufgrund der Ausbildung von Membranporen durch die Dimerisierung von proapoptotischen Bax-Proteinen und führt zum Wandern von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol, wo dann die Caspase-Kaskade eingeleitet wird (vgl. Abbildung 3-8).<sup>[109-110]</sup> Dieses Ereignis kann mithilfe von kationischen Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. dem JC-1 (**84**, 5,5'-6,6'-Tetrachloro-1,1'-3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin-Iodid) nachgewiesen werden. Die delokalisierte positive Ladung erlaubt dem lipophilen Farbstoff den Eintritt in die Mitochondrienmatrix, wo dieser beim Überschreiten der kritischen Konzentration aggregiert und in gesunden Zellen als rote Fluoreszenz nachzuweisen ist. Zusätzlich liegt der Farbstoff im Zytoplasma in Form von Monomeren vor und zeigt grüne Fluoreszenz. In apoptotischen Zellen kann der Farbstoff aufgrund des zusammengebrochenen mitochondrialen Membranpotentials nicht mehr in der Mitochondrienmatrix aggregieren; die grüne Fluoreszenz nimmt in diesen Zellen im Vergleich zur roten Fluoreszenz zu.<sup>[114-115]</sup>



**84**

**Abbildung 3-11:** Struktur von JC-1 (**84**, 5,5'-6,6'-Tetrachloro-1,1'-3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin-Iodid).

Änderungen im Mitochondrienmembranpotential wurden mithilfe des *Mitochondrial Membrane Detection Kit* nachgewiesen. Hierfür wurden 500  $\mu\text{l}$  der adhärennten 518A2-Zellen ( $1,5 \cdot 10^5$  pro ml) in die *Wells* einer 24-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die dicht gewachsenen Zellen für 6 bis 48 h mit den entsprechenden Substanzen (5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA von den *Wells* abgelöst und mit den losen Zellen aus dem zuvor

abgenommen Überstand für 10 min bei 400 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C abzentrifugiert. Die Suspensionszellen HL-60 wurden auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$  pro ml gebracht, ebenfalls für 6 bis 48 h mit den entsprechenden Derivaten (500 µl, 5 µM Endkonzentration) im Brutschrank inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 500 µl einer 0,2× JC-1-Lösung resuspendiert, für 15 min (HL-60) bzw. 30 min (518A2) bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach einem Waschschrift wurden die Pellets in PBS-Puffer resuspendiert und mithilfe eines F200-Plattenreaders der Firma TECAN (100 µl Suspension pro *Well* einer schwarzen 96-*Well*-Mikrotiterplatte) bzw. mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur, Becton Dickinson, 500 µl Suspension pro FACS-Röhrchen) ausgewertet.

Für die Fluoreszenzmessung am Plattenreader wurde das Verhältnis von roter ( $\lambda_{\text{ex}} = 535$  (25) nm,  $\lambda_{\text{em}} = 590$  (20) nm) zu grüner Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 485$  (20) nm,  $\lambda_{\text{em}} = 535$  (25) nm) gemessen, das für apoptotische im Vergleich zu gesunden Zellen aufgrund des Zusammenbrechens des mitochondrialen Membranpotentials abnehmen sollte. Schwankungen in der Zellzahl spielen bei dieser Messmethode aufgrund der Verhältnisrechnung keine entscheidende Rolle.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie – auch FACS (**f**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting) genannt – beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. So kann mittels Vorwärtsstreulicht (FSC, **f**orward **s**catter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, **s**ideward **s**catter) aufgrund von Beugung und Brechung des Lichts zunächst nach Größe und Körnung getrennt werden; gleichzeitig mit dem gestreuten Licht kann man Fluoreszenzfarben messen. Die rot fluoreszierenden JC-1-Aggregate werden im FL2-Kanal registriert, die grün fluoreszierenden JC-1-Monomere im FL1-Kanal. Bei der Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie wurden jeweils 10000 Zellen untersucht. Die entsprechenden Parameter, die in Tabelle 3-1 aufgelistet sind, wurden mit dem Programm *CellQuest* (Becton Dickinson) eingestellt; die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *WinMDI* (Version 2.9).

**Tabelle 3-1:** Zusammenfassung aller Parameter und Einstellungen zur Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie.

Parameter	Detektor	Spannung	Verstärkungsfaktor	Modus	Anmerkung
P1	FSC	E-1	7,99	Lin	Schwellenwert 36
P2	SSC	366	1,00	Lin	
P3	FL1	394	1,00	Log	Kompensation 8,1% FL2
P4	FL2	351	1,00	Log	Kompensation 22% FL1
P5	FL3	650	1,00	Log	

### 3.4.6 Calciumkonzentrationsbestimmung

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielt eine zentrale Rolle in der Physiologie und Biochemie von Organismen und Zellen. Es stellt einen wichtigen intrazellulären Botenstoff – einen sogenannten *second messenger* der Signaltransduktion – dar, der an der Erregung von Muskeln und Nerven, dem Glykogen-Stoffwechsel, der Zellteilung sowie an der Aktivierung einiger Enzyme und Hormone als Kofaktor beteiligt ist. Im Laufe der Evolution haben sich Mechanismen (z.B. Natrium-Calcium-Austauscher oder  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen) entwickelt, die die zytosolische Calciumkonzentration in der ruhenden Zelle auf etwa 70 bis 80 nM halten. Dabei wird das überschüssige Calcium entweder in den Extrazellularraum oder in intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wie das Endoplasmatische Retikulum (ER) abgegeben. So entsteht ein hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient von etwa 1:10000 gegenüber dem Zytosol, der als Antrieb für schnelle Signalprozesse dienen kann. Unabhängig von den beiden Hauptmechanismen der Apoptose – dem Rezeptor-Ligand-gerichteten Weg und dem mitochondrialen Weg – kann die Apoptose über einen dritten Signalweg eingeleitet werden, welcher das ER umfasst (vgl. 3.4.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten).<sup>[96]</sup> Dieser Weg wird durch die Procaspase-12 vermittelt, die spezifisch mit dem ER assoziiert ist und bei ER-Stress – z.B. durch Störungen des Calciumhaushalts – aktiviert werden kann (vgl. Abbildung 3-8).<sup>[116-117]</sup>

Für die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration bietet sich Fura-2 (**85**) an, das in Form seines Acetyloxymethylesters **86** verwendet wird, nach der Aufnahme in die Zelle durch intrazelluläre Esterasen zu **85** umgesetzt wird, so in der Zelle verbleibt und  $\text{Ca}^{2+}$  komplexiert.<sup>[118]</sup>

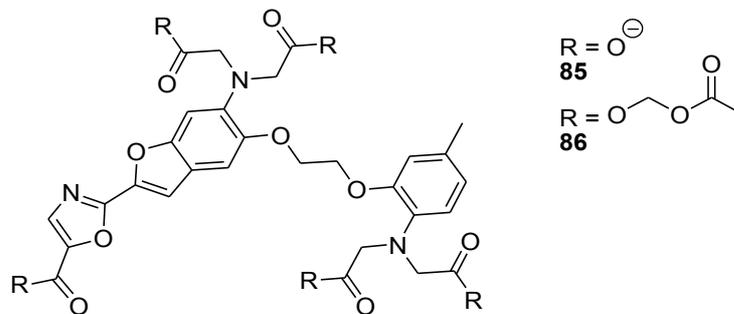
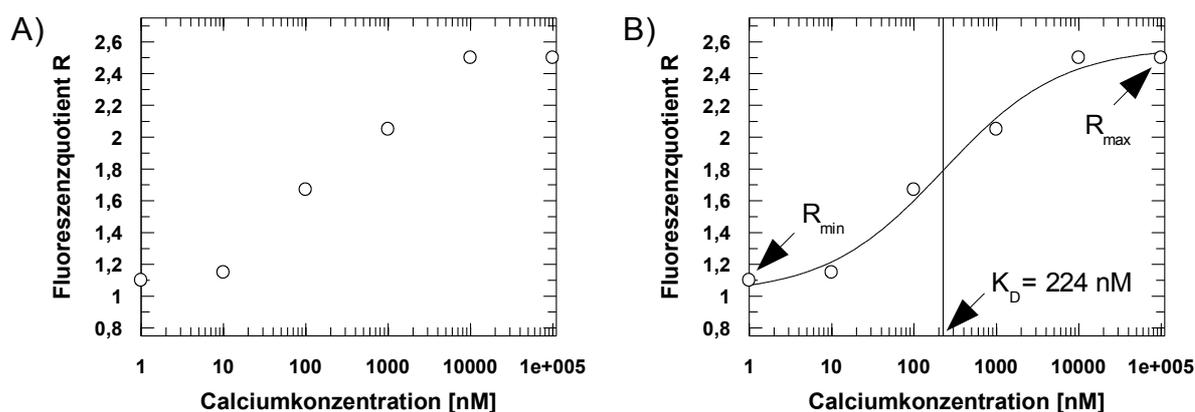


Abbildung 3-12: Struktur von Fura-2 (**85**) und Fura-2/AM (**86**).

Durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung verändern sich die Fluoreszenz-Eigenschaften von **85**: Während freies Fura-2 (**85**) ein Anregungsmaximum bei 380 nm ( $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm) aufweist, verschiebt sich dieses durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  hin zu 340 nm ( $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm). Dies kann bei der Berechnung der Calciumkonzentration ausgenutzt werden, wobei der Fluoreszenzquotient ( $R = F_{340}/F_{380}$ ) des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Farbstoffs zu dem des  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes herangezogen wird. Mithilfe der Grynkiewicz-Gleichung {6} kann R in die entsprechende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration umgerechnet werden, wobei die Dissoziationskonstante  $K_D$  des Komplexes sowie das maximale und minimale Fluoreszenzsignal berücksichtigt werden muss (vgl. Abbildung 3-13). Schwankungen in der Zellzahl fallen aufgrund der Verhältnisrechnung nicht sonderlich ins Gewicht.

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{F_{\max}}{F_{\min}} \quad \text{mit:} \quad \{6\}$$

$[\text{Ca}^{2+}]$	... Calciumkonzentration [nM],
$K_D = 224 \text{ nM}$	... Dissoziationskonstante,
$R_{\min}$	... Fluoreszenzquotient ohne $\text{Ca}^{2+}$ ,
$R_{\max}$	... Fluoreszenzquotient bei $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung,
$F_{\min}$	... Fluoreszenz $F_{380}$ ohne $\text{Ca}^{2+}$ ,
$F_{\max}$	... Fluoreszenz $F_{380}$ bei $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung.



**Abbildung 3-13:** Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels Grynkwicz-Gleichung unter Berücksichtigung der Dissoziationskonstante  $K_D$  sowie der maximalen und minimalen Fluoreszenzquotienten  $R_{\max}$  und  $R_{\min}$ .

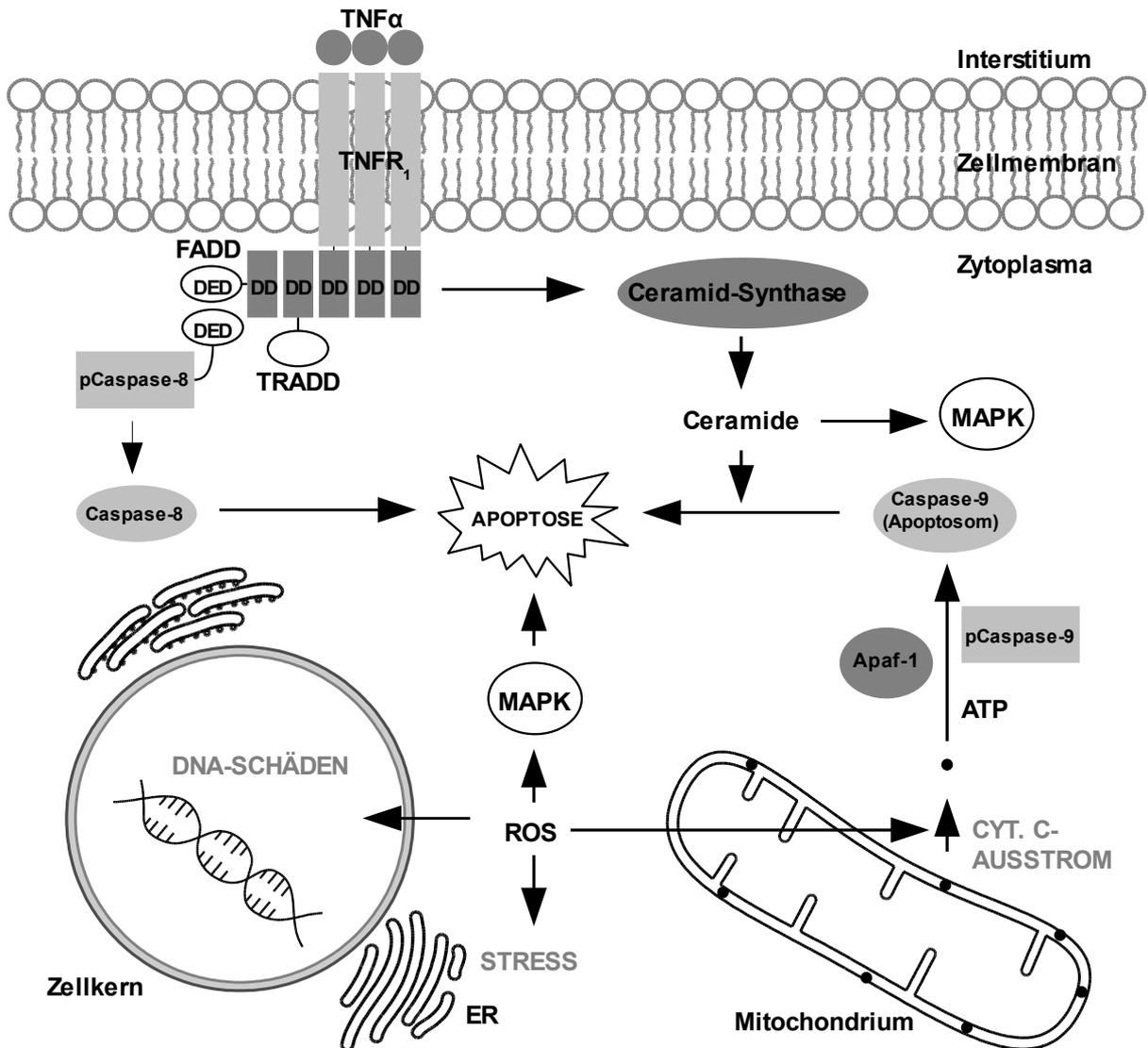
Für die Bestimmung der Calciumkonzentration wurden 500  $\mu\text{l}$  der 518A2-Zellen ( $1,5 \cdot 10^5$  pro ml) in die *Wells* einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für bis zu 72 h mit den entsprechenden Substanzen (5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA von den *Wells* abgelöst und mit den losen Zellen aus dem zuvor abgenommen Überstand für 10 min bei 400 g und  $4^\circ\text{C}$  (Eppendorf *mini spin*) abzentrifugiert. Die HL-60-Zellen ( $5 \cdot 10^6$  pro ml) wurden ebenfalls bis zu 72 h mit den entsprechenden Derivaten (500  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) im Brutschrank inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Pellets wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer I resuspendiert, auf eine Zelldichte von  $1,3 \cdot 10^6$  pro ml gebracht und mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer II weiter auf  $1 \cdot 10^6$  pro ml verdünnt. Die Proben wurden für 20 min bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert, abzentrifugiert, wiederum 10 min in frischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer I inkubiert und abzentrifugiert. Die Zelldichte wurde mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer I erneut auf  $1 \cdot 10^6$  pro ml gebracht. Inzwischen wurden in die *Wells* einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte je 100  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer I vorgelegt und auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt. Zu dem vorgewärmten Puffer wurden 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension pipettiert, nochmals 10 min inkubiert und anschließend wurde die Fluoreszenz  $F_{340}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ ) und  $F_{380}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ ) mithilfe eines F200-Plattenreaders bestimmt. Zur Kalibrierung wurden 10  $\mu\text{l}$  einer 2%-igen Digitonin-Lösung ( $R_{\max}$ ) sowie 50  $\mu\text{l}$  einer 600 mM EGTA-Lösung ( $R_{\min}$ ) zur Zellsuspension pipettiert, 10 min inkubiert und ebenfalls gemessen. Während Digitonin zur Zellyse führt und  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Speichern frei gibt, komplexiert EGTA sämtliches  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>[119]</sup>

#### 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen

Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) sind Produkte des normalen Metabolismus und je nach Konzentration nützlich oder schädlich für Zellen und Gewebe. In geringen, physiologischen Konzentrationen wirken ROS als sogenannte *redox messenger* in intrazellulären Signal- und Regulationswegen; zu hohe Konzentrationen dagegen – etwa nach der Exposition von Xenobiotika – führen zur Schädigung zellulärer Strukturen und folglich zur Apoptose (vgl. 1.3 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion). Dabei können sowohl intrinsische als auch extrinsische Pfade eingeschlagen werden. So ist die Generierung von ROS zum einen eng verknüpft mit der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung (Fas-FasL, TNFR<sub>1</sub>-TNF $\alpha$ ), der Aktivierung der Sphingomyelinase und der damit verbundenen Ceramid-Produktion (vgl. 3.4.8 Nachweis von Ceramid-Bildung) sowie der Aktivierung der redox-sensitiven MAP-Kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Andererseits hat eine erhöhte Konzentration an ROS eine Schädigung der mitochondrialen DNA zur Folge, was die Bildung von pro-apoptotischen Proteinen und das bereits bekannte „Apoptose-Programm“ stimuliert (vgl. Abbildung 3-14).<sup>[120]</sup>

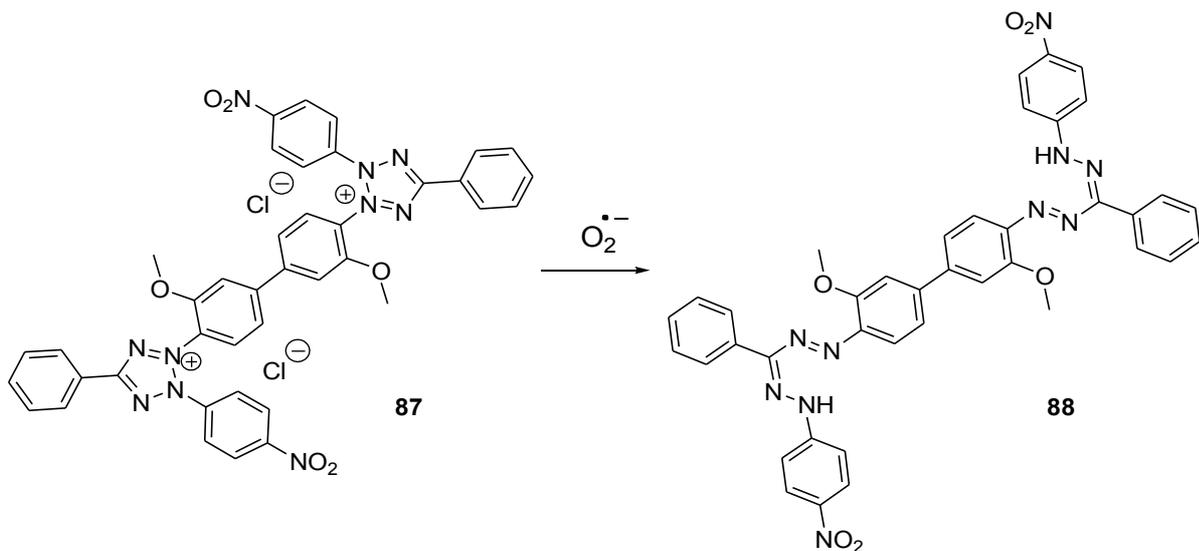
##### 3.4.7.1 NBT-Test

Wie bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei den zu untersuchenden Derivaten um redox-aktive Chinone, die unter biologischen Bedingungen zu Semichinonen reduziert werden und dabei ROS generieren können (vgl. 1.3 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion). Um nun den Einfluss der Seitenketten der Doxorubicin- bzw. Thymochinonderivate auf die ROS-Produktion zu untersuchen, wurde der Nitroblau-Tetrazolium-Test (NBT-Test) herangezogen. Bei diesem Test wird das gelbe, wasserlösliche *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid (**87**, NBT) durch die elektronenübertragenden Superoxidradikale über die Zwischenstufe Monoformazan zum violetten, wasserunlöslichen Diformazan (**88**) reduziert (vgl. Abbildung 3-15).<sup>[121-122]</sup>



**Abbildung 3-14:** Involvement reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) in die Apoptose-Induktion durch die Aktivierung der Sphingomyelinase bzw. Ceramidsynthase über die Rezeptoren Fas und TNFR $_1$  mit der Folge der Ceramid-Produktion, der Aktivierung von redox-sensitiven MAP-Kinasen (MAPK), der Schädigung zellulärer DNA und der Stimulierung pro-apoptotischer Proteine.

Die Absorptionsmaxima von NBT (**87**, 300 nm) und Diformazan (**88**, 570 nm) unterscheiden sich deutlich voneinander, daher kann die Auswertung leicht mit einem Spektrophotometer erfolgen. Da **88** durch die Zugabe von Kaliumhydroxid und Dimethylsulfoxid in Lösung gebracht wird, kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (630 nm).<sup>[121-122]</sup>



**Abbildung 3-15:** Zelluläre Reduktion von NBT (**87**) zum Diformazan (**88**) durch elektronenübertragende Superoxidradikale.

Für den NBT-Test an den adhärenen 518A2-Zellen wurden nach erfolgter Trypsinierung 100  $\mu$ l einer Zellsuspension der Dichte  $5 \cdot 10^4$  pro ml in jedes *Well* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Von den Suspensionszellen (HL-60) wurden 100  $\mu$ l der Zelldichte  $5 \cdot 10^5$  pro ml verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Testsubstanzen in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M hinzu pipettiert und bis zu 72 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte für 5 min bei 150 g und 4°C (Heraeus Multifuge X3 FR) zentrifugiert, zum Entfernen des Überstandes invertiert und jedes *Well* mit 100  $\mu$ l einer 0,1%-igen NBT-Lösung (in PBS-Puffer) versetzt. Die Platte wurde für 4 h (518A2) bzw. 1 h (HL-60) im Brutschrank inkubiert, danach erneut für 5 min bei 150 g und 4°C (Heraeus Multifuge X3 FR) zentrifugiert, zum Entfernen des Überstandes wiederum invertiert und jedes *Well* mit 100  $\mu$ l 2M KOH sowie 130  $\mu$ l DMSO versetzt. Die Platte wurde weitere 30 min im Brutschrank inkubiert und anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 630 und 405 nm (Hintergrund) mithilfe eines PowerWave340-Plattenreaders der Firma BIO-TEK. Die Differenz der Absorptionen ergibt bezogen auf einen Referenzwert (DMSO statt Testsubstanz) sowie die Anzahl der vitalen Zellen – bestimmt mittels MTT-Test (vgl. 3.3.1.1 Effektivität) – ein Maß für die ROS-Produktion.<sup>[121]</sup>

#### 3.4.7.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein

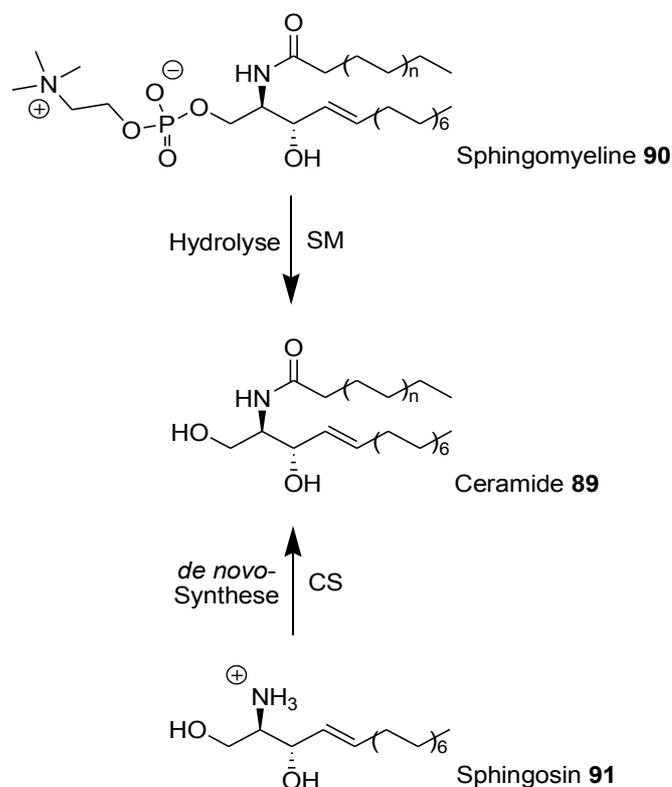
Da bei der Apoptose stets auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden, wenn die Mitochondrien schrumpfen und zelluläre Strukturen abgebaut werden, muss außerdem überprüft werden, ob die im NBT-Test gemessene ROS-Produktion an der Auslösung der Apoptose beteiligt ist oder nur eine Folgeerscheinung der Apoptose darstellt. Hierfür wurden für die 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen MTT-Tests in Gegenwart des Radikalfängers *N*-Acetyl-L-Cystein (5 mM, 2 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht) wie bereits beschrieben durchgeführt und ausgewertet und auf die jeweiligen Ansätze ohne Radikalfänger bezogen. Der resultierende Faktor  $R(+/-)$  gibt Aufschluss über die direkte Beteiligung der ROS an der Apoptoseinduktion bzw. Wirksamkeit der Substanzen (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität). Je kleiner  $R(+/-)$  – also je größer der Verlust der Wirksamkeit – ist, desto größer ist die ROS-Beteiligung an der Apoptoseinduktion.

#### 3.4.7.3 Involvierung redox-sensitiver Kinasen

Die Generierung von ROS geht immer einher mit der Aktivierung von redox-sensitiven Kinasen. So ist die Sauerstoffradikal-Produktion stets mit der Aktivierung der MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) verbunden (vgl. 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen). Je nach ROS-Level und Dauer der JNK-Aktivierung werden anti- oder pro-apoptotische Wege eingeleitet. Die JNK stellt demnach eine Art zelluläre Schutzfunktion gegenüber der generierten ROS dar; beim Überschreiten einer bestimmten Schwellwert-Konzentration können jedoch Apoptose-induzierende Signalwege angeschaltet werden. Eine ähnliche Funktion übernehmen die p38-MAP-Kinase sowie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Zudem wird durch die Verminderung des GSH-Spiegels die redox-sensitive Proteinkinase **C** (PKC) aktiviert. Der Faktor  $R(+/-)$  kann mithilfe geeigneter Inhibitoren (JNK: SP 600125, ERK: PD 98059, p38-MAPK: SB 202190, PKC: PKC 412) ermittelt werden, was einen Aufschluss über die Beteiligung dieser Kinasen an der Wirksamkeit der Substanzen gibt (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität).<sup>[120,123]</sup>

## 3.4.8 Nachweis von Ceramid-Bildung

Ceramide (**89**) gehören zu den strukturgebenden Sphingolipiden, dienen jedoch neben der Beteiligung an der Bildung zellulärer Membranen auch als *second messenger* in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Je nach Zelltyp und physiologischem Umstand vermitteln Ceramide (**89**) eine Reihe von Effekten – die Zellproliferation und -differenzierung, aber auch den Zellzyklusarrest bis hin zur Apoptose.<sup>[124-125]</sup> Für Anthracycline wie Doxorubicin (**13**) ist seit längerem bekannt, dass ein Anstieg der intrazellulären Ceramidkonzentration nach der Induktion der *de novo*-Synthese durch die Ceramidsynthase (CS) bzw. der Sphingomyelin-Hydrolyse durch die Sphingomyelinase (SM) zur Einleitung der Apoptose führt (vgl. Abbildung 3-16). Dieser Signaltransduktionsweg ist dabei eng verbundenen mit Störungen im intrazellulären Redox-Gleichgewicht und extremen Belastungen der Zelle durch oxidativen Stress (vgl. Abbildung 3-14 sowie 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen).<sup>[126-127]</sup>



**Abbildung 3-16:** Ceramid-Metabolismus: *de novo*-Synthese durch die Ceramidsynthase (CS), Sphingomyelin-Hydrolyse durch die Sphingomyelinase (SM).

Zur Bestimmung der intrazellulären Ceramidkonzentration wurden 500  $\mu\text{l}$  der adhärennten 518A2-Zellen nach erfolgter Trypsinierung (vgl. 3.1 Zellkultivierung) in einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro ml in jedes *Well* einer 24-*Well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Testsubstanzen in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  hinzu pipettiert und weitere 24 h im Brutschrank inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA von den *Wells* abgelöst und mit den losen Zellen aus dem zuvor abgenommenen Überstand für 10 min bei 400 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C abzentrifugiert. Die Suspensionszellen HL-60 wurden auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$  pro ml gebracht, ebenfalls für 24 h mit den entsprechenden Derivaten (500  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) im Brutschrank inkubiert und anschließend abzentrifugiert.

Alle folgenden Schritte wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. F. Lang und Dr. med. Dr. rer. nat. M. Föllner an der Universität in Tübingen (Institut für Physiologie) durchgeführt: Die Färbung der Zellen mit dem primären Antikörper (Anti-Ceramide Mouse, Verdünnung 1:5 in 1% FBS in PBS) erfolgte für 1 h bei 4°C. Anschließend wurde dreimal mit 1% FBS in PBS gewaschen und 30 min mit dem sekundären Antikörper (Anti-Mouse Goat pAb, Fluorescein isothiocyanate (FITC) Conjugate, Verdünnung 1:50 in 1% FBS in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal gewaschen und mittels Flow-Cytometrie untersucht (FL1-Kanal).

Weiterhin wurden für die 518A2- und HL-60-Zellen MTT-Tests in Gegenwart geeigneter Inhibitoren der Ceramidsynthese (Fumonisin B1) bzw. Sphingomyelinase (Chlorpromazin) wie bereits beschrieben durchgeführt, ausgewertet und auf die jeweiligen Ansätze ohne Inhibitorzugabe bezogen. Der resultierende Faktor  $R(+/-)$  gibt Aufschluss über die direkte Beteiligung der Ceramid-Bildung an der Apoptoseinduktion bzw. Wirksamkeit der Substanzen (vgl. 3.3.2 MDR-Sensitivität). Je kleiner  $R(+/-)$  – also je größer der Verlust der Wirksamkeit – ist, desto stärker ist die Beteiligung der Ceramide als *second messenger* der Apoptoseinduktion.

### 3.5 Wechselwirkung mit der DNA: Bandenretardationstest

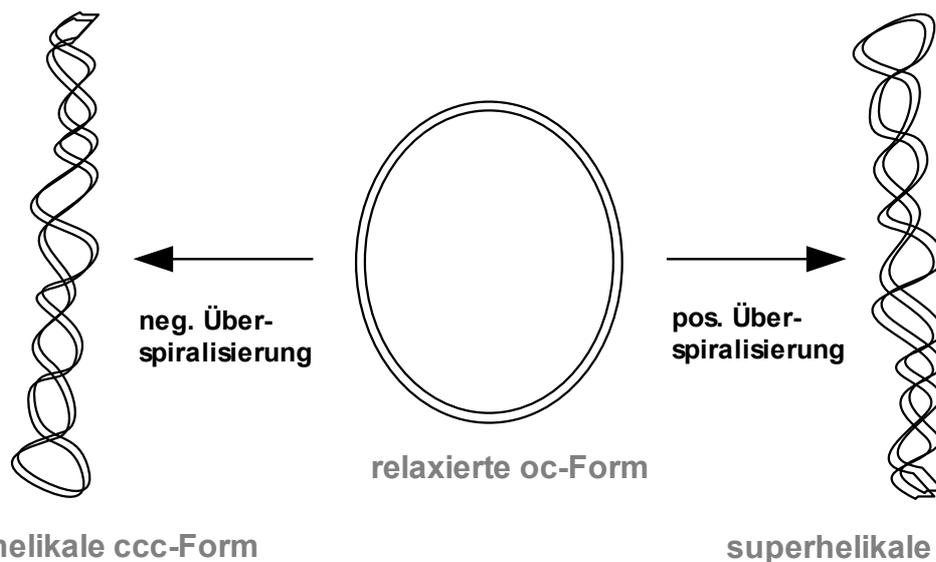
Die biologische Wirkung von Doxorubicin (**13**) beruht hauptsächlich auf der Interkalation in die DNA, was so die Assoziation der Enzyme DNA-Helikase, DNA-Topoisomerase II und DNA-Polymerase verhindert und letztendlich zur Störung der Replikation führt (vgl. 2.2.1 Doxorubicin (**13**) und seine Derivate). Die Interkalation erfolgt in die B-Form doppelsträngiger DNA mit einer Spezifität für benachbarte Guanin- und Cytosinreste; die GC- und CG-Basenpaare winden sich dabei um 15° bzw. 9° aus der Helix heraus, um Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu vermeiden. Die Bindung an die DNA wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken – besonders durch die Hydroxylgruppe an C-9 und C-14 und durch das Proton an der geladenen Aminogruppe stabilisiert.<sup>[128]</sup> Die Wechselwirkung verschiedener Doxorubicinderivate mit der DNA wurde daher anhand der Tertiärstruktur von Plasmid-DNA mithilfe der Agarosegelelektrophorese untersucht (Bandenretardation). Für Thymochinon (**17**) ist bislang keine DNA-Bindfähigkeit bekannt, dennoch sollte dies für einige Derivate überprüft werden.

Der Bandenretardationstest dient eigentlich zum Nachweis von DNA- oder RNA-bindenden Proteinen, kann aber auch herangezogen werden, um Wirkstoffe zu identifizieren, die mit der DNA wechselwirken können. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass Plasmid-DNA unterschiedliche Tertiärstrukturen (Konformationen) annehmen kann und diese unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Plasmide können in drei verschiedenen Konformationen vorliegen: die vorwiegende superhelikale ccc-Form (*covalently closed circular*), die seltenere relaxierte oc-Form (*open circular*) sowie die kaum vorliegende lineare Form. Alle drei Formen der Plasmid-DNA unterscheiden sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität bei einer Agarosegelelektrophorese, die von vielen physikalischen Faktoren abhängt und letztendlich die Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  eines Teilchens während der Elektrophorese beeinflusst {7}.

$$v = \frac{E \cdot z}{f} = E \cdot u \quad \text{mit:} \quad \{7\}$$

$u$	... Mobilität,
$v$	... Wanderungsgeschwindigkeit,
$E$	... elektrische Feldstärke,
$z$	... Nettoladung,
$f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r$	... Reibungskoeffizient (Gesetz von Stokes).

Die aufgrund der negativen Überspiralisierung schlanke und mobile ccc-Form wandert im Agarosegel weiter als die relaxierte und ausladende oc-Form (vgl. Abbildung 3-18). Kommt es nun zu einer Wechselwirkung zwischen einem Wirkstoff und der Plasmid-DNA, so nimmt die negative Überspiralisierung der Plasmid-DNA ab, was zu einer Verminderung der elektro-phoretischen Mobilität bis hin zur relaxierten oc-Form führt. Hierbei muss auf die Konzentration der Testsubstanzen geachtet werden, da eine zu große Konzentration zu einer positiven Überspiralisierung und folglich wieder zu einer größeren elektro-phoretischen Mobilität ähnlich der ccc-Form führt.

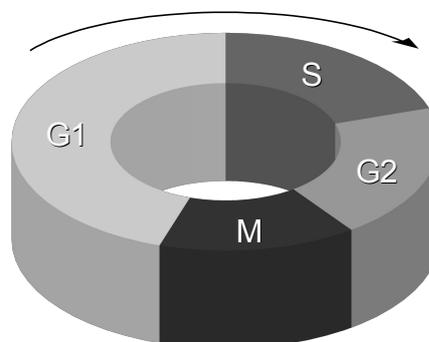


**Abbildung 3-17:** Unterschiedliche Konformationen der Plasmid-DNA: Überspiralisierung der relaxierten oc-Form führt zur superhelikalen ccc-Form.

Für den Bandenretardationstest wurde pBR322 benutzt, ein im Jahre 1977 von Francisco Bolivar und Raymond Rodriguez künstlich konstruiertes Plasmid; die fortlaufende Nummer 322 dient der Unterscheidung von ähnlichen Plasmiden.<sup>[129]</sup> Zu pBR322-DNA-Aliquots (Endkonzentration 73,5 µg / ml in TE-Puffer) wurden verschiedene Konzentrationen der zu testenden Substanzen (0, 5, 10, 25, 50 µM) pipettiert und für 24 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde jedes Aliquot mit 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 4 h bei 66 V, 30 mA und 5 Watt. Anschließend wurde das Gel 20 min in eine Agarosegel-Färbelösung gelegt und danach kurz in 0,5× TBE-Puffer gewässert. Die Geldokumentation erfolgte mittels UV-Transilluminator.<sup>[99, 130-131]</sup>

### 3.6 Zellzyklus-Analyse

Proliferierende Zellen durchlaufen regelmäßig einen Teilungszyklus, auch Zellzyklus genannt, der zwischen 10 h und 24 h dauert. Er lässt sich in 4 verschiedene Phasen unterteilen, die nacheinander durchlaufen werden (vgl. Abbildung 3-17). Während der S-Phase (**S**ynthese-Phase) wird die DNA repliziert; in der M-Phase (**M**itose-Phase) findet die Zellteilung statt. Dazwischen liegen die G-Phasen (**G**ap-Phase, *gap* = Lücke), die für das Zellwachstum durch RNA- und Protein-Synthese (G1-Phase) bzw. die Vorbereitung auf die Mitose (G2-Phase) genutzt werden.<sup>[132]</sup>



**Abbildung 3-18:** Schematische Darstellung der Zellzyklus-Phasen: Sektoren repräsentieren die relative Dauer jeder Phase.

Zellen, die sich nicht teilen, weil sie ausdifferenziert sind, verlassen die G1-Phase und gehen in die G0-Phase über. Mitose-auslösende Signale allerdings ermöglichen einen Übergang zurück in die G1-Phase. Dauer und Abfolge der Phasen werden von sogenannten Kontrollpunkten (*Checkpoints*) überwacht, die dafür sorgen, dass erst dann der nächste Schritt im Zellzyklus erfolgt, wenn der vorhergehende abgeschlossen ist. An solchen *Checkpoints* besteht die Möglichkeit einer Unterbrechung (Arretierung) des Zellzyklus, mit der Folge der Apoptose-Initiation.<sup>[132]</sup>

Für die Zellzyklus-Analyse wurden 5 ml der adhärennten 518A2-Zellen ( $0,5 \cdot 10^5$  pro ml) in die *Wells* einer 24-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die dicht gewachsenen Zellen für 6 bis 24 h mit den entsprechenden Substanzen (5  $\mu$ M Endkonzentration) inkubiert, anschließend mittels Trypsin-EDTA von den *Wells* abgelöst und mit den losen Zellen aus dem zuvor abgenommenen Überstand für 10 min bei 400 g (Eppendorf *mini spin*) und 4°C abzentrifugiert. Die Suspensionszellen HL-60 wurden auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$  pro ml gebracht, ebenfalls für 6 bis 24 h mit den entsprechenden Derivaten (5 ml, 5  $\mu$ M Endkonzentration) im Brutschrank inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit eiskaltem Ethanol (70%) auf eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^6$  pro ml gebracht und für mindestens 60 min bei 4°C fixiert und anschließend zentrifugiert. Nach einem Waschschrift wurden die Pellets in 50  $\mu$ l Zellzyklus-Analyse-Färbelösung resuspendiert und nach einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank (37°C) mittels Durchflusszytometrie (*Cytomics FC500*, Beckman Coulter, 500  $\mu$ l Suspension pro FACS-Röhrchen) ausgewertet. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 3-2 aufgelistet.<sup>[133]</sup>

Die Zellen wurden zunächst, wie bereits beschrieben, mittels Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) nach Größe und Körnung getrennt (vgl. 3.4.5 Mitochondrienmembranpotential). Zudem erfolgte die Messung des DNA-Gehaltes der Zellen bzw. die Analyse deren Replikations-Status mithilfe des in der Färbelösung enthaltenen roten Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid, der in der Lage ist, in die DNA zu interkalieren (FL3-Kanal). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *WinMDI* (Version 2.9).<sup>[134]</sup>

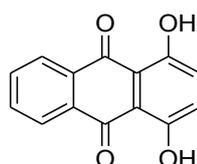
**Tabelle 3-2:** Zusammenfassung aller Parameter und Einstellungen zur Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie.

Parameter	Detektor	Spannung	Verstärkungsfaktor	Modus	Anmerkung
P1	FSC	195	5,00	Lin	
P2	SSC	269	1,00	Lin	Schwellenwert 2
P3	FL1	393	1,00	Log	Kompensation 0,3% FL3
P4	FL2	337	1,00	Log	
P5	FL3	398	1,00	Log	Kompensation 30% FL1
P6	AUX	724	1,00		

## 3.7 Zelluläre Aufnahme und Verteilung

### 3.7.1 Doxorubicinderivate

Wie bereits erwähnt, sind Mehrfachresistenzen (MDR) ein Grund für eventuelle Misserfolge in der Krebstherapie. Ein entscheidender Punkt für die MDR ist die reduzierte intrazelluläre Wirkstoffansammlung durch verminderte Wirkstoffaufnahme und bzw. oder durch erhöhten Efflux (vgl. 1.5 Resistenzmechanismen und gezielte Verabreichung von Wirkstoffen). Da Doxorubicin (**13**) eine intrinsische Fluoreszenz aufweist, kann dies als Indikator für die Wirkstoffaufnahme und -ansammlung genutzt werden. Als Fluorophor dient dabei Dihydroanthrachinon (**92**), welches bereits mit sichtbarem Licht angeregt werden kann; das Maximum der Anregung liegt bei 480 bis 500 nm (vgl. Abbildung 3-19).<sup>[135-136]</sup>



**92**

**Abbildung 3-19:** Struktur des bekannten Fluorophors Dihydroanthrachinon (**92**).

### 3.7.1.1 Fluoreszenzspektren

Zunächst wurden mithilfe eines Spektrophotometers (UV-160A UV-VIS) Absorptionsspektren von Doxorubicin (**13**) und den Derivaten (**26-38**, 5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration in PBS-Puffer) zwischen 200 und 600 nm aufgenommen, um eine geeignete Anregungswellenlänge für die folgende Fluoreszenzmessung der verschiedenen Derivate zu finden. Wie für Dihydroanthrachinon (**92**) lag das Maximum der Anregung zwischen 480 und 500 nm. Anschließend wurden mit einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (SFM 25) Fluoreszenzspektren von Doxorubicin (**13**) und den Derivaten (5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration in PBS-Puffer) zwischen 500 und 700 nm nach Anregung bei 490 nm aufgenommen, um den Einfluss der Fettsäure-Seitenketten auf die Fluoreszenz des Grundgerüsts zu messen.<sup>[136]</sup>

### 3.7.1.2 Zelluläre Aufnahme: Influx

Dank der intrinsischen Fluoreszenz der Doxorubicinderivate kann deren zelluläre Aufnahme ohne Zusetzen anderer Farbstoffe direkt aus dem Zellkulturmedium bestimmt werden. Hierbei wurde bewusst auf die Messung der intrazellulären Fluoreszenz, etwa durch die Nutzung eines Durchflusszytometers verzichtet, denn die intrinsische Fluoreszenz von Doxorubicin (**13**) nimmt durch die Interkalation in native DNA um mehr als 95% ab. An die DNA gebundenes Doxorubicin (**13**) würde also durch die Messung der intrazellulären Fluoreszenz nicht erfasst werden. Ähnliches gilt auch für die Wechselwirkung von **13** mit anderen Biomolekülen.<sup>[137-139]</sup> Für die Messung der zellulären Aufnahme der Doxorubicinderivate wurden je 500  $\mu\text{l}$  der adhären Zellen (518A2, HT-29, KB-V1 sowie MCF-7) nach erfolgter Trypsinierung (vgl. 3.1 Zellkultivierung,  $1 \cdot 10^5$  pro ml) in jedes *Well* einer 24-*Well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Von den Suspensionszellen (HL-60) wurden 500  $\mu\text{l}$  der Zelldichte  $5 \cdot 10^5$  pro ml verwendet. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch den im Zellkulturmedium enthaltenen, ebenfalls fluoreszenten pH-Indikator Phenolrot zu vermeiden, wurde für diesen Versuch ausschließlich Phenolrot-freies Medium verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Testsubstanzen (Endkonzentration 5  $\mu\text{M}$ ) hinzu pipettiert und für weitere 3 h inkubiert. Anschließend

wurden je 100  $\mu$ l aus dem Überstand der adhärennten Zellen in die *Wells* einer schwarzen 96-*Well*-Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz bei 590 nm (20 nm) nach Anregung bei 485 nm (20 nm) mithilfe des F200-Plattenreaders der Firma TECAN gemessen. Für die Suspensionszellen erfolgte zunächst ein Zentrifugationsschritt bei 300 g und 4°C (Eppendorf *mini spin*), ansonsten wurde wie bei den adhärennten Zellen verfahren. Bezogen auf die Grundfluoreszenz der Derivate (0 h, 5  $\mu$ M im Medium) wurde aus der verbliebenen Fluoreszenzintensität nach erfolgter Inkubation (3 h, im Medium) die zelluläre Aufnahme bestimmt.

#### 3.7.1.3 Wirkstoff-Ausschleusung: Efflux

Natürlich kann mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz nicht nur die Aufnahme der Doxorubicinderivate in die Zelle verfolgt werden, sondern auch deren Ausschleusung. Ein vermehrter Efflux von Wirkstoffen beispielsweise durch die Überexpression von ABC-Transportproteinen ist meist mit einem hohen Widerstand der Zelle gegen eine Vielzahl von Therapeutika verbunden (vgl. 1.3 Resistenzmechanismen und gezielte Verabreichung von Wirkstoffen). Die Fähigkeit der Doxorubicinderivate, Mehrfachresistenzen zu überwinden, sollte nicht nur mittels MTT-Test in Gegenwart geeigneter Inhibitoren der ABC-Transporter P-gp, BDRP und MRP-1 untersucht werden (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität), sondern auch über die Messung der zellulären Ausschleusung.

Hierfür wurde wie oben beschrieben verfahren (vgl. 3.6.1.2 Zelluläre Aufnahme: Influx); nach 3-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das Medium durch frisches Phenolrot-freies Zellkulturmedium ersetzt und die Inkubation für weitere 3 h fortgesetzt. Nach der Behandlung wurde wieder die Fluoreszenz im Überstand bei 590 nm (20 nm) nach Anregung bei 485 nm (20 nm) mithilfe des F200-Plattenreaders der Firma TECAN gemessen. Die Berechnung der Ausschleusung erfolgte analog zur Aufnahme aus der verbliebenen Fluoreszenz nach erfolgter Inkubation. Auf Standard-Efflux-Tests mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein ( $\lambda_{\text{ex}}=495$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=510$  nm) musste aufgrund der Überlappung des Fluoreszenzspektrums mit dem von Doxorubicin (**13**,  $\lambda_{\text{ex}}=490$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=555$  nm) verzichtet werden.<sup>[140]</sup>

#### 3.7.1.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen

Um eine Verteilung der Doxorubicinderivate innerhalb der Zelle zu verfolgen, wurden verschiedene Fluoreszenzfärbungen im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durchgeführt.

Dafür wurden PtK<sub>2</sub>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert: Diese wurden wie oben beschrieben mit Hilfe von Trypsin passagiert. In jedes *Well* einer 4-*Well*-Mikrotiterplatte, die zuvor mit je einem sterilen Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) präpariert wurde, wurden 750 µl der Zellsuspension gegeben und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert, um ein vollständiges Anheften der Zellen zu gewährleisten. Vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Doxorubicinderivate (Endkonzentration 5-10 µM, DMSO < 0,1%) zugegeben und 2 h bis 16 h bei 37°C inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium aus den *Wells* entfernt und 2× mit PBS gewaschen. Bei Bedarf wurden die Zellen an dieser Stelle 10 min mit dem Hoechst Lebendfarbstoff 33324 (5 µg / ml) behandelt, um den Zellkern sichtbar zu machen. Danach wurden die Deckgläschen aus den *Wells* entnommen und umgekehrt mit den Zellen nach unten in einen Tropfen PBS auf einen Objektträger gelegt. Um ein Austrocknen der Proben zu vermeiden, wurde herkömmlicher Nagellack zum Versiegeln auf dem Rand des Deckgläschens verteilt.

Einige Proben wurden nicht vital in PBS sondern fixiert mit einer Gegenfärbung des Golgi-Apparats betrachtet. Hierfür wurde nach der Inkubation ebenfalls das Medium aus den *Wells* entfernt und 2× mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 15 min mit 3,7% Formalin in PBS, sowie deren Permeabilisierung für 5 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS. Zwischen den beiden Schritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für alle Schritte der Fixierung wurden je 500 µl pro *Well* verwendet. Vor der Färbung wurde außerdem mit 500 µl 10% FBS in PBS blockiert.

Für die Färbung des Golgi-Apparats wurden die Zellen 1 h mit 250 µl eines primären monoklonalen Anti-Golgi-Maus-Antikörpers (Verdünnung 1:100 in 10% FBS in PBS) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und 45 min mit 250 µl des sekundären Antikörpers inkubiert. Hierbei wurde ein Anti-Maus-Antikörper verwendet, der mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor488 gekoppelt ist. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen 10 min mit DAPI (1 µg / ml) behandelt. Die Deckgläschen wurden aus den Wells entnommen und umgekehrt mit den Zellen nach unten in einen Tropfen Einbettmedium (Prolong Antifade Gold) auf einen Objektträger gelegt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der CCD-Kamera Axiocam am Fluoreszenzmikroskop Axioplan unter Verwendung der Neofluar-Ojektive 20× und 40× (Filterset Texas Red, DAPI) erstellt.<sup>[141]</sup>

#### 3.7.1.5 Verteilung im Gewebe: Mausmodell

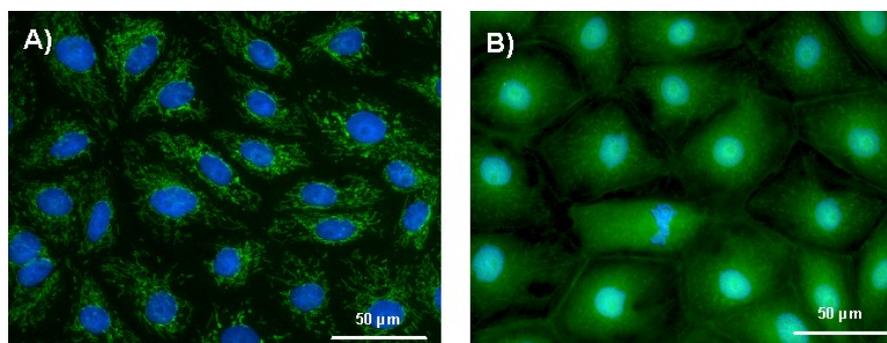
Um eine Verteilung der Doxorubicinderivate innerhalb eines mehrzelligen Organismus zu verfolgen, wurden Tierversuche in der Uniklinik in Erlangen-Nürnberg unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Ocker durchgeführt.

Dafür wurde männlichen NMRI nu/nu Mäusen (durchschnittlich 35-45 g Körpergewicht, 10-18 Wochen alt) Doxorubicin (**13**) sowie die Derivate **26** und **32** intravenös (i.v., 1 mg / ml in steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung) in einer Dosis von 2,8 mg / kg Körpergewicht verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt i.v. die gleiche Menge Kochsalzlösung ohne Wirkstoff. Die Tiere wurden an den Zeitpunkten 0,5, 30, 60 und 120 min nach Injektion durch Genickbruch getötet, die Organe (Herz, Lunge, Leber, Nieren, Milz und Brustbein) wurden entnommen, in Kryoröhrchen portioniert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.<sup>[139]</sup> Die Gewebeprobe wurden nach dem Auftauen mit eiskalter 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen; anschließend erfolgte die Extraktion in 1 ml 98%-igem Ethanol pro 5 mg Gewebeprobe für 1 min mit einem Homogenisator (Ultraturax). Danach wurde die Fluoreszenz der Doxorubicinderivate in den Gewebeeextrakten bei 590 nm (20 nm) nach Anregung bei 485 nm (20 nm) mithilfe des F200-Plattenreaders der Firma TECAN gemessen.<sup>[143]</sup> Für die mikroskopischen Untersuchungen der Gewebeprobe wurden einige Proben in

*Tissue Freezing Medium* eingebettet und mit einem *2800 Frigocut-E* Kryostat (Reichert-Jung) in 20-35  $\mu\text{m}$  dünne Gewebeschnitte geschnitten und auf *Superfrost/Plus*-Objektträger plaziert. Ähnlich wurde für die in Parafin eingebetteten Proben vorgegangen (Mitarbeiter der Uniklinik Erlangen-Nürnberg). Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit einem Axiovert 135 Fluoreszenzmikroskop (Filterset DAPI, Rhodamin, Vergrößerung 32 $\times$ ) untersucht.<sup>[144]</sup>

### 3.7.2 Thymochinonderivate: Markierung und Visualisierung

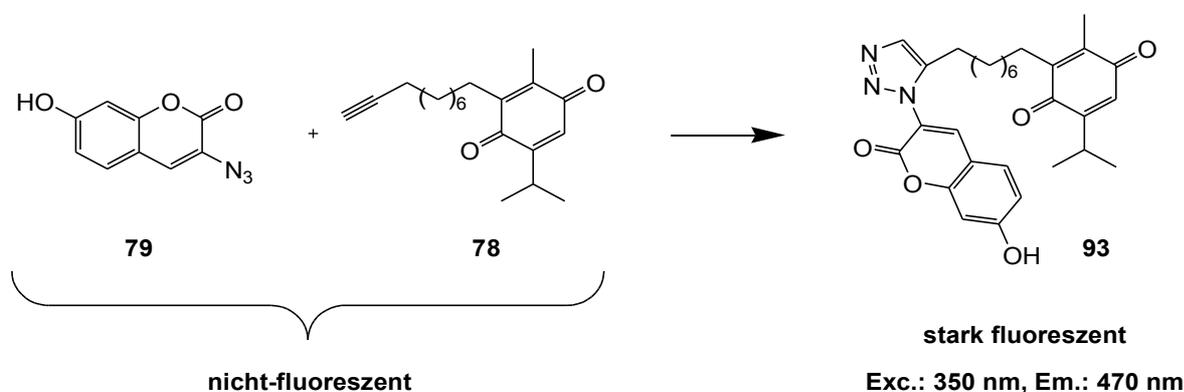
Thymochinon (**17**) weist leider keine intrinsische Fluoreszenz auf, was die Untersuchung seiner intrazellulären Verteilung erschwert. Erste Vorarbeiten an den Beutelratten-Zellen PtK<sub>2</sub> (Dr. Randi Diestel, HZI Braunschweig) mit dem Biotin-markierten Thymochinonderivat **76** ergaben eine Lokalisation im Zellkern und in unmittelbarer Nähe zum Zellkern (siehe Abbildung 3-20). Hierbei wurden die PtK<sub>2</sub>-Zellen ebenfalls auf Deckgläschen in 4-Well-Mikrotiterplatten kultiviert, für 24 h mit dem Biotin-Konjugat **76** (30  $\mu\text{g}$  / ml,  $\sim$  6,5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert, anschließend fixiert und permeabilisiert und schließlich mit einem Streptavidin-AlexaFluor488-Konjugat (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gefärbt. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (1  $\mu\text{g}$  / ml) wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Einbettmedium (Prolong Antifade Gold) eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Axioplan, Filterset DAPI, FITC, Neofluar 40 $\times$ , vgl. 3.6.1.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen).<sup>[145-146]</sup>



**Abbildung 3-20:** Intrazelluläre Verteilung des Biotin-Thymochinon-Konjugats **76**: A) PtK<sub>2</sub>-Kontrollzellen (MeOH) sowie B) mit **76** (30  $\mu\text{g}$  / ml, 24 h) behandelte PtK<sub>2</sub>-Zellen nach der Färbung mit einem Streptavidin-AlexaFluor488-Konjugat und der Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI.<sup>[146]</sup>

Derivat **76** schien hauptsächlich im Zellkern zu akkumulieren. Da Biotin selbst eine wichtige Rolle während der Histon-Modifikation spielt und die prosthetische Gruppe verschiedener mitochondrialer Carboxylasen bildet, war das Biotin-Streptavidin-System jedoch nicht sehr eindeutig; es zeigte sich eine starke Färbung der Mitochondrien sowohl in den behandelten als auch den Kontrollzellen.<sup>[147-148]</sup>

Um die zelluläre Verteilung von Thymochinon (**17**) und seinen Derivaten noch besser untersuchen zu können, wurden die beiden Thymochinon-Alkine **77** und **78** synthetisiert, die in einer *in vitro* „Klick-Reaktion“ (1,3-dipolare Azid-Alkin-Cykloaddition oder Huisgen-Reaktion) in Gegenwart von Natriumascorbat und Kupfersulfat mit verschiedenen Cumarinaziden reagieren und somit in der Zelle lokalisiert werden können.<sup>[149-150]</sup> Die verwendeten Cumarinazide sind nicht toxisch, leicht membrangängig und nur gering fluoreszent; die durch die „Klick-Reaktion“ entstehenden Triazole – Abbildung 3-21 zeigt das aus TQ-Alkin **78** und dem Hydroxycumarinazid (**79**) entstehende Triazol **93** – sind dagegen stark fluoreszent und sollten die Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie erlauben.<sup>[77]</sup>



**Abbildung 3-21:** Kupfer-(I)-katalysierte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cykloaddition im zellfreien Ansatz: Die nicht-fluoreszenten Verbindungen **78** und **79** reagieren zum stark fluoreszierenden Triazol **93**.

Zunächst wurde die „Klick-Reaktion“ in einem zellfreien Ansatz durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5  $\mu\text{M}$  Alkin **77-78** und Azid **79-81** in PBS-Puffer zusammen mit 1 mM Natriumascorbat und 500  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat unterschiedlich lang bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Außerdem wurden verschiedene zellbasierte „Klick-Reaktionen“ im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durchgeführt. Dafür wurden die PtK<sub>2</sub>-Zellen wie oben beschrieben auf Deckgläschen kultiviert (vgl. 3.6.1.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen). Vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die TQ-Alkine **77** und **78** (Endkonzentration 16 µM, DMSO < 0,1%) zugegeben und für 16 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium aus den *Wells* entfernt und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wie oben beschrieben. Danach wurden die Zellen für 30 min bei RT mit den Cumarinaziden **79-81** (5 µM) unter Verwendung des *Click-iT-cell reaction buffer Kits* (440 µl 1× *Click-iT cell reaction buffer* + 10 µl CuSO<sub>4</sub> + 50 µl *Click-iT cell buffer additive*) gefärbt. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung des Golgi-Apparats wie oben beschrieben (vgl. 3.6.1.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen), mit der Ausnahme, dass ein an den roten Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor594 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet wurde. Auf die Behandlung mit DAPI wurde verzichtet, da die Fluoreszenz nach erfolgter „Klick“-Reaktion ebenfalls blau fluoreszent erwartet wird. Die Deckgläschen wurden aus den *Wells* entnommen und umgekehrt mit den Zellen nach unten in einen Tropfen Einbettmedium (Prolong Antifade Gold) auf einen Objektträger gelegt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der CCD-Kamera Axiocam am Fluoreszenzmikroskop Axioplan unter Verwendung des Neofluar-Ojektivs 40× (Filterset DAPI, Texas Red) erstellt.

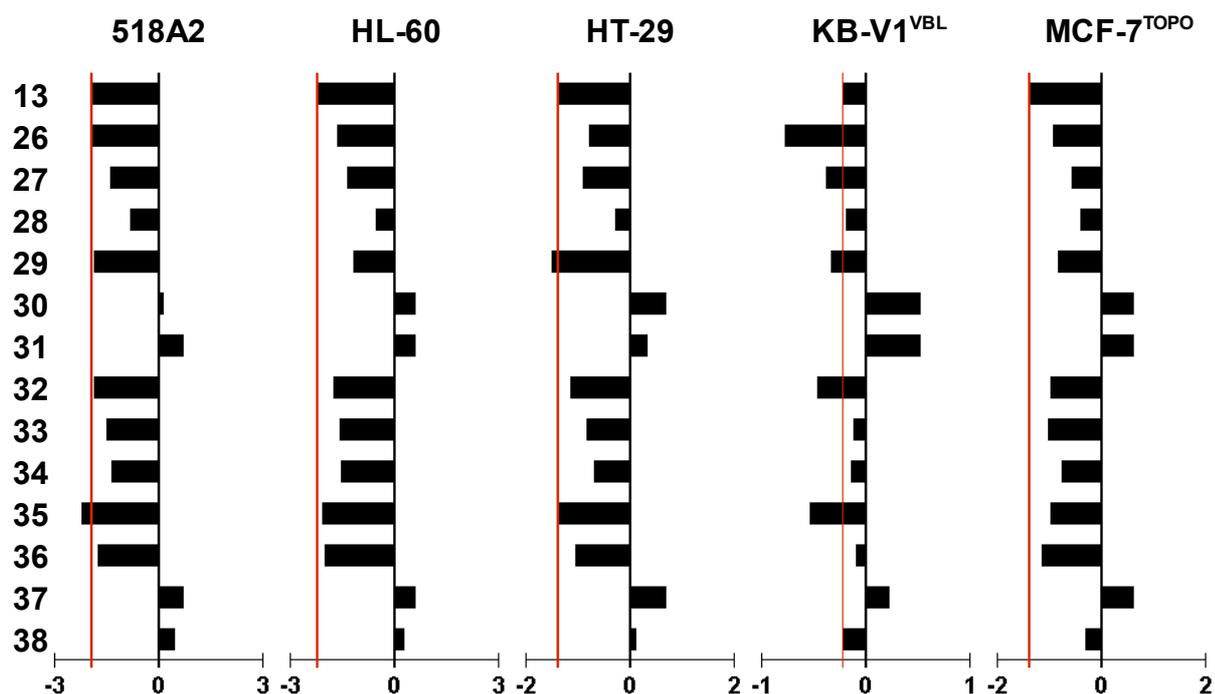
Einzig **78** und **79** führten zellbasiert zu einer detektierbaren „Klick-Reaktion“, weshalb nur auf diese Ergebnisse eingegangen wurde.

## 4 Ergebnisse und Diskussion: Doxorubicin (13) und seine Derivate

### 4.1 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test

#### 4.1.1 Effektivität

Die Doxorubicinderivate **26-38** sowie Doxorubicin (**13**) selbst wurden *in vitro* mittels MTT-Test auf ihre Wachstums-inhibierende Funktion gegenüber 518A2 Melanom-, HL-60 Leukämie-, HT-29 Kolonkarzinom-, KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen untersucht. Die generelle Zelllinienspezifität – d.h. die IC<sub>50</sub>-Werte nach 72-stündiger Inkubation der Zellen mit einer Testsubstanz verglichen mit der mittleren Wirkung aller Testsubstanzen – ist in Abbildung 4-1 grafisch aufgeführt; eine ausführliche Auflistung aller Kurz- und Langzeitergebnisse (24-72 h) ist im Anhang in den Tabellen A-1, A-2, A-4 und A-6 zu finden (vgl. 3.3.1.1 Effektivität).



**Abbildung 4-1:** Generelle Zelllinienspezifität von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivate **26-38** gegen 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- sowie MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen: Zelllinienspezifische Auftragung der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte der einzelnen Derivate relativ zum Mittelwert der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte aller Derivate, negative bzw. positive Werte stehen für eine im Vergleich zum Mittelwert bessere bzw. schlechtere Wirkung der Derivate, Markierung der Wirkung von **13** (—) zur besseren Vergleichbarkeit.

Bereits während der Vorarbeiten kristallisierte sich die Variante der Hydrazonbildung als effektivste der drei möglichen Methoden zur Derivatisierung des Doxorubicin-Grundkörpers heraus.<sup>[59]</sup> Ein Vergleich von **26**, **30** und **31** über alle Zelllinien hinweg zeigt, dass die Anbindung der gesättigten Margarinsäure via Hydrazon im besten Fall zu einer Wirkverbesserung gegenüber Doxorubicin (**13**) führt, wenigstens aber nicht wie für Ester **30** und Amid **31** zu einem Verlust der Effektivität (vgl. Abbildung 4-1). Für die systematisch synthetisierten Fettsäurederivate **26-29** konnte eine Zelllinienspezifität festgestellt werden: An den mehrfachresistenten KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen schnitten diese Derivate besonders gut ab – allen voran **26**, das mit einem Langzeit-IC<sub>50</sub>-Wert von 5,07 ± 0,93 µM mehr als dreimal aktiver war als Doxorubicin (**13**, 18,34 ± 7,60 µM). Im Fall der sensitiven HL-60 Leukämie-Zellen sowie der mehrfachresistenten MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen wirkte kein Derivat besser als **13**; das Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**26**) konnte verglichen mit den übrigen Fettsäurederivaten aber wenigstens mit der Wirkung von Doxorubicin (**13**) mithalten.<sup>[151]</sup>

Für die Hydrazonderivate (**32-36**) mit unterschiedlich langen (–)-Menthol- und (–)-Borneol-terminierten Fettsäureresten konnte ebenfalls keine Regelmäßigkeit festgestellt werden: Die Derivate **32-36** zeigten an den verschiedenen Zelllinien ähnliche Wirkprofile, jedoch gehörten **32** und **35** stets zu den besseren Testsubstanzen. In Bezug auf die 518A2 Melanom-Zellen schnitt Derivat **35** besonders gut ab und übertraf mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 60 ± 10 nM nach 72 h Inkubation sogar die Wirkung von **13** um das Doppelte (120 ± 40 nM, vgl. Abbildung 4-1). Auch an den KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen zeigten die Derivate **32** und **35** eine im Vergleich zu Doxorubicin (**13**) verbesserte Wirksamkeit.<sup>[151]</sup>

Zudem wurden die beiden Hauptmetabolite des Doxorubicins (**13**) – das Doxorubicinol (**37**) und das Doxorubicin-Aglycon (**38**) – in die Tests einbezogen. Beide Metabolite zeigten jedoch eine drastische Verminderung der Wirkung gegenüber **13** (vgl. Abbildung 4-1).

#### 4.1.2 MDR-Sensitivität

Die klinische Anwendung von Doxorubicin (**13**) ist u.a. aufgrund von Mehrfachresistenzen limitiert.<sup>[31]</sup> Um Derivate zu identifizieren, die in der Lage sind, solche Resistenzen zu überwinden, wurde die Wirkung der aktivsten Derivate an den mehrfachresistenten HT-29<sup>COLC</sup>-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen bzw. an den Doxorubicin-resistenten HT-29<sup>DOX</sup>-, KB-V1<sup>DOX</sup>- und MCF-7<sup>DOX</sup>-Zellen auf Basis des MTT-Tests mit der an den sensitiven, parental Zellen (HT-29-, KB-V1- und MCF-7) verglichen. Die IC<sub>50</sub>-Werte nach 72 h Inkubation sowie die resultierenden Quotienten R(+/-) aus den IC<sub>50</sub>-Werten an den resistenten und sensitiven HT-29-Zellen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Idealerweise sollte R(+/-) bei 1 liegen; dann ähneln sich die IC<sub>50</sub>-Werte und die Anfälligkeit der Substanzen gegenüber dem Resistenzmechanismus ist eher gering (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität).

**Tabelle 4-1:** Effektivität und MDR-Sensitivität von Doxorubicin (**13**) und seinen aktivsten Derivaten **26**, **29**, **32** und **35** an HT-29-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>			R (+/-) <sup>b</sup>	
	HT-29	HT-29 <sup>COLC</sup>	HT-29 <sup>DOX</sup>	$\frac{\text{HT-29}^{\text{COLC}}}{\text{HT-29}}$	$\frac{\text{HT-29}^{\text{DOX}}}{\text{HT-29}}$
<b>13</b>	0,85 ± 0,11	0,69 ± 0,10	0,42 ± 0,12	0,8	0,5
<b>26</b>	3,62 ± 0,60	0,29 ± 0,10	3,18 ± 0,18	<b>0,1</b>	0,9
<b>29</b>	0,67 ± 0,12	0,58 ± 0,09	0,28 ± 0,13	0,9	0,4
<b>32</b>	1,57 ± 0,66	0,97 ± 0,34	1,12 ± 0,06	0,6	0,7
<b>35</b>	0,95 ± 0,002	0,50 ± 0,24	0,75 ± 0,05	0,5	0,8

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten nach 72-stündiger Behandlung der HT-29-Kolonkarzinom-Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

<sup>b</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den resistenten und sensitiven Zellen.

Da die HT-29-Zellen aufgrund der Überexpression des ABC-Transporters MRP-1 mehrfachresistent sind, verstärkt sich diese Resistenz durch die Sensibilisierung mit Colchichin (COLC) bzw. Doxorubicin (**13**, DOX) nicht mehr signifikant; die Wirkung der Testsubstanzen **13**, **26**, **29**, **32** und **35** in resistenten und parental HT-29-Zellen war annähernd gleich.<sup>[38,43]</sup> Für **26** wurde allerdings festgestellt, dass die Wirkung in den resistenten HT-29<sup>COLC</sup>-Zellen im Vergleich zu den parental Zellen stieg.

In Bezug auf die Zervix- und Mammakarzinom-Zellen wurde analog vorgegangen, so dass auch hier ein Quotient R(+/-) aus den IC<sub>50</sub> (72 h)-Werten an den resistenten und sensitiven Zellen ermittelt werden konnte (vgl. Tabelle 4-2). Die verwendeten IC<sub>50</sub>-Werte sind in den Tabellen A-4 bis A-7 im Anhang zu finden.

**Tabelle 4-2:** MDR-Sensitivität von Doxorubicin (13) und seinen aktivsten Derivaten 26, 29, 32 und 35 an KB-V1- und MCF-7-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>			
	$\frac{KB-V1^{VBL}}{KB-V1}$	$\frac{KB-V1^{DOX}}{KB-V1}$	$\frac{MCF-7^{TOPO}}{MCF-7}$	$\frac{MCF-7^{DOX}}{MCF-7}$
<b>13</b>	366,8	35,8	<b>11,2</b>	18,4
<b>26</b>	<b>8,3</b>	3,9	27,9	11,6
<b>29</b>	31,1	3,5	23,9	12,9
<b>32</b>	29,5	5,3	15,7	8,1
<b>35</b>	<b>4,6</b>	<b>0,6</b>	<b>6,1</b>	<b>2,4</b>

<sup>a</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den resistenten und sensitiven Zellen.

Anders als bei den HT-29-Zellen sind die Zervix- und Mammakarzinom-Zellen eher sensitiv, zeigen jedoch nach der Langzeitbehandlung mit Vinblastin (VBL) bzw. Topotecan (TOPO) und Doxorubicin (13, DOX) eine Überexpression der ABC-Transporter P-gp und BCRP.<sup>[48-49]</sup> Verglichen mit 13 war die Anfälligkeit aller getesteten Derivate gegenüber P-gp deutlich geringer, was an dem mehr als 10× geringeren Quotienten KB-V1<sup>VBL</sup>/KB-V1 zu sehen ist (vgl. Tabelle 4-2). Am wenigsten durch P-gp beeinflusst schienen dabei die Derivate 26 und 35 zu sein, was die hohe Effektivität dieser Derivate an den KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen erklärt (vgl. Abbildung 4-1). Im Gegenteil dazu ist der Einfluss des ABC-Transporters BCRP auf die Derivate 26, 29 und 32 und folglich deren Ausscheidung verantwortlich für die geringe Wirkung an den MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen. Im Fall der Doxorubicin-resistenten KB-V1<sup>DOX</sup>- und MCF-7<sup>DOX</sup>-Zellen konnte die geringste MDR-Sensitivität für das 11-[(–)-Menthoxy-carbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (35) verzeichnet werden. Weiterhin wurden MTT-Tests an den HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen in Gegenwart geeigneter Inhibitoren der ABC-Transporter MRP-1, P-gp und BCRP durchgeführt. Die resultierenden Quotienten R(+/-) aus den IC<sub>50</sub> (72 h)-Werten mit und ohne

Inhibitorzugabe sollten idealerweise – also bei möglichst geringem Einfluss der ABC-Transporter – nahe 1 liegen (vgl. Tabelle 4-3).

**Tabelle 4-3:** MDR-Sensitivität von Doxorubicin (13) und seinen aktivsten Derivaten 26, 29, 32 und 35 an HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>		
	*HT-29 HT-29	*KB-V1 <sup>VBL</sup> KB-V1 <sup>VBL</sup>	*MCF-7 <sup>TOPO</sup> MCF-7 <sup>TOPO</sup>
<b>13</b>	0,3	0,1	0,1
<b>26</b>	0,3	<b>0,7</b>	0,1
<b>29</b>	0,2	0,2	0,1
<b>32</b>	0,4	0,2	0,2
<b>35</b>	0,3	0,1	0,03

<sup>a</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte mit und ohne Inhibitorzugabe.

\* 24 h vor Zugabe der Testsubstanzen wurde MK571 (10 µM) zur MRP-1-Inhibierung in den HT-29-Zellen, Verapamil (24 µM) zur Inhibierung von P-gp in den KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen und Fumitremorgin C (1,2 µM) zur BCRP-Inhibierung in den MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen verabreicht.

Es konnte erneut gezeigt werden, dass das Derivat **26** verglichen mit den übrigen Testsubstanzen am wenigsten vom ABC-Transporter P-gp beeinflusst wird; der MDR-Sensitivitäts-Faktor R(+/-) lag hier bei 0,7. Das bestätigt die vorangegangenen Versuche; das Doxorubicinderivat **26** ist in der Lage, P-gp-bedingte Mehrfachresistenzen zu überwinden.<sup>[151]</sup>

Die resistenten HT-29 Kolonkarzinom-Zellen überexprimieren neben dem ABC-Transporter MRP-1 auch **UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs)**, die für die Glucuronisierung und Ausschleusung von Wirkstoffen auch unabhängig von MRP-1 verantwortlich sind. Um den Einfluss der UGTs auf die Wirkung der Testsubstanzen zu untersuchen, wurden MTT-Tests an den HT-29-Zellen in Gegenwart des spezifischen UGT-Inhibitors Propofol durchgeführt (vgl. 3.3.2 MDR-Sensitivität, Tabelle A-3 im Anhang). Die Wirkung der Testsubstanzen **13, 26, 29, 32** und **35** nahm bei Verwendung des Inhibitors im Vergleich zu den „UGT-intakten“ HT-29-Zellen zu. Dies spricht entweder für eine Glucuronisierung und anschließende Entgiftung der Zelle durch andere Transporter (≠ MRP-1) oder einen Wirkungsverlust durch die Glucuronisierung.

## 4.1.3 Selektivität

Zur Überprüfung der Tumorselektivität der Testsubstanzen wurde der therapeutische Index TI bestimmt. Es handelt sich hierbei um den Quotienten aus den  $IC_{50}$ -Werten an den nicht-malignen Fibroblasten (HF) und den  $IC_{50}$ -Werten an den Melanom-Zellen (518A2). Die verwendeten  $IC_{50}$ -Werte nach 72-stündiger Inkubation und die therapeutischen Indices sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Idealerweise sollte der Wirkstoff möglichst selektiv die Tumorzellen bekämpfen, ohne jedoch gesunde, nicht-maligne Zellen zu beeinflussen; TI sollte demnach möglichst groß sein.

**Tabelle 4-4:** Selektivität von Doxorubicin (**13**) und seinen aktivsten Derivaten **26**, **29**, **32** und **35** an Melanom-Zellen (518A2) im Vergleich zu nicht-malignen Fibroblasten (HF).

Testsubstanz	$IC_{50}$ (72 h) [ $\mu$ M] <sup>a</sup>		TI <sup>b</sup> $\frac{HF}{518A2}$
	HF	518A2	
<b>13</b>	6,93 ± 3,70	0,12 ± 0,04	<b>57,8</b>
<b>26</b>	1,11 ± 0,74	0,11 ± 0,05	10,1
<b>29</b>	4,07 ± 2,26	0,14 ± 0,03	29,1
<b>32</b>	3,49 ± 0,99	0,14 ± 0,01	24,9
<b>35</b>	2,88 ± 0,14	0,06 ± 0,01	<b>48,0</b>

<sup>a</sup>  $IC_{50}$ -Werte erhalten nach 72-stündiger Behandlung der HF Fibroblasten und 518A2 Melanom-Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

<sup>b</sup> Der therapeutische Index TI ergibt sich aus dem Quotienten der  $IC_{50}$  (72 h)-Werte an den HF Fibroblasten und den 518A2 Melanom-Zellen.

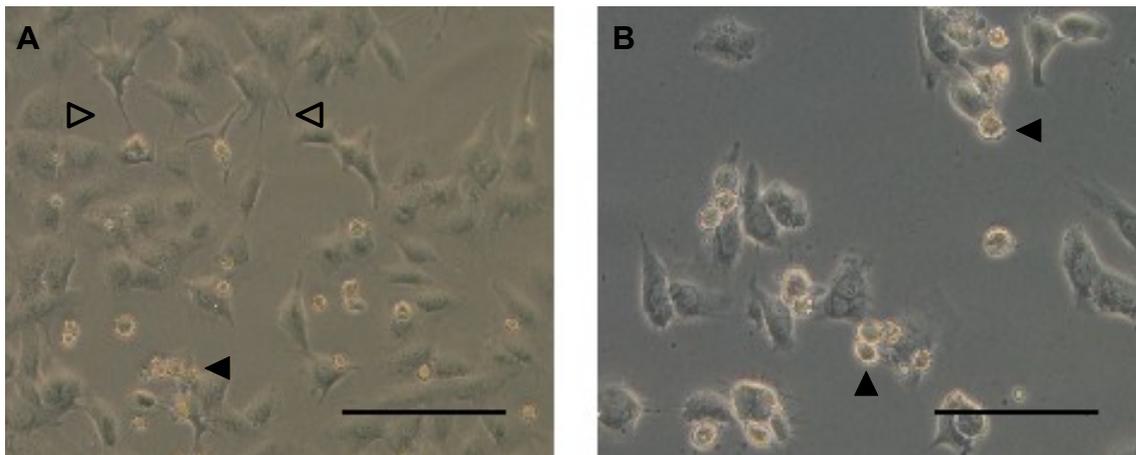
Der beste therapeutische Index TI ergab sich für Doxorubicin (**13**) selbst; das beste Derivat stellte in dieser Hinsicht **35** dar. Bei den übrigen Derivaten war die Selektivität zwischen malignen Tumorzellen und nicht-malignen Fibroblasten nicht mehr befriedigend.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Derivatisierung von Doxorubicin (**13**) vor allem in den resistenten Zelllinien zu einer Verbesserung der Wirkung (vgl. **26**, **35**) führt. Zudem konnten Ansätze gezeigt werden, P-gp-bedingte Mehrfachresistenzen mit geeigneten Derivaten (**26**) zu überwinden.<sup>[151]</sup>

## 4.2 Nachweis von Apoptose

### 4.2.1 Morphologie

Die Apoptose-bedingten morphologischen Veränderungen der Zellen nach der Behandlung mit Doxorubicinderivaten konnten mikroskopisch verfolgt werden. Als Beispiel wurden mikroskopische Aufnahmen der 518A2 Melanom-Zellen gewählt, die für 6 h bzw. 24 h mit dem Doxorubicinderivat 11-[-(-)-Menthoxy-carbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydraton (**35**) inkubiert worden waren (Endkonzentration jeweils 5  $\mu\text{M}$ ). Bereits nach 6-stündiger Inkubation mit **35** war der Verlust von Zellverbindungen festzustellen; nach längeren Inkubationszeiten konnte das Schrumpfen der Zellen und deren Unterteilung in membrangebundene Vesikel (apoptotische Körperchen) beobachtet werden (vgl. Abbildung 4-2).



**Abbildung 4-2:** Mikroskopische Aufnahme der 518A2 Melanom-Zellen nach 6- (A) bzw. 24-stündiger Inkubation (B) mit dem Doxorubicinderivat 11-[-(-)-Menthoxy-carbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydraton (**35**, 5  $\mu\text{M}$ ): Zu den typischen Apoptose-bedingten, morphologischen Veränderung der behandelten Zellen zählt deren Schrumpfen und der Verlust von Zellverbindungen ( $\Delta$ ) sowie die Unterteilung der Zelle in membrangebundene Vesikel ( $\blacktriangle$ ); Axiovert 135, Achrostigmat-Objektiv 35 $\times$ . Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

Das Auftreten dieser morphologischen Veränderungen darf nicht als eindeutige Nachweismethode der Apoptose verstanden werden, sie kann aber bereits einen Hinweis darauf geben.

#### 4.2.2 DNA-Fragmentierung

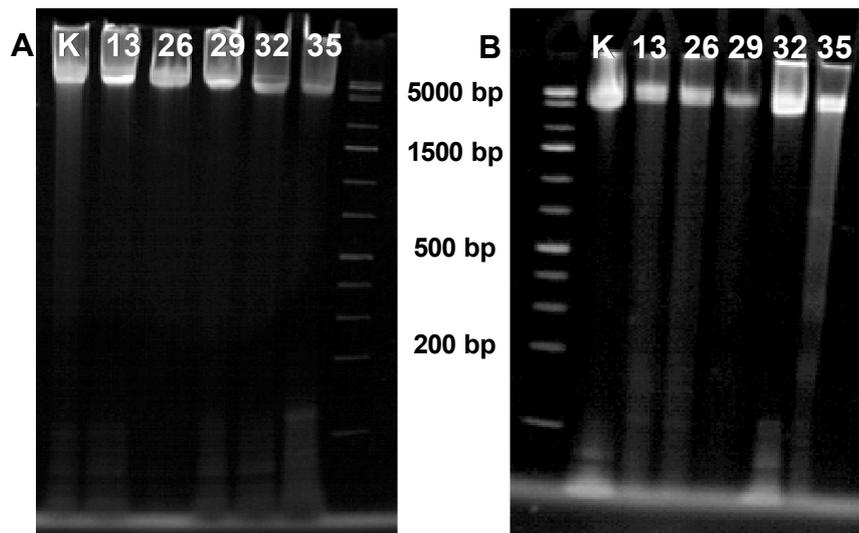
Die DNA-Fragmentierung gilt als typisches Merkmal zur Identifizierung von apoptotisch sterbenden Zellen und wird daher zu deren Nachweis herangezogen. Dabei können die DNA-Fragmente direkt nach der Inkubation mit den Apoptose-auslösenden Substanzen isoliert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert werden. Weiterhin kann die Fragmentierung der zellulären DNA auch immunohistochemisch durch enzymatische *in situ*-Färbungen – beispielsweise mit dem TUNEL-Test – analysiert werden (vgl. 3.4.2 DNA-Fragmentierung).

##### 4.2.2.1 TUNEL-Test

Der TUNEL-Test beruht auf der Fluoreszenzmarkierung der während der Apoptose frei werdenden 3'-OH-Gruppen durch das Enzym TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) mit Fluorescein-konjugierten Nukleotiden (dUDPs). Die Detektion der fluoreszierenden DNA-Fragmente erfolgt normalerweise mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Leider konnte der TUNEL-Test in Verbindung mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26-38** nicht durchgeführt werden, da sich die Fluoreszenzspektren von Fluorescein ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ ) und Doxorubicin (**13**) ( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$ ) zu sehr überlappen (vgl. 4.6.1 Fluoreszenzspektren). Aus diesem Grund wurde die DNA-Fragmentierung mittels Gelelektrophorese untersucht.<sup>[59,132]</sup>

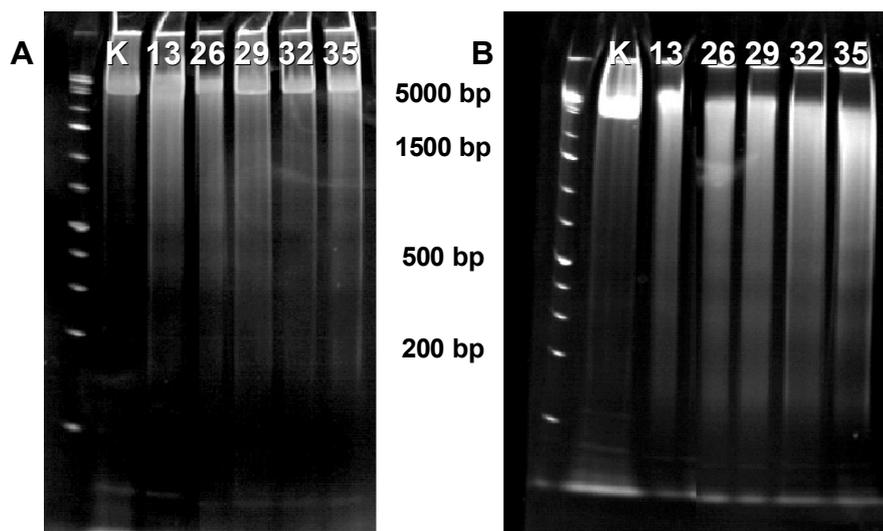
##### 4.2.2.2 Gelelektrophorese

Hierfür wurde die genomische DNA aus 518A2 Melanom- bzw. HL-60 Leukämie-Zellen isoliert, die zuvor für bis zu 24 h mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26-38** inkubiert worden waren. Nach kurzen Inkubationszeiten von nur 6-8 h konnte an den 518A2-Zellen kaum Fragmentierung der zellulären DNA festgestellt werden; längere Behandlungen dieser Zellen mit **13** bzw. **26-35** jedoch führte zu einer deutlichen DNA-Fragmentierung.<sup>[59]</sup> Es konnten die typischerweise auftretenden DNA-Fragmente von etwa 200 bp, 400 bp bzw. 600 bp erhalten werden (vgl. Abbildung 4-3).<sup>[95]</sup>



**Abbildung 4-3:** DNA-Fragmentierung in den 518A2 Melanom-Zellen nach 6- (A) bzw. 24-stündiger Inkubation (B) mit Doxorubicin (13) und seinen Derivaten 26, 29, 32 und 35 (je 5  $\mu$ M, Kontrolle = K): native ServaGele (10  $\times$  10 cm, pH 7,4), DNA-Standard (rechts): *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* (0,5  $\mu$ g), Laufpuffer: 1 $\times$  TBE, 7 V / cm.

Im Fall der HL-60-Zellen konnte bereits nach 6 h ein deutliches Fragmentierungsmuster (mit DNA-Fragmenten der Größe 200 bp, 400 bp bzw. 600 bp) für die aktivsten Derivate erhalten werden (vgl. Abbildung 4-4).<sup>[59]</sup> Diese Ergebnisse passen sehr gut zu denen aus dem MTT-Test: Die dort aktiveren Test-substanzen führten zu einer stärkeren Fragmentierung der DNA.



**Abbildung 4-4:** DNA-Fragmentierung in den HL-60 Leukämie-Zellen nach 6- (A) bzw. 24-stündiger Inkubation (B) mit Doxorubicin (13) und seinen Derivaten 26, 29, 32 und 35 (jeweils 5  $\mu$ M, Kontrolle = K): native ServaGele (10  $\times$  10 cm, pH 7,4), DNA-Standard: *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* (0,5  $\mu$ g), Laufpuffer: 1 $\times$  TBE, 7 V / cm.

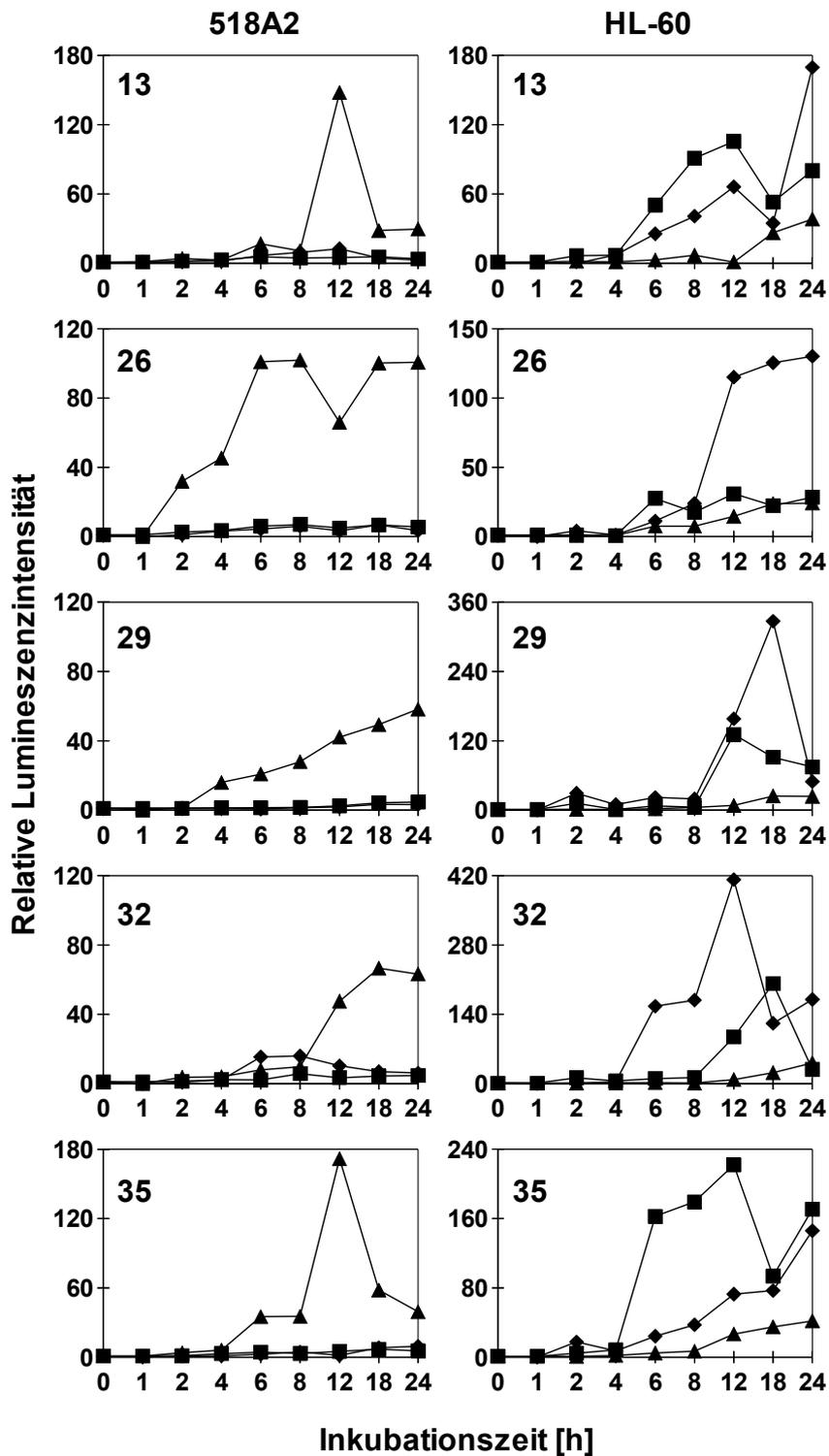
### 4.2.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten

Die Auslösung der Apoptose geht meist einher mit der Aktivierung von Caspasen, die für die Weiterleitung von Zelltod-Signalen und den Abbau zellulärer Strukturen verantwortlich sind. Zur Bestimmung der Caspase-Aktivitäten nach dem Zellaufschluss behandelte 518A2 Melanom- bzw. HL-60 Leukämie-Zellen wurden lumino-metrische Assay-Kits herangezogen. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Caspase-9-Aktivierung in Abhängigkeit von der Caspase-8 mithilfe von Western Blot-Analysen (vgl. 3.4.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten).

#### 4.2.3.1 Caspase-Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der Caspasen-3, -8 und -9 nach einer Inkubation der 518A2 Melanom- bzw. HL-60 Leukämie-Zellen von bis zu 24 h mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26**, **29**, **32** und **35** ist in Abbildung 4-5 aufgezeigt. Für Doxorubicin (**13**) und das aktivste Derivat 11-[(–)-Menthoxy-carbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**35**) wurden ähnliche Caspase-Kinetiken erhalten: In den 518A2 Melanom-Zellen, in denen aufgrund einer Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 sowohl der intrinsische, mitochondriale Apoptose-Pfad als auch der extrinsische Weg über die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 gehemmt ist, kam es nach 8 h Inkubation mit **13** oder **35** zu einem starken Anstieg in der Caspase-9-Aktivität.<sup>[33-34]</sup> In den HL-60 Leukämie-Zellen dagegen war für diese beiden Derivate bereits nach 4 h eine erhöhte Aktivität der Effektor-Caspase-3 zu verzeichnen. Diese kann auch unabhängig von den Initiator-Caspasen-8 und -9 aktiviert werden und über die Caspase-Kaskade zu einer Rekrutierung anderer Caspasen führen.<sup>[102]</sup> Die Caspasen-8 und -9 zeigten eine deutliche Aktivität erst nach 8 h bis 12 h, was auf eine Aktivierung durch die Caspase-3 schließen lässt.<sup>[151]</sup>

Die Fettsäurederivate **26** und **29** führten in den 518A2-Zellen zu einer stetigen Verstärkung der Caspase-9-Aktivität zwischen 1 h und 24 h Inkubation. In den HL-60 Leukämie-Zellen dagegen bewirkten diese Derivate die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 nach einer 8-stündigen Inkubation.<sup>[151]</sup>

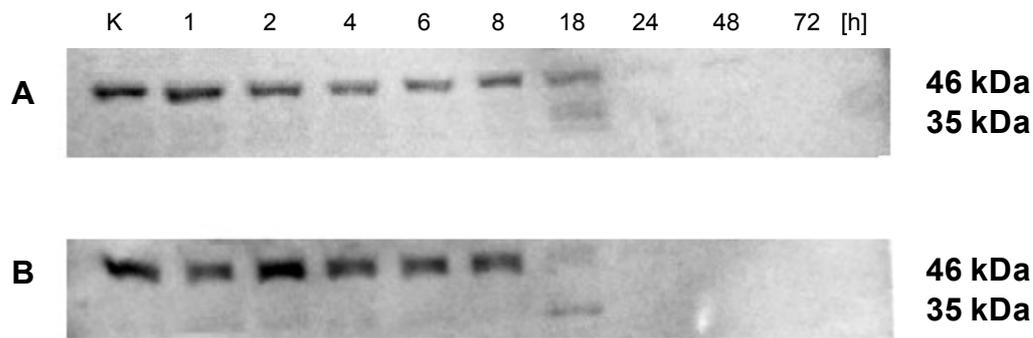


**Abbildung 4-5:** Caspase-3-, -8- und -9-Aktivität in den 518A2-Zellen (links) sowie HL-60-Zellen (rechts) nach einer Inkubation mit Doxorubicin (13) und seinen Derivaten 26, 29, 32 und 35: Verwendung der luminometrischen Assays Caspase-Glo 3/7, 8 und 9; Darstellung der Aktivitäten der Caspasen-3/7 (■), -8 (◆) und -9 (▲) als relative Lumineszenzintensitäten. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Die einzige Ausnahme unter den Doxorubicinderivaten bildete das 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-ethansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**32**): Die Inkubation mit diesem Derivat führte in den HL-60-Zellen bereits nach 4 h zu einer Aktivierung der Caspase-8; das Aktivitätsmaximum der Effektor-Caspase-3 dagegen wurde erst deutlich später, nämlich nach 18 h erreicht. Auch in den 518A2-Zellen bewirkte **32** eine frühe Aktivierung der Caspase-8 (6 h bis 8 h), wahrscheinlich mit der Folge der Rekrutierung der übrigen Caspasen (vgl. 4.2.3.2 Western Blot-Analyse).<sup>[151]</sup>

#### 4.2.3.2 Western Blot-Analyse

Da das 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-ethansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**32**) an den 518A2-Zellen als einziges Derivat zu einer initialen Aktivierung der Caspase-8 führte, sollte unter Verwendung eines Caspase-8-Inhibitors überprüft werden, ob diese unmittelbar eine Rekrutierung der Caspase-9 bewirkte. In ersten MTT-Test mit und ohne Verwendung des Caspase-8-Inhibitors konnte gezeigt werden, dass die Caspase-8 für die Apoptose-Initiation nach der Behandlung mit **32** von entscheidender Bedeutung ist; die Wirkung von **32** nahm im MTT-Test bei Caspase-8-Inhibierung um mehr als das Doppelte ab. Dennoch war noch Aktivität vorhanden ( $IC_{50}$  (518A2 + Casp-8-Inhibitor):  $340 \pm 90$  nM), was für einen weiteren Apoptose-auslösenden Pfad über die Caspase-9 unabhängig von der Caspase-8 spricht. Für die übrigen Derivate konnte kein Effekt festgestellt werden. Es wurden für Derivat **32** weiterhin Western Blot-Analysen der Caspase-9 mit und ohne Verwendung des Caspase-8-Inhibitors durchgeführt; jedoch konnte keine Veränderung im Aktivierungsmuster gezeigt werden (vgl. Abbildung 4-6). Sowohl mit als auch ohne gleichzeitige Inhibierung der Caspase-8 lag das Maximum der Caspase-9-Aktivierung im Western Blot bei 18 h. Das bestätigt die Ergebnisse aus dem Caspase-Glo 8 Assay: Auch hier lag das Maximum der Caspase-9-Aktivität bei 18 h Inkubation der 518A2-Zellen mit **32**. Nach längeren Inkubationszeiten schien die aktive Caspase-9 wie auch die inaktive Pro-Caspase-9 nicht mehr zugänglich zu sein, was durch einen Abbau von zellulären Strukturen nach längerer Einwirkung von **32** zu erklären ist.



**Abbildung 4-6:** Western Blot-Analyse an 518A2 Melanom-Zellen nach bis zu 72-stündiger Inkubation mit **32** (5  $\mu$ M): A) Zeit-abhängige Aktivierung der Caspase-9 ohne und B) mit gleichzeitiger Inhibierung der Caspase-8; 12%-ige ClearPAGE-Gele (10  $\times$  10 cm), Protein-Standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10  $\mu$ l), Laufpuffer: 1 $\times$  SDS reducing buffer, 12 V / cm, 120 min, Ladekontrolle erfolgte durch  $\beta$ -Actin.

### 4.2.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid

Um den Mechanismus der Apoptose weiter einzugrenzen, wurden außerdem Western Blot- und *real time*-PCR-Analysen für die Apoptose-Regulationsproteine Bcl-2, Bax und Bid durchgeführt (vgl. 3.4.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid).

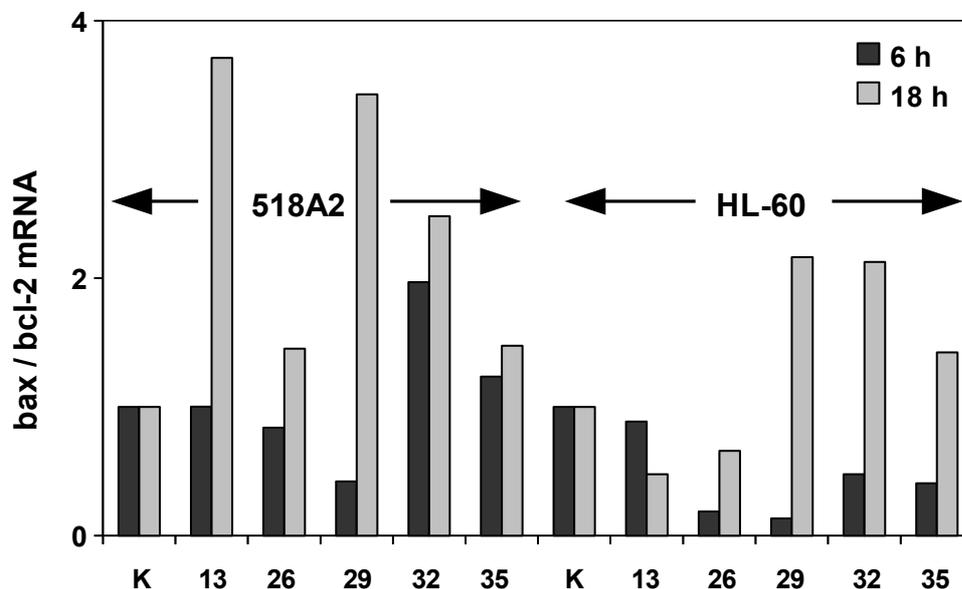
#### 4.2.4.1 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analysen für Bid, dem *BH3-only*-Mitglied der Bcl-2-Familie, das nach Aktivierung durch die Caspase-8 zur Freisetzung von Cytochrom c führen kann, zeigten für Derivat **32** mit und ohne Inhibierung der Caspase-8 keinerlei Aktivierung von Bid zu tBid, weshalb auf eine ausführliche Darstellung in dieser Arbeit verzichtet wurde (vgl. 3.4.4 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid).<sup>[107]</sup> Dies bestätigt jedoch noch einmal die Unabhängigkeit des intrinsischen, mitochondrialen Pfads (via Caspase-9) vom extrinsischen Weg (via Caspase-8) bei der Apoptose-Initiation durch das Doxorubicinderivat **32**.

Für Bax bzw. Bcl-2 wurden ebenfalls Western Blot-Analysen durchgeführt; die Antikörperbindung war in beiden Fällen jedoch zu unspezifisch, weshalb auf die Untersuchung mittels quantitativer *real time*-PCR zurückgegriffen wurde.

4.2.4.2 Quantitative *real time*-PCR

Aus den durch die *real time*-PCR-Analysen ermittelten bax- bzw. bcl-2-mRNA-Expressionen wurden für Doxorubicin (**13**) und seine Derivate **26**, **29**, **32** und **35** die Apoptose-relevanten Verhältnisse der bax- zu bcl-2-mRNA in den Zelllinien 518A2 und HL-60 berechnet (vgl. Abbildung 4-7). Bei einem pro-apoptotischem Verhältnis (Bax >> Bcl-2) bildet sich ein Mega-Kanal aus Bax-Oligomeren, der einen Einstrom verschiedenster Ionen und eine Abnahme im Transmembranpotential ermöglicht. Die hierfür verwendeten Daten sind im Anhang in den Tabelle A-18 und A-19 zu finden.



**Abbildung 4-7:** bax / bcl-2 mRNA-Expression in 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach 0 h (K = Kontrolle), 6 h bzw. 18 h Inkubation (5  $\mu$ M) mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26**, **29**, **32** und **35**. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

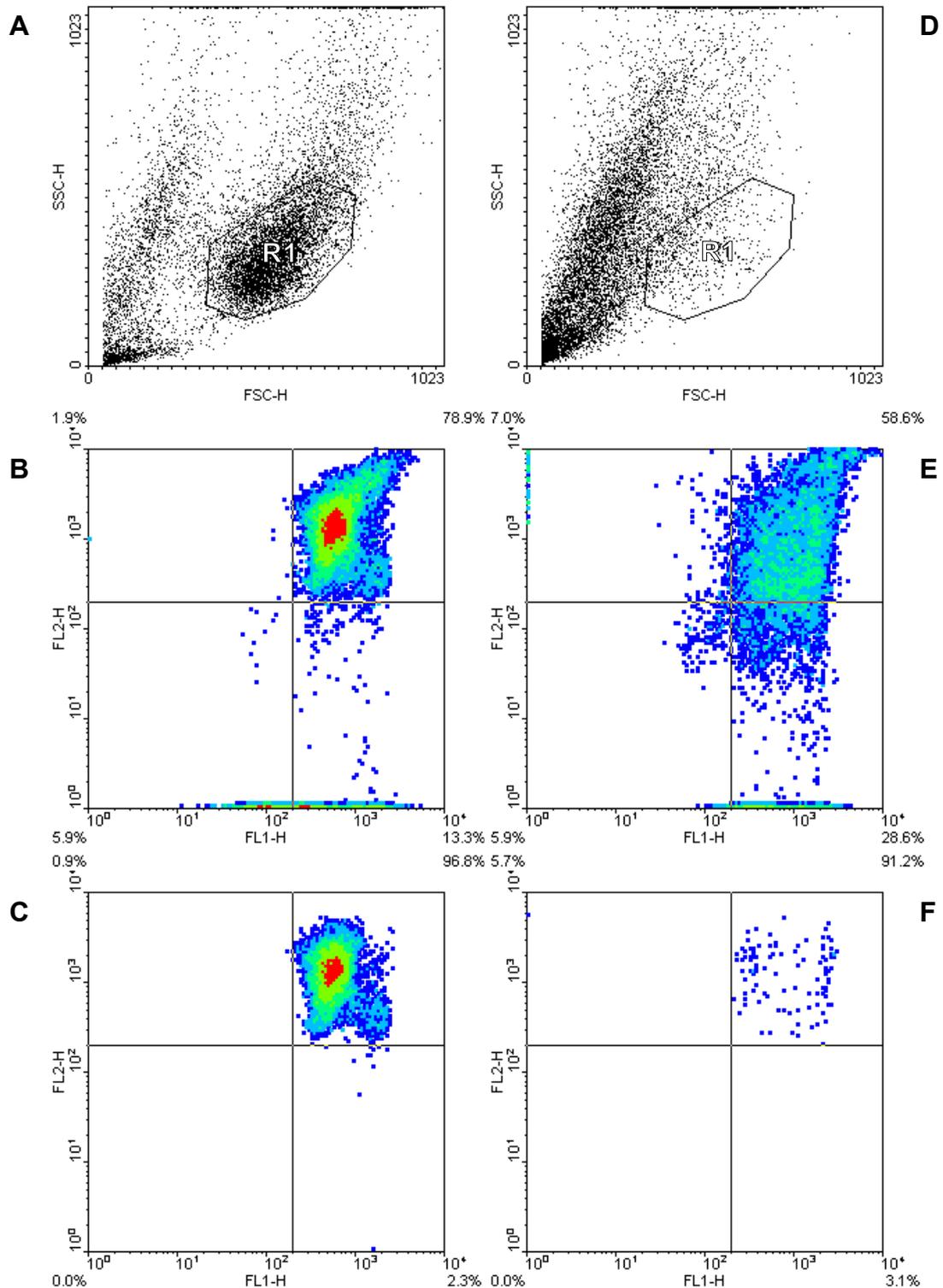
In den 518A2 Zellen führten alle getesteten Doxorubicinderivate nach längeren Inkubationszeiten (18 h) durch die vermehrte bax-mRNA-Expression zu einem pro-apoptotischen Verhältnis der bax- zu bcl-2-mRNA. Für die (-)-Mentholderivate **32** und **35** wurde dies ebenfalls nach kürzeren Inkubationszeiten von nur 6 h erhalten; Derivat **32** zeigte nach dieser Zeit einen enormen Abfall in der bcl-2-mRNA-Expression, der höchstwahrscheinlich mit der Aktivierung der Caspase-8 einher ging (vgl. Tabelle A-18 bzw. A-19, 4.2.3.1 Caspase-Aktivitätsbestimmung).

Im Fall der HL-60-Zellen war ein pro-apoptotisches Verhältnis der bax- zu bcl-2-mRNA nach einer 18-stündigen Inkubation nur für **29**, **32** und **35** zu verzeichnen. Doxorubicin (**13**) und sein Derivat **26** zeigten dagegen ein Level unter Kontroll-Niveau. Andere Arbeitsgruppen hatten bereits einen frühen Anstieg der bax- zu bcl-2-mRNA-Expression in HL-60-Zellen nach 2-6 h Inkubation mit Doxorubicin (**13**) beschrieben, nach 6 h Inkubation schien dieses Verhältnis wieder zu sinken.<sup>[152]</sup> Die Inkubationszeiten waren für die Derivate **13** und **26** zwar nicht optimal gewählt, dennoch wurde die Verbindung der Apoptose-Initiation durch die vermehrte Expression von bax und die Aktivierung der Caspasen-3, -8 und -9 deutlich.

#### 4.2.5 Mitochondrienmembranpotential

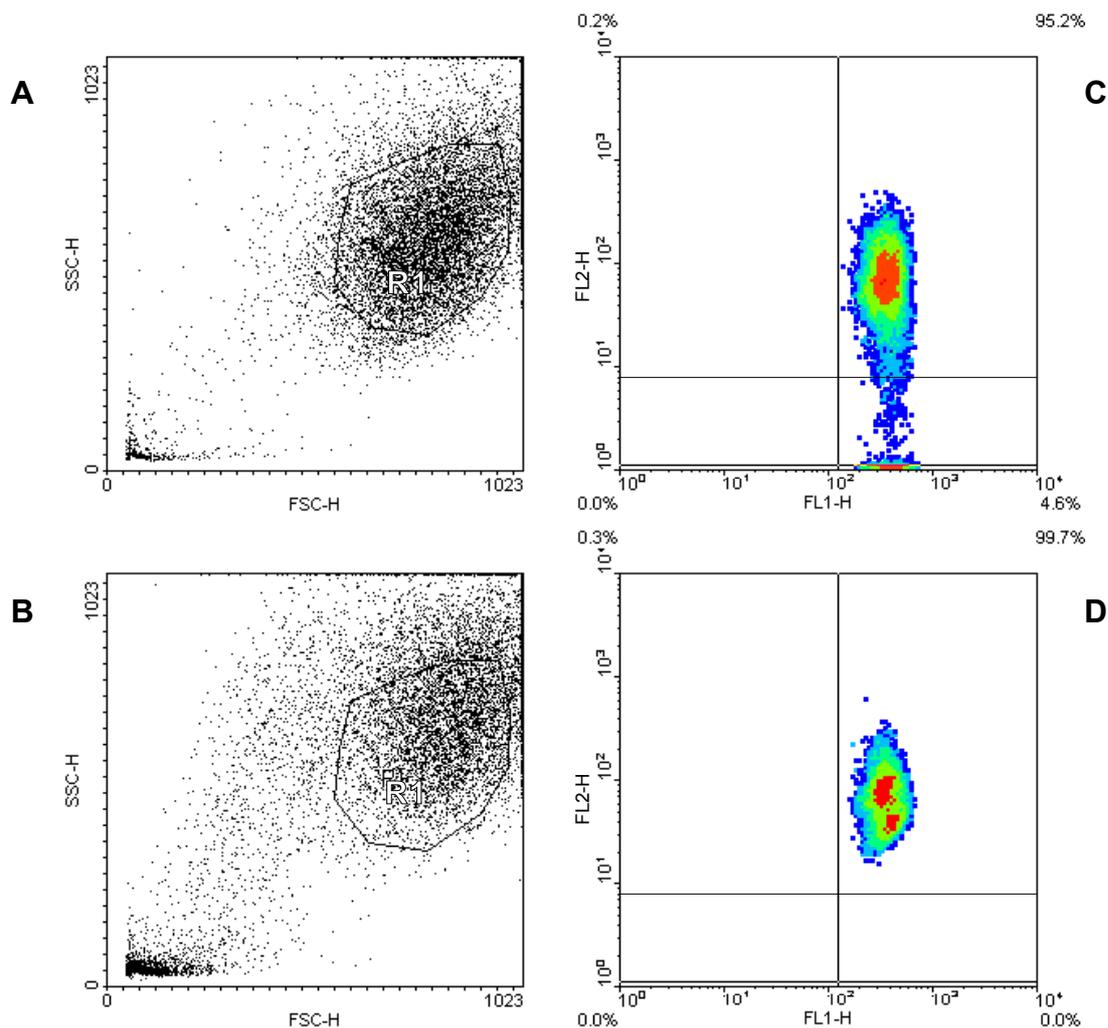
Das Zusammenbrechen des elektrochemischen Gradienten der Mitochondrien  $\Delta\Psi$  stellt ein zentrales Ereignis während der Apoptose dar, das mithilfe des kationischen Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 **84** nachgewiesen werden kann. Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff liegt einerseits im Zytoplasma in Form von grün fluoreszierenden Monomeren vor, andererseits bilden sich in der Mitochondrienmatrix rot fluoreszierende Aggregate. In apoptotischen Zellen wird aufgrund des kollabierten elektrochemischen Gradienten  $\Delta\Psi$  vermehrt grüne Fluoreszenz gemessen (vgl. 3.4.5 Mitochondrienmembranpotential). Diese Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential nach der Inkubation der 518A2 Melanom- bzw. HL-60 Leukämie-Zellen mit Doxorubicin (**13**) bzw. **26-38** wurden zunächst mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) untersucht. Das Prinzip dieser Messmethode beruht auf der Lichtemission von Zellen nach der Anregung mit einem Laserstrahl. Dabei erfolgt die Trennung der Zellen (insgesamt 10000) mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC) nach Körnung bzw. Größe und gleichzeitig die Messung der grünen (FL1-H) bzw. roten Fluoreszenz (FL2-H) des von den Zellen aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffs.

Die Daten wurden mit dem Programm *WinMDI* (Version 2.9) ausgewertet, wobei zunächst diejenigen Zellen im *DotPlot* (FSC-H / SSC-H, Lin) mit einem Polygon R1 markiert wurden, die laut Körnung zu den vitalen zählen (vgl. Abbildung 4-8, A).<sup>[153]</sup>



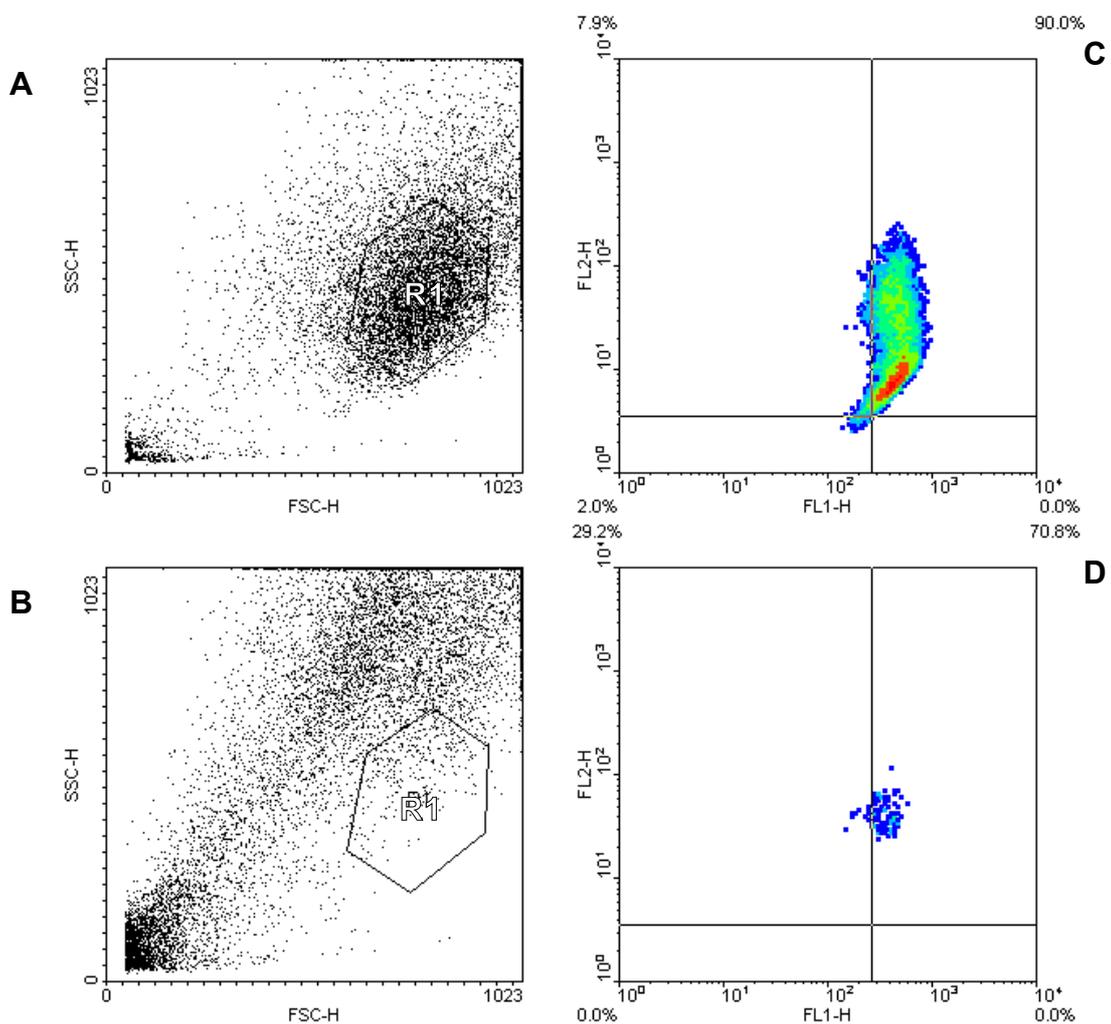
**Abbildung 4-8:** Durchflusszytometrische Analyse JC-1-gefärbter, unbehandelter HL-60-Zellen (A-C) bzw. JC-1-gefärbter HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (**13**, 5  $\mu$ M, D-F): A, D) *DotPlot* aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon R1 markiert die vitalen Zellen; B, E) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller 10000 Zellen; C, F) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons R1.

Anschließend wurden die so markierten Zellen in einem *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H, Log) dargestellt. Dieser wurde in 4 Quadranten eingeteilt, wobei im Fall der Kontrolle mehr als 95% aller Zellen im oberen rechten Quadrant (Quad OR) liegen sollten (vgl. Abbildung 4-8, C). Das Polygon R1 wurde für die behandelten Zellen übernommen (vgl. Abbildung 4-8, D), so dass sich im *DensityPlot* eine Verringerung der Zellzahl in Quadrant OR ergab (vgl. Abbildung 4-8, F). Die Diskriminierung der Zellen unter Verwendung eines Polygons ist dabei nicht zwingend, man erhält jedoch deutlichere Ergebnisse (vgl. Abbildung 4-8, B, C, E und F).<sup>[153]</sup>



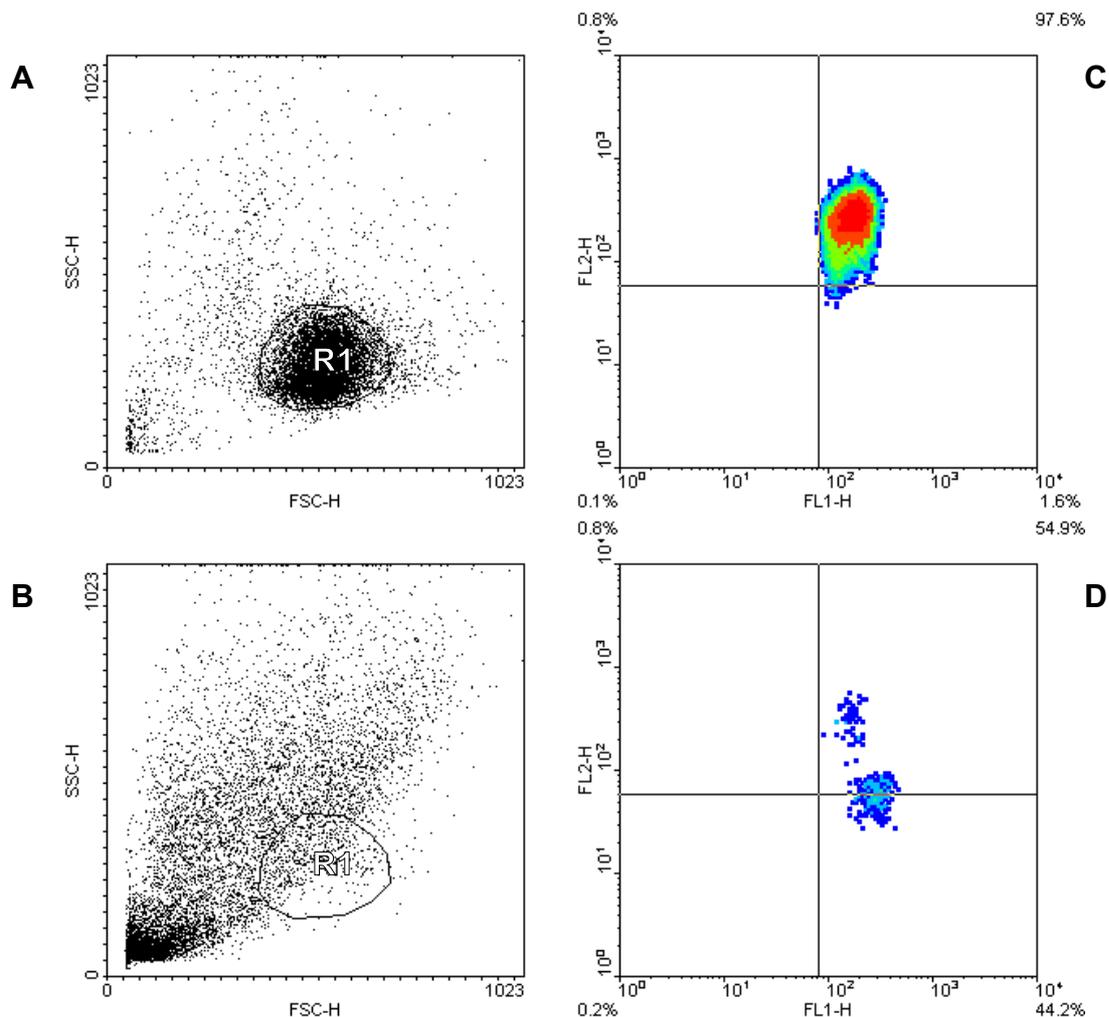
**Abbildung 4-9:** Durchflusszytometrische Analyse von JC-1-gefärbten 518A2-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit DMSO (A, C) bzw. Doxorubicin (**13**, 5  $\mu$ M, B, D): A, B) *DotPlot* aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon R1 markiert die vitalen Zellen; C, D) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller 10000 Zellen; C, F) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons R1. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Nach dieser Methode wurde für die 518A2- bzw. HL-60-Zellen nach der Inkubation mit Doxorubicin (13) und seinen Derivaten 26, 29, 32 und 35 vorgegangen. Ausgewählte Analysen hierzu sind in den Abbildungen 4-9 bis 4-11 dargestellt, alle übrigen Graphen befinden sich im Anhang. Ein Vergleich der Abbildungen 4-9 und 4-10 zeigt sehr deutlich die Abnahme der intakten Mitochondrien nach der Behandlung mit Doxorubicin (13). Während eine Inkubation von 6 h kaum eine Veränderung der Mitochondrien bewirkte, zeigte sich nach 18 h bereits eine deutliche Reduzierung der Zellen mit intakten Mitochondrien (vgl. Abbildung 4-10, D, OR).<sup>[153]</sup>



**Abbildung 4-10:** Durchflusszytometrische Analyse von JC-1-gefärbten 518A2-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit DMSO (A, C) bzw. Doxorubicin (13, 5  $\mu$ M, B, D): A, B) *DotPlot* aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon R1 markiert die vitalen Zellen; C, D) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller 10000 Zellen; C, F) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons R1. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Für die HL-60-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild: Nach einer längeren Inkubation (18 h) mit Doxorubicin (13) wurden vermehrt Zellen mit defekten Mitochondrien erhalten (vgl. Abbildung 4-11).<sup>[153]</sup>



**Abbildung 4-11:** Durchflusszytometrische Analyse von JC-1-gefärbten HL-60-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit DMSO (A, C) Doxorubicin (13, 5 µM, B, D): A, B) DotPlot aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon R1 markiert die vitalen Zellen; C, D) DensityPlot (FL1-H / FL2-H) aller 10000 Zellen; C, D) DensityPlot (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons R1. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Um unabhängig von der Zellzahl zu sein, wurde die Messung des Mitochondrienmembranpotentials vom FACS auf den Fluoreszenz-Plattenreader übertragen. Hierbei wird das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz bestimmt, was für apoptotische Zellen im Vergleich zur Kontrolle abnehmen sollte.

Die HL-60 Leukämie-Zellen, die 18 h mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **32** und **35** inkubiert wurden, zeigten eine deutliche Abnahme der intakten Mitochondrien um bis zu 77%. Die Behandlung mit den übrigen Derivaten ergab dagegen nur einen Verlust von etwa 30-40% (vgl. Tabelle 4-5). Im Fall der 518A2 Melanom-Zellen konnte nur eine geringe Abnahme der intakten Mitochondrien festgestellt werden, die Testsubstanzen **13** und **26-38** schienen hier nach 18 h genauso aktiv zu sein wie nach 6 h an den HL-60-Zellen. Die einzige Ausnahme bildete Derivat **32**, dass nach 18-stündiger Behandlung der 518A2-Zellen zu einem fast 40%-igen Verlust der Mitochondrien führte. Durch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 ist der mitochondriale Weg der Apoptose gehemmt; Derivat **32** ist jedoch in der Lage, die bcl-2-mRNA-Expression in den 518A2-Zellen zu verringern und somit diese „Apoptose-Barriere“ zu umgehen (vgl. 4.2.4.2 Quantitative *real time*-PCR).<sup>[33-34,151]</sup>

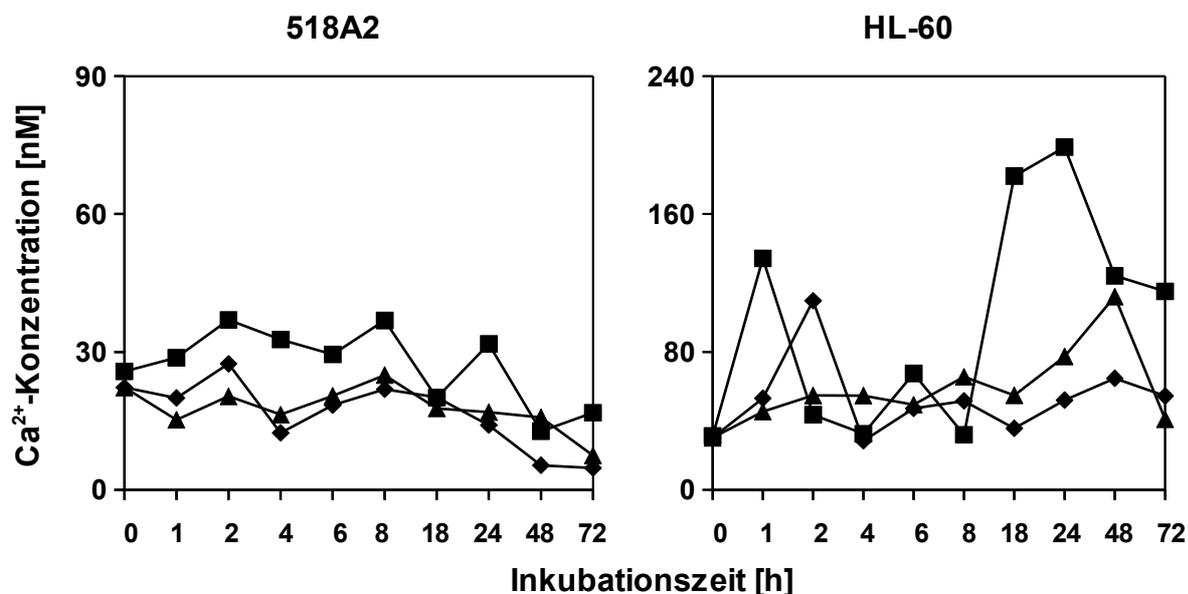
**Tabelle 4-5:** Prozentualer Anteil intakter Mitochondrien [%]<sup>a</sup> in 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach der Inkubation mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26-38**.

Testsubstanz	Intakte Mitochondrien [%] <sup>a</sup>			
	518A2		HL-60	
	6 h	18 h	6 h	18 h
<b>13</b>	98,4 ± 10,2	73,9 ± 19,3	82,9 ± 7,5	<b>28,4 ± 4,0</b>
<b>26</b>	113,0 ± 11,3	79,9 ± 16,0	93,6 ± 8,3	59,2 ± 4,3
<b>27</b>	95,7 ± 3,5	98,8 ± 4,3	102,6 ± 0,6	103,7 ± 4,1
<b>28</b>	80,4 ± 11,0	97,4 ± 1,6	87,9 ± 10,6	86,8 ± 2,7
<b>29</b>	119,7 ± 7,1	95,8 ± 33,8	102,9 ± 11,1	71,2 ± 10,9
<b>30</b>	81,1 ± 1,8	79,1 ± 5,5	97,4 ± 1,0	92,8 ± 3,5
<b>31</b>	88,2 ± 3,9	91,8 ± 1,1	93,0 ± 2,8	92,8 ± 0,1
<b>32</b>	92,7 ± 12,9	<b>60,8 ± 17,5</b>	75,5 ± 6,4	<b>35,8 ± 3,9</b>
<b>33</b>	81,7 ± 3,3	79,0 ± 11,4	92,6 ± 8,1	66,3 ± 6,1
<b>34</b>	82,8 ± 2,4	71,7 ± 10,6	84,3 ± 12,7	67,6 ± 4,2
<b>35</b>	108,3 ± 2,4	71,0 ± 16,7	90,1 ± 4,6	<b>22,6 ± 4,5</b>
<b>36</b>	65,7 ± 6,7	72,6 ± 4,0	77,5 ± 3,7	64,6 ± 6,9
<b>37</b>	81,1 ± 3,1	92,0 ± 8,1	87,3 ± 0,7	86,4 ± 1,9
<b>38</b>	80,5 ± 9,9	93,8 ± 2,6	83,0 ± 0,8	83,6 ± 6,9

<sup>a</sup> Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz des Farbstoffs JC-1 (*Mitochondrial Membrane Detection Kit*, Stratagene) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (100%) nach einer 6- und 18-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5 µM). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

## 4.2.6 Calciumkonzentrationsbestimmung

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielt als sogenannter *second messenger* nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion in Nerven und Muskeln, sondern auch bei der alternativen Apoptose-Initiation via ER-Stress (vgl. 3.4.6 Calciumkonzentrationsbestimmung). Die Bestimmung der Calciumkonzentration in mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26-38** behandelten Zellen erfolgte mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 **85** und ließ im Vergleich zu ruhenden, unbehandelten Zellen Rückschlüsse auf Störungen im Calcium-Haushalt zu. So wurde zunächst die Fluoreszenz des Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$  bzw.  $380 \text{ nm}$ ) gemessen und anschließend die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Berücksichtigung der Dissoziationskonstante ( $K_D = 224 \text{ nM}$ ) sowie der maximal und minimal möglichen Fluoreszenzsignale ( $F_{\text{max}}$  und  $F_{\text{min}}$ ) anhand der Grynkiewicz-Gleichung {2} berechnet. Für die 518A2-Zellen wurden zytosolische Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Bereich von 20-30 nM ermittelt, was gut mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt; die Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen der HL-60-Zellen lag bei etwa 30-40 nM.<sup>[154]</sup> Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsverlauf für die Derivate **13**, **32** und **35** ist in Abbildung 4-12 dargestellt, die übrigen Ergebnisse sind im Anhang zu finden.



**Abbildung 4-12:** Verlauf der Calciumkonzentration in den 518A2-Zellen (links) sowie HL-60-Zellen (rechts) nach einer Inkubation mit Doxorubicin (**13**, ■) und seinen Derivaten **32** (♦) und **35** (▲). Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen, die Standardabweichungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Wie erwartet bewirkte die Behandlung der 518A2 Melanom-Zellen mit **13**, **32** oder **35** keine Störung im Calcium-Haushalt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration blieb während der gesamten Inkubation annähernd gleich bzw. verringerte sich nach längerer Behandlung geringfügig, was aufgrund des Verlustes des Mitochondrienpotentials und der Membranintegrität während der fortschreitenden Apoptose normal ist. Im Fall der HL-60 Leukämie-Zellen konnten jedoch deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ermittelt werden: Doxorubicin (**13**) führte zu einem ersten Signal nach bereits 1 h Inkubation, danach stellte sich wieder die Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein. Nach längeren Inkubationszeiten (> 18 h) folgte ein weiteres  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Für die (–)-Mentholderivate **32** und **35** wurden andere Kinetiken erhalten, die sich teilweise mit der von **13** überschneiden.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass alle aktiven Doxorubicinderivate (vgl. 4.1 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test) in der Lage sind, Apoptose sowohl in den HL-60-Zellen als auch in den 518A2-Zellen auszulösen. Der Nachweis erfolgte dabei mittels DNA-Fragmentierung, der Aktivierung relevanter Caspasen und Regulationsproteine und über die Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential sowie im Calcium-Haushalt, wobei die einzelnen Tests miteinander sehr gut korrelierten. Zudem bestätigte sich in jedem Test die Bcl-2-bedingte Blockade der Apoptose-Initiation in den 518A2-Zellen.<sup>[33-34]</sup> Es folgten weitere Untersuchungen, um den genauen Wirkmechanismus der Doxorubicinderivate weiter einzugrenzen.

#### 4.2.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen

Chinone wie Doxorubicin (**13**) und Thymochinon (**17**) sind an der Generierung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) beteiligt, die als sogenannte *redox messenger* in intrazellulären Signal- und Regulationswegen wirken und die Auslösung der Apoptose stimulieren können (vgl. 1.3 Wirkungsweise bioaktiver Chinone: Sauerstoffradikalproduktion). Daher wurde die ROS-Produktion der Doxorubicinderivate mithilfe des NBT-Tests bestimmt und deren Beteiligung an der Apoptose-Initiation und der Rekrutierung redox-sensitiver Kinasen untersucht (vgl. 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen).<sup>[120]</sup>

4.2.7.1 NBT-Test

Die Doxorubicinderivate **26**, **29**, **32** und **35**, die neben Doxorubicin (**13**) selbst die größten Wachstums-inhibierende Effekte an den 518A2 Melanom-Zellen aufwiesen, bewirkten in eben diesen Zellen unter klinisch relevanten Konzentrationen (5 µM) einen enormen Anstieg der ROS-Produktion nach Langzeit-Inkubationen von 72 h (vgl. Tabelle 4-6). Am deutlichsten war dies für das einfache Fettsäurederivat **26** der Fall; hierbei war die ROS-Produktion fast 5× stärker als für **13**. In Bezug auf die HL-60 Leukämie-Zellen ergaben sich geringere ROS-Level; auch diese Ergebnisse korrelierten mit den MTT-Tests. Bei der Verwendung von supra-klinischen Konzentrationen (50 µM) ergeben sich allerdings Werte, die nicht mehr im Verhältnis zu anderen Versuchen stehen.<sup>[151]</sup>

**Tabelle 4-6:** Prozentuale ROS-Produktion [%]<sup>a</sup> in 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach der Inkubation mit den Doxorubicinderivaten **13** sowie **26-38**.

Testsubstanz	ROS-Produktion [%] <sup>a</sup>			
	518A2		HL-60	
	24 h	72 h	24 h	72 h
<b>13</b>	2,5 ± 0,3	<b>15,4 ± 1,9</b>	2,8 ± 0,8	5,6 ± 0,8
<b>26</b>	6,6 ± 1,0	<b>71,2 ± 19,7</b>	2,8 ± 0,5	3,4 ± 0,3
<b>27</b>	2,8 ± 0,4	4,4 ± 1,7	0,6 ± 0,3	4,0 ± 0,2
<b>28</b>	1,6 ± 0,5	2,3 ± 0,5	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
<b>29</b>	2,9 ± 1,6	<b>45,1 ± 7,7</b>	1,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3
<b>30</b>	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1
<b>31</b>	1,3 ± 0,8	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<b>32</b>	3,0 ± 1,4	<b>16,2 ± 0,5</b>	3,8 ± 1,5	<b>11,2 ± 2,1</b>
<b>33</b>	2,2 ± 0,9	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,3	5,7 ± 0,8
<b>34</b>	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,5	6,8 ± 1,3
<b>35</b>	3,3 ± 0,9	<b>38,3 ± 12,4</b>	3,8 ± 1,1	5,9 ± 0,9
<b>36</b>	2,7 ± 1,3	3,8 ± 0,7	1,8 ± 0,6	7,9 ± 1,1
<b>37</b>	1,7 ± 0,5	3,0 ± 0,8	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,3
<b>38</b>	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,4	0,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2

<sup>a</sup> Prozentuale ROS-Produktion (NBT-Reduktion) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (1%) nach einer 24- und 72-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5 µM). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Ergänzend zum NBT-Test wurden zykelvoltametrische Messungen durchgeführt (Dr. Sandra Breyer), um den Einfluss des Substitutionsmusters auf die Redoxeigenschaften des Doxorubicin-Grundkörpers zu untersuchen. Die Derivate **26**, **29**, **32** und **35** führten dabei im Vergleich zu Doxorubicin (**13**) selbst zu einer reversibleren ROS-Produktion unter vollständiger Regenerierung des 5,12-Chinon-Kerns, was die deutlichen Unterschiede im NBT-Test erklärt.<sup>[58,151]</sup>

##### 4.2.7.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein

Um sicher zu stellen, dass die Sauerstoffradikalproduktion keine Folgeerscheinung der Apoptose darstellte, wurden MTT-Tests in Gegenwart des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein angefertigt. Es zeigte sich ein Rückgang der Wachstumsinhibierenden Wirkung der Doxorubicinderivate (5  $\mu$ M, 72 h) um 20-30% an den 518A2 Melanom- bzw. um etwa 10% an den HL-60 Leukämie-Zellen (vgl. Tabelle A-30 im Anhang).<sup>[155]</sup>

##### 4.2.8 Involvierung redox-sensitiver Kinasen

Zudem ist die Generierung von ROS eng verknüpft mit der Aktivierung von redox-sensitiven MAP-Kinasen wie etwa p38-MAPK, JNK und ERK. Diese Kinasen stellen eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress dar, sind aber auch – bei übermäßiger Belastung durch ROS – an der Initiation der Apoptose beteiligt. Eine weitere redox-sensitive Kinase stellt die Proteinkinase C dar, die durch eine Verminderung im GSH-Spiegel aktiviert wird und ebenfalls zur Apoptose-Auslösung führen kann. Um nun eine Beteiligung dieser Kinasen an der Wirksamkeit der Testsubstanzen zu untersuchen, wurden MTT-Tests mithilfe geeigneter Inhibitoren durchgeführt. Die IC<sub>50</sub>-Werte dazu sind im Anhang aufgelistet (vgl. Tabelle A-31 bis A-33), die resultierenden Quotienten R (+/-) sind in den folgenden drei Tabellen 4-7 bis 4-9 für die 518A2 Melanom-, HL-60 Leukämie- und HT-29 Kolonkarzinom-Zellen zusammengefasst. Ist der Quotient R (+/-) dabei > 1, so ist die entsprechende Kinase höchstwahrscheinlich an der Initiation der Apoptose beteiligt; ist der Wert allerdings < 1, dann übernimmt die Kinase eher eine Art Schutzfunktion.<sup>[120,123,156-157]</sup>

#### 4 Ergebnisse und Diskussion: Doxorubicin (13) und seine Derivate

In Bezug auf die 518A2 Melanom-Zellen schien die Apoptose-Initiation durch die (–)-Mentholderivate **32** und **35** über die redox-sensitiven Kinasen zu verlaufen; es konnten deutliche Effekte sowohl nach der Inhibierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38-MAPK als auch nach der Proteinkinase C-Inhibierung beobachtet werden (vgl. Tabelle 4-7). Doxorubicin (**13**) selbst zeigte an dieser Zelllinie wie die übrigen Derivate **26** und **29** nur eine geringe Abhängigkeit von der Proteinkinase C (PKC).

**Tabelle 4-7:** Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirksamkeit ausgewählter Doxorubicinderivate in 518A2 Melanom-Zellen.

Testsubstanz	R (+/–) <sup>a</sup>			
	<sup>+518A2</sup> 518A2	<sup>**518A2</sup> 518A2	<sup>+++518A2</sup> 518A2	<sup>****518A2</sup> 518A2
<b>13</b>	0,7	1,7	0,8	<b>2,5</b>
<b>26</b>	2,1	4,1	1,7	<b>5,6</b>
<b>29</b>	1,8	5,1	4,5	<b>4,6</b>
<b>32</b>	<b>14,4</b>	<b>56,6</b>	<b>12,9</b>	<b>10,4</b>
<b>35</b>	<b>13,0</b>	<b>14,7</b>	<b>9,2</b>	<b>19,5</b>

<sup>a</sup> Der Faktor R (+/–) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte mit und ohne Inhibitorzugabe.

<sup>+</sup> 50 µM PD 98059 wurde zur Inhibierung der ERK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

<sup>\*\*</sup> 20 µM SP 600125 wurde zur Inhibierung der JNK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

<sup>+++</sup> 10 µM SB 202190 wurde zur Inhibierung der p38-MAPK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

<sup>\*\*\*\*</sup> 50 nM PKC 412 wurde zur Inhibierung der PKC 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

**Tabelle 4-8:** Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirksamkeit ausgewählter Doxorubicinderivate in HL-60 Leukämie-Zellen.

Testsubstanz	R (+/–) <sup>a</sup>			
	<sup>+HL-60</sup> HL-60	<sup>**HL-60</sup> HL-60	<sup>+++HL-60</sup> HL-60	<sup>****HL-60</sup> HL-60
<b>13</b>	0,1	1,1	0,8	<b>21,5</b>
<b>26</b>	0,1	0,2	0,5	<b>2,4</b>
<b>29</b>	0,1	0,05	1,5	<b>5,0</b>
<b>32</b>	1,3	<b>5,6</b>	0,3	<b>14,2</b>
<b>35</b>	<b>3,0</b>	0,3	1,5	<b>28,0</b>

<sup>a</sup> Siehe Tabelle 4-7.

Für die HL-60-Zellen konnte eine starke Abhängigkeit der Wachstums-inhibierenden Wirkung aller Doxorubicinderivate von der PKC ausgemacht werden (vgl. Tabelle 4-

8), was durch die Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt wurde.<sup>[156]</sup> Zudem schien ERK ausnehmend für die Derivate **32** und **35** eine Schutzfunktion zu übernehmen. Weiterhin wurde die Involvierung redox-sensitiver Kinasen in den HT-29 Kolonkarzinom-Zellen untersucht. Es konnte jedoch keine Beteiligung an der Wirkung der Testsubstanzen festgestellt werden (vgl. Tabelle 4-9). Auffällig waren jedoch die niedrigen Quotienten R (+/-) für Doxorubicin (**13**) und sein einfaches Fettsäurederivat **26**, was auf eine Schutzfunktion der Kinasen schließen ließ.

**Tabelle 4-9:** Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirksamkeit ausgewählter Doxorubicinderivate in HT-29 Kolonkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>			
	<sup>+</sup> HT-29 HT-29	<sup>++</sup> HT-29 HT-29	<sup>+++</sup> HT-29 HT-29	<sup>++++</sup> HT-29 HT-29
<b>13</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	0,8
<b>26</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,1</b>
<b>29</b>	1,2	4,3	1,8	1,0
<b>32</b>	1,2	0,6	1,1	0,5
<b>35</b>	0,2	1,2	1,2	1,0

<sup>a</sup> Siehe Tabelle 4-7.

#### 4.2.9 Nachweis von Ceramid-Bildung

Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) sind außerdem an der Aktivierung der Sphingomyelinase bzw. Ceramid-Synthase und einem damit verbundenen Anstieg der Ceramid-Produktion beteiligt (vgl. 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen). Als sogenannte *second messenger* vermitteln Ceramide eine Vielzahl von Signalen, darunter auch die Einleitung von Apoptose (vgl. 3.4.8 Nachweis von Ceramid-Bildung). Die mit einem entsprechenden Antikörper ermittelten Ceramid-Produktionen der 518A2- bzw. HL-60-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den Testsubstanzen (5 µM) sind in Tabelle 4-10 aufgeführt (AG Prof. Dr. med. F. Lang, Dr. med. Dr. rer. nat. M. Föller, Institut für Physiologie, Universität Tübingen).<sup>[124-125]</sup> Für die 518A2 Melanom-Zellen ergab sich keine Ceramid-Produktion nach der Inkubation mit den Doxorubicinderivaten; in den HL-60 Leukämie-Zellen jedoch bewirkten die Derivate eine verstärkte Produktion an Ceramiden (vgl. Tabelle 4-10).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion: Doxorubicin (13) und seine Derivate

**Tabelle 4-10:** Ceramid-Produktion [%]<sup>a</sup> der 518A2- bzw. HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit ausgewählten Doxorubicinderivaten.

Testsubstanz	Ceramid-Produktion (24 h) [%] <sup>a</sup>	
	518A2	HL-60
<b>13</b>	3,6	4,0
<b>26</b>	3,9	<b>16,3</b>
<b>29</b>	4,3	<b>9,0</b>
<b>32</b>	2,7	<b>10,5</b>
<b>35</b>	5,9	<b>8,1</b>

<sup>a</sup> Nachweis mittels Ceramid-Antikörper, neg. Kontrolle 1% (unbehandelte 518A2- bzw. HL-60-Zellen), pos. Kontrolle 6.8% (Erythrozyten + 50 µg/ml Methyldopa), durch Prof. Dr. med. F. Lang und Dr. med. Dr. rer. nat. M. Föllner, Institut für Physiologie, Universität Tübingen, gemessen.

Um nun zu überprüfen, ob die Bildung der Ceramide einen direkten Einfluss auf die Wirkung der Testsubstanzen hat, wurden MTT-Tests unter Verwendung geeigneter Inhibitoren angefertigt. Hierbei wurde zum einen die *de novo*-Synthese durch die Ceramidsynthase, zum anderen die Sphingomyelin-Hydrolyse durch die Sphingomyelinase gehemmt und die Auswirkungen mittels MTT-Test analysiert (vgl. 3.4.8 Nachweis von Ceramid-Bildung). Die Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte und die sich daraus ergebenden Faktoren R (+/-) sind in den Tabellen 4-11 und 4-12 aufgeführt.

**Tabelle 4-11:** Beteiligung der Ceramide an der Wirksamkeit ausgewählter Doxorubicinderivate in 518A2 Melanom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>			R (+/-) <sup>b</sup>	
	518A2	+518A2	**518A2	$\frac{+518A2}{518A2}$	$\frac{**518A2}{518A2}$
<b>13</b>	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,25 ± 0,21	0,8	2,1
<b>26</b>	0,11 ± 0,05	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,7	1,0
<b>29</b>	0,14 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,08	0,8	0,9
<b>32</b>	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,16	0,07 ± 0,01	1,9	0,5
<b>35</b>	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,21 ± 0,10	1,0	3,5

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten nach 72-stündiger Behandlung der Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

<sup>b</sup> Der Faktor R (+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte mit und ohne Inhibitorzugabe.

+ 1 µM Fumonisin B1 wurden zur Inhibierung der Ceramid-Synthase 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\* 10 µM Chlorpromazin wurden zur Inhibierung der Sphingomyelinase 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

Für die 518A2-Zellen konnte keine signifikante Veränderung der Wirkung der Derivate **26**, **29** und **32** durch die Inhibierung der Ceramidsynthese bzw. Sphingomyelinase festgestellt werden. Dagegen schien die Bildung der Ceramide via Sphingomyelinase wichtig für die Wirkung von Doxorubicin (**13**) und dem Derivat **35** zu sein. Dies war für die HL-60-Zellen noch stärker ausgeprägt (vgl. Tabelle 4-12). Zudem zeigte sich für die übrigen Derivate **26**, **29** und **32** ein Rückgang der Wachstums-inhibierende Funktion bei Inhibierung der Sphingomyelinase, was die Beteiligung der Ceramid-Produktion an deren Wirkung untermauert (vgl. Tabelle 4-10). Das (-)-Mentholderivat **32** schien außerdem als einziges Derivat die Bildung der Ceramide sowohl *de novo* durch die Ceramidsynthese als auch durch die Sphingomyelin-Hydrolyse zu beeinflussen.

**Tabelle 4-12:** Beteiligung der Ceramide an der Wirksamkeit ausgewählter Doxorubicinderivate in HL-60 Leukämie-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [μM] <sup>a</sup>			R (+/-) <sup>b</sup>	
	HL-60	*HL-60	**HL-60	*HL-60 HL-60	**HL-60 HL-60
<b>13</b>	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,83 ± 0,08	0,6	<b>11,6</b>
<b>26</b>	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,06	2,76 ± 1,76	0,8	<b>9,9</b>
<b>29</b>	0,81 ± 0,19	0,39 ± 0,19	6,98 ± 0,81	0,5	<b>8,6</b>
<b>32</b>	0,23 ± 0,10	0,71 ± 0,48	1,00 ± 0,10	<b>6,5</b>	<b>4,3</b>
<b>35</b>	0,11 ± 0,05	0,12 ± 0,02	2,03 ± 1,03	0,5	<b>18,5</b>

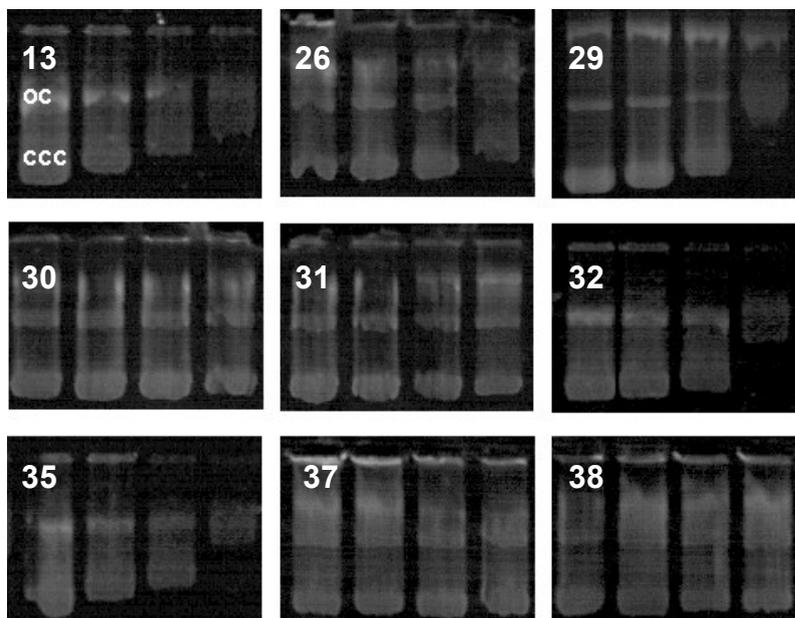
<sup>a</sup> Siehe Tabelle 4-11.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Apoptose in mit den Doxorubicinderivaten behandelten HL-60- bzw. 518A2-Zellen sowohl klassisch über die intrinsischen und extrinsischen Pfade als auch alternativ über reaktive Sauerstoffradikale und die dadurch bedingte Aktivierung redox-sensitiver Kinasen bzw. die Bildung von Ceramiden ausgelöst wird. Da der zur Inhibierung der Sphingomyelinase verwendete Wirkstoff Chlorpromazin in geringem Maße auch die Clathrin-abhängige Endozytose beeinflusst, muss dies bei der Auswertung natürlich berücksichtigt werden; eine direkte Beteiligung der Sphingomyelinase steht jedoch außer Frage.<sup>[159]</sup>

### 4.3 Wechselwirkung mit der DNA: Bandenretardationstest

Es zeigte sich in einigen Versuchen, dass die Seitenketten einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung der entsprechenden Derivate ausüben. Daher wurde zusätzlich die DNA-Bindefähigkeit ausgewählter Doxorubicinderivate mithilfe des Bandenretardationstests überprüft, um festzustellen, ob die DNA auch für diese als potentiell *Target* in Betracht kommt.

Dafür wurden verschiedene Konzentration der Testsubstanzen mit pBR322 Plasmid-DNA inkubiert und deren Effekt auf die vorwiegend superhelikal vorliegende Form (ccc) gelelektrophoretisch untersucht (vgl. Abbildung 4-13). Bei DNA-Bindung oder -Interkalation in die ccc-Form windet sich diese unter Abnahme der Über-spiralisierung und folglich der elektrophoretischen Mobilität zur oc-Form auf, was im Agarosegel deutlich wird (vgl. 3.5 Wechselwirkung mit der DNA).



**Abbildung 4-13:** Verhalten der elektrophoretischen Mobilität von pBR322-Plasmid-DNA nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen **13, 26, 29, 30, 31, 32, 35, 37** und **38** (oc = *open circular DNA form*, ccc = *covalently closed circular DNA form*). Bahn 1 (links): 0 µM, Bahn 2: 5 µM, Bahn 3: 10 µM, Bahn 4: 25 µM. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise zeigten diejenigen Testsubstanzen, die im MTT-Test die größten Wachstums-inhibierende Effekte aufwiesen – also die (–)-Mentholderivate **32** und **35** sowie das Doxorubicin (**13**) selbst, die deutlichste Retardation der ccc-DNA-Form. Diejenigen Derivate jedoch, die kaum aktiv waren (die Fettsäurederivate **30** und **31** sowie die Doxorubicin-Metabolite **37** und **38**), führten zu keiner Wechselwirkung mit der Plasmid-DNA. Es konnte somit gezeigt werden, dass die DNA grundsätzlich als Target für die Doxorubicinderivate dient; die Affinität der Bindefähigkeit bzw. Interkalation hängt dabei stark vom jeweiligen Fettsäure- bzw. Terpen-Rest ab.<sup>[151]</sup>

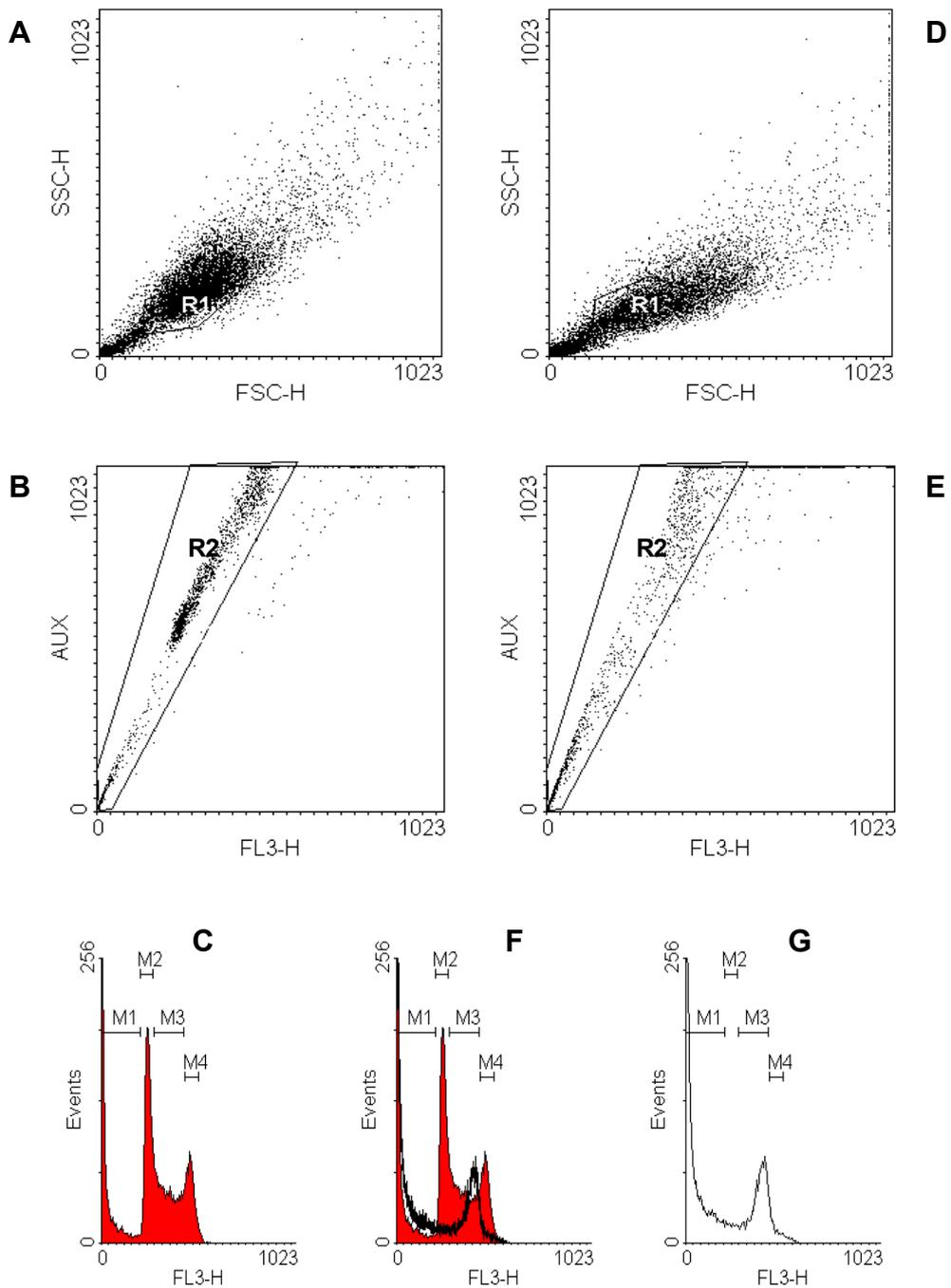
#### 4.4 Zellzyklus-Analyse

Wie bereits erwähnt, wird der Zellzyklus einer Zelle an verschiedenen Kontrollpunkten (*Checkpoints*) überwacht, so dass der nächste Schritt im Zellzyklus erst dann erfolgt, wenn der vorhergehende abgeschlossen ist (vgl. 3.4.9 Zellzyklus-Analyse). Durch die Schädigung von zellulären Strukturen nach der Behandlung mit einem Wirkstoff und beim Ausbleiben geeigneter Reparatur-Mechanismen kann nun der Zellzyklus unterbrochen werden, was letztendlich auch zur Auslösung von Apoptose führt.<sup>[128]</sup>

Da Doxorubicin (**13**) und seine Derivate in der Lage sind, in die DNA zu interkalieren (vgl. 4.3.1 Bandenretardationstest) und dadurch Enzyme wie die DNA-Topoisomerase II, -Helikase oder -Polymerase zu blockieren, wird die Replikation der DNA gestört, was höchstwahrscheinlich zu einem Arrest der Zelle in der S-Phase im Zellzyklus führt. Um dies zu überprüfen, wurden 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach der Behandlung mit Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26** und **35** mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und mithilfe der Durchflusszytometrie konnte der Zellzyklus bestimmt werden. Dabei wurde, wie bereits beschrieben, vorgegangen (vgl. 4.2.5 Mitochondrienmembranpotential): Die Körnung bzw. Größe der insgesamt 20000 Zellen wurde mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC) eingestellt und die Messung der roten Fluoreszenz des von den Zellen aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffs PI erfolgte mithilfe eines Fernrot-Detektors (FL3-H). Die Daten wurden ebenfalls mit dem Programm *WinMDI* (Version 2.9) ausgewertet, wobei

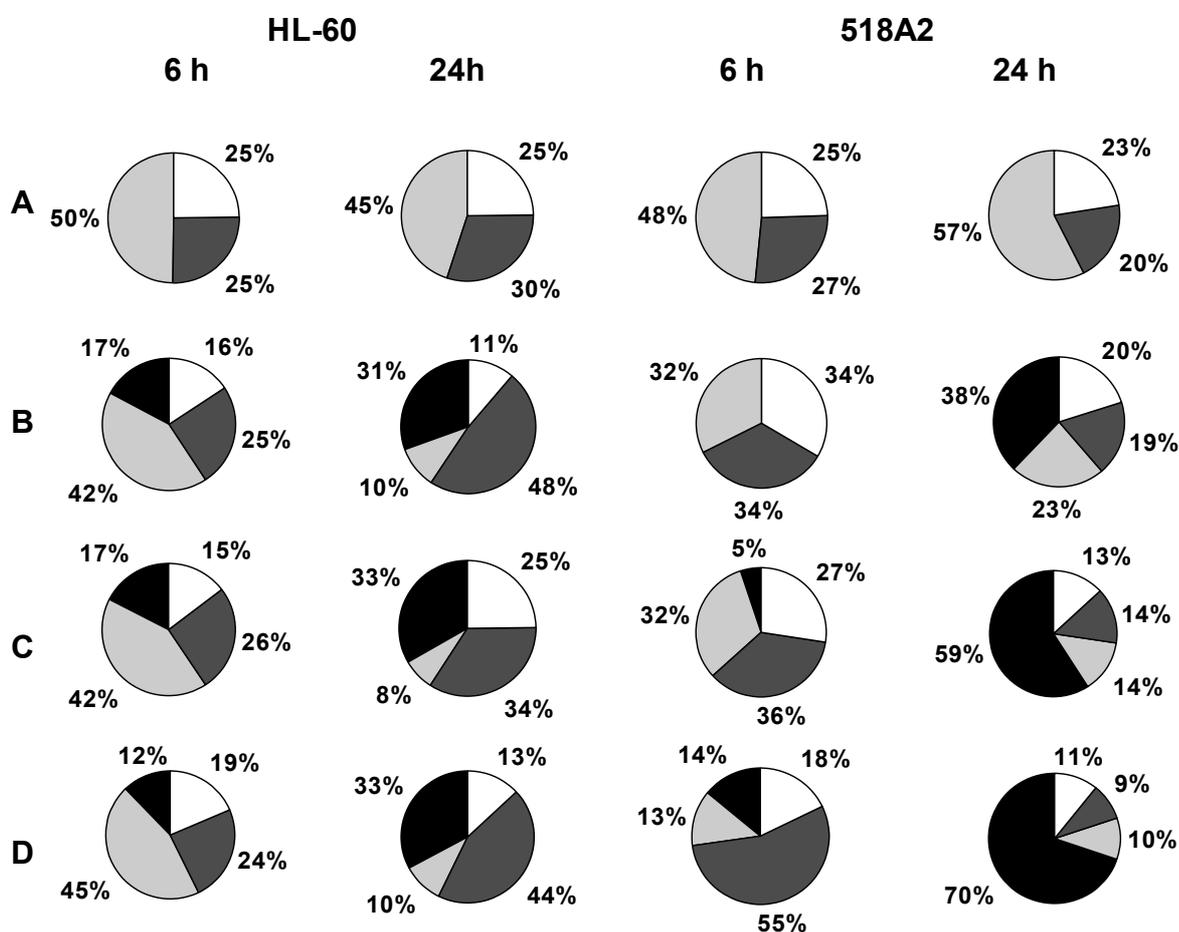
wieder diejenigen Zellen im *DotPlot* (FSC-H / SSC-H, Lin) mit einem Polygon R1 markiert wurden, die laut Körnung zu den vitalen zählen (vgl. Abbildung 4-14, A und D). Die Diskriminierung der Zellen erfolgte jedoch über ein weiteres Polygon R2: Dabei wurden Höhen- und Flächensignale der Fluoreszenz (FL3-H / AUX, Lin) gegeneinander aufgetragen, was den Ausschluss von sogenannten „Zell-Dubletten“ ermöglichte. Diese würden aufgrund ihres doppelten DNA-Gehalts die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse verfälschen und mussten daher unbedingt ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 4-14, B und E). Schließlich erfolgte für die diskriminierten Zellen („single cells“) die Auftragung der Fluoreszenzintensität in einem Histogramm (FL3-H / *Events*, Lin). Mithilfe der Marker M1 bis M4 ließen sich die einzelnen Phasen des Zellzyklus kennzeichnen, wobei M1 für die SubG1-Phase (apoptotische Zellen), M2 für die G1- bzw. G0-Phase, M3 für die S-Phase und M4 für die G2- bzw. M-Phase steht (vgl. Abbildung 4-14, C, F und G). Während der G1- bzw. G0-Phase weisen die Zellen einen einfachen Chromosomensatz auf, was im Histogramm in einem einfachen Fluoreszenzsignal (~ 300) resultierte. In der G2- bzw. M-Phase ist der Chromosomensatz verdoppelt, weshalb sich auch das Fluoreszenzsignal (~ 600) verdoppelte. Da während der S-Phase die Replikation erfolgt, befand sich das Fluoreszenzsignal für alle Zellen in dieser Phase zwischen dem einfachen und doppelten Signal.<sup>[133-134]</sup>

Für die unbehandelten HL-60-Zellen waren fast 45-50% in der G1- bzw. G0-Phase und jeweils 25% in der S- und G2- bzw. M-Phase. Ein geringer Teil der Kontrollzellen wies apoptotische Merkmale (DNA-Fragmente) auf und wurde der SubG1-Phase zugeordnet (vgl. Abbildung 4-14, C). Die 24-stündige Behandlung der HL-60-Zellen mit Doxorubicin (**13**) führte zu einem Zellzyklus-Arrest während der S-Phase am Übergang in die G2-Phase und zu einem Anstieg der Zellen in der SubG1-Population (~ 30% Apoptose, vgl. Abbildung 4-14, G). Zur besseren Verdeutlichung wurden die Zellzyklus-Analysen der mit **13** behandelten und der unbehandelten HL-60-Zellen übereinandergelegt (vgl. Abbildung 4-14, F).



**Abbildung 4-14:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter, unbehandelter HL-60-Zellen (A-C) bzw. Propidiumiodid-gefärbter 518A2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin (**13**, 5  $\mu$ M, D-E, G): A, D) *DotPlot* aller 20000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon R1 markiert die vitale Zellpopulation; B, E) Dubletten-Diskriminierung (FL3-H / AUX) aller Zellen, das Polygon R2 markiert die „single cells“; C, G) Histogramme (FL3-H / Events) für die diskriminierten Zellen (Dubletten-Diskriminierung) mit M1 = SubG1, M2 = G1/G0, M3 = S und M4 = G2/M; F) Überlagerung der Histogramme C und G.

So wurde für Doxorubicin (**13**) und seine Derivate **26** und **35** sowohl für die HL-60- als auch die 518A2-Zellen verfahren (6 h bzw. 24 h Inkubationszeit, jeweils 5  $\mu$ M). Die resultierenden Zellzyklus-Analysen sind im Anhang aufgeführt; die folgende Abbildung 4-15 zeigt die daraus berechnete Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde der geringfügige Anteil der apoptotischen Zellen für die Derivate berücksichtigt. Außerdem wurde die intrinsische Fluoreszenz der Derivate, die ebenfalls unter M1 auftaucht, bei der Berechnung ausgeschlossen.



**Abbildung 4-15:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter HL-60- (links) bzw. 518A2-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin (**13**, B) und seinen Derivaten **26** (C) und **35** (D) (jeweils 5  $\mu$ M, Kontrolle = A), wobei die Sektoren die prozentuale Auftragung der Zellzyklus-Phasen kennzeichnen: SubG1 (schwarz), G0 bzw. G1 (hellgrau), S (dunkelgrau) und G2 bzw. M (weiß).

Für Doxorubicin (**13**) und seine Derivate **26** und **35** wurde sowohl für die HL-60- (24 h) als auch die 518A2-Zellen (6 h) ein Zellzyklus-Arrest während der S-Phase, also während der DNA-Replikationsphase, festgestellt. Aufgrund der Interkalation der Derivate in die DNA und der dadurch bedingten Blockierung verschiedener DNA-bindender Enzyme verbleiben die Zellen in der S-Phase (vgl. 4.3. Wechselwirkung mit der DNA).<sup>[158]</sup>

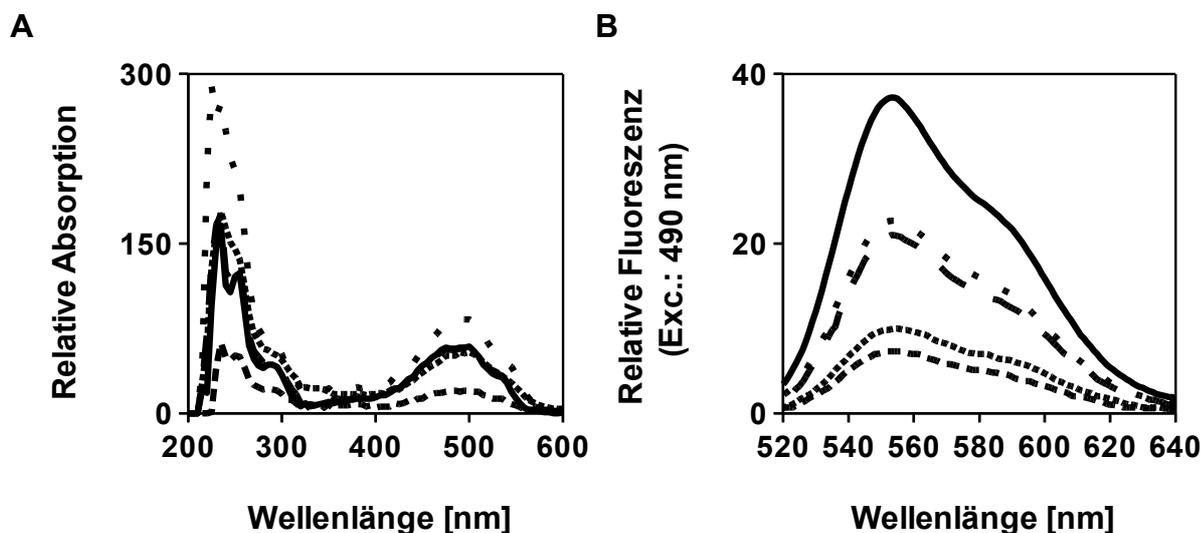
Zudem konnte vermehrt Apoptose gemessen werden: Während diese nach kurzen Inkubationszeiten (6 h) für die HL-60-Zellen zunächst stärker ausgeprägt war, war schließlich nach längerer Zeit (24 h) in beiden Zelllinie deutlich Apoptose zu verzeichnen. Dabei war der apoptotische Anteil der 518A2-Zellen stets größer als für die HL-60-Zellen, was gut mit den Kurzzeit-IC<sub>50</sub>-Werten korrelierte, die an den Melanomzellen etwas effektiver waren (vgl. Tabelle A-1 im Anhang). Zudem bestätigen sich noch einmal die Studien zur DNA-Fragmentierung mittels Gelelektrophorese, denn auch hierbei wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h deutliche Fragmentierungsmuster für beide Zelllinien erhalten (vgl. 4.4.2 DNA-Fragmentierung).

### 4.5 Zelluläre Aufnahme und Verteilung

Aufgrund der intrinsischen Fluoreszenz der Doxorubicinderivate war es möglich, deren Aufnahme in die Zellen zu untersuchen.

#### 4.5.1 Fluoreszenzspektren

Dafür wurden zunächst Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26**, **29**, **32** und **35** aufgenommen, um Aussagen über den Einfluss der Seitenketten auf den Fluorophor treffen zu können. Wie aus den Absorptionsspektren in Abbildung 4-16 (A) ersichtlich ist, lag der Bereich für eine ideale Anregung der Derivate zwischen 480 und 500 nm, genau wie für den Fluorophor Dihydroanthrachinon (vgl. 3.9.1.1 Fluoreszenzspektren).<sup>[132]</sup>



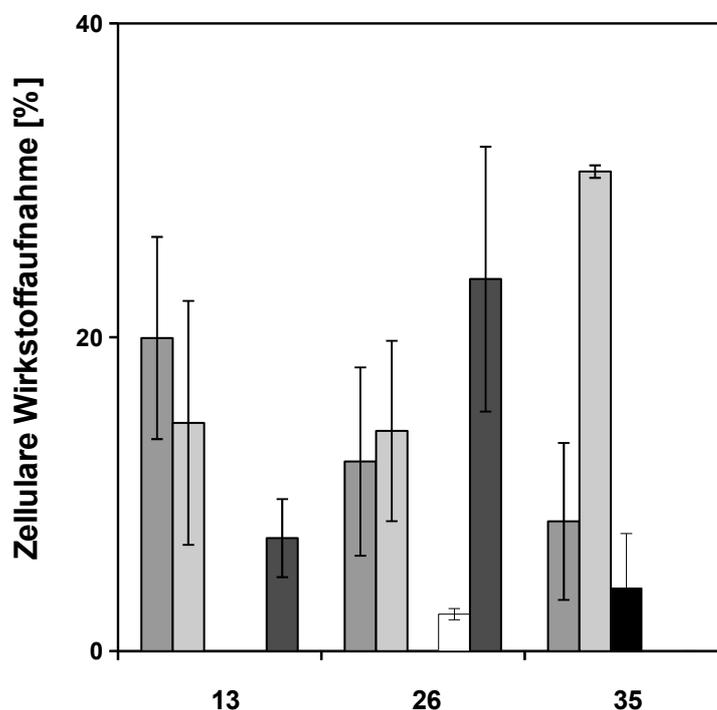
**Abbildung 4-16:** Absorptions- (A) bzw. Fluoreszenzspektren (B) für Doxorubicin (**13**, —) und seine Derivate **26** (•••), **29** (•••••), **32** (---) und **35** (— —); B) Die Anregung der Proben (je 5  $\mu\text{M}$ ) erfolgte jeweils bei 490 nm, das Emissionsfeld reichte von 520 bis 640 nm. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Die Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{Exc}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 500\text{-}700 \text{ nm}$ ) ähnelten sich zwar alle in ihrem Verlauf, die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Derivate allerdings unterschieden sich stark von Doxorubicin (**13**) selbst. Es war eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um etwa 50% (**26**, **29**) bzw. um mehr als 75% (**32**, **35**) zu verzeichnen (vgl. Abbildung 4-16, B).<sup>[160]</sup>

Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer dämpfenden Wirkung der Seitenketten und wurde bereits in eigenen Vorarbeiten für den Heptadecansäureester **30** genauer untersucht.<sup>[59]</sup> Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für eine Mischung aus **13** und Ölsäure beschrieben.<sup>[133]</sup> Zudem scheint die Rückfaltung der lipophileren (–)-Mentholreste (**32**, **35**) zu einer stärkeren Wechselwirkung mit dem aromatischen Fluorophor und somit zu einer stärkeren Dämpfung der Fluoreszenz zu führen als dies für die Fettsäurederivate **26** und **29** der Fall ist.

## 4.5.2 Zelluläre Aufnahme: Influx

Anschließend wurde die Aufnahme von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26**, **29**, **32** und **35** in die 518A2 Melanom-, HL-60 Leukämie-, HT-29 Kolonkarzinom-, KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen (5  $\mu$ M, 3 h) mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz untersucht. Es wurde dabei eine Inkubationszeit von nur 3 h gewählt, weil einige Vorversuche zeigten, dass genau nach dieser Zeit der größte Anteil der Testsubstanzen bereits aufgenommen war. Längere Inkubationen führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Aufnahme.<sup>[59]</sup> Alle Testsubstanzen akkumulierten nach dieser kurzen Zeit stark in den 518A2- und HL-60-Zellen, was eine sehr gute Übereinstimmung zu den zuvor bestimmten Wachstums-Inhibierungen zeigte. Im Vergleich dazu war die Aufnahme in die mehrfachresistenten HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen eher gering, was in einer geringeren Wachstums-inhibierenden Wirkung resultierte (vgl. Abbildung 4-17 und Tabelle A-43).<sup>[160]</sup>



**Abbildung 4-17:** Aufnahme von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26** und **35** in die 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen nach einer 3-stündigen Inkubation (5  $\mu$ M); ermittelt mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Exc}} = 485 / 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 590 / 20 \text{ nm}$ ) relativ zur unbehandelten Kontrolle (0%). Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Die zytotoxische Wirkung der Doxorubicinderivate bzw. deren Potential zur Apoptose-Initiation scheint jedoch nicht ausschließlich von einer verbesserten Aufnahme in die Zellen abzuhängen. Obwohl Derivat **35** im MTT-Test gegen die 518A2-Zellen 2× besser abschnitt als Doxorubicin (**13**), war die zelluläre Aufnahme deutlich geringer. Ein ähnliches Bild ergab sich für die HL-60-Zellen: An dieser Zelllinie wirkte Doxorubicin (**13**) sehr viel besser als seine Derivate, dennoch konnte der größte Influx für **35** ausgemacht werden.

Bemerkenswert war zudem die stärkere Akkumulation von **26** in den MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen, die jedoch nicht zu einer im Vergleich mit **13** verbesserten Wirkung führte (vgl. 4.1.1 MTT-Test, 4.5.3 Wirkstoff-Ausschleusung: Efflux).

#### 4.5.3 Wirkstoff-Ausschleusung: Efflux

Analog zur Aufnahme wurde die Ausschleusung der Testsubstanzen aus den 518A2 Melanom-, HL-60 Leukämie-, HT-29 Kolonkarzinom-, KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz untersucht. Die Wahl der Zeitspanne fiel dabei auf insgesamt 6 h, weil es nach längeren Inkubationszeiten teilweise zu einer Hydrolyse / Metabolisierung der Derivate und somit zu Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften hin zu höheren Intensitäten kam.<sup>[59]</sup> Es konnte für Doxorubicin (**13**) nach dieser Zeit keinerlei Ausschleusung aus den Zellen festgestellt werden (vgl. Tabelle A-44). Für das Fettsäurederivat **26** wurde lediglich ein geringer Efflux aus den MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen gemessen; was aber verglichen mit der starken Aufnahme in die Zellen nicht sonderlich ins Gewicht fiel. In Bezug auf das (-)-Mentholderivat **35** ergab sich ein deutlicher Efflux sowohl aus den HL-60- als auch aus den HT-29-Zellen.

Diese Messungen lassen jedoch nur Vermutungen zu, da eine Metabolisierung oder Hydrolyse auch nach kurzen Inkubationszeiten nicht vollkommen auszuschließen ist. Auf die Verwendung von Standard-Efflux-Tests (z.B. der Calcein-AM-Efflux-Test) musste aufgrund der Überlappung der Fluoreszenzspektren leider verzichtet werden (vgl. 3.6.1.3 Wirkstoff-Ausschleusung: Efflux).

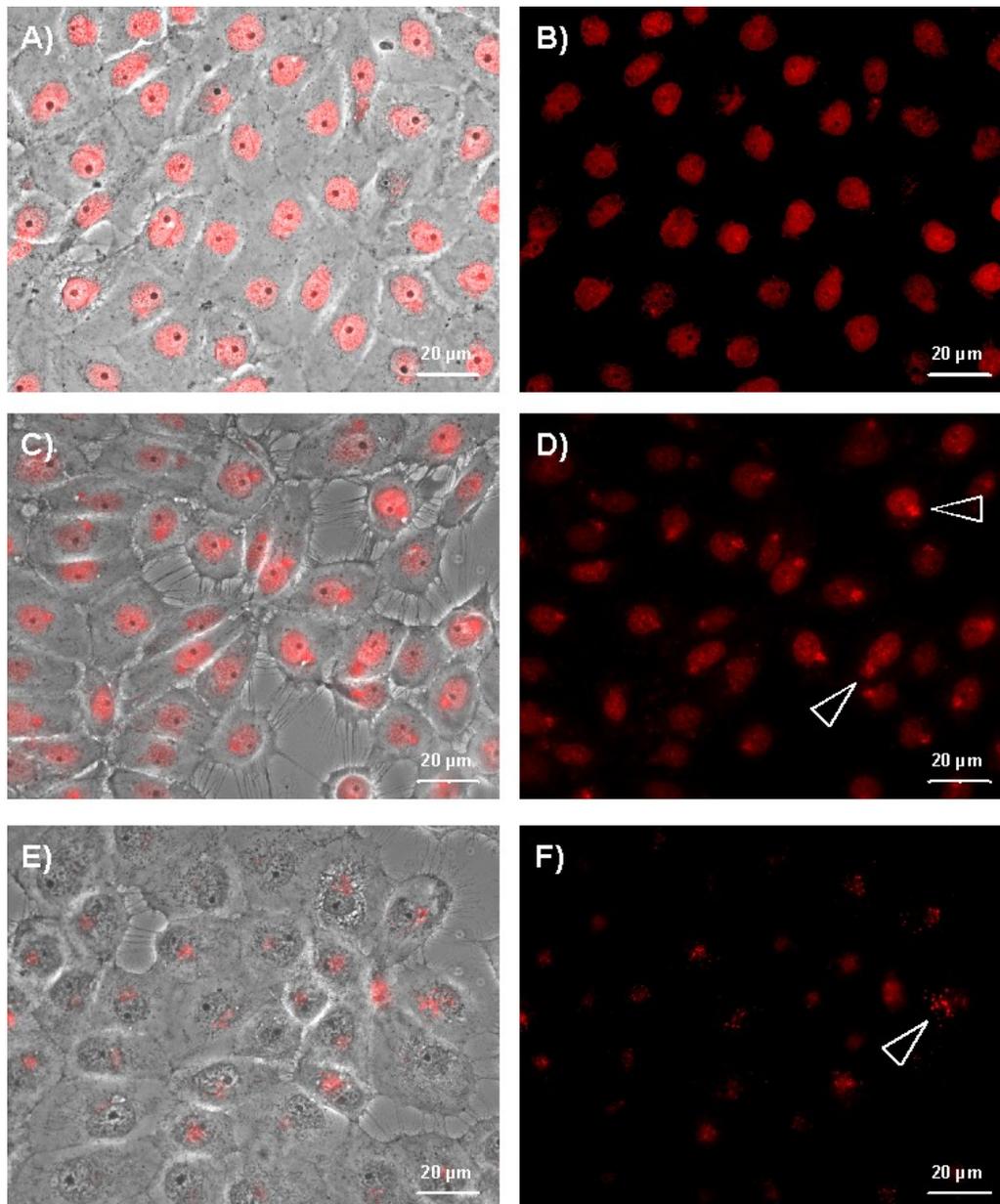
Hinweise auf einen möglichen Efflux über die verschiedenen ABC-Transporter konnten jedoch mithilfe des MTT-Tests unter Verwendung geeigneter Inhibitoren bzw. dem Vergleich von resistenten und sensitiven Zellen gesammelt werden (vgl. 4.1.1.2 MDR-Sensitivität). Sowohl in den KB-V1<sup>VBL</sup>- als auch MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen wurde das Fettsäurederivat **26** am wenigsten von den Resistenzmechanismen (P-gp, BCRP etc.) beeinflusst. Dies resultierte verglichen mit den übrigen Derivaten in einer stärkeren Akkumulation von **26** in diesen Zellen – entweder durch vermehrten Influx oder verminderten Efflux. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von **13** in resistente MCF-7-Zellen aufgrund der dichteren Packung der Lipide (hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren) innerhalb der Membran erschwert wird, was einen Efflux durch ABC-Transporter begünstigt. Eventuell ist **26** in der Lage, aufgrund der Fettsäure-Seitenkette besser mit der Membran zu interagieren und somit vermehrt in der Zelle zu akkumulieren.<sup>[161]</sup>

#### 4.5.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen

Die zelluläre Verteilung der Doxorubicinderivate wurde ebenfalls mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz in PtK<sub>2</sub> Beutelratten-Nieren-Zellen untersucht. Bereits nach 2 h konnte **13** im Zellkern lokalisiert werden (vgl. Abbildung 4-18, A-B). Nach längeren Inkubationszeiten fand allerdings eine Akkumulation von **13** oder entsprechender Metabolite in Vesikeln statt, die sich zunächst in der Nähe der Zellkerne konzentrierte (4 h, vgl. Abbildung 4-18, C-D), sich später aber über die gesamte Zellen erstreckte (16 h, vgl. Abbildung 4-18, E-F).<sup>[160]</sup> Diese Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte Daten anderer Arbeitsgruppen an Ratten-Embryo-Fibroblasten bzw. humanen myeloischen Leukämie-Zellen.<sup>[162-163]</sup> Zudem passen die Daten zu einer vermuteten Metabolisierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder im Golgi-Apparat.

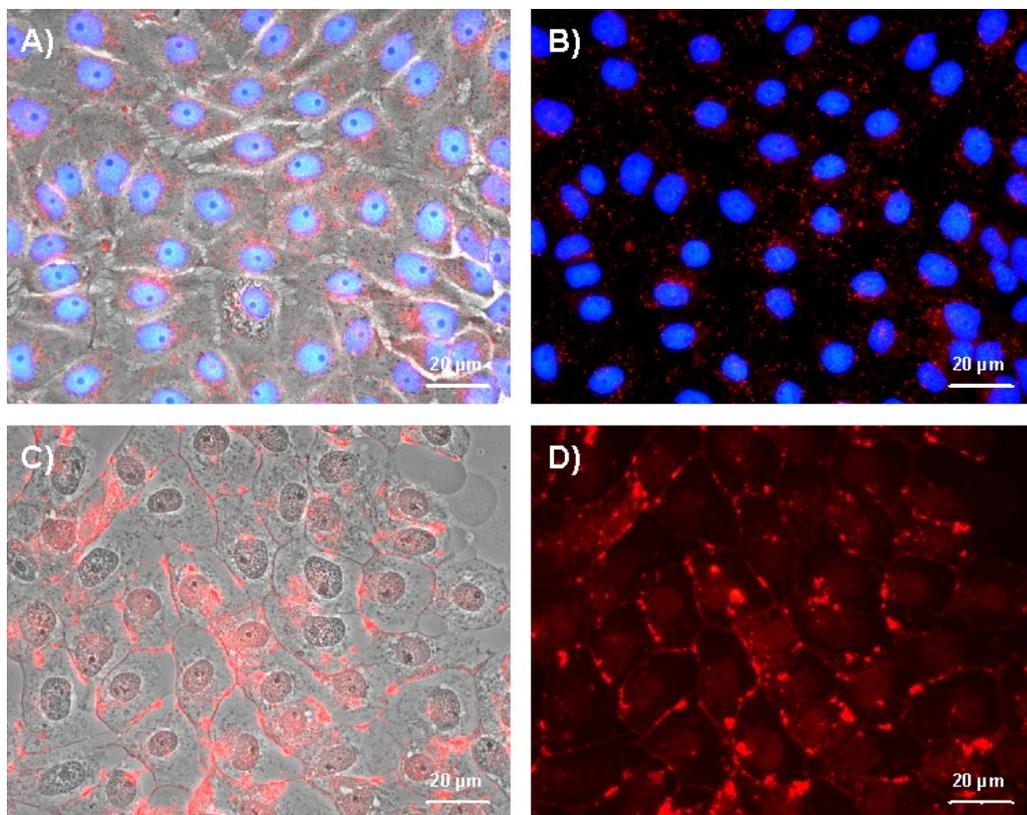
Für das (-)-Mentholderivat **35** ergaben sich ähnliche, jedoch etwas verzögerte zelluläre Verteilungen; die vollständige Akkumulierung im Zellkern war erst nach 4 h erreicht. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Fluoreszenzintensität durch die Interkalation der Doxorubicinderivate in die DNA vermindert wird, weshalb nicht der

gesamte Anteil der Derivate erfasst werden kann. Auch wenn keine Lokalisation mehr im Kern möglich war, kann dort trotzdem eine Interaktion in die DNA stattgefunden haben.



**Abbildung 4-18:** Zelluläre Verteilung von Doxorubicin (**13**, 10 µM) nach der Behandlung der PtK<sub>2</sub>-Zellen für 2 h (A-B), 4 h (C-D) oder 16 h (E-F); die Visualisierung erfolgte vital in PBS mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan mit Axiocam, Neofluor-Objektiv 40×). Die Akkumulation von **13** in zytoplasmatischen Vesikeln wurde markiert (Δ); links: Mischbild von Hellfeld- und Fluoreszenz-Kanal; rechts: Fluoreszenz-Kanal.

Ein völlig anderes Bild ergab sich für das Fettsäurederivat **26**: Hierbei war bereits nach einer kurzen Inkubationszeit von nur 2 h eine Verteilung über die ganze Zelle festzustellen (zytoplasmatische Vesikel); es erfolgte anders als für **13** und **35** keine Akkumulation im Zellkern, wie die Gegenfärbung mit dem DNA-bindenden Hoechst 33342 Lebendfarbstoff zeigt (vgl. Abbildung 4-19, A-B). Bei längerer Inkubation konnte eine intensive Fluoreszenzfärbung von **26** oder einem entsprechenden Metabolit in der Zellmembran ausgemacht werden. Möglicherweise dient der lange Fettsäurerest dabei als eine Art Anker in der Membran.<sup>[160]</sup>

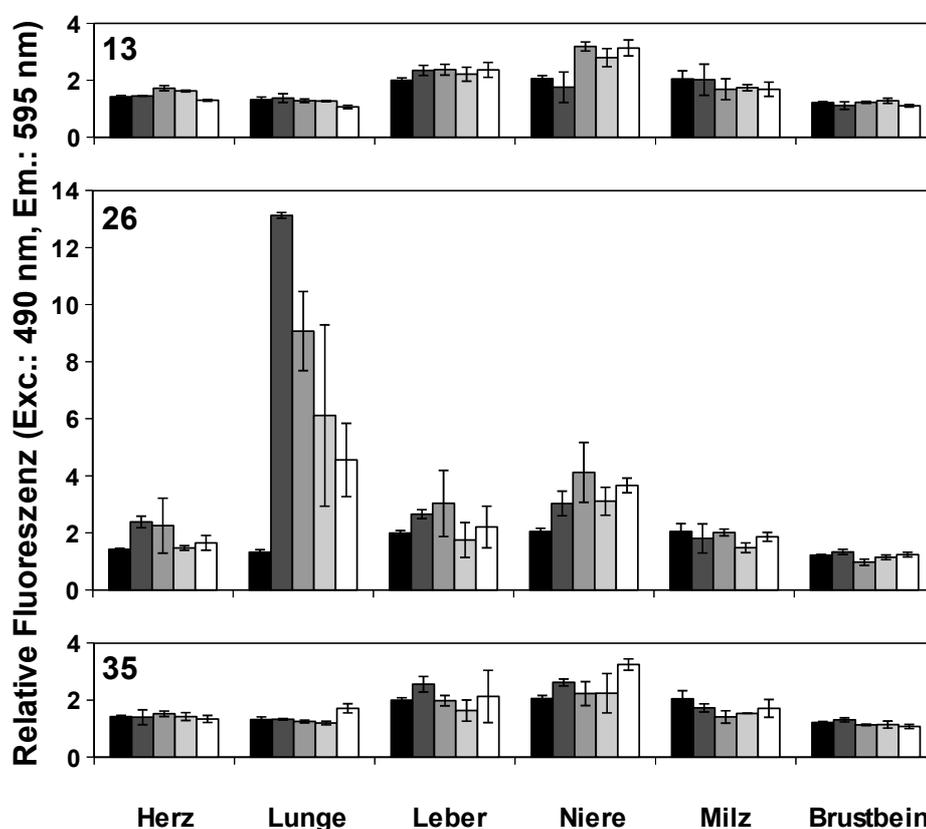


**Abbildung 4-19:** Zelluläre Verteilung von **26** (10 µM) nach Behandlung von PtK<sub>2</sub>-Zellen für 2 h (A-B) und 16 h (C-D); die Visualisierung erfolgte vital in PBS mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan mit Axiocam, Neofluor-Objektiv 40×). Die Zellkerne wurden zusätzlich mit dem Hoechst 33342 Lebendfarbstoff gefärbt (A-B); links: Mischbild von Hellfeld- und Fluoreszenz-Kanal; rechts: Fluoreszenz-Kanal.

Eine Fixierung der Zellen in Ethanol mit anschließender Färbung bestimmter Kompartimente konnte leider nicht erfolgen, da die Wirkstoffe dabei aus den Zellen herausgewaschen werden.

#### 4.5.5 Verteilung im Gewebe: Mausmodell

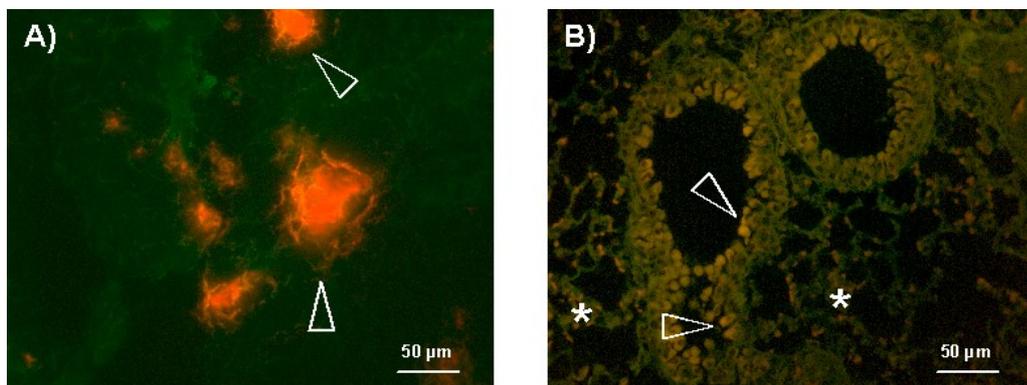
Die Gewebeverteilung von Doxorubicin (**13**) und ausgewählten Derivaten (**26**, **35**) wurde in NMRI nu/nu Mäusen untersucht. Dafür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion der Testsubstanzen (2,8 mg / kg Körpergewicht) Gewebeproben (Herz, Lunge, Leber, Milz, Brustbein) entnommen, die einerseits extraktiv mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz ( $\lambda_{Exc} = 485 / 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 590 / 20 \text{ nm}$ ), andererseits in Form von 20-35  $\mu\text{m}$  dünnen Gewebeschnitten fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden (vgl. Abbildung 4-20 und 4-21).



**Abbildung 4-20:** Gewebeverteilung von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten **26** und **32**: Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenz ( $\lambda_{Exc} = 485 / 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 590 / 20 \text{ nm}$ ) in Gewebeproben männlicher NMRI nu/nu Mäuse, die für 0,5 min (■), 30 min (■), 60 min (■) und 120 min (■) mit den Testsubstanzen (2,8 mg / kg) behandelt worden waren, relativ zur unbehandelten Kontrolle (■).

Ausschließlich das Fettsäurederivat **26** konnte sowohl extraktiv als auch mikroskopisch (nach 30 min) in der Lunge lokalisiert werden (vgl. Abbildung 4-20 und 4-21).<sup>[164]</sup>

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden sowohl native als auch Parafinfixierte Gewebeschnitte angefertigt: Während die nativen Schnittserien eine Lokalisation von **26** innerhalb des Lungengewebes ermöglichten (vgl. Abbildung 4-21, A), fand durch die Fixierung, wie bereits beschrieben (vgl. 4.4.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen), eine Art Auswaschung statt, was die Lokalisation erschwerte. Andererseits war die Gewebestruktur in den histologischen Schnittserien wesentlich besser zu erkennen (vgl. Abbildung 4-21, B).



**Abbildung 4-21:** Gewebeverteilung des Doxorubicinderivats **26** in der Lunge (30 min nach der Injektion, Fluoreszenzkanal): die Visualisierung erfolgte (A) vor und (B) nach der Fixierung in Parafin in 20-35 µm dicken Gewebeprobe mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Achrostigmat-Objektiv 35×, Filterset DAPI). Die Akkumulation von **26** im Lungengewebe wurde markiert (Δ), ebenso die intrinsische Fluoreszenz der roten Blutkörperchen (\*).

Die mikroskopischen Aufnahmen der Lungengewebeschnitte bestätigen die mittels Ethanol-Extraktion gewonnene Gewebeverteilung von **26** (vgl. Abbildung 4-21). Für keine andere Gewebeprobe konnte eine derartige Ansammlung des Wirkstoffs festgestellt werden. Die übrigen Verbindungen **13** und **35** konnten auch auf diese Weise nicht in den Geweben nachgewiesen werden. Möglicherweise wirkt die lange Fettsäureseitenkette wiederum als Anker und ermöglicht so eine stärkere Akkumulation im Gewebe.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eindrucksvoll, wie hilfreich die intrinsische Fluoreszenz eines Wirkstoffs sein kann. Wenn auch eine Vielzahl von Messmethoden aufgrund der Eigenfluoreszenz schwer durchzuführen sind, so profitiert man in dieser Hinsicht davon.

#### 4.6 Zusammenfassende Diskussion

Am Beispiel der Funktionalisierung von Doxorubicin (**13**) mit verschiedenen Fettsäuren zeigt sich sehr schön, dass kleine Veränderungen der Leitstruktur einen erheblichen Einfluss auf das biologische Wirkprofil einer Substanz haben können. So kann die Wachstums-inhibierende Wirkung **13** an verschiedenen Zelllinien, die üblicherweise damit therapiert werden – also Melanom-, Leukämie- und Karzinom-Zellen, durch die Anknüpfung einer einfachen Fettsäure verbessert werden: Das Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**26**) zeigt verglichen mit den übrigen Fettsäurederivaten deutliche Aktivität gegen diese Zelllinien und übertrifft aufgrund einer geringeren Anfälligkeit gegenüber dem ABC-Transporter P-gp die Wirkung von **13** an den mehrfachresistenten KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen um das 3-Fache. Von den Terpendervaten zeigen die (–)-Mentholderivate **32** und **35** überdurchschnittliche Aktivität gegen alle Zelllinien: Das 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**35**) übertrifft die Wirkung aller Derivate an den 518A2-Zellen und ist zudem noch an Doxorubicin-resistenten Zellen wirksam. Es konnten somit zwei Doxorubicinderivate (**26** und **35**) identifiziert werden, die in der Lage sind, limitierende Mehrfachresistenzen zu überwinden.

Die Wirkungsweise von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten ist hauptsächlich apoptotisch: Es zeigen sich morphologische Veränderung der Zellen sowie eine Fragmentierung der zellulären DNA. Weiterhin konnte die Beteiligung Apoptose-relevanter Caspasen, eine vermehrte bax-mRNA-Expression sowie eine Abnahme an intakten Mitochondrien festgestellt werden, wobei die Caspase-Kinetiken von der Zelllinie und dem jeweiligen Derivat abhängen. So konnte eine Aktivierung der Caspase-8 (HL-60) bzw. Caspase-9 (518A2) als Apoptose-initiierend ausgemacht werden. Eine Ausnahme bildet jedoch das 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-ethansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**32**), welches aufgrund der Repression der bcl-2-mRNA-Expression in den 518A2-Zellen zu einer Überwindung derer Blockade im intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Pfad und somit zu einer Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und einer stärkeren Abnahme intakter Mitochondrien ( $\Delta\Psi\downarrow$ ) führt. Außerdem ist ein Zellzyklus-Arrest während der S-Phase – also der Replikations-

phase – zu verzeichnen. Aufgrund der Interkalation in die DNA, die je nach Fettsäure-Rest mehr oder weniger stark ausgeprägt ist, und der dadurch bedingten Blockierung DNA-bindender Enzyme (Topoisomerase II, Helikase, Polymerase) kommt es zu einer Arretierung der Zellen in der S-Phase. Ein Ausbleiben der Reparatur der DNA-Schäden führt folglich zu einer vermehrten Apoptose-Rate. Die Apoptose-Initiation ist zudem an die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) geknüpft. Unter klinisch relevanten Konzentrationen (5µM) führen vor allem die Doxorubicinderivate zu einer erhöhten ROS-Produktion. Aufgrund der vollständigen Regenerierung des 5,12-*p*-Chinon-Kerns (Zyklovoltametrie) sind die Derivate anders als **13** in der Lage, reversibel mit Sauerstoff zu reagieren und mehr ROS zu bilden. Durch die Generierung von ROS scheinen weiterhin redox-sensitive Kinasen wie die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38-MAPK, aber vor allem die Proteinkinase C aktiviert zu werden, um sich an der Apoptose-Initiation zu beteiligen. Auch die Mitwirkung von Ceramiden und Ca<sup>2+</sup> als *second messenger* der Apoptose konnte in den HL-60-Zellen für alle Derivate festgestellt werden. Dabei erfolgt die Bildung der Ceramide einerseits die Ceramidsynthese und andererseits durch die Sphingomyelinase.

Mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz konnten außerdem die Wirkmechanismen der verschiedenen Derivate eingegrenzt werden: Während Doxorubicin (**13**) und das (–)-Mentholderivat **35** nach kurzen Inkubationszeiten vorwiegend im Zellkern bzw. später in zytoplasmatischen Vesikeln akkumulieren, kann das Fettsäurederivat **26** zu keiner Zeit im Zellkern lokalisiert werden, sondern ausschließlich in zytoplasmatischen Vesikeln sowie in der Zellmembranen. Möglicherweise dient der Fettsäurerest dabei als eine Art Anker. Dieser verhilft **26** wahrscheinlich auch zu einer vermehrten Akkumulation in den resistenten Zervix- und Mammakarzinom-Zellen; der Eintritt in den Zellkern und die Ausprägung der Wirkung wird jedoch ebenfalls erschwert. Bemerkenswerterweise konnte **26** als einziges Derivat im Lungengewebe von *i.v.* behandelten Mäusen nachgewiesen werden, was die „Anker-Theorie“ bekräftigt. In Anbetracht der Tatsache, dass die Prognosen für Lungenkrebs-Patienten auch heute noch sehr gering sind, bietet das Doxorubicinderivat **26** die Möglichkeit, selektiver in der Lunge zu akkumulieren und seine Wirkung zu entfalten als die üblichen Präparate, die zur Anwendung kämen (z.B. Doxorubicin (**13**)).

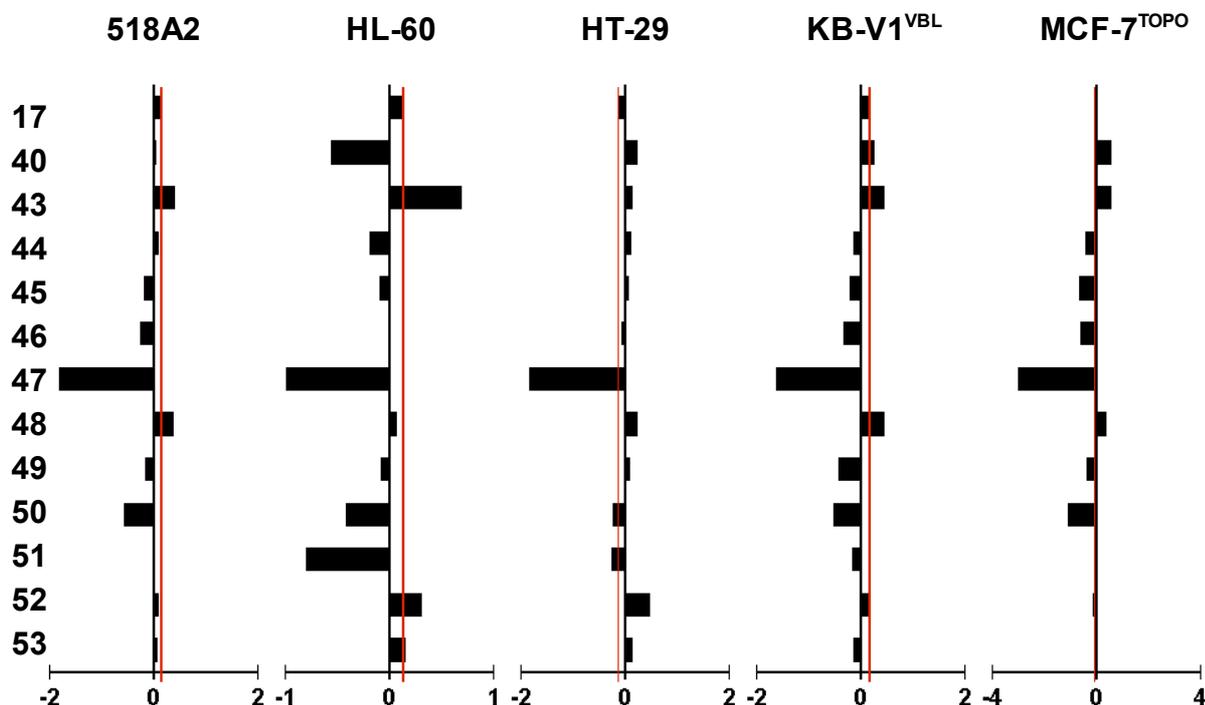
## 5 Ergebnisse und Diskussion: Thymochinon (17) und seine Derivate

### 5.1 Bestimmung der Wirksamkeit

#### 5.1.1 MTT-Test: Fettsäurederivate

##### 5.1.1.1 Effektivität

Auch für Thymochinon (17) und seine Fettsäurederivate **40-53** wurde *in vitro* mittels MTT-Test die Wachstums-inhibierende Wirkung gegenüber den 518A2 Melanoma-, HL-60 Leukämie-, HT-29 Kolonkarzinom-, KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen bestimmt. Die generelle Zelllinienspezifität für **17**, **40** sowie **43-53** nach 72-stündiger Inkubation ist in Abbildung 5-1 dargestellt; eine ausführliche Auflistung aller Kurz- und Langzeitergebnisse (24-72 h) befindet sich im Anhang in den Tabellen A-8, A-9, A-10, A-12 und A-14 (vgl. 3.3.1.1 Effektivität).



**Abbildung 5-1:** Generelle Zelllinienspezifität von Thymochinon (17) und seinen Derivaten **40** sowie **43-53** gegen 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- sowie MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen: Zelllinienspezifische Auftragung der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte der einzelnen Derivate relativ zum Mittelwert der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte aller Derivate, negative bzw. positive Werte stehen für eine im Vergleich zum Mittelwert bessere bzw. schlechtere Wirkung der Derivate, Markierung der Wirkung von **17** (—) zur besseren Vergleichbarkeit.

Wie bei den Doxorubicinderivaten lieferte auch im Fall von Thymochinon (**17**) genau eine Derivatisierungsmethode die über alle Zelllinien gesehen effektivsten Derivate: die direkte Alkylierung von **17** via C-6. Während Hydrazon **40** und Amid **41** an den resistenten HT-29 Kolonkarzinom- bzw. MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen zu keiner Wachstums-Inhibierung führte, zeigte **42** geringe Aktivität. Das Hexadecansäure-Hydrazon **40** war zwar verglichen mit Thymochinon (**17**) deutlich effektiver gegenüber den HL-60 Leukämie-Zellen, der therapeutische Index jedoch wurde nicht verbessert (vgl. Tabelle A-9 sowie 5.1.1.3 Selektivität). Aus diesem Grund wurden ausschließlich direkt verknüpfte Thymochinonderivate systematisch mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren synthetisiert, um den Einfluss der Doppelbindungen auf die Wirksamkeit der Derivate zu überprüfen. Anders als bei **13** konnte in diesem Fall eine Regelmäßigkeit festgestellt werden: Je ungesättigter und länger der Fettsäurerest dabei war, desto aktiver war das resultierende Derivat. Mit Abstand am effektivsten gegen alle verwendeten Zelllinien war das 6-(All-Z)-Henicosä-3,6,9,12,15,18-hexaenyl-Thymochinon (**47**, DHA): Es übertraf mit Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werten im nano-molaren Bereich an allen adhären Ten Tumor-Zelllinien – vor allem an den MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen (30 ± 10 nM) – bei Weitem die Wirksamkeit der Ausgangsverbindung **17** und der übrigen Derivate (**43-46**, vgl. Abbildung 4-24). Die Docosahexaensäure **73**, die zur Synthese von **47** verwendet wurde, zeigte im MTT-Test keinerlei Wirkung (vgl. Tabellen A-8, A-9, A-10, A-12 und A-14 im Anhang). Um so erstaunlicher ist die dramatische Verbesserung der Effektivität durch die Derivatisierung.<sup>[165]</sup>

Weiterhin konnte die geringe Wirkung des vollständig gesättigten bzw. einfach ungesättigten Fettsäurederivats **43** bzw. **44** durch Oxofunktionalisierung verbessert werden. Die so erhaltenen Derivate **48-50** sind nun deutlich aktiver, ohne jedoch an Tumorselektivität zu verlieren. Andererseits geht die Aktivität durch diese Funktionalisierung des 3-fach ungesättigten **46** zu **51** verloren (vgl. Abbildung 5-1).

Die verzweigten Alkyl-Thymochinone **52** und **53** brachten keine Verbesserung der Wirkung gegenüber **17**. Hierbei hätten ebenfalls längere Alkylreste untersucht werden müssen, um abschließende Aussagen über die Wirkoptimierung zu treffen.

5.1.1.2 MDR-Sensitivität

Für Thymochinon (**17**) gibt es noch keine klinischen Studien, die einen Einfluss von ABC-Transportproteinen auf dessen Wirkung beschreiben, dennoch wurde die MDR-Sensitivität der interessantesten Fettsäurederivate an den mehrfachresistenten HT-29<sup>COLC</sup>-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen auf Basis des MTT-Tests untersucht (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität). Die verwendeten IC<sub>50</sub>-Werte nach 72 h Inkubation sind in den Tabellen A-10 bis A-15 aufgeführt; die ermittelten Quotienten R(+/-) aus den IC<sub>50</sub>-Werten an den resistenten und sensitiven Zellen sind in Tabelle 5-1 zu finden. Diese sollten idealerweise bei 1 liegen, dann ist nämlich die Anfälligkeit der Testsubstanzen gegenüber der Resistenz eher gering.

**Tabelle 5-1:** MDR-Sensitivität von Thymochinon (**17**) und seinen aktivsten Fettsäurederivaten an den HT-29-, KB-V1- und MCF-7-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>		
	$\frac{\text{HT-29}^{\text{COLC}}}{\text{HT-29}}$	$\frac{\text{KB-V1}^{\text{VBL}}}{\text{KB-V1}}$	$\frac{\text{MCF-7}^{\text{TOPO}}}{\text{MCF-7}}$
<b>17</b>	1,2	1,3	1,3
<b>40</b>	0,8	0,9	1,1
<b>43</b>	1,0	1,6	3,0
<b>46</b>	1,0	0,7	0,7
<b>47</b>	<b>27,5</b>	1,0	1,5
<b>53</b>	1,1	0,8	3,8

<sup>a</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den resistenten und sensitiven Zellen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der MTT-Ergebnisse an den resistenten und sensitiven Zellen für die untersuchten Thymochinonderivate festgestellt werden, mit Ausnahme des DHA-Derivats **47**. Hier schien es eine Anfälligkeit gegenüber dem ABC-Transporter MRP-1 zu geben, denn **47** war an den elterlichen HT-29 Kolonkarzinom-Zellen viel effektiver ( $0,89 \pm 0,37 \mu\text{M}$ ) als an den mehrfachresistenten HT-29<sup>COLC</sup>-Zellen ( $24,52 \pm 8,79 \mu\text{M}$ ). Dies wurde in Gegenwart der Inhibitoren für die ABC-Transporter MRP-1, P-gp und BCRP auf MTT-Basis überprüft. Die resultierenden MDR-Sensitivitäts-Faktoren R(+/-) sind in Tabelle 5-2 aufgelistet.

**Tabelle 5-2:** MDR-Sensitivität von Thymochinon (17) und seinen aktivsten Fettsäurederivaten an den HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>		
	$\frac{*HT-29}{HT-29}$	$\frac{*KB-V1^{VBL}}{KB-V1^{VBL}}$	$\frac{*MCF-7^{TOPO}}{MCF-7^{TOPO}}$
<b>17</b>	0,4	0,8	0,9
<b>40</b>	0,8	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>
<b>43</b>	0,9	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>
<b>46</b>	0,5	0,6	0,8
<b>47</b>	2,4	1,7	<b>40,3</b>
<b>53</b>	1,1	1,2	0,5

<sup>a</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werten an den resistenten und sensitiven Zellen.

\* 24 h vor Zugabe der Testsubstanzen wurde MK571 (10 µM) zur MRP-1-Inhibierung in den HT-29-Zellen, Verapamil (24 µM) zur Inhibierung von P-gp in den KB-V1<sup>VBL</sup>-Zellen und Fumitremorgin C (1,2 µM) zur BCRP-Inhibierung in den MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen verabreicht.

Thymochinon (**17**) und die Derivate **46** und **53** zeigten keine oder nur geringe Auffälligkeiten, die auf eine Ausschleusung durch die entsprechenden ABC-Transporter schließen ließ. Für **40** und **43** dagegen verstärkte sich die Effektivität nach Inhibierung von P-gp und BCRP in den Zervix- und Mammakarzinom-Zellen, was einen möglichen Einfluss dieser Transportproteine auf die Wirkung der Derivate bedeutet. Dies könnte auch den etwas erhöhten Faktor R(+/-) aus Tabelle 5-1 erklären. Anders als erwartet, verminderte sich die Wirkung von **47** durch die Zugabe der Inhibitoren; besonders drastisch war dies für die Mammakarzinom-Zellen zu verzeichnen. Möglicherweise wechselwirken die Inhibitoren mit der Testsubstanz oder führen zu einer Verminderung der Aufnahme von **47** durch die Zellen und letztlich zu einem Wirkungsverlust. An dieser Stelle muss gesagt werden, dass die verwendeten Inhibitoren zwar sehr selektiv wirken und auch stets in den Konzentrationsbereichen angewandt werden, die optimal für die gewünschte inhibierende Funktion sind; dennoch kann es immer zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen, die die Auswertung der Ergebnisse erschweren.

Wie bereits für Doxorubicin (**13**) beschrieben, kann die Ausschleusung von Wirkstoffen auch unabhängig von den ABC-Transportproteinen erfolgen, nämlich über sogenannte Glucuronid-Transporter. Die hierfür notwendige Glucuronisierung

durch UGTs kann durch den Inhibitor Propofol gehemmt werden (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität). Vergleicht man nun die IC<sub>50</sub>-Werte nach 72 h Inkubation mit und ohne Inhibitor (vgl. Tabelle A-11), so kann man auf eine eventuelle Anfälligkeit der Testsubstanzen für solche Transporter schließen. Liegt der Quotient R(+/-) unter 1, so ist ein Glucuronierung durch UGTs mit anschließender Ausschleusung der Substanz wahrscheinlich. Für keines der ausgewählten Derivate konnte dabei ein Einfluss der UGTs auf die Wirkung festgestellt werden. Interessanterweise wurde die Effektivität des DHA-Derivats **47** wiederum durch die Zugabe des Inhibitors vermindert, was die Theorie der Aufnahme dieses Derivats über bestimmte Transporter oder Carrier bekräftigt.

### 5.1.1.3 Selektivität

Wie für Doxorubicin (**13**) beschrieben, wurde auch für Thymochinon (**17**) und seine aktivsten Fettsäurederivate die Tumorselektivität überprüft. Hierbei wurden ebenfalls die Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte an nicht-malignen Fibroblasten (HF) mit denen an den 518A2 Melanom-Zellen verglichen. Die ermittelten therapeutischen Indices sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

**Tabelle 5-3:** Selektivität von Thymochinon (**17**) und seinen Derivaten **40**, **42**, **46**, **47** und **53** an Melanom-Zellen (518A2) im Vergleich zu nicht-malignen Fibroblasten (HF).

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>		TI <sup>b</sup> $\frac{\text{HF}}{518\text{A2}}$
	HF	518A2	
<b>17</b>	32,62 ± 19,96	28,33 ± 9,17	1,2
<b>40</b>	29,80 ± 9,71	22,16 ± 8,00	1,3
<b>42</b>	> 100	66,80 ± 9,32	1,5
<b>46</b>	74,56 ± 18,00	11,18 ± 4,01	6,7
<b>47</b>	5,05 ± 2,27	0,33 ± 0,10	<b>15,3</b>
<b>53</b>	> 100	23,03 ± 7,07	4,4

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten nach 72-stündiger Behandlung der HF Fibroblasten und 518A2 Melanom-Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

<sup>b</sup> Der therapeutische Index TI ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den HF Fibroblasten und den 518A2 Melanom-Zellen.

Der beste therapeutische Index wurde für das Derivat **47** erhalten. Die übrigen getesteten Derivate zeigten zwar einen verglichen mit **17** besseren TI, waren jedoch allesamt zu inaktiv.

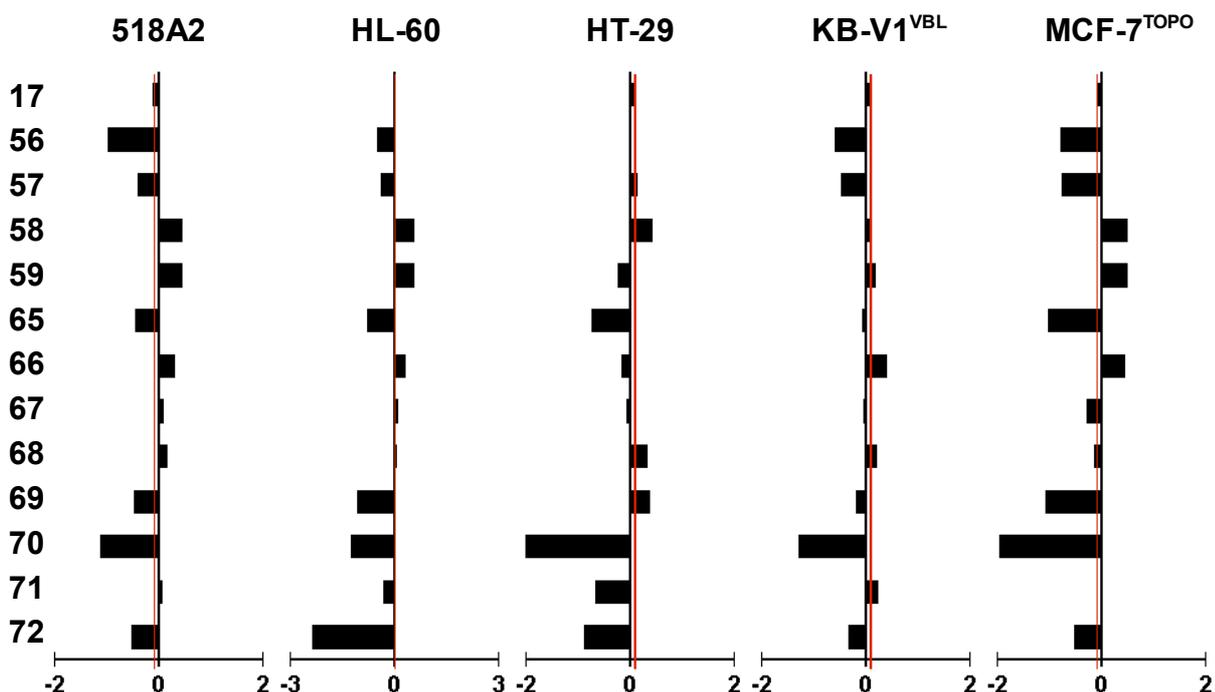
Erfreulicherweise war das DHA-Derivat **47** das aktivste dieser „ersten Serie“; die eher geringe zytotoxische Wirkung von Thymochinon (**17**) konnte durch die Derivatisierung mit der Fettsäure DHA (**73**) um den Faktor 86 gesteigert werden.

### 5.1.2 MTT-Test: Terpenderivate

#### 5.1.2.1 Effektivität

Weiterhin wurden für die Thymochinon-Terpenderivate **56-72** MTT-Tests zur Ermittlung der Wachstums-inhibierenden Funktion gegenüber den 518A2 Melanoma-, HL-60 Leukämie-, HT-29 Kolonkarzinom-, KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen durchgeführt. Die generelle Zelllinienspezifität nach Langzeitinkubation ist für **56-59** sowie **65-72** in Abbildung 5-2 dargestellt; eine ausführliche Auflistung der Ergebnisse (24-72 h) ist im Anhang in den Tabellen A-8, A-9, A-10, A-12 und A-14 zu finden (vgl. 3.3.1.1 Effektivität).

Um wiederum den Einfluss der Kettenlänge zwischen dem Thymochinon-Kern und dem Terpen-Rest zu untersuchen, wurden zunächst die (–)-Menthol-Konjugate **56-59** mit unterschiedlich langen *Spacern* getestet. Auch hierbei ergab sich eine Regelmäßigkeit; diejenigen Derivate mit den kürzeren *Spacern* (**56** und **57**) scheinen aktiver zu sein als Derivate mit längeren *Spacern* (**58** und **59**, vgl. Abbildung 5-2). Daher wurden alle übrigen Derivate fast ausschließlich in dieser Form synthetisiert. Unter den Monoterpenderivaten gleicher *Spacer*-Länge gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede, alle zeigen ein ähnliches Wirkungsspektrum (vgl. Tabellen A-8, A-9, A-10, A-12 und A-14 im Anhang). Das aktivste Konjugat dieser Gruppe ist das 6-[3-(–)-Menthoxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**56**), das außer an den resistenten HT-29 Kolonkarzinom-Zellen stets Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte im einstelligen mikro-molaren Bereich (< 10 µM) aufweist.<sup>[166]</sup>



**Abbildung 5-2:** Generelle Zelllinienspezifität von Thymochinon (**17**) und seinen Derivaten **56-59** sowie **65-72** gegen 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- sowie MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen: Zelllinienspezifische Auftragung der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte der einzelnen Derivate relativ zum Mittelwert der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte aller Derivate, negative bzw. positive Werte stehen für eine im Vergleich zum Mittelwert bessere bzw. schlechtere Wirkung der Derivate, Markierung der Wirkung von **17** (—) zur besseren Vergleichbarkeit.

Eine weitere Wirkungssteigerung konnte mit der Konjugation von kommerziell nicht erhältlichen Sesqui-, Di- und Triterpenen an das Thymochinon-Grundgerüst erzielt werden (**65-72**). Von den Sesquiterpenderivaten übertrafen gleich 3 die Wirkung der Ausgangsverbindung **17** signifikant, nämlich 6-(3-Hydroxycaryophyllen)-propyl-Thymochinon **65**, 6-(3-Germacrol)-propyl-Thymochinon **69** und 6-(3-Illudin M)-propyl-Thymochinon **70**. Letzteres trägt den Naturstoff Illudin M **74** als Rest, welcher selbst antitumorale Eigenschaften aufweist, jedoch relativ unspezifisch gegen Tumore und nicht-maligne Zellen wirkt. Durch die Konjugation von **74** an Thymochinon (**17**) konnte zwar die Toxizität von Illudin M (**74**) vermindert und der therapeutische Index verbessert werden, jedoch ist die Wirkung an den nicht-malignen Fibroblasten (HF) immer noch so hoch, dass der Einsatz als Chemotherapeutikum eher nicht infrage käme (vgl. 5.1.2.3 Selektivität).<sup>[166]</sup>

Weiterhin standen die beiden Triterpenderivate **71** und **72** zur Verfügung, wobei die Anbindung der Betulinsäure (**75**) an den Thymochinon-Grundkörper entweder über deren Säure- (**72**) oder Alkoholfunktion (**71**) erfolgte. Die Wachstums-inhibierende Wirkung scheint dabei abhängig von der Anwesenheit der freien Alkoholfunktion zu sein, was den bisherigen Aussagen zum antitumoralen Effekt der Betulinsäure (**74**) widerspricht, wonach die Säurefunktion entscheidend ist.<sup>[73-74]</sup> Mit dem Thymochinon-Betulinsäureester (**72**) konnte jedenfalls ein weiteres Derivat gefunden werden, das die Wirkung der Ausgangsverbindung Thymochinon (**17**) bei Weitem übertrifft (vgl. Abbildung 5-2). Es ist zudem mit einem Langzeit-IC<sub>50</sub>-Wert von  $0,13 \pm 0,02 \mu\text{M}$  das an den HL-60 Leukämie-Zellen beste getestete Thymochinonderivat und liegt damit im Wirkungsbereich des etablierten Chemotherapeutikums Doxorubicin (**13**,  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ). Interessanterweise ist auch **74** wie die DHA (**73**) kaum zytotoxisch gegenüber malignen Tumoren und nicht-malignen Fibroblasten (vgl. 5.1.2.3 Selektivität).

Das einzige Diterpenderivat unter den Testsubstanzen, 6-(3-Hydroxycommunsäure)-propyl-Thymochinon **68**, zeigte tendenziell eine dem Thymochinon (**17**) ähnliche Wirksamkeit. Analog zu den Betulinsäurederivaten hätte die Anbindung des Terpens auch über die Säurefunktion erfolgen können, was auch hier noch einmal zu einer Steigerung der Effektivität hätte führen können. Leider konnte dies nicht überprüft werden.

#### 5.1.2.2 MDR-Sensitivität

Für die interessantesten Terpenderivate wurde ebenfalls die MDR-Sensitivität an den mehrfachresistenten HT-29<sup>COLC</sup>-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen auf Basis des MTT-Tests untersucht (vgl. 3.3.1.2 MDR-Sensitivität). Die verwendeten IC<sub>50</sub>-Werte nach 72 h Inkubation sind in den Tabellen A-10 bis A-15 aufgeführt; die ermittelten Quotienten R(+/-) aus den IC<sub>50</sub>-Werte an den resistenten und sensitiven Zellen sind in Tabelle 5-4 zu finden. Diese sollten idealerweise bei 1 liegen, dann wäre nämlich die MDR-Sensitivität der Testsubstanzen sehr gering.

**Tabelle 5-4:** MDR-Sensitivität von Thymochinon (17) und seinen aktivsten Terpendervaten an den HT-29-, KB-V1- und MCF-7-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>		
	$\frac{\text{HT-29}^{\text{COLC}}}{\text{HT-29}}$	$\frac{\text{KB-V1}^{\text{VBL}}}{\text{KB-V1}}$	$\frac{\text{MCF-7}^{\text{TOPO}}}{\text{MCF-7}}$
<b>17</b>	1,2	1,3	1,3
<b>56</b>	0,7	0,3	0,3
<b>59</b>	1,0	1,3	<b>2,3</b>
<b>65</b>	<b>3,3</b>	1,2	0,4
<b>69</b>	0,8	1,2	0,5
<b>70</b>	<b>2,9</b>	1,2	0,9
<b>71</b>	<b>3,8</b>	1,0	0,8
<b>72</b>	<b>8,2</b>	0,6	0,4

<sup>a</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den resistenten und sensitiven Zellen.

Keines der untersuchten Thymochinon-Terpendervate zeigte eine Anfälligkeit gegenüber dem ABC-Transportprotein P-gp (vgl. Tabelle 5-4). Die höheren Terpendervate allerdings – besonders die Betulinsäurederivate **71** und **72** – schienen in den mehrfachresistenten HT-29<sup>COLC</sup> Kolonkarzinon-Zellen weniger effektiv zu sein als in den entsprechenden sensitiven Zellen. Die Betulinsäure (**75**) selbst war ebenfalls wenig wirksam gegenüber den HT-29<sup>COLC</sup> -Zellen. Aber auch gegenüber den MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinon-Zellen zeigte **75** eine gewisse MDR-Sensitivität, die jedoch für die Thymochinon-Konjugate **71** und **72** nicht mehr bestand. Die Zugabe der Inhibitoren dieser ABC-Transporter führte an diesen beiden Derivaten zudem zu einer Verminderung der Wirkung, was wiederum mit einer Wechselwirkung oder einer verringerten Aufnahme in die Zelle zu erklären ist (vgl. Tabelle 5-5).<sup>[166]</sup>

Für die (-)-Mentholderivate wurde bereits eine Abhängigkeit der Wirkung von der Länge des *Spacers* zwischen dem Thymochinon-Kern und dem (-)-Mentholrest festgestellt (vgl. 5.1.2.1 Effektivität). Eine ähnliche Abhängigkeit ergibt sich auch für die MDR-Sensitivität. Die aktiven Derivate **56** und **57** scheinen weniger von den ABC-Transportproteinen beeinflusst zu werden als die eher inaktiven Derivate **58** und **59**. So kann ein Zusammenhang zwischen der Effektivität und MDR-Sensitivität hergestellt werden.<sup>[166]</sup>

**Tabelle 5-5:** MDR-Sensitivität von Thymochinon (17) und seinen aktivsten Terpendervaten an den HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>		
	$\frac{*HT-29}{HT-29}$	$\frac{*KB-V1^{VBL}}{KB-V1}$	$\frac{*MCF-7^{TOPO}}{MCF-7}$
<b>17</b>	0,4	0,8	0,9
<b>56</b>	0,8	1,3	1,1
<b>59</b>	2,5	0,5	<b>0,2</b>
<b>65</b>	0,05	0,4	1,1
<b>69</b>	0,3	0,5	1,6
<b>70</b>	0,4	0,4	1,1
<b>71</b>	<b>3,8</b>	<b>1,7</b>	0,4
<b>72</b>	<b>5,3</b>	<b>5,2</b>	<b>4,4</b>

<sup>a</sup> Der Faktor R(+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den resistenten und sensitiven Zellen.

### 5.1.2.3 Selektivität

Weiterhin wurden die Thymochinon-Terpendervate auf ihre Tumorselektivität hin überprüft. Hierbei wurden, wie bereits erwähnt, die Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte an nicht-malignen Fibroblasten (HF) mit denen an 518A2 Melanom-Zellen verglichen. Die resultierenden therapeutischen Indices sind in Tabelle 5-6 zusammengefasst; diese sollten möglichst hoch sein.

Der beste therapeutische Index TI ergab sich für 6-[3-(–)-Menthoxycarbonyl]-propyl-Thymochinon (**56**), das aktivste unter den Monoterpenenderivaten. Für die Sesqui- und Diterpenkonjugate (**65-70**) konnte keine signifikante Verbesserung von TI gegenüber Thymochinon (**17**) festgestellt werden. Durch die Konjugation von Illudin M (**74**) an **17** konnte jedoch die hohe Toxizität von **74** gegen nicht-maligne Fibroblasten gedrosselt werden, was in einer Verbesserung von TI um den Faktor 4,5 resultierte. Andererseits ging die Tumorselektivität der Triterpensäure **75** durch Anbindung an **17** verloren; beide Betulinsäure-Derivate (**71** und **72**) wiesen einen verglichen mit **75** deutlich geringeren TI auf.

## 5 Ergebnisse und Diskussion: Thymochinon (17) und seine Derivate

**Tabelle 5-6:** Selektivität von Thymochinon (17) und seinen Derivaten **56**, **59**, **65** und **69-72** an Melanom-Zellen (518A2) im Vergleich zu nicht-malignen Fibroblasten (HF).

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>		TI <sup>b</sup> $\frac{HF}{518A2}$
	HF	518A2	
<b>17</b>	32,62 ± 19,96	28,33 ± 9,17	1,2
<b>56</b>	68,78 ± 12,38	3,90 ± 0,74	<b>17,6</b>
<b>59</b>	> 100	> 100	1,0
<b>65</b>	23,87 ± 0,93	13,09 ± 2,33	1,8
<b>69</b>	48,14 ± 14,14	12,23 ± 1,54	3,9
<b>70</b>	3,17 ± 1,68	2,87 ± 0,32	1,1
<b>71</b>	46,21 ± 5,52	53,27 ± 3,19	<b>0,9</b>
<b>72</b>	24,49 ± 8,05	11,40 ± 2,71	2,2

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten nach 72-stündiger Behandlung der HF Fibroblasten und 518A2-Melanom-Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

<sup>b</sup> Der therapeutische Index TI ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte an den HF Fibroblasten und den 518A2-Melanom-Zellen.

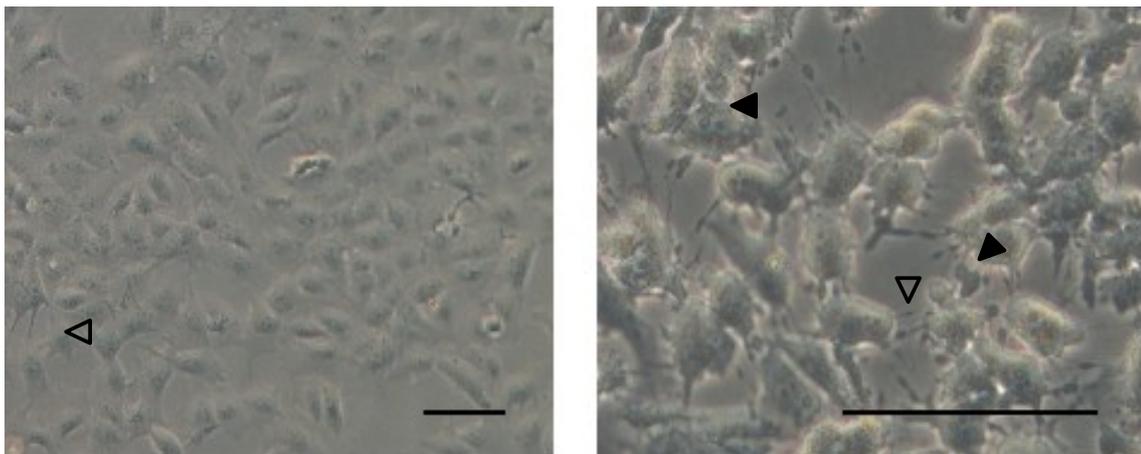
Abschließend kann gesagt werden, dass die Derivatisierung von Thymochinon (**17**) mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten, oxo-funktionalisierten und Terpen-terminierten Fettsäuren zu einer Verbesserung der Wirkung und Tumorselektivität führt. Dabei stechen 2 Konjugate besonders hervor: Sowohl das DHA-Derivat **47** als auch das (–)-Menthol-Konjugat **56** führen zu einer mehr als 12-fachen Verbesserung der Tumorselektivität gegenüber **17**. Gleichzeitig konnte die schwache antitumorale Wirkung von **17** um den Faktor 7 (**56**) bzw. 86 (**47**) gesteigert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die geringe Effektivität der länger-kettigen Derivate (z.B. **59**) auf der vermehrten Ausschleusung durch bestimmte ABC-Transportproteine beruht.

Weiterhin war eine Verminderung der Toxizität des Sesquiterpens Illudin M (**74**) durch die Konjugation an **17** möglich: Das so gewonnene Derivat **70** weist einen deutlich besseren TI als **74** auf, ohne jedoch an antitumoraler Wirksamkeit zu verlieren.

## 5.2 Nachweis von Apoptose

### 5.2.1 Morphologie

Die morphologischen Veränderungen der Zellen nach der Behandlung mit den neuen Thymochinonderivaten konnten ebenfalls mikroskopisch verfolgt werden. Jedoch war die erste sichtbare Wirkung erst weit nach 24 h Inkubation festzustellen; die einzige Ausnahme bildete das Illudin M-Konjugat **70**, das bereits nach 18 h zu den Apoptose-typischen Membranabschnürungen führte. Als Beispiel wurden mikroskopische Aufnahmen der 518A2 Melanom-Zellen gewählt, die für 24 h bzw. 48 h mit dem Thymochinon-Betulinsäure-Konjugat (**72**, Endkonzentration je 5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert worden waren (vgl. Abbildung 5-3).



**Abbildung 5-3:** Mikroskopische Aufnahme der 518A2 Melanom-Zellen nach 24- (A) bzw. 48-stündiger Inkubation (B) mit dem Thymochinon-Betulinsäureester (**72**, 5  $\mu\text{M}$ ): Zu den typischen Apoptose-bedingten, morphologischen Veränderung der behandelten Zellen zählt deren Schrumpfen sowie der Verlust von Zellverbindungen ( $\Delta$ ) und die Unterteilung der Zelle in membrangebundene Vesikel ( $\blacktriangle$ ); Axiovert 135, Achrostigmat-Objektiv 35 $\times$ .

Während kurze Inkubationszeiten (< 24 h) zu keinen bzw. nur geringen morphologischen Veränderungen führten, zeigte sich nach längeren Zeiten (> 48 h) die typischerweise auftretende Unterteilung der Zellen in membrangebundene Vesikel sowie der fast vollständige Verlust von Zell-Zell-Verbindungen (vgl. Abbildung 5-3).

## 5.2.2 DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung der zellulären DNA als zentrales Ereignis während der Apoptose wurde im Fall der Thymochinonderivate immunohistochemisch mit dem TUNEL-Test nachgewiesen (vgl. 3.4.2 DNA-Fragmentierung).

### 5.2.2.1 TUNEL-Test

Dieser Test beruht, wie bereits erwähnt, auf der Fluoreszenzmarkierung der freien 3'-OH-Gruppen der DNA-Fragmente und der anschließenden Detektion der grün fluoreszierenden Fragmente mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (vgl. 3.4.2.1 TUNEL-Test). Bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen konnte so für jedes Thymochinonderivat eine Apoptoserate bestimmt werden (vgl. Tabelle 5-7). Unter den Fettsäurederivaten zeigten nur **46** und **47** signifikante Apoptose-Induktion nach 24 h Inkubation in beiden Zelllinien. Für die übrigen Derivate, auch für Thymochinon (**17**) selbst, wurden Apoptoseraten im Bereich der Kontrolle erhalten.<sup>[163]</sup> Die getesteten Terpendervative **70-72** führten in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Apoptoserate; das bereits im MTT-Test hervorragende Betulinsäurederivat **72** schnitt an den HL-60-Zellen wiederum besser ab als **71**.

**Tabelle 5-7:** Prozentualer Anteil an apoptotischen 518A2- und HL-60-Zellen [%]<sup>a</sup> nach Inkubation mit Thymochinon **17** und seinen Derivaten **40, 42, 46** sowie **70-72**.

Testsubstanz	Apoptoserate (24 h) [%] <sup>a</sup>	
	518A2	HL-60
<b>17</b>	3.2 ± 2.1	2.1 ± 1.3
<b>40</b>	0.0 ± 0.1	2.0 ± 0.9
<b>42</b>	2.1 ± 1.9	2.1 ± 1.6
<b>46</b>	<b>9.6 ± 6.3</b>	<b>11.4 ± 6.9</b>
<b>47</b>	<b>14.2 ± 1.8</b>	<b>8.9 ± 1.1</b>
<b>70</b>	<b>22.4 ± 6.9</b>	<b>21.9 ± 13.2</b>
<b>71</b>	6.6 ± 2.2	<b>12.4 ± 3.4</b>
<b>72</b>	6.8 ± 0.7	<b>21.4 ± 7.4</b>

<sup>a</sup> Anteil apoptotischer Zellen (*TUNEL, In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (0%) nach einer 24-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5 µM). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Erwähnenswert ist, dass sowohl die Docosahexaensäure **73** als auch die Betulinsäure **75** (Ausnahme HL-60: ~ 10% Apoptose) kaum Apoptose-Induktion bewirken. Illudin M **74** selbst ist dabei sehr viel aktiver als sein Konjugat **70** und führt zu Apoptose-Raten von etwa 25% (HL-60) bis fast 40% (518A2).

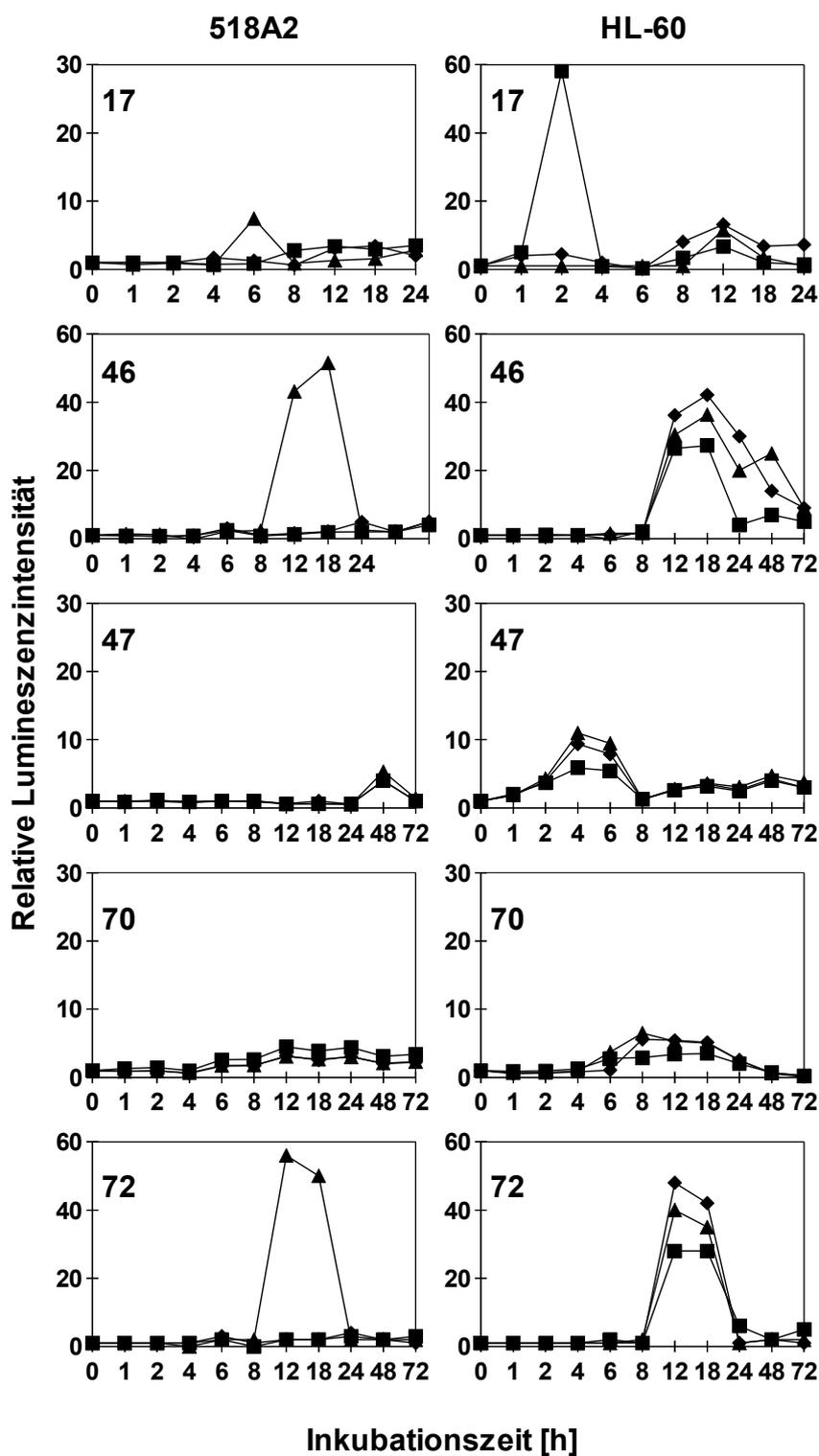
Auf die Durchführung der Gelelektrophorese wurde verzichtet, denn es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die zytotoxische, Wachstums-inhibierende Wirkung der Thymochinonderivate auf der Auslösung von Apoptose beruhte. Für Thymochinon (**17**) selbst konnte unter diesen Bedingungen keine Apoptose-Induktion festgestellt werden, es ist aber bekannt, dass höhere Konzentrationen diese auslösen.<sup>[18-19]</sup>

### 5.2.3 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten

#### 5.2.3.1 Caspase-Aktivitätstest

Auch für die Thymochinonderivate wurde die Beteiligung der Caspasen-3, -8 und -9 an der Initiation der Apoptose in den 518A2 Melanom- bzw. HL-60 Leukämie-Zellen untersucht. Es ergaben sich dabei für die verschiedenen Derivate Caspase-Kinetiken, die sich teilweise stark von den durch Thymochinon (**17**) induzierten unterschieden (vgl. Abbildung 5-4). Verglichen mit den Doxorubicinderivaten jedoch konnte eine Analogie festgestellt werden. Und zwar schien die Bcl-2-abhängige Blockade des intrinsischen, mitochondrialen Pfads der Apoptose in den 518A2-Zellen wiederum zur Hemmung der Caspase-3- bzw. -8-Aktivierung zu führen, weshalb vorwiegend die Caspase-9 als Initiator fungierte.<sup>[33-34]</sup> In den HL-60-Zellen dagegen waren zumeist alle drei Caspasen beteiligt.

Thymochinon (**17**) führte in den HL-60-Zellen zu einer frühen (> 2 h) Aktivierung der Caspase-3, gefolgt von der Rekrutierung aller Caspasen nach 12 h. Im Gegensatz dazu ergab sich für **46** und **72** ein Maximum aller Caspase-Aktivitäten zwischen 12 h und 18 h Inkubation. Die Konjugate **47** und **70** zählten zwar im MTT- und TUNEL-Test zu den aktivsten, bewirkten jedoch nur eine moderate Caspase-Aktivierung.<sup>[165]</sup>



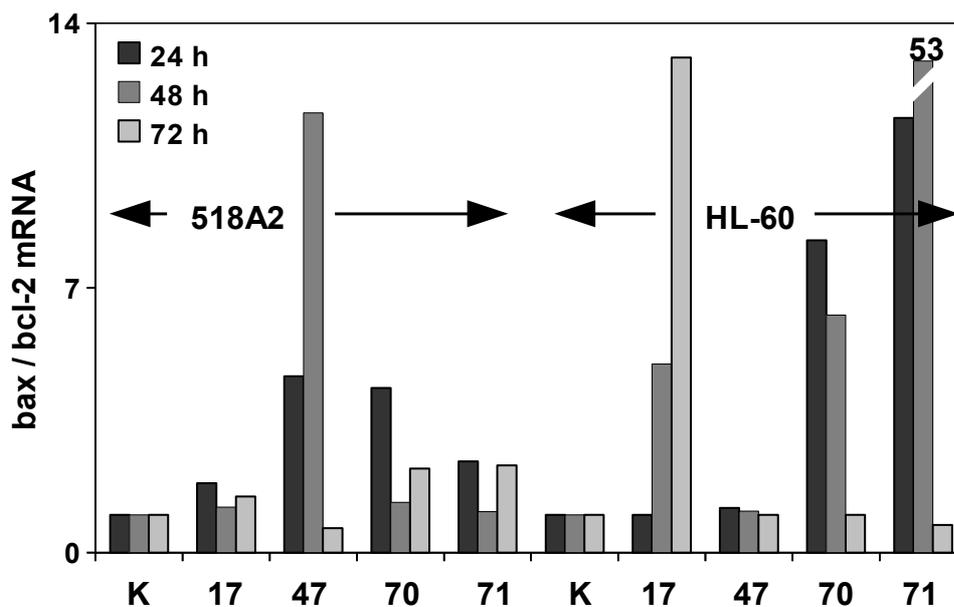
**Abbildung 5-4:** Caspase-3-, -8- und -9-Aktivität in 518A2-Zellen (links) sowie HL-60-Zellen (rechts) nach einer Inkubation mit Thymochinon (17) und seinen Derivaten 46, 47, 70 und 72: Verwendung der luminometrischen Assays Caspase-Glo 3/7, 8 und 9; Darstellung der Aktivitäten der Caspasen-3/7 (■), -8 (◆) und -9 (▲) und als relative Lumineszenzintensitäten. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

In den 518A2-Zellen führte die Inkubation mit Thymochinon (17) und den Derivaten 46 und 72 zu einer Aktivierung der Caspase-9 nach 6 h bzw. 12 h. Die Konjugate 47 und 70 bewirkten wiederum nur eine geringe Aktivierung aller Caspasen.<sup>[165]</sup>

#### 5.2.4 Apoptose-Regulationsproteinen: Bcl-2, Bax und Bid

##### 5.2.4.1 Quantitative *real time*-PCR

Weiterhin wurden für Thymochinon (17) und seine aktivsten Derivate 47, 70 und 72 die Apoptose-relevanten Verhältnisse der bax- zu bcl-2-mRNA in den Zelllinien 518A2 und HL-60 berechnet (vgl. Abbildung 5-5). Die hierfür verwendeten Daten sind im Anhang in den Tabellen A-22 bis A-24 zu finden.



**Abbildung 5-5:** bax / bcl-2 mRNA- Expression in 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubation (5 µM) mit Thymochinon (17) und seinen Derivaten 47, 70 und 72. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

In den HL-60-Zellen führten alle Thymochinonderivate bis auf das DHA-Derivat 47 zu einem pro-apoptotischen Verhältnis der bax- zu bcl-2-mRNA. Für 47 waren die Messpunkte offenbar nicht günstig gewählt, denn die Caspase-3-, -8- und -9-Aktivierung erfolgte viel früher (< 6 h, vgl. Abbildung 5-4, 5.2.3.1 Caspase-Aktivitäts-

bestimmung). In Bezug auf die Bcl-2-überexprimierenden 518A2-Zellen konnte sowohl für Thymochinon (**17**) als auch für die Derivate **47**, **70** und **72** eine Repression der bcl-2-mRNA-Expression und ein damit verbundener Anstieg im Apoptose-relevanten Verhältnis der bax- zu bcl-2-mRNA verzeichnet werden; am deutlichsten war dies für Derivat **47** festzustellen.<sup>[33-34]</sup>

Die Ergebnisse aus der quantitativen *real time*-PCR passen somit sehr gut zu den bisherigen Ergebnissen zur Wachstums-inhibierenden (MTT-Test) und Apoptose-induzierenden Wirkung (TUNEL-Test, Caspase-Aktivitätsbestimmung) der Thymochinonderivate.

#### 5.2.5 Mitochondrienmembranpotential

Außerdem wurde das Kollabieren des Mitochondrienmembranpotentials  $\Delta\Psi$  in mit Thymochinonderivaten behandelten 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 **84** und unter Verwendung eines Fluoreszenz-Plattenreaders untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in der folgenden Tabelle 5-8 aufgelistet.

Sowohl in den HL-60 Leukämie-Zellen als auch in den 518A2 Melanom-Zellen konnte auch nach 72-stündiger Inkubation nur eine geringe Abnahme der intakten Mitochondrien festgestellt werden. Für die Konjugate **47** und **70** wurden die besten Ergebnisse in den Melanom-Zellen erzielt; die Behandlung dieser mit **47** führte zu einem fast 25%-igen Verlust der intakten Mitochondrien, die Inkubation mit **70** sogar zu einem 55%-igen Verlust. Zudem ergab sich besonders für diese Derivate eine starke Abnahme der bcl-2-mRNA-Expression und somit eine Möglichkeit, die Bcl-2-gerichtete Blockade des mitochondrialen Apoptose-Pfads in den 518A2-Zellen zu umgehen (vgl. 5.2.4.1 Quantitative *real time*-PCR).<sup>[33-34,165-166]</sup> In den Leukämie-Zellen bewirkte die 72-stündige Behandlung mit den (–)-Mentholderivaten **56** und **59** sowie dem Illudin M-Konjugat **70** eine Abnahme der intakten Mitochondrien um nur etwa 30%. Dies zeigte deutlich, dass die Initiation der Apoptose nicht zwingend mit der Abnahme des Mitochondrienmembranpotentials  $\Delta\Psi$  einhergehen muss.<sup>[167]</sup>

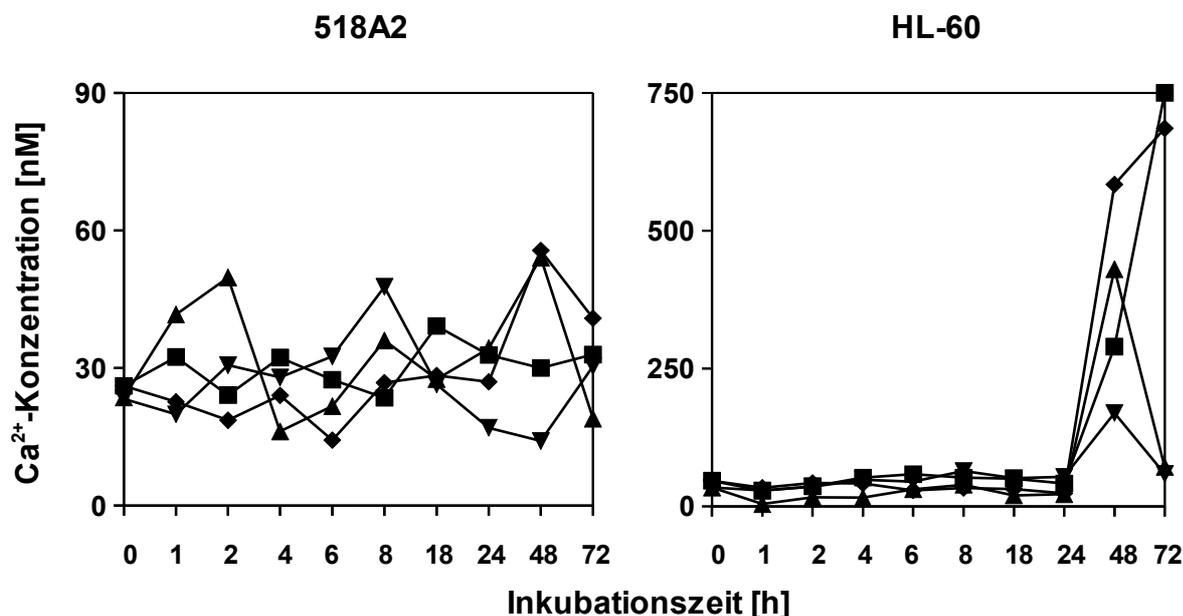
**Tabelle 5-8:** Prozentualer Anteil intakter Mitochondrien [%]<sup>a</sup> in 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach der Inkubation mit Thymochinonderivaten.

Testsubstanz	Intakte Mitochondrien [%] <sup>a</sup>			
	518A2		HL-60	
	24 h	72 h	24 h	72 h
<b>17</b>	99.8 ± 6.3	94.6 ± 7.0	82.6 ± 6.1	82.5 ± 4.9
<b>40</b>	94.3 ± 5.1	92.5 ± 11.3	101.0 ± 7.0	96.0 ± 12.2
<b>42</b>	106.0 ± 9.5	96.7 ± 9.6	105.7 ± 5.2	101.1 ± 7.1
<b>46</b>	90.0 ± 6.6	87.4 ± 13.4	86.1 ± 9.8	89.0 ± 13.3
<b>47</b>	79.6 ± 1.8	<b>76.3 ± 22.9</b>	95.4 ± 4.4	85.1 ± 14.3
<b>52</b>	88.7 ± 5.7	91.9 ± 6.1	98.2 ± 6.3	98.9 ± 8.0
<b>56</b>	105.7 ± 13.1	92.6 ± 12.1	123.8 ± 36.0	<b>76.9 ± 9.8</b>
<b>59</b>	106.9 ± 11.0	94.2 ± 1.9	91.8 ± 17.5	<b>70.1 ± 10.6</b>
<b>65</b>	92.0 ± 17.9	95.7 ± 3.6	116.7 ± 46.2	86.7 ± 5.2
<b>66</b>	108.3 ± 1.4	100.0 ± 1.2	84.9 ± 1.1	95.1 ± 1.8
<b>69</b>	91.7 ± 14.2	98.1 ± 1.6	93.2 ± 21.8	87.5 ± 12.4
<b>70</b>	72.7 ± 4.3	<b>54.0 ± 11.0</b>	94.2 ± 1.2	<b>68.7 ± 25.5</b>
<b>71</b>	116.8 ± 1.9	88.5 ± 1.6	103.5 ± 11.5	99.1 ± 3.0
<b>72</b>	100.6 ± 9.0	97.9 ± 2.9	126.0 ± 3.1	131.4 ± 6.2

<sup>a</sup> Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz des Farbstoffs JC-1 (*Mitochondrial Membrane Detection Kit*, Stratagene) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (100%) nach einer 24- und 72-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5 µM). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

### 5.2.6 Calciumkonzentrationsbestimmung

Schließlich wurde auch der Einfluss der Thymochinonderivate auf die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase der 518A2- ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>Ruhe</sub> = 20-30 nM) bzw. HL-60-Zellen ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>Ruhe</sub> = 30-40 nM) untersucht. Der Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsverlauf für die Derivate **17**, **47**, **70** und **72** ist in Abbildung 5-6 dargestellt, die übrigen Ergebnisse sind in den Tabellen A-25 und A-26 zu finden. Wie bei den Doxorubicinderivaten zeigten auch die Thymochinonderivate keinerlei Einfluss auf den Calcium-Haushalt der Melanom-Zellen. Für die Leukämie-Zellen dagegen ergaben sich deutliche Ca<sup>2+</sup>-Signale nach längerer Behandlung (> 48 h) mit den Derivaten **17**, **47**, **70** und **72**. Die Intensität der Signale war dabei sehr viel stärker als für die Doxorubicinderivate. Ein ähnlicher Einfluss auf den Calcium-Haushalt wurde von Florian Lang et al. für den Thymochinon-bedingten Zelltod in Erythrozyten beschrieben.<sup>[168]</sup>



**Abbildung 5-6:** Verlauf der Calciumkonzentration in 518A2-Zellen (links) sowie HL-60-Zellen (rechts) nach einer Inkubation mit Thymochinon (17, ■) und seinen Derivaten 47 (◆), 70 (▲) und 72 (▼). Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle aktiven Thymochinonderivate (vgl. 5.1.1 MTT-Test) sowohl in den HL-60- als auch in den 518A2-Zellen zu einer Initiation der Apoptose führen. Der Nachweis erfolgte wiederum über die Fragmentierung der DNA, die Aktivierung relevanter Caspasen und Regulationsproteine und die Veränderungen im Mitochondrienmembranpotenzial sowie im Calcium-Haushalt. Um den Wirkmechanismus der Thymochinonderivate noch mehr einzugrenzen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

### 5.2.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen

Thymochinon (17) ist schon seit längerer Zeit als Radikalfänger bekannt; diverse Studien bestätigten die anti-oxidative Wirkung der Thymochinon-reichen Fraktion von *Nigella sativa*.<sup>[16,62,169-170]</sup> Seit kurzem allerdings wird auch immer wieder die pro-oxidative Wirkung von 17 beschrieben.<sup>[171-172]</sup> Daher sollte für ausgewählte Thymochinonderivate überprüft werden, ob es im Verlauf der Wachstums-Inhibierung und Apoptose-Initiation zu einer Generierung von Sauerstoffradikalen kommt.

## 5.2.7.1 NBT-Test

Das DHA-Thymochinon **47** (5  $\mu\text{M}$ ) bewirkte nach einer Langzeit-Inkubation von 72 h die mit Abstand größte ROS-Produktion in den 518A2 Melanom-Zellen (vgl. Tabelle 5-9). Kein anderes Thymochinonderivat erzielte einen solchen Effekt.<sup>[165]</sup> Der Naturstoff Illudin M (**74**), der als Seitenkette für Konjugat **70** diente, führte unter den gleichen Bedingungen zu einer Generierung von etwa 10% ROS – was in weiteren Studien bestätigt wurde.<sup>[173]</sup> Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Verwendung höherer Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ , 24 h); hierbei wurde jedoch auch eine ROS-Produktion von etwa 5% für Thymochinon (**17**) selbst ermittelt.

**Tabelle 5-9:** Prozentuale ROS-Produktion [%]<sup>a</sup> in 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Thymochinonderivaten.

Testsubstanz	ROS-Produktion [%] <sup>a</sup>			
	518A2		HL-60	
	24 h	72 h	24 h	72 h
<b>17</b>	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<b>40</b>	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0
<b>42</b>	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,7	1,0 ± 0,1
<b>46</b>	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0
<b>47</b>	4,5 ± 0,5	<b>22,0 ± 0,4</b>	3,6 ± 0,3	<b>4,4 ± 0,3</b>
<b>53</b>	0,9 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<b>56</b>	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	2,3 ± 1,1
<b>59</b>	1,3 ± 0,6	0,7 ± 0,1	2,2 ± 0,6	1,0 ± 0,0
<b>65</b>	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,4	2,0 ± 0,8	3,4 ± 1,7
<b>66</b>	1,8 ± 0,9	0,9 ± 0,1	6,8 ± 1,3	0,7 ± 0,0
<b>69</b>	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,6 ± 1,5
<b>70</b>	2,1 ± 0,4	1,6 ± 0,5	2,7 ± 1,0	<b>8,0 ± 0,2</b>
<b>71</b>	3,7 ± 1,1	0,8 ± 0,0	4,8 ± 0,5	1,9 ± 0,6
<b>72</b>	1,3 ± 0,6	0,7 ± 0,4	2,0 ± 0,5	<b>6,8 ± 0,9</b>

<sup>a</sup> Prozentuale ROS-Produktion (NBT-Reduktion) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (1%) nach einer 24- und 72-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5  $\mu\text{M}$ ). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

In den HL-60 Leukämie-Zellen führten vor allem die Derivate **47**, **70** und **72** sowohl unter klinisch relevanten (5  $\mu\text{M}$ ) als auch supra-klinischen Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ )

zu einer erhöhten ROS-Produktion nach Langzeit-Inkubation von 72 h. Interessanterweise waren es genau diejenigen Derivate, die auch im MTT-Test zu den aktivsten zählten. Die ROS-Produktion schien an der Wachstums-Inhibierung bzw. Apoptose-Initiation durch die Derivate beteiligt zu sein. Zur genaueren Überprüfung wurden MTT-Tests unter Verwendung des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein durchgeführt.

#### 5.2.7.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein

Es zeigte sich für einige Testsubstanzen ein Rückgang der Wachstums-Inhibierung um 6-17% (**17**, **47**, **74**, 50  $\mu$ M, 72 h) an den 518A2-Zellen sowie um 7-10% (**72**, **74**, **75**, 5  $\mu$ M, 72 h) bzw. um fast 15% (**47**, 50  $\mu$ M, 72 h) für die HL-60-Zellen (vgl. Tabelle A-34 und A-35 im Anhang). Dies bestätigte die Korrelation zwischen der Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen und der Wachstums-Inhibierung durch die Derivate.

#### 5.2.7.3 Involvierung redox-sensitiver Kinasen

Weiterhin wurde die Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirkung ausgewählter Thymochinonederivate mittels MTT-Test unter der Verwendung geeigneter Inhibitoren untersucht. Die  $IC_{50}$  (72 h)-Werte dazu sind im Anhang aufgelistet (vgl. Tabelle A-36 bis A-38); die Faktoren  $R (+/-)$  für die 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen sind in den folgenden Tabellen 5-10 bis 5-12 zu finden.

In den 518A2 Melanom-Zellen scheint die Wachstums-Inhibierung durch das Betulin-säurekonjugat **72** über die redox-sensitiven Kinasen ERK und p38-MAPK zu verlaufen; es konnte hierfür eine deutliche Abnahme der  $IC_{50}$ -Werte nach der Inhibierung dieser beiden MAP-Kinasen erhalten werden ( $R (+/-) > 1$ , vgl. Tabelle 5-10). Für das Illudin M-Konjugat **70** jedoch waren Quotienten  $R (+/-) < 1$  zu verzeichnen, was eher auf eine Schutzfunktion der MAP-Kinasen hindeutet. Zudem wurde an dieser Zelllinie für keines der Derivate eine Abhängigkeit von der Proteinkinase C festgestellt.

**Tabelle 5-10:** Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirksamkeit ausgewählter Thymochinonderivate in 518A2 Melanom-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>			
	<sup>+518A2</sup> 518A2	<sup>++518A2</sup> 518A2	<sup>+++518A2</sup> 518A2	<sup>++++518A2</sup> 518A2
<b>17</b>	1,1	0,5	0,8	1,1
<b>47</b>	1,4	2,0	1,1	1,7
<b>70</b>	0,5	0,3	0,3	0,3
<b>72</b>	<b>8,2</b>	0,3	<b>2,4</b>	1,2

<sup>a</sup> Der Faktor R (+/-) ergibt sich aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte mit und ohne Inhibitorzugabe.

\* 50 µM PD 98059 wurden zur Inhibierung der ERK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\* 20 µM SP 600125 wurden zur Inhibierung der JNK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\*\* 10 µM SB 202190 wurden zur Inhibierung der p38-MAPK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\*\*\* 50 nM PKC 412 wurden zur Inhibierung der PKC 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

Im Fall der HL-60 Leukämie-Zellen scheint die Wirkung aller Thymochinonderivate mehr oder weniger von redox-sensitiven Kinasen abzuhängen: Es wurden deutliche Effekte sowohl nach der Inhibierung der MAP-Kinasen ERK (bei **72**), JNK (bei **70** und **72**) und p38-MAPK (bei **47** und **72**) als auch nach Proteinkinase C-Inhibierung (bei **47**, **70** und **72**) beobachtet (vgl. Tabelle 5-11). Thymochinon (**17**) selbst zeigte keine signifikante Abhängigkeit von diesen Kinasen, was wiederum sehr gut zu den Ergebnissen von Florian Lang et al. passt, die eher eine PKC-Inhibierung durch **17** feststellten als deren Aktivierung.<sup>[168]</sup>

**Tabelle 5-11:** Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirksamkeit ausgewählter Thymochinonderivate in HL-60 Leukämie-Zellen.

	R (+/-) <sup>a</sup>			
	<sup>+HL-60</sup> HL-60	<sup>++HL-60</sup> HL-60	<sup>+++HL-60</sup> HL-60	<sup>++++HL-60</sup> HL-60
<b>17</b>	2,2	2,2	0,7	2,6
<b>47</b>	0,6	2,4	<b>8,1</b>	<b>8,5</b>
<b>70</b>	1,2	<b>7,3</b>	1,1	<b>51,6</b>
<b>72</b>	<b>22,6</b>	<b>46,7</b>	<b>3,0</b>	<b>769,2</b>

<sup>a</sup> Siehe Tabelle 5-10.

Die Arbeiten von Nahed El-Najjar et al. zeigen, dass die Apoptose-Initiation durch Thymochinon (**17**, 40 µM, 24 h) in HCT-116 Kolonkarzinom-Zellen u.a. durch die

Bildung von ROS und die Aktivierung der redox-sensitiven MAP-Kinasen ERK und JNK vermittelt wird.<sup>[171]</sup> Dies konnte für die HT-29 Kolonkarzinom-Zellen unter den verwendeten Bedingungen (5 µM, 72 h) allerdings nicht festgestellt werden; die MAP-Kinasen scheinen eher eine Schutzfunktion zu übernehmen (vgl. Tabelle 5-12). Es ist jedoch möglich, dass es bei höheren Konzentrationen an Thymochinon (**17**) zum Überschreiten der ROS-Schwellwert-Konzentration und somit zur Beteiligung dieser Kinasen an der Apoptose-Initiation kommt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Derivate **70** und **72** erzielt. Für das DHA-Thymochinon **47** dagegen schienen die MAP-Kinasen ERK und p38-MAPK an der Initiation der Apoptose beteiligt zu sein (R (+/-) > 1). Außerdem zeigten die Derivate **47** und **70** (außer das Betulinsäure-Konjugat **74**) eine Abhängigkeit von der Proteinkinase C.

**Tabelle 5-12:** Beteiligung redox-sensitiver Kinasen an der Wirksamkeit ausgewählter Thymochinonderivate in HT-29 Kolonkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	R (+/-) <sup>a</sup>			
	<sup>+</sup> HT-29 HT-29	<sup>++</sup> HT-29 HT-29	<sup>+++</sup> HT-29 HT-29	<sup>++++</sup> HT-29 HT-29
<b>17</b>	0,6	0,3	0,9	2,1
<b>47</b>	<b>6,9</b>	0,1	<b>5,0</b>	<b>81,7</b>
<b>70</b>	0,06	0,4	1,3	<b>10,7</b>
<b>72</b>	0,1	0,2	0,2	1,1

<sup>a</sup> Siehe Tabelle 5-10.

### 5.2.8 Nachweis von Ceramid-Bildung

Analog zu den Doxorubicinderivaten wurde auch für die Thymochinonderivate überprüft, ob die Generierung von ROS möglicherweise mit der Bildung von Ceramiden verbunden ist (vgl. 3.4.7 Nachweis von Sauerstoffradikalen). Es konnte jedoch weder für die Melanom- noch für die Leukämie-Zellen ein signifikanter Anstieg des Ceramid-Levels festgestellt werden (vgl. Tabelle 5-13). Daher wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die Daten der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Florian Lang und Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Föller, die ebenfalls die Beteiligung von Ceramiden am Thymochinon-bedingten Zelltod in Erythrozyten ausschlossen.<sup>[168]</sup>

**Tabelle 5-13:** Ceramid-Produktion [%]<sup>a</sup> der 518A2- bzw. HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit ausgewählten Thymochinonderivaten.

Testsubstanz	Ceramid-Produktion (24 h) [%] <sup>a</sup>	
	518A2	HL-60
<b>17</b>	1,1	2,1
<b>46</b>	0,8	0,4
<b>47</b>	1,2	0,5
<b>56</b>	0,8	0,3
<b>65</b>	1,1	0,3
<b>70</b>	0,9	0,4
<b>72</b>	0,6	0,4

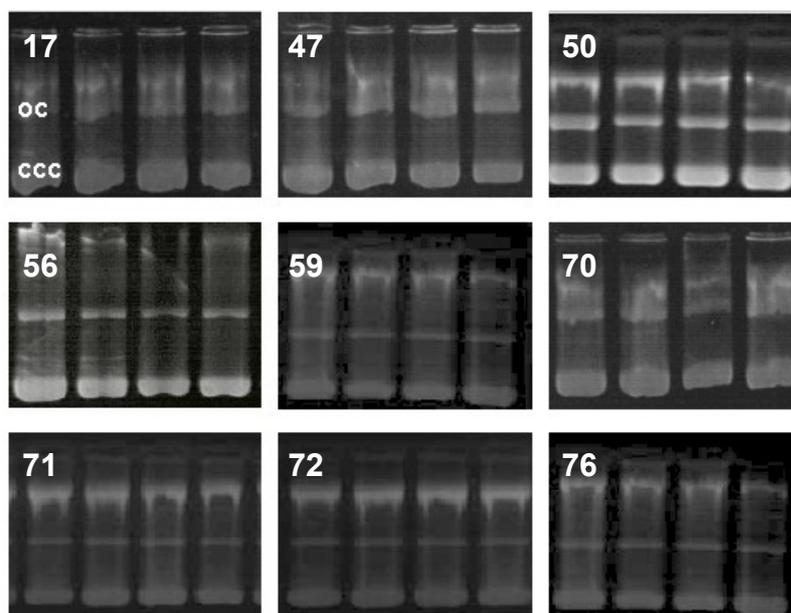
<sup>a</sup> Nachweis mittels Ceramid-Antikörper, neg. Kontrolle 1% (unbehandelte 518A2- bzw. HL-60-Zellen), pos. Kontrolle 6.8% (Erythrozyten + 50 µg/ml Methyl dopa), durch Prof. Dr. med. F. Lang und Dr. med. Dr. rer. nat. M. Föller, Institut für Physiologie, Universität Tübingen, gemessen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Thymochinon (**17**) und seine Derivate auf klassischen (intrinsisch, extrinsisch) und alternativen Wegen (ROS) zu einer Initiation der Apoptose führen. Dabei ist jedoch die Beteiligung von Ceramiden auszuschließen.

### 5.3 Wechselwirkung mit der DNA: Bandenretardationstest

Es sind keinerlei Studien bekannt, die die zelluläre DNA als *Target* von Thymochinon (**17**) belegen, dennoch wurde die DNA-Bindefähigkeit ausgewählter Thymochinonderivate mithilfe von Bandenretardationstests überprüft.

Abbildung 5-7 verdeutlicht sehr schön, dass weder Thymochinon (**17**) noch eines seiner Derivate eine Topologie-verändernde Wechselwirkung mit der DNA eingingen. Eine Bindung oder Interkalation in die vorwiegend vorliegende überspiralisierte ccc-Form der verwendeten Plasmid-DNA hätte eine Aufwindung der DNA, also eine Entspiralisierung und somit eine Abnahme der elektrophoretischen Mobilität bedeutet; dies war jedoch nicht der Fall.



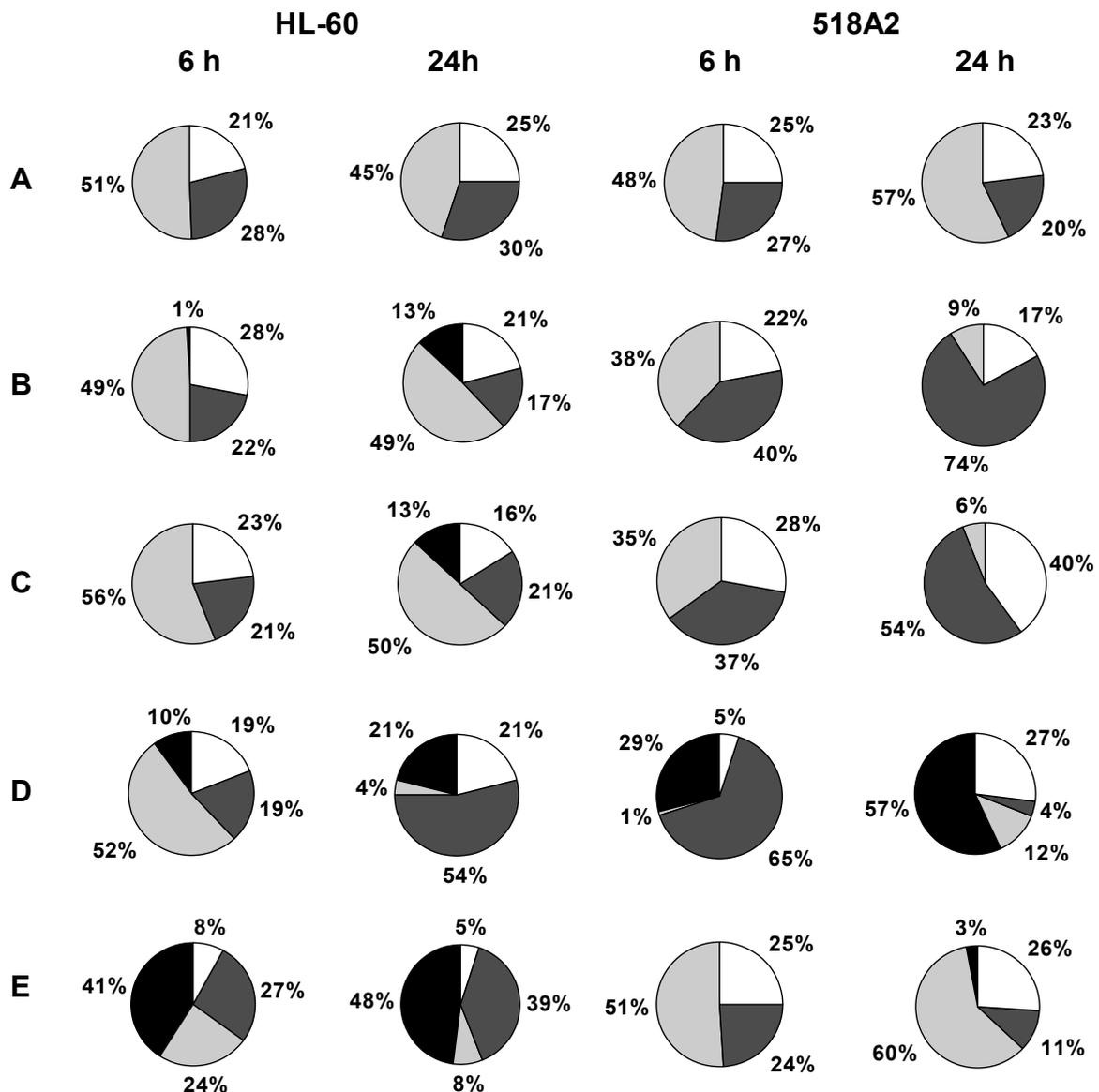
**Abbildung 5-7:** Verhalten der elektrophoretischen Mobilität von pBR322-Plasmid-DNA nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen **17**, **47**, **50**, **56**, **59**, **70**, **71**, **72** und **76** (oc = open circular DNA form, ccc = covalently closed circular DNA form). Konzentrationen: Bahn 1 (links): 0 µM, Bahn 2: 5 µM, Bahn 3: 10 µM, Bahn 4: 25 µM. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

### 5.4 Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklus-Analysen für Thymochinon (**17**) und seine Derivate **47**, **70** und **72** wurden – wie bereits für Doxorubicin (**13**) beschrieben – ausgewertet (vgl. 4.4 Zellzyklus-Analyse). Abbildung 5-8 zeigt für jedes Derivat die Verteilung der HL-60- bzw. 518A2-Zellen innerhalb des Zellzyklus; die zugehörigen Histogramme dazu sind im Anhang aufgeführt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde auch hier der Anteil der apoptotischen Zellen in der Kontrolle auf 0% gesetzt und bei der Berechnung der Zellzyklus-Verteilung der Thymochinonderivate berücksichtigt.

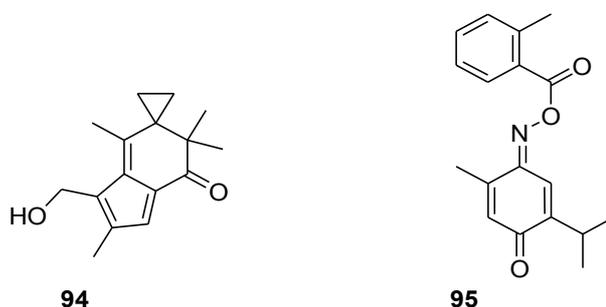
Thymochinon (**17**) und seine Derivate **47** und **70** bewirkten in den 518A2 Melanom-Zellen bereits nach kurzen Inkubationszeiten (6 h) einen Zellzyklus-Arrest während der S-Phase bzw. am S-G2-Übergang (**47**, vgl. Abbildung 5-8). Ein S-Phase-Arrest wurde für **70** auch an den HL-60 Leukämie-Zellen (24 h) beobachtet. Weiterhin konnte die Initiation der Apoptose festgestellt werden: Während **17** und **47** nur geringfügig zu einer Auslösung von Apoptose führten (13%, HL-60, 24 h), war für die Derivate **70** und **72** deutlich Apoptose zu verzeichnen (**70**: 57%, 518A2, 24 h; **72**:

48%, HL-60, 24 h). Dies bestätigt teilweise die Ergebnisse des TUNEL-Tests, wonach die Terpendervative **70** und **72** nach 24 h Inkubation in den HL-60- und 518A2-Zellen zu deutlich mehr Apoptose führten als das Fettsäurederivat **47** sowie **17** selbst (vgl. 5.2.2 DNA-Fragmentierung). Auch im TUNEL-Test ergaben sich für **72** deutliche Unterschiede in den Apoptose-Raten der HL-60- und 518A2-Zellen, nicht jedoch für **47** und **70**. Die Ergebnisse beider Tests stimmen also nur bedingt überein.



**Abbildung 5-8:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter HL-60- (links) bzw. 518A2-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Behandlung mit Thymochinon (**17**, B) und seinen Derivaten **47** (C), **70** (D) und **72** (E) (jeweils 5 µM, Kontrolle = A), wobei die Sektoren die prozentuale Auftragung der Zellzyklus-Phasen kennzeichnen: SubG1 ■, G0 bzw. G1 □, S ■ und G2 bzw. M □.

Für Irofulven (**94**), ein Illudin M-Analogon, ist seit längerer Zeit bekannt, dass es zu DNA-Läsionen führt, die zur Blockierung der Replikation führen.<sup>[174]</sup> Die Arretierung der Zellen in der S-Phase bei der Behandlung mit **70** könnte einem solchen Effekt zugrunde liegen. Kaum zu erklären ist jedoch der S-Phase-Arrest nach der Behandlung mit **17**: Es wurden zwar von der Arbeitsgruppe um Dr. Thorsten Berg einige Untersuchungen zur Inhibierung bestimmter Zellzyklus-Regulatoren wie etwa der Polo-like Kinasen (Plk 1-3) angestellt, ein Arrest in der S-Phase lässt sich dadurch jedoch nicht erklären (vgl. Tabelle A-27). Thymochinon (**17**) scheint dabei sehr unspezifisch die verschiedenen Kinasen zu inhibieren.<sup>[175]</sup> Anders ist dies bei Poloxin (**95**); durch die Einführung der Seitenkette wurde die Spezifität für die Plk 1 erhöht. Ähnliche Erfolge konnten auch für die hier verwendeten Derivate erzielt werden. Das Fettsäure-Konjugat **46** z.B. zeigt eine selektive inhibierende Wirkung gegen Plk 2. Weniger spezifisch ist dagegen die Wirkung von **47** und **70**; hier scheinen wie für **17** sämtliche getesteten Zellzyklus-Regulatoren inhibiert zu werden.



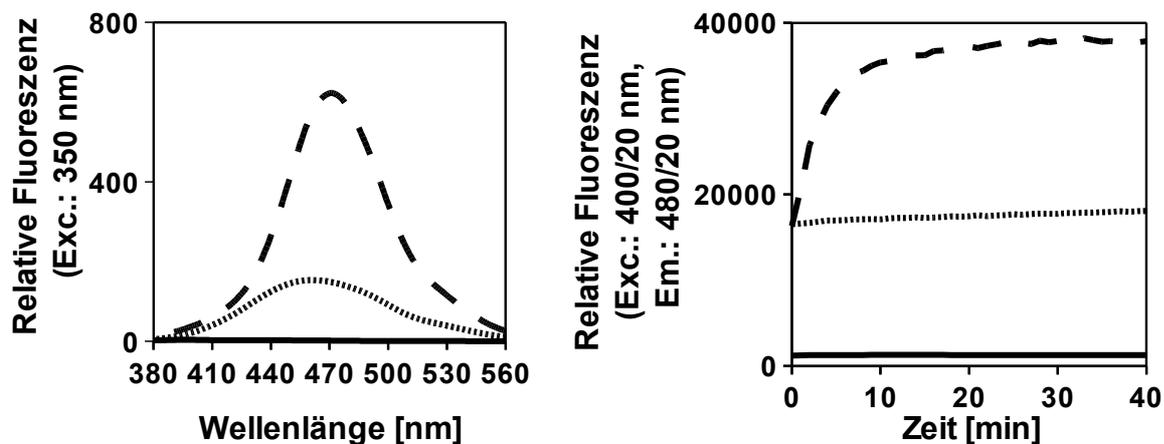
**Abbildung 5-9:** Struktur des Illudin M-Analogons Irofulven (**94**) sowie des Thymochinonderivates Poloxin (**95**).

### 5.5 Zelluläre Aufnahme und Verteilung: Markierung und Visualisierung

Anders als bei Doxorubicin (**13**) konnte für die Visualisierung der intrazellulären Verteilung von Thymochinon (**17**) keine intrinsische Fluoreszenz genutzt werden. Daher wurde zunächst auf eine Biotin-Markierung zurückgegriffen, die mithilfe des Streptavidin-Biotin-Systems eine Lokalisation ermöglichen sollte.<sup>[145]</sup> Das Biotin-Thymochinon **76** schien dabei im Zellkern der PtK<sub>2</sub>-Zellen zu akkumulieren (Dr. Randi Diestel).<sup>[146]</sup> Aufgrund der vielseitigen biologischen Eigenschaften von Biotin kam es allerdings zu starken Hintergrund-Färbungen (z.B. in den Mitochondrien), weshalb

das Streptavidin-Biotin-System in diesem Fall nicht das Mittel der Wahl darstellte.<sup>[145]</sup> Zudem konnte die Lokalisation von **76** aufgrund der Beteiligung von Biotin an der Histon-Modifikation nicht eindeutig dem Thymochinon-Grundkörper zugeordnet werden.<sup>[147]</sup> Daher wurde die *in vitro* „Klick-Reaktion“ herangezogen, um die Visualisierung von Thymochinon-Alkinen, die dem Thymochinon (**13**) in Gestalt und Wirkung recht ähnlich sind, zu ermöglichen und um eine Verbesserung zum Streptavidin-Biotin-System zu erzielen.

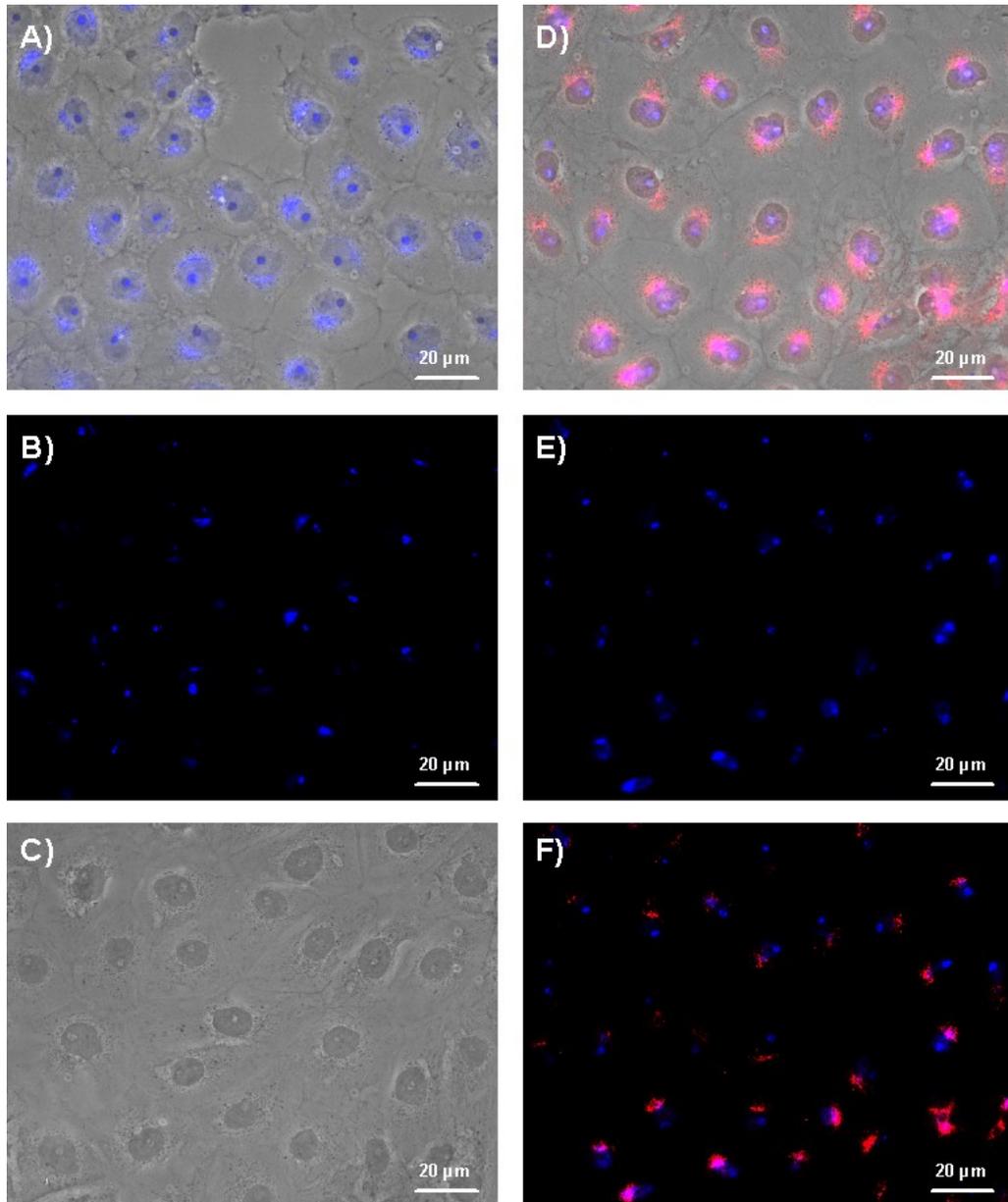
Die Kupfer-(I)-katalysierte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition wurde eigentlich entwickelt, um Proteine *in vivo* zu lokalisieren. Für niedermolekulare Verbindungen wie etwa dem Thymochinon (**17**) bietet sich diese Methode jedoch auch zu deren Visualisierung in Zellen und Gewebeproben an (vgl. 3.6.2.1 Markierung und Visualisierung).<sup>[176-180]</sup> Zunächst wurde die „Klick-Reaktion“ in einem Zell-freien Ansatz durchgeführt: Dafür wurden jeweils 5  $\mu\text{M}$  der Thymochinon-Alkine **77** und **78** sowie der Cumarinazide **79**, **80** und **81** mit 1 mM Natriumascorbat und 500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  in PBS-Puffer unterschiedlich lang bei RT und im Dunkeln inkubiert; anschließend erfolgte die Messung der Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Als Beispiel wurde das Fluoreszenzspektrum des Produktes der „Klick-Reaktion“ von 6-Dec-9-ynyl-Thymochinon (**78**) und 7-Hydroxycumarinazid (**79**) dargestellt. Um eine möglichst vollständige Cycloaddition zu ermöglichen, wurde dabei ein Gemisch aus je 5  $\mu\text{M}$  **78** und **79**, 1 mM Natriumascorbat und 500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  für 30 min bei RT inkubiert (vgl. Abbildung 5-10, A). Das Absorptionsmaximum des Kopplungsproduktes lag zwischen 250 nm und 350 nm; das Emissionsfeld reichte von 400 nm bis 550 nm. Dagegen zeigte das Thymochinon-Alkin **78** keinerlei bzw. das Cumarinazid **79** nur geringe Fluoreszenz unter diesen Bedingungen. Abbildung 5-10 (B) veranschaulicht zudem sehr schön die Zeit-Abhängigkeit der „Klick-Reaktion“: Während sich für die Edukte **78** und **79** in dieser Zeit keine Veränderung in der Fluoreszenzintensität ergab, zeigte sich für den Cycloadditions-Ansatz (**78** + **79**) innerhalb der ersten 10 min ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität; nach etwa 20-30 min wurde ein Fluoreszenz-Plateau erreicht.



**Abbildung 5-10:** Fluoreszenzspektren (A) bzw. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz (B) von 6-Dec-9-ynyl-Thymochinon (**78**, —) und 7-Hydroxycumarinazid (**79**, .....), sowie dem Produkt der „Klick-Reaktion“ (**93**, - - -); jeweils 5  $\mu\text{M}$  in Click-iT Cell Reaction Buffer (RT, für A: 30 min); A) die Anregung der Proben erfolgte jeweils bei 350 nm (Absorptionsmaximum für **93**), das Emissionsfeld reichte von 400 nm bis 550 nm (Fluoreszenzspektrophotometer SFM25); B) die Anregung der Proben erfolgte jeweils bei 400 / 20 nm, die Emission wurde bei 480 / 20 nm gemessen (Fluoreszenz-Plattenreader Tecan *Infinite* F200). Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Diese Bedingungen wurden schließlich für die Visualisierung der Thymochinonderivate **77** und **78** in den nicht-malignen PtK<sub>2</sub> Beutlratten-Nierenzellen herangezogen (vgl. 5.5.2 Markierung und Visualisierung, Abbildung 5-11). Für das Alkin **77** konnte in den PtK<sub>2</sub>-Zellen keine „Klick-Reaktion“ nach 30 min festgestellt werden. Möglicherweise verhindert eine hydrolytische Ester-Spaltung von **77** die Cycloaddition. Zudem zeigte ausschließlich Azid **79** eine für die intrazelluläre „Klick-Reaktion“ günstige geringe Hintergrundfärbung (vgl. Abbildung 5-11, C), die Azide **80** und **81** dagegen waren zu fluoreszent und wurden daher nicht verwendet. Abbildung 5-11 (A-B) zeigt Aufnahmen der PtK<sub>2</sub>-Zellen, die zunächst für 16 h mit Thymochinon-Alkin **79** (5  $\mu\text{M}$ ) und nach der Fixierung und Permeabilisierung für 30 min mit Azidocumarin **79** (5  $\mu\text{M}$ ) in *Click-iT Cell Reaction Buffer* (1 mM Natriumascorbat, 500  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>) behandelt wurden. Die blaue Fluoreszenz des Kopplungsproduktes **93** war in verschiedenen DNA- bzw. RNA-reichen Zellkernregionen (Chromatin, Nukleoli) sowie dem Zellkern angrenzenden Regionen lokalisiert. Diese Zellkernnahen Regionen wurden in einem weiteren Experiment mit einem Golgi-spezifischen Antikörper bzw. einem entsprechenden sekundären Antikörper (AlexaFluor488-Konjugat) gegengefärbt, um zu bestätigen, dass es sich hierbei um Teile des Golgi-

Apparats bzw. des ERs handelte (vgl. Abbildung 5-11, D-F). Beide Kompartimente sind u.a. an der Verpackung von Xenobiotika und entsprechenden Metaboliten in sekretorische Vesikel und deren Transport zur Zellmembran beteiligt.



**Abbildung 5-11:** PtK<sub>2</sub>-Zellen wurden mit **78** (5 µM, 16 h) behandelt, die Visualisierung erfolgte nach der „Klick-Reaktion“ mit **79** (5 µM, 30 min in *Click-iT Cell Reaction Buffer*) vital in PBS mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan mit Axiocam, Neofluor-Objektiv 40×); C) zeigt die Hintergrundfärbung der PtK<sub>2</sub>-Zellen, die nur mit **79** behandelt wurden; D-F) die Dictyosomen wurden zusätzlich mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern (AlexaFluor488-Konjugat) angefärbt; A, C-D): Mischbild von Hellfeld- und Fluoreszenz-Kanal; B, E-F): Fluoreszenz-Kanal.

Ein ähnliches Phänomen wurde auch für die Doxorubicinderivate **13**, **26** und **35** beobachtet (vgl. 4.5.4 Zelluläre Verteilung: Fluoreszenzfärbungen): Auch hierbei kommt es zeitweise zu einer Lokalisation der Derivate in Kern-Nähe.

Die Lokalisation des Thymochinonderivats **78** bzw. des Kopplungsproduktes **93** in DNA- bzw. RNA-reichen Zellkernregionen bestätigt noch einmal die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse (5.4 Zellzyklus-Analyse). Obwohl keine direkte Wechselwirkung mit der DNA festgestellt werden konnte (5.3.1 Bandenretardationstest), scheint es jedoch eine Verbindung zur dieser oder entsprechender DNA-bindender Proteine bzw. Enzyme zu geben. Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass Thymochinon (**17**) die **Histondeacetylase** (HDAC) inhibiert und sogar zu einer Histon-Hyperacetylierung führt.<sup>[181]</sup> Solche Histonacetylierungen (vor allem an H3 und H4) können zu einer Verlängerung der S- bzw. G2/M-Phase führen.<sup>[182]</sup>

## 5.6 Zusammenfassende Diskussion

Thymochinon (**17**) weist eine Vielzahl von pharmakologisch interessanten Effekten auf; seine geringe Antitumor-Aktivität gilt in diesem Fall als Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung zum Chemotherapeutikum. Durch geeignete Funktionalisierung mit verschiedenen Fettsäuren und Terpenen zeigt sich eine enorme Steigerung der Effektivität. Dabei konnte eine Regelmäßigkeit festgestellt werden: Je ungesättigter und länger der Fettsäurerest bzw. je kürzer der *Spacer* zwischen dem Thymochinon-Kern und dem Terpen-Rest war, desto aktiver war das resultierende Derivat. Das DHA-Thymochinon (**47**) übertrifft mit  $IC_{50}$ -Werten im nano-molaren Bereich die Wirkung von **17** an den verschiedenen Zelllinien bei Weitem. Auch das (-)-Mentholderivat **56** schneidet mit mikro-molaren  $IC_{50}$ -Werten stets besser ab als die Ausgangsverbindung Thymochinon (**17**). Derivat **56** ist zudem eines der wenigen Derivate, das kaum anfällig gegenüber der verschiedenen ABC-Transportproteine ist. Beide Derivate sind kaum aktiv gegenüber nicht-malignen Fibroblasten und weisen daher eine deutliche Tumorselektivität auf. Die Anknüpfung diverser Sesquiterpene an den Thymochinon-Grundkörper stellt sich als besonders erfolgreich heraus: Gleich drei Derivate übertreffen die Wirkung von **17** signifikant; allen voran das Illudin M-Konjugat **70**. Ähnlich positiv verläuft die Funktionalisierung mit dem Triterpen Betulinsäure **74**: Beide Derivate weisen Wachstums-inhibierende Wirkung auf, wobei die Anknüpfung via Alkoholfunktion (**72**) vielversprechender erscheint.

Die Wirkungsweise von Thymochinon (**17**) und seinen Derivaten ist ebenfalls apoptotisch: Wie für Doxorubicin (**13**) konnte eine morphologische Veränderung der Zellen, die Fragmentierung der zellulären DNA sowie die Beteiligung Apoptose-relevanter Caspasen festgestellt werden. Dabei erfolgte die Apoptose-Initiation sowohl über die Aktivierung der Caspase-8 (HL-60) als auch der Caspase-9 (518A2). Anders als bei **13** ist jedoch für sämtliche Derivate eine Repression der bcl-2-mRNA-Expression bei teilweiser Aktivierung der bax-mRNA-Expression in den 518A2-Zellen zu verzeichnen. Der Verlust intakter Mitochondrien ist zudem nicht so stark ausgeprägt. Es ist aber bekannt, dass die Initiation der Apoptose nicht zwingend mit der Abnahme des Mitochondrienmembranpotentials einhergehen muss. Die Initiation

der Apoptose ist jedoch stark an die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS), die Aktivierung redox-sensitiver Kinasen, vor allem der Proteinkinase C, und die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  als *second messenger* geknüpft. Im Gegensatz zu Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten konnte allerdings keine Mitwirkung von Ceramiden an der Apoptose-Auslösung festgestellt werden.

Weiterhin war für die Thymochinonderivate **17**, **47**, **70** und **72** ein Zellzyklus-Arrest während der S-Phase bzw. am Übergang zwischen S- und G2-Phase sowie ein Anstieg der SubG1-Population zu verzeichnen. Letzteres spricht für eine vermehrte Apoptose-Rate. Das Illudin M-Derivat **70** zeigt als einziges Derivat geringfügige Wechselwirkung mit der DNA. Eventuell resultierende DNA-Läsionen führen zu einer Blockierung der Replikation und somit zu einem S-Phase-Arrest. Die Arretierung der Zellen in der S-Phase nach der Behandlung mit Thymochinon (**17**) und **47** könnte mit der Wirkung von **17** als Histondeacetylase-Inhibitor zusammenhängen. Untermuert wurde dies durch die Lokalisation des Thymochinonderivats **78** nach der Kopplung mit Cumarinazid **79** („Klick-Reaktion“) in DNA- und RNA-reichen Regionen (Chromatin, Nukleoli). Weiterhin war eine Akkumulation von **78** bzw. dem Kopplungsprodukt **93** in Teilen des ERs bzw. Golgi-Apparats festzustellen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mithilfe des Biotin-markierten Thymochinons **76** erhalten; aufgrund der vielseitigen biologischen Eigenschaften von Biotin und der starken Hintergrundfärbung konnte die zelluläre Lokalisation allerdings nicht eindeutig dem Thymochinon-Grundkörper zugeordnet werden. Somit wurde mit der *in vitro* „Klick-Reaktion“ – also der Kupfer-(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Azid-Alkin-Cycloaddition – eine Verbesserung gegenüber dem Biotin-Streptavidin-System erzielt.

## 6 Ergebnisse und Diskussion: Kombination von Doxorubicin (13) und Thymochinon (17)

### 6.1 Bestimmung der Wirksamkeit: MTT-Test

#### 6.1.1 Effektivität

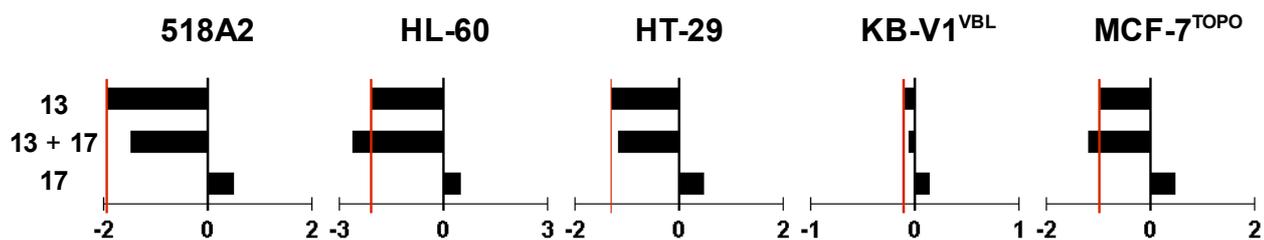
Für Thymochinon (17) ist seit Längerem eine chemoprotektive Wirkung bekannt; die kombinatorische Behandlung zeigte *in vivo* eine Verminderung der Nebenwirkungen durch Doxorubicin (13), ohne jedoch an Wirksamkeit zu verlieren.<sup>[20-21]</sup> Daher sollte mittels MTT-Test die Wachstums-inhibierende Funktion einer äquimolaren Mischung von 13 und 17 mit der der beiden Einzelverbindungen an den 518A2 Melanom-, HL-60 Leukämie-, HT-29 Kolonkarzinom-, KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen verglichen werden. Die generelle Zelllinienspezifität nach 72-stündiger Inkubation ist in Abbildung 6-1 dargestellt. Die verwendeten IC<sub>50</sub>-Werte sind im Anhang zu finden. Außerdem kann mithilfe der IC<sub>50</sub>-Werte festgestellt werden, ob es sich bei der Kombination beider Chinone um einen synergistischen, additiven oder gar antagonistischen Effekt handelt. Hierfür wurde der Kombinationsindex (*Combination Index*, CI) eingeführt {8}.<sup>[183-184]</sup> Ergibt sich ein Kombinationsindex von CI < 1, so handelt es sich um einen synergistischen, fördernden Effekt von 17 auf die Wirkung von 13. Bei einem CI = 1 spricht man von einem additiven Effekt. Und schließlich gibt ein Kombinationsindex CI > 1 einen antagonistischen, hemmenden Effekt von 17 auf die Wirkung von 13 an.

$$CI = \frac{IC_{50}(Dox+TQ)}{IC_{50}(Dox)} + \frac{IC_{50}(Dox+TQ)}{IC_{50}(TQ)} \quad \text{mit:} \quad \{8\}$$

CI ... Kombinationsindex,

$$CI \left\{ \begin{array}{l} < 1 \dots \textit{Synergismus (Syn)} \\ = 1 \dots \textit{additiver Effekt (Add)} \\ > 1 \dots \textit{Antagonismus (Ant)} \end{array} \right.$$

IC<sub>50</sub> (x) ... IC<sub>50</sub>-Wert [µM].



**Abbildung 6-1:** Generelle Zelllinienspezifität von Doxorubicin (13), Thymochinon (17) und einer Kombination aus 13 und 17 gegen 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- sowie MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen: Zelllinienspezifische Auftragung der mittleren logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte der einzelnen Ansätze relativ zum Mittelwert der logarithmierten IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte aller Ansätze, negative bzw. positive Werte stehen für eine im Vergleich zum Mittelwert größere bzw. schlechtere Wirkung der Derivate, Markierung der Wirkung von 13 (—) zur besseren Vergleichbarkeit.

Wie erwartet, zeigte das wenig toxische Thymochinon (17) eine deutlich geringere Aktivität gegen die verschiedenen Zelllinien als das etablierte Chemotherapeutikum Doxorubicin (13). An den P-gp-überexprimierenden KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom-Zellen war die Wirkung beider Chinone jedoch annähernd gleich (~ 25 µM). Dennoch führte die gleichzeitige Gabe von 13 und 17 nicht zu einer Wirkungssteigerung. Die Berechnung von CI ergab einen antagonistischen Effekt beider Chinone (CI = 1,78) für diese Zelllinie. Dies wurde auch für die Melanom- und Kolonkarzinom-Zellen erhalten; die Wirkung der Testsubstanzen war auch an diesen beiden Zelllinien antagonistisch (vgl. Abbildung 6-1).<sup>[185]</sup>

Interessanterweise wurde ein Synergismus von Thymochinon (17) und Doxorubicin (13) für die sensitiven HL-60 Leukämie- bzw. die mehrfachresistenten MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen ermittelt (vgl. Abbildung 6-1). Hier zeigte eine Kombination von 13 und 17 eine Steigerung der Wirkung von 13 um das Doppelte für die MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen (13: IC<sub>50</sub> = 1,01 ± 0,36 µM, 13 + 17: IC<sub>50</sub> = 0,64 ± 0,22 µM) bzw. das 4-Fache für die HL-60-Zellen (13: IC<sub>50</sub> = 80 ± 10 nM, 13 + 17: IC<sub>50</sub> = 20 ± 10 nM). Die Doxorubicinderivate 26-38 dagegen konnten an diesen Zelllinien keine Wirkungssteigerung im Vergleich zu 13 erzielen (vgl. 4.1.1 Effektivität).<sup>[185]</sup>

### 6.1.2 MDR-Sensitivität

Beim Vergleich der Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte an den resistenten (HT-29<sup>COLC</sup>, HT-29<sup>DOX</sup>, KB-V1<sup>VBL</sup>, KB-V1<sup>DOX</sup>, MCF-7<sup>TOPO</sup> und MCF-7<sup>DOX</sup>) mit denen an den sensitiven Zellen (HT-29, KB-V1 und MCF-7) konnte zudem ein synergistischer Effekt beider Chinone in Bezug auf die Wirkung in den HT-29<sup>DOX</sup> Kolonkarzinom-Zellen festgestellt werden. Die Wirkung von **13** konnte an diesen Zellen durch die gleichzeitige Gabe von **17** leicht gesteigert werden (CI = 0,84). Zudem schien **17** die MDR-Sensitivität von **13** gegenüber den BCRP-überexprimierenden MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen zu vermindern; der Quotient aus den Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werten an den resistenten und sensitiven MCF-7-Zellen konnte von ~ 11 auf ~ 2,5 reduziert werden. Dies wurde mithilfe eines MTT-Tests unter Verwendung des BCRP-Inhibitors bestätigt. Die Anfälligkeit von **13** gegenüber dem ABC-Transporter BCRP wurde durch die gleichzeitige Gabe von **17** um einen Faktor von 3,5 vermindert (vgl. Anhang).<sup>[183]</sup>

### 6.1.3 Selektivität

Um nun zu überprüfen, ob Thymochinon (**17**) ebenfalls einen Effekt auf die Tumorselektivität von Doxorubicin (**13**) ausübte, wurde wiederum der therapeutische Index TI bestimmt. Die Kombination beider Chinone führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Selektivität, sondern zu dem gegenläufigen Effekt: Die Wirkung an den HF Fibroblasten nahm drastisch zu und erreichte annähernd die Effektivität, die eine kombinatorische Behandlung mit **13** und **17** auch in den 518A2 Melanom-Zellen hervorrief (IC<sub>50</sub> ~ 300 nM).

Der schlechte TI könnte durch eine vermehrte Radikalproduktion (ROS) in den normalen HF-Zellen zustande kommen, was bei einer Therapie mit Doxorubicin (**13**) schon mehrfach berichtet wurde.<sup>[184]</sup> Durch die Kombination beider Chinone kam es offenbar zu einem Überschreiten der ROS-Schwellwert-Konzentration und durch die übermäßige ROS-Belastung zur Wachstums-Inhibierung. Dies sollte in einem NBT-Test zusätzlich überprüft werden (vgl. 6.2.7.1 NBT-Test).

Abschließend kann die Kombination des chemoprotektiven Thymochinons (**17**) mit dem etablierten Therapeutikum Doxorubicin (**13**) jedoch als positiv betrachtet werden. Besonders an den Zelllinien, an denen die Doxorubicinderivate **26-38** nicht nennenswert wirkten, überzeugte die kombinatorische Behandlung mit **13** und **17**; nämlich an den HL-60 Leukämie- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen. Zudem zeigte sich das Potential einer solchen Therapie, Resistenzen zu überwinden.

## 6.2 Nachweis von Apoptose

### 6.2.1 Morphologie und DNA-Fragmentierung

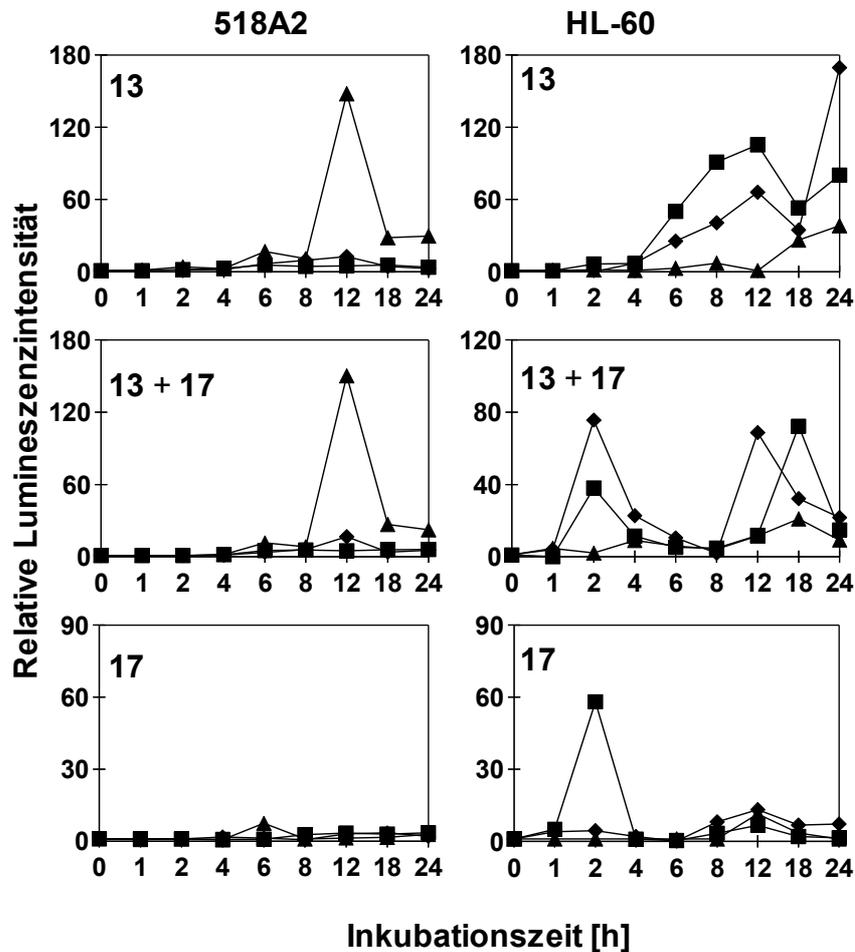
Die morphologischen Veränderungen sowie die Fragmentierung der zellulären DNA wurde auch für die äquimolare Kombination beider Chinone (**13** + **17**) festgestellt. Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede zu den nur mit **13** inkubierten Zellen, weshalb auf die erneute Darstellung verzichtet wird.<sup>[132]</sup>

### 6.2.2 Bestimmung der Caspase-Aktivitäten

#### 6.2.2.1 Caspase-Aktivitätstest

Die Aktivität der Caspasen-3, -8 und -9 nach einer Inkubation der 518A2- und HL-60-Zellen mit Doxorubicin (**13**), Thymochinon (**17**) und einer äquimolare Mischung beider Chinone ist in Abbildung 6-2 dargestellt.

Die Behandlung der 518A2-Zellen mit **13** oder einer Kombination aus **13** und **17** ergab identische Caspase-Kinetiken. Mithilfe des MTT-Tests konnte bereits ein antagonistischer Effekt von Thymochinon (**17**) auf Doxorubicin (**13**) festgestellt werden, der sich hier noch einmal bestätigte. In den Leukämie-Zellen dagegen führte die Mischung aus **13** und **17** zu zwei distinkten Maxima der Aktivität aller Caspasen, einmal nach 2 h und ein weiteres Mal nach 12-18 h.<sup>[185]</sup> Dies erklärt die deutliche Verbesserung der Wachstums-inhibierende Wirkung im Vergleich zu **13** durch einen additiven Effekt beider Chinone.

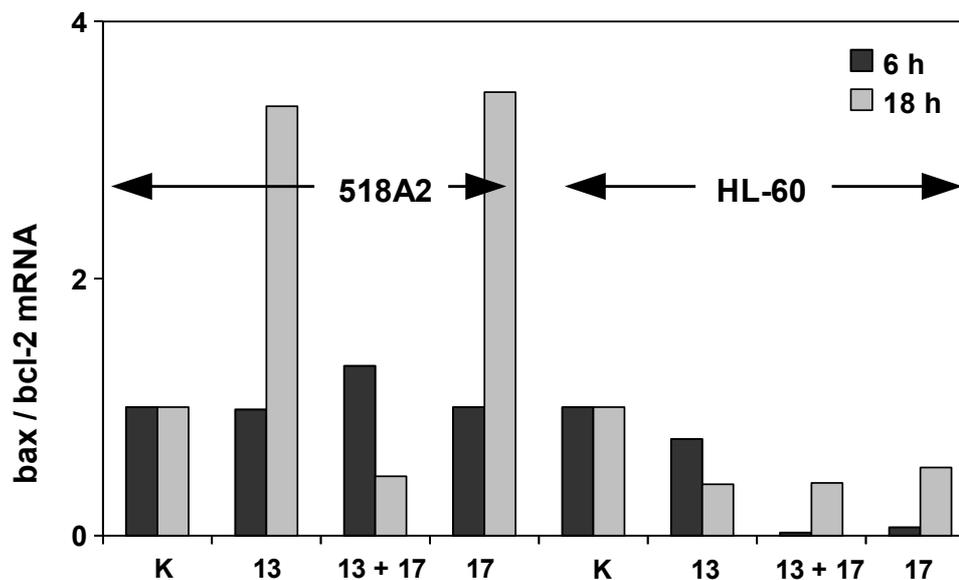


**Abbildung 6-2:** Caspase-3-, -8- und -9-Aktivität in 518A2-Zellen (links) sowie HL-60-Zellen (rechts) nach Inkubation mit Doxorubicin (13), Thymochinon (17) und einer äquimolaren Mischung aus 13 und 17: Verwendung der luminometrischen Assays Caspase-Glo 3/7, 8 und 9; Darstellung der Aktivitäten der Caspasen-3/7 (■), -8 (◆) und -9 (▲) und als relative Lumineszenzintensitäten. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

### 6.2.3 Apoptose-Regulationsproteine: Bcl-2, Bax und Bid

#### 6.2.3.1 Quantitative *real time*-PCR

Weiterhin wurde das Apoptose-relevante Verhältnis der bax- zu bcl-2-mRNA in 518A2- und HL-60-Zellen ermittelt, die für 6 h bzw. 18 h mit einer äquimolaren Mischung aus 13 und 17 inkubiert worden waren. Diese Quotienten sind im Vergleich zu denen der Einzelkomponenten 13 und 17 in Abbildung 6-3 aufgezeigt; die zur Berechnung verwendeten Daten sind im Anhang in der Tabelle A-28 zu finden.



**Abbildung 6-3:** bax / bcl-2 mRNA- Expression in an den 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen nach 6 h bzw. 18 h Inkubation (5 µM) mit Doxorubicin (13), Thymochinon (17) und einer äquimolaren Mischung aus 13 und 17. Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

Der antagonistische Effekt von Thymochinon (17) auf Doxorubicin (13) an den 518A2 Melanom-Zellen zeigte sich auch an den bax- und bcl-2-mRNA-Expressionen. Im Vergleich zu den Einzelkomponenten 13 und 17 war für deren äquimolare Mischung eine vermehrte mRNA-Expression des anti-apoptotischen bcl-2 zu verzeichnen. Im Fall der HL-60 Leukämie-Zellen dagegen ergab sich für die angegebenen Inkubationszeiten in allen drei Ansätzen ein bax- zu bcl-2-Level unter Kontroll-Niveau. Für Thymochinon (17) wurde ein pro-apoptotisches Verhältnis der bax- zu bcl-2-mRNA-Expression erst nach längeren Inkubationszeiten (> 24 h) erhalten (vgl. 5.2.4.1 Quantitative *real time*-PCR); Doxorubicin (13) selbst schien dieses viel früher (< 6 h) zu erreichen (vgl. 4.2.4.2 Quantitative *real time*-PCR). Die Kombination beider Chinone lässt ein ähnliches Bild vermuten.<sup>[151-152,185]</sup>

#### 6.2.4 Mitochondrienmembranpotential

Sowohl für Doxorubicin (13) als auch für Thymochinon (17) konnte das Kollabieren des Mitochondrienmembranpotentials  $\Delta\Psi$  als zentrales Ereignis der Apoptose ausgemacht werden.<sup>[151,165-166]</sup> Zudem sollte ein möglicher Einfluss von 17 auf die

Wirkung von **13** untersucht werden: Im Fall der Melanom-Zellen bestätigte sich der antagonistische Effekt beider Derivate; die Wirkung von **13** konnte nicht verbessert werden (vgl. Tabelle 6-1). An den Leukämie-Zellen wurde wiederum der additive Effekt von Thymochinon (**17**) deutlich; die apoptotische Wirkung von **13** konnte vor allem nach kürzeren Inkubationszeiten (6 h) verbessert werden.<sup>[185]</sup>

**Tabelle 6-1:** Prozentualer Anteil intakter Mitochondrien [%]<sup>a</sup> in 518A2- und HL-60-Zellen nach Inkubation mit **13**, **17** und einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17**.

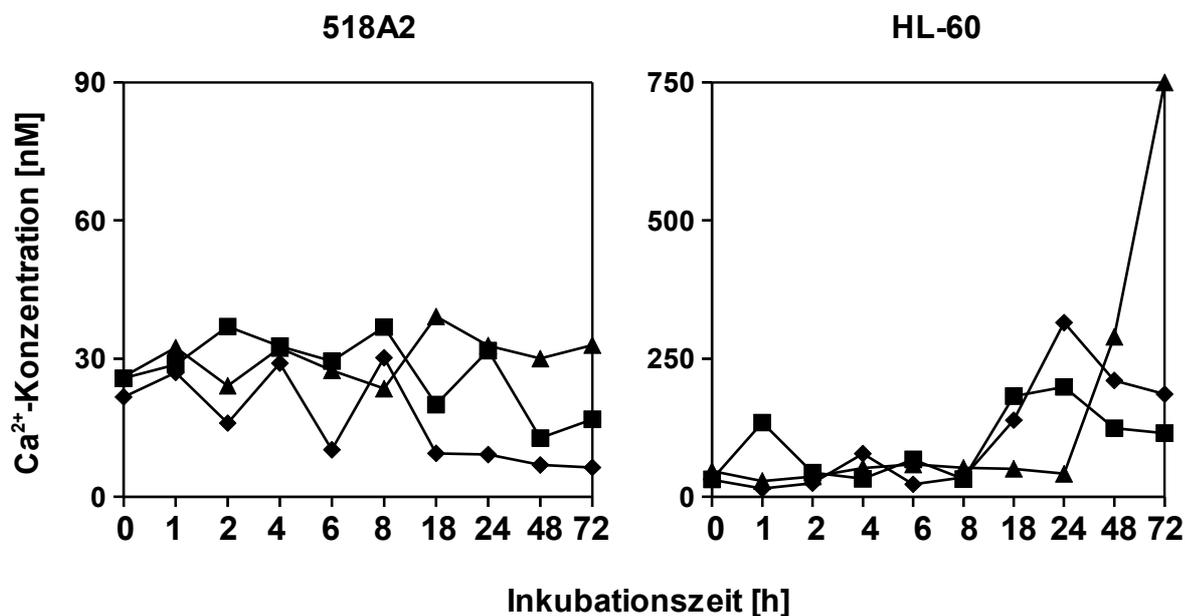
Testsubstanz	Intakte Mitochondrien [%] <sup>a</sup>			
	518A2		HL-60	
	6 h	18 h	6 h	18 h
<b>13</b>	98.4 ± 10.2	73.9 ± 19.3	82.9 ± 7.5	28.4 ± 4.0
<b>13 + 17</b>	98.5 ± 14.1	71.2 ± 11.7	63.8 ± 4.4	31.6 ± 8.4
<b>17</b>	106.1 ± 10.2	94.4 ± 9.3	77.3 ± 1.2	63.3 ± 8.8

<sup>a</sup> Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz des Farbstoffs JC-1 (*Mitochondrial Membrane Detection Kit*, Stratagene) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (100%) nach einer 6- und 18-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5 µM). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

### 6.2.5 Calciumkonzentrationsbestimmung

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die Beeinflussung der Calcium-Homöostase der 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen. Für die 518A2-Zellen konnte nach der Behandlung mit **13 + 17** keine Veränderung im Calcium-Haushalt festgestellt werden; in den HL-60-Zellen jedoch bewirkte Thymochinon (**17**) eine geringfügige Verstärkung des Ca<sup>2+</sup>-Signals von Doxorubicin (**13**) (vgl. Abbildung 6-4). Die Daten, die hierfür verwendet wurden, sind vollständig in Tabelle A-29 im Anhang aufgeführt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine Kombination der bioaktiven Chinone **13** und **17** – wie auch die Einzelkomponenten – zu einer Initiation der Apoptose führen. Es wurde die Fragmentierung der DNA, die Aktivierung relevanter Caspasen und Regulationsproteine, die Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential, sowie die Veränderung im Calcium-Haushalt festgestellt. Zudem wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Beteiligung der ROS vor allem an der Wirkung in den nicht-malignen HF-Zellen zu klären.



**Abbildung 6-4:** Verlauf der Calciumkonzentration in 518A2-Zellen (links) sowie HL-60-Zellen (rechts) nach Inkubation mit Doxorubicin (13, ■), Thymochinon (17, ▲) und einer äquimolaren Mischung aus 13 und 17 (◆). Diese Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

### 6.2.6 Nachweis von Sauerstoffradikalen

Sowohl für **13** als auch für **17** sind pro-oxidative Eigenschaften bekannt, weshalb für die äquimolare Mischung ebenfalls die Bildung von Sauerstoffradikalen und deren Beteiligung an der Rekrutierung redox-sensitiver Kinasen untersucht wurde.<sup>[152,171-172]</sup>

#### 6.2.6.1 NBT-Test

Die kombinatorische Behandlung der Melanom- und Leukämie-Zellen mit **13** und **17** bewirkte eine signifikante Erhöhung der ROS-Produktion verglichen mit den beiden Einzelkomponenten: In den 518A2 Melanom-Zellen konnte nach einer 72-stündigen Inkubation mit der Mischung aus **13** + **17** beinahe eine Verdopplung der ROS-Produktion im Vergleich zu **13** erzielt werden, in den HL-60 Leukämie-Zellen stieg die ROS-Produktion durch die gleichzeitige Gabe von **13** und **17** sogar um das 7-Fache (vgl. Tabelle 6-2). Dieser additive Effekt könnte mit einer Aktivierung unterschiedlicher NAD(P)H-Oxidoreduktasen durch die beiden *p*-Chinone erklärt werden, was eine effektivere ROS-Produktion bedeuten würde.<sup>[10,184]</sup>

## 6 Ergebnisse und Diskussion: Kombination von Doxorubicin (13) und Thymochinon (17)

**Tabelle 6-2:** Prozentuale ROS-Produktion [%]<sup>a</sup> in 518A2- und HL-60-Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin (13) und Thymochinon (17).

Testsubstanz	ROS-Produktion [%] <sup>a</sup>			
	518A2		HL-60	
	24 h	72 h	24 h	72 h
<b>13</b>	2,5 ± 0,3	15,4 ± 1,9	2,8 ± 0,8	5,6 ± 0,8
<b>13 + 17</b>	6,2 ± 0,4	<b>26,6 ± 5,0</b>	12,0 ± 2,0	<b>40,1 ± 6,2</b>
<b>17</b>	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

<sup>a</sup> Prozentuale ROS-Produktion (NBT-Reduktion) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle (1%) nach einer 24- und 72-stündigen Behandlung der 518A2- und HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen (5 µM). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Der schlechte therapeutische Index TI einer Kombination aus **13** und **17** war nicht die Folge einer Generierung von ROS. In normalen Zellen sollten eigentlich vermehrt reaktive Sauerstoffradikale an der Apoptose-Initiation durch bioaktive Chinone wie **13** beteiligt sein; dies konnte aber nicht für die nicht-malignen Fibroblasten (HF) festgestellt werden (vgl. 6.1.3 Selektivität).<sup>[30,185-186]</sup>

### 6.2.6.2 MTT-Test in Gegenwart des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein

In MTT-Tests unter der Verwendung des Radikalfängers *N*-Acetyl-Cystein konnte jedoch kein additiver Effekt von Thymochinon (**17**) auf die ROS-vermittelte Wachstums-Inhibierung von Doxorubicin (**13**) festgestellt werden. Sowohl **13** als auch die Mischung aus **13** + **17** führte verglichen mit den Ansätzen ohne *N*-Acetyl-Cystein zu einer Reduktion der Wachstums-Inhibierung um 10% (vgl. Tabelle A-39 im Anhang).

### 6.2.6.3 Involvierung redox-sensitiver Kinasen

In Bezug auf die redox-sensitiven Kinasen konnte kein signifikanter Effekt von Thymochinon (**17**) auf die Wirkung von Doxorubicin (**13**) festgestellt werden, weshalb auf die ausführliche Darstellung der Daten verzichtet wird. Es zeigte sich wie für **13** vor allem an den HL-60-Zellen eine starke Abhängigkeit der Wirkung von der PKC. Die IC<sub>50</sub>-Werte dazu befinden sich im Anhang in der Tabelle A-40 (vgl. 4.2.8 Involvierung redox-sensitiver Kinasen).

### 6.2.7 Nachweis von Ceramid-Bildung

Für eine kombinatorische Behandlung der HL-60 Leukämie- und 518A2 Melanom-Zellen mit **13** und **17** wurden keine signifikante Veränderungen im Ceramid-Level im Vergleich zu Doxorubicin (**13**) festgestellt, weshalb auf die ausführliche Darstellung der Daten verzichtet wird. Die IC<sub>50</sub>-Werte dazu befinden sich im Anhang in den Tabellen A-41 bis A-42.

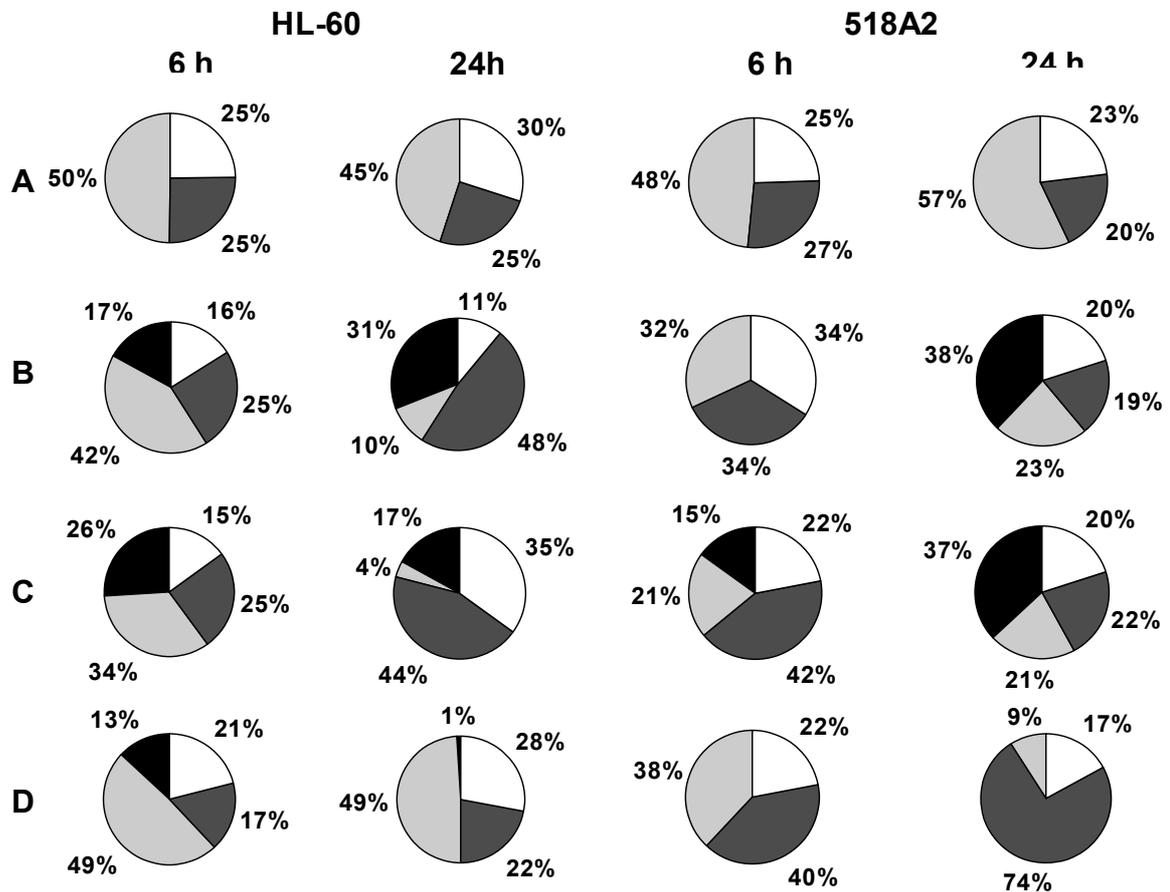
Abschließend kann gesagt werden, dass eine kombinatorische Behandlung der HL-60- bzw. 518A2-Zellen mit Doxorubicin (**13**) und Thymochinon (**17**) zu einer Auslösung der Apoptose sowohl klassisch über die intrinsischen und extrinsischen Pfade als auch alternativ über ROS und die dadurch bedingte Aktivierung redox-sensitiver Kinasen bzw. die Bildung von Ceramiden führt.

## 6.3 Zellzyklus-Analyse

Wie bereits beschrieben, wurde für die mit einer Kombination aus **13** und **17** behandelten HL-60- und 518A2-Zellen eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt (vgl. 4.3 Zellzyklusanalyse); die Histogramme dazu sind im Anhang aufgeführt. Zur Berechnung der Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus wurde wiederum um den apoptotischen Anteil in der Kontrolle korrigiert sowie die intrinsische Fluoreszenz von **13** bei der Berechnung ausgeschlossen.

Für die 518A2-Zellen bestätigte sich erneut der antagonistische Effekt beider Chinone: Zwar waren nach 6 h mehr apoptotische 518A2-Zellen nach der Behandlung mit **13** und **17** zu verzeichnen als für **13** allein, dennoch waren die Verteilungen der Zellen innerhalb des Zellzyklus nach 24 h nahezu identisch (vgl. Abbildung 6-5). Es konnte demnach kein fördernder Effekt von **17** auf die Wirkung von **13** festgestellt werden. Aus den Zellzyklus-Analysen der HL-60-Zellen war ebenfalls kein additiver Effekt der beiden Chinone abzulesen, obwohl dies durch diverse Untersuchungen bestätigt wurde. Es konnte aber notiert werden, dass sich die Zellen vermehrt am Übergang zwischen S- und G2-Phase befanden und nicht

wie bei **13** allein ausschließlich in der S-Phase. Es waren deutlich weniger Zellen in der G1/G0-Phase. Wahrscheinlich führte dies zu der vermehrten Wachstumsinhibierenden Wirkung.



**Abbildung 6-5:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter HL-60- (links) bzw. 518A2-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin (**13**, B), Thymochinon (**17**, D) und einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17** (C) (jeweils 5  $\mu$ M, Kontrolle = A), wobei die Sektoren die prozentuale Auftragung der Zellzyklus-Phasen kennzeichnen: SubG1 , G0 bzw. G1 , S  und G2 bzw. M .

#### 6.4 Zusammenfassende Diskussion

Seit längerer Zeit ist für Thymochinon (17) eine chemo-protective Wirkung bekannt. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen bei der kombinatorischen Therapie mit Doxorubicin (13) und 17 *in vivo* eine Verminderung der durch 13 bedingten Nebenwirkungen feststellen – von einer Wirkungssteigerung war bislang nichts bekannt. Aus diesem Grund war es interessant, den Einfluss von 17 auf den Wirkmechanismus von 13 an verschiedenen Tumorzelllinien zu untersuchen. Es ergaben sich dabei verschiedene Zelllinien-spezifische Effekte: An den mehrfachresistenten KB-V1<sup>VBL</sup>- bzw. HT-29-Zellen sowie den „Apoptose-gehemmten“ 518A2-Zellen konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit 13 und 17 keine Wirkungssteigerung erzielt werden; für diese Zelllinie ergab sich ein antagonistischer Effekt beider Chinone. Interessanterweise war ein Synergismus, also ein fördernder Effekt von 17 auf die Wirkung von 13, an den sensitiven HL-60-Zellen bzw. den mehrfachresistenten MCF-7<sup>TOPO</sup> zu verzeichnen; genau an diesen Zelllinie führte die Derivatisierung von 13 zu keiner Wirkungssteigerung. Der Synergismus an den MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen ist durch eine durch 17 bedingte Verminderung der Anfälligkeit von 13 gegenüber dem ABC-Transporter BCRP zu erklären. Weitere fördernde Effekte von Thymochinon (17) auf die Wirkung von Doxorubicin (13) konnten für Doxorubicin-resistente Zellen (HT-29<sup>DOX</sup>) festgestellt werden.

Die Wirkung der kombinatorischen Therapie (13 + 17) war wie für die einzelnen Komponenten 13 und 17 apoptotisch: Es konnte ebenfalls eine morphologische Veränderung der Zellen, die Fragmentierungen der zellulären DNA (SubG1 $\uparrow$ ), der Verlust intakter Mitochondrien sowie die Beteiligung Apoptose-relevanter Caspasen und Regulationsproteine festgestellt werden. Dabei wurde jeweils der Synergismus (HL-60) bzw. Antagonismus (518A2) beider Chinone bestätigt. Zudem kam es sowohl in den 518A2- als auch den HL-60-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Sauerstoffradikal-Produktion. Eventuell führten beide *p*-Chinone zur Aktivierung unterschiedlicher NAD(P)H-Oxidoreduktasen, was die effektivere ROS-Produktion erklären würde. In normalen, nicht-malignen Zellen kann eine vermehrte ROS-Produktion ebenfalls zur Auslösung von Apoptose führen; dies konnte für die HF

Fibroblasten jedoch nicht festgestellt werden. Die Verschlechterung des therapeutischen Index' für die kombinatorische Behandlung von **13** und **17** im Vergleich zu den Einzelkomponenten – also die Wirkungssteigerung an den nicht-malignen Fibroblasten – konnte hiermit nicht erklärt werden. *In vivo* bzw. im Zell-freien System wurde zwar vermehrt eine anti-oxidative Wirkung von **17** beobachtet, *in vitro* (auf Basis von Zell-Tests) dagegen hielten sich pro- und anti-oxidative Effekte die Waage. Es sind demnach noch weitere Untersuchungen nötig, um den chemo-protektiven und dennoch Wirkungs-steigernden Einfluss von Thymochinon (**17**) auf etablierte Chemotherapeutika wie Doxorubicin (**17**) zu klären.

Es konnte dennoch gezeigt werden, dass **17** sehr wohl einen positiven Einfluss auf die Wirkung von **13** ausübte. Thymochinon (**17**) stellte demnach eine Art Verstärker der antitumoralen Wirkung von Doxorubicin (**13**) dar. Besonders deutlich wird dies für die sensitiven HL-60 Leukämie-Zellen bzw. die resistenten HT-29<sup>DOX</sup> Kolon- und MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen. Somit zeigt **17** nicht nur chemoprotektive Eigenschaften, sondern auch das Potential, Mehrfachresistenzen zu überwinden.

## 7 Zusammenfassung

Eine Reihe von natürlichen Chinonen weist eine Vielzahl an pharmakologisch sehr interessanten Eigenschaften auf, antitumorale Aktivitäten eingeschlossen. Das etablierte Chemotherapeutikum Doxorubicin (**13**) beispielsweise – ein Sekundärmetabolit von *Streptomyces peucetius* var. *caesius* – findet seine klinische Anwendung bei der Behandlung verschiedenster Krebserkrankungen wie etwa Leukämien, Lymphomen, Karzinomen und Sarkomen. Dennoch ist die Verwendung von **13** als Chemotherapeutikum durch seine Kardiotoxizität und die Ausbildung von Resistenzen limitiert. Um diese Nebenwirkungen möglichst gering zu halten, ist die kumulative Dosis von **13** auf 550 mg / m<sup>2</sup> festgesetzt. Durch geeignete Derivatisierung von Doxorubicin (**13**) mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten bzw. Terpen-terminierten Fettsäuren sollten unerwünschte Nebenwirkungen – wie etwa die Anfälligkeit gegenüber Mehrfachresistenzen – minimiert werden, ohne jedoch einen Verlust der Wirksamkeit zu riskieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe biochemischer Arbeitsmethoden diejenigen Wirkstoff-Kandidaten zu finden und zu charakterisieren, die diese Kriterien erfüllen.

Es konnten zwei Doxorubicinderivate identifiziert werden, die in der Lage waren, limitierende Mehrfachresistenzen zu überwinden: Dies ist zum einen das Heptadecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**26**), das anders als die übrigen Fettsäurederivate eine deutliche Wachstums-inhibierende und mit **13** vergleichbare Wirkung gegen die verschiedenen Tumor-Zelllinien aufweist. Zudem übertrifft **26** aufgrund einer geringeren Anfälligkeit gegenüber dem ABC-Transportprotein P-gp die Wirkung von **13** an mehrfachresistenten KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom-Zellen um das 3-Fache. Die lange Fettsäureseitenkette dient dabei als eine Art Anker. Zum anderen handelt es sich um das 11-[(–)-Menthoxycarbonyl]-undecansäure-Doxorubicinhydrochlorid-Hydrazon (**35**), das insbesondere an 518A2 Melanom- bzw. Doxorubicin-resistenten Zellen effektiver ist als **13** und die übrigen Derivate.

Die Wirkungsweise von Doxorubicin (**13**) und seinen Derivaten ist vorwiegend apoptotisch, wobei sowohl klassische Wege wie der extrinsische und intrinsische Apoptose-Pfad (Caspasen-3, -8 und -9  $\uparrow$ ,  $\Delta\Psi\downarrow$ ) als auch alternative Wege über das Endoplasmatische Retikulum (Verlust der Calcium-Homöostase) und die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und Ceramiden sowie die Aktivierung redox-sensitiver Kinasen beteiligt sind. Weiterhin konnte auch für die meisten Derivate die zelluläre DNA als Haupt-Target identifiziert werden. Die Interkalation der Derivate in die DNA führt aufgrund der Blockierung von DNA-bindenden Enzymen zu einem Verbleib der Zellen in der DNA-Replikation-Phase und somit zur Auslösung der Apoptose.

Doch nicht nur komplexe Anthrachinone wie Doxorubicin (**13**) sind für die Wirkstoffentwicklung von Interesse, auch einfache Verbindungen wie das *p*-Benzochinon Thymochinon (**17**) – Bestandteil des Schwarzkümmel-Extraktes (*Nigella sativa*) – sind aufgrund von antioxidativen und antitumoralen Effekten potentielle Kandidaten zur Weiterentwicklung zum Chemotherapeutikum. Durch die Funktionalisierung von Thymochinon (**17**) mit verschiedenen gesättigten und ungesättigten bzw. Terpen-terminierten Fettsäuren sollte die geringe antitumorale Wirkung verbessert werden; die Derivate sollten wiederum mithilfe geeigneter biochemischer Arbeitsmethoden charakterisiert werden.

Es konnten einige Derivate identifiziert werden, die die Wirkung und Selektivität der Ausgangsverbindung **17** bei Weitem überschreiten: Einerseits zeigt das DHA-Thymochinon (**47**) mit Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werten im nano-molaren Bereich verglichen mit **17** (milli-molare Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte) überdurchschnittliche Effektivität bei gleichzeitig verbesserter Tumorselektivität. Andererseits weist das (–)-Mentholderivat **56** (mikro-molare Langzeit-IC<sub>50</sub>-Werte) die geringste MDR-Sensitivität, also die geringste Anfälligkeit gegenüber ABC-Transportern auf. Desweiteren führt die Anknüpfung des Triterpens Betulinsäure (**74**) über die Alkoholfunktion zu dem vielversprechenden Derivat **72**, das sich durch eine große Selektivität für die HL-60 Leukämie-Zellen auszeichnet.

Die Wirkungsweise von Thymochinon (**17**) und seinen Derivaten ist vorwiegend apoptotisch; es werden wie für **13** beschrieben sowohl klassische (Caspase-3, -8 und -9  $\uparrow$ ,  $\Delta\Psi\downarrow$ ) als auch alternative Wege (ROS  $\uparrow$ ,  $\text{Ca}^{2+}$   $\uparrow$ , redox-sensitive Kinasen  $\uparrow$ ) der Apoptose-Initiation angesprochen. Als Haupt-Wirkort von **17** konnten DNA- bzw. RNA-reiche Regionen im Zellkern identifiziert werden; dabei scheint die Funktion von **17** als Histondeacetylase-Inhibitor eine Blockierung der DNA-Replikation (S-Phase bzw. Übergang von S- zu G2-Phase) und somit die Initiation der Apoptose zu bewirken.

Da seit längerer Zeit eine chemoprotektive Wirkung für Thymochinon (**17**) bekannt ist, sollte zudem der Einfluss von **17** auf **13** an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht werden. Es ergab sich ein Synergismus beider Chinone an den sensitiven HL-60-Zellen bzw. den mehrfachresistenten MCF-7<sup>TOPO</sup> Mamma- und HT-29<sup>DOX</sup> Kolonkarzinom-Zellen, wobei Letzterer durch eine Thymochinon-bedingte Verminderung der Anfälligkeit von Doxorubicin (**13**) gegenüber bestimmten ABC-Transportern zu erklären ist. Somit zeigt **17** nicht nur chemoprotektive Eigenschaften, sondern auch das Potential, Mehrfachresistenzen zu überwinden.

Die Wirkung der kombinatorischen Therapie von **13** und **17** ist ebenfalls apoptotisch, wobei der Wirkmechanismus dem von **13** sehr ähnelt. Die signifikante Erhöhung der ROS-Produktion in den Tumor-Zellen kann durch die Aktivierung unterschiedlicher NAD(P)H-Oxidoreduktasen durch beide Chinone erklärt werden; eine solche vermehrte ROS-Produktion ist anders als erwartet in nicht-malignen HF Fibroblasten interessanterweise nicht zu verzeichnen.

Es sind noch weitere Untersuchungen nötig, um den chemoprotektiven und wirkungssteigernden Einfluss von Thymochinon (**17**) auf das etablierte Chemotherapeutikum Doxorubicin (**13**) zu klären. Es konnte aber im Ansatz gezeigt werden, dass **17** sehr wohl einen positiven Einfluss auf die Wirkung von **13** ausübt. Thymochinon (**17**) stellte demnach eine Art „Verstärker“ der antitumoralen Wirkung von Doxorubicin (**13**) dar und zeigt zudem Potential, Mehrfachresistenzen zu überwinden.

## 8 Summary

There is a series of naturally occurring quinones with a variety of pharmacologically interesting properties including anti-tumour activities. The *Streptomyces* metabolite doxorubicin (**13**) is one of the most common anti-cancer agents for the treatment of human tumours namely leukaemia, lymphoma, carcinoma and sarkoma, although its clinical use is limited due to side effects such as cumulative cardiac toxicity and multi-drug resistances. To improve the effectiveness with simultaneous circumvention of the drawbacks, **13** was covalently linked to saturated or unsaturated and terpenyl-terminated fatty acids. The aim of this work was the characterisation of these new doxorubicin *N*-acyl hydrazones using biochemical methods to identify drug candidates who meet the above criteria.

Thus, two derivatives were found that were able to overcome limiting multi-drug resistances: This is, firstly, the doxorubicin heptadecanoyl hydrazone (**26**), which causes a significant growth-inhibitory effect against the different tumour cell lines compared with **13**. In P-gp-over-expressing KB-V1<sup>VBL</sup> cervix carcinoma cells it is three times more effective than **13** through breaching multi-drug resistances. The long fatty acid group can act as an anchor. The second is the doxorubicin 11-[(–)-menthoxy-carbonyl]-undecanoyl hydrazone (**35**), which is more effective in 518A2 melanoma and doxorubicin-resistant cells than **13** and the other derivatives.

The mode of action of doxorubicin (**13**) and its conjugates is mainly apoptotic including the activation of the apoptosis-relevant caspases-3, -8 and -9 as well as through the loss of Ca<sup>2+</sup> homeostasis (ER stress), the generation of reactive oxygen species (ROS) or ceramides and the activation of redox-sensitive kinases. Similar to doxorubicin **13**, the main target of the new doxorubicin *N*-acyl hydrazones is the cellular DNA. By intercalation into cellular DNA they can block DNA-binding enzymes causing an arrest during the replication phases (s-phase) leading to apoptosis.

Since thymoquinone (**17**), the main bioactive constituent of the volatile black seed oil (*Nigella sativa*), displays weak anti-tumour activity, and due to other properties such

as anti-oxidative and anti-neoplastic effects there is growing interest in its therapeutic potential. Analogously to **13**, thymoquinone (**17**) was covalently linked to saturated or unsaturated and terpenyl-terminated fatty acids to improve its generally low anti-cancer activity. The most promising candidates among the derivatives were identified and characterised using biochemical methods.

There were several conjugates with improved efficacy and selectivity compared with **17**: On the one hand, 6-(hencosahexaenyl)-thymoquinone (**47**), which shows nano-molar IC<sub>50</sub> values following 72 h incubation, revealed a dramatical boost of the growth-inhibiting effect in all tumour cells over that of **17** (micro-molar IC<sub>50</sub> (72 h) values). On the other hand, 6-(menthoxy-butyl)-thymoquinone (**56**) exhibited micro-molar IC<sub>50</sub> (72 h) values and was even least affected by the multi-drug-relevant ABC-transporters P-gp and BCRP. Furthermore, the conjugation of **17** with the triterpene betulinic acid (**74**) resulted in compound **72**, which was most effective against the HL-60 leukaemia cells.

Including the parent compound **17** all derivatives induced apoptosis associated with DNA fragmentation, changes in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi\downarrow$ ), the generation of ROS and the activation of caspases and redox-sensitive kinases. The main target of **17** seems to be the DNA- and RNA-rich regions within the cellular nucleus, whereas its function as an inhibitor of the histone deacetylase might cause apoptosis induction following an arrest during replication.

There is a known chemo-protective effect by thymoquinone (**17**). Therefore the influence of **17** on doxorubicin-induced growth-inhibition and apoptosis was to be studied in several tumour cell lines. In cells of HL-60 leukaemia as well as multi-drug resistant MCF-7<sup>TOPO</sup> breast and HT-29<sup>DOX</sup> colon carcinoma a synergistic effect for both *p*-quinones was obtained, whereas the latter was reached due to a breach of the multi-drug resistance mechanisms.

The mode of action of an equimolar mixture of thymoquinone (**17**) and doxorubicin (**13**) was apoptotic, similar to that of **13** alone. But there was a distinct rise in ROS

generation in all tumour cell lines following incubation with **13** + **17**, maybe as a result of the activation of different NAD(P)H oxidoreductases. In non-malignant HF fibroblasts, normally showing higher ROS levels during drug-related apoptosis, no generation of reactive oxygen species was observed.

Thus, further studies concerning the chemo-protective and beneficial effects of thymoquinone (**17**) on the action of the established drug doxorubicin (**13**) are necessary to identify its molecular mechanism. However, it was possible to show that **17** is more than just chemo-protective. It can act as a potential booster for the anti-tumour effect of **13**. Depending on the cancer cell line distinct improvements of efficacy, selectivity and breach of multi-drug resistances were observed.

## 9 Anhang

### 9.1 MTT: Doxorubicin (13) und seine Derivate

**Tabelle A-1:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26-38** gegen 518A2 Melanom- und HL-60 Leukämie-Zellen.

Testsubstanz	518A2, IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>13</b>	0,34 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,12 ± 0,04
<b>26</b>	0,76 ± 0,05	0,35 ± 0,09	0,11 ± 0,05
<b>27</b>	0,67 ± 0,35	0,39 ± 0,11	0,42 ± 0,17
<b>28</b>	2,85 ± 1,64	1,83 ± 0,45	1,61 ± 0,64
<b>29</b>	7,38 ± 0,55	0,32 ± 0,02	0,14 ± 0,03
<b>30</b>	> 50	> 50	13,14 ± 0,64
<b>31</b>	> 50	> 50	> 50
<b>32</b>	0,71 ± 0,52	0,54 ± 0,02	0,14 ± 0,01
<b>33</b>	1,20 ± 0,27	0,42 ± 0,08	0,32 ± 0,12
<b>34</b>	0,82 ± 0,20	0,51 ± 0,17	0,46 ± 0,16
<b>35</b>	0,23 ± 0,06	0,16 ± 0,05	0,06 ± 0,01
<b>36</b>	0,57 ± 0,19	0,23 ± 0,06	0,19 ± 0,05
<b>37</b>	> 50	> 50	> 50
<b>38</b>	41,65 ± 5,33	26,98 ± 3,05	22,54 ± 6,49
Testsubstanz	HL-60, IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>13</b>	0,22 ± 0,10	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,01
<b>26</b>	1,41 ± 0,15	0,86 ± 0,00	0,28 ± 0,07
<b>27</b>	1,24 ± 0,57	0,56 ± 0,05	0,56 ± 0,41
<b>28</b>	5,56 ± 0,47	2,80 ± 0,16	3,83 ± 1,15
<b>29</b>	5,08 ± 0,39	1,22 ± 0,07	0,81 ± 0,19
<b>30</b>	> 50	> 50	> 50
<b>31</b>	> 50	> 50	> 50
<b>32</b>	0,57 ± 0,18	0,26 ± 0,11	0,23 ± 0,10
<b>33</b>	0,39 ± 0,18	0,33 ± 0,11	0,33 ± 0,05
<b>34</b>	0,40 ± 0,22	0,49 ± 0,17	0,37 ± 0,25
<b>35</b>	0,30 ± 0,10	0,25 ± 0,19	0,11 ± 0,05
<b>36</b>	0,23 ± 0,07	0,19 ± 0,09	0,13 ± 0,05
<b>37</b>	> 50	> 50	> 50
<b>38</b>	65,62 ± 10,52	24,93 ± 2,06	22,23 ± 4,03

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-2.

**Tabelle A-2:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26-38** gegen HT-29 Kolonkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	HT-29, IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>13</b>	35,66 ± 6,54	4,46 ± 1,48	0,85 ± 0,11
<b>26</b>	25,56 ± 9,29	7,73 ± 1,57	3,62 ± 0,60
<b>27</b>	46,03 ± 19,49	6,04 ± 1,13	2,64 ± 0,17
<b>28</b>	21,69 ± 13,46	23,17 ± 7,24	11,12 ± 4,58
<b>29</b>	30,99 ± 13,68	15,50 ± 2,98	0,67 ± 0,12
<b>30</b>	> 100	> 100	> 100
<b>31</b>	38,24 ± 8,19	52,55 ± 6,00	44,85 ± 4,22
<b>32</b>	24,95 ± 13,36	22,31 ± 9,11	1,57 ± 0,66
<b>33</b>	18,18 ± 2,77	9,29 ± 3,22	3,15 ± 0,20
<b>34</b>	13,63 ± 7,32	7,10 ± 2,92	4,36 ± 2,02
<b>35</b>	42,91 ± 15,61	4,38 ± 3,31	0,95 ± 0,00
<b>36</b>	48,53 ± 12,74	13,64 ± 3,31	1,91 ± 1,31
<b>37</b>	> 100	> 100	> 100
<b>38</b>	71,13 ± 28,87	65,22 ± 16,44	26,56 ± 10,43

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-3:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26, 29, 32** und **35** gegen HT-29 bzw. HT-29<sup>COLC</sup> Kolonkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [μM] <sup>a</sup>					
	°HT-29	*HT-29	HT-29 <sup>COLC</sup>	°HT-29 <sup>COLC</sup>	*HT-29 <sup>COLC</sup>	HT-29 <sup>DOX</sup>
<b>13</b>	0.11 ± 0.06	0.22 ± 0.05	0,69 ± 0,10	0.43 ± 0.15	0.10 ± 0.02	0,42 ± 0,12
<b>26</b>	0.07 ± 0.02	0.95 ± 0.53	0,29 ± 0,10	0.21 ± 0.11	0.09 ± 0.01	3,18 ± 0,18
<b>29</b>	0.21 ± 0.08	0.13 ± 0.01	0,58 ± 0,09	1.20 ± 0.12	0.09 ± 0.01	0,28 ± 0,13
<b>32</b>	0.27 ± 0.16	0.61 ± 0.33	0,97 ± 0,34	1.48 ± 0.24	0.10 ± 0.02	1,12 ± 0,06
<b>35</b>	0.11 ± 0.02	0.27 ± 0.13	0,50 ± 0,24	0.18 ± 0.05	0.14 ± 0.04	0,75 ± 0,05

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

° 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Propofol (20 μM) zur Inhibierung der UGT1A9 verabreicht.

\* 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde MK517 (10 μM) zur Inhibierung von MRP-1 verabreicht.

**Tabelle A-4:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26-38** gegen KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	KB-V1 <sup>VBL</sup> , IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>13</b>	59,92 ± 13,00	35,55 ± 8,50	18,34 ± 7,60
<b>26</b>	42,93 ± 10,84	10,73 ± 4,34	5,07 ± 0,93
<b>27</b>	32,47 ± 1,84	17,66 ± 3,21	12,73 ± 1,77
<b>28</b>	29,62 ± 5,89	18,67 ± 3,13	19,74 ± 6,99
<b>29</b>	40,81 ± 3,88	20,50 ± 2,07	13,99 ± 4,98
<b>30</b>	> 100	> 100	> 100
<b>31</b>	-	-	-
<b>32</b>	17,81 ± 3,82	18,35 ± 3,04	10,32 ± 2,12
<b>33</b>	> 100	34,93 ± 15,71	23,25 ± 12,47
<b>34</b>	79,64 ± 6,75	21,54 ± 3,76	21,75 ± 3,82
<b>35</b>	30,46 ± 4,58	17,09 ± 2,54	8,82 ± 0,67
<b>36</b>	68,81 ± 18,81	20,72 ± 6,68	24,24 ± 7,18
<b>37</b>	> 100	46,50 ± 0,26	50,10 ± 18,27
<b>38</b>	39,12 ± 10,85	20,00 ± 0,13	18,13 ± 4,00

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-5:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26, 29, 32** und **35** gegen KB-V1 bzw. KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [μM] <sup>a</sup>		
	KB-V1	*KB-V1 <sup>VBL</sup>	KB-V1 <sup>DOX</sup>
<b>13</b>	0,05 ± 0,01	1,02 ± 0,04	1,79 ± 0,58
<b>26</b>	0,61 ± 0,03	3,73 ± 0,51	2,37 ± 0,37
<b>29</b>	0,45 ± 0,01	2,63 ± 0,32	1,56 ± 0,50
<b>32</b>	0,35 ± 0,01	1,51 ± 0,34	1,87 ± 0,23
<b>35</b>	1,91 ± 0,01	0,67 ± 0,09	1,10 ± 0,29

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

\* 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Verapamil-Hydrochlorid (24 μM) zur Inhibierung von P-gp verabreicht.

**Tabelle A-6:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26-38** gegen MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen.

Testsubstanz	MCF-7 <sup>TOPO</sup> , IC <sub>50</sub> [µM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>13</b>	6,24 ± 1,49	1,34 ± 0,51	1,01 ± 0,36
<b>26</b>	5,90 ± 1,90	3,19 ± 0,61	2,97 ± 0,91
<b>27</b>	14,64 ± 1,30	6,15 ± 1,93	6,58 ± 1,45
<b>28</b>	40,54 ± 7,34	20,34 ± 6,48	9,93 ± 2,81
<b>29</b>	5,68 ± 1,36	4,33 ± 2,27	3,58 ± 0,98
<b>30</b>	> 100	> 100	> 100
<b>31</b>	-	-	-
<b>32</b>	8,39 ± 2,59	3,79 ± 1,00	2,66 ± 1,00
<b>33</b>	6,69 ± 0,89	4,65 ± 1,21	2,37 ± 1,01
<b>34</b>	10,21 ± 2,81	7,18 ± 1,82	4,26 ± 1,95
<b>35</b>	7,13 ± 1,85	2,65 ± 1,13	2,64 ± 1,05
<b>36</b>	6,33 ± 1,69	3,79 ± 1,30	1,77 ± 0,61
<b>37</b>	> 100	> 100	> 100
<b>38</b>	16,69 ± 5,65	15,76 ± 5,16	12,51 ± 1,94

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-7:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Doxorubicin-Derivate **13** sowie **26, 29, 32** und **35** gegen MCF-7 bzw. MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>		
	MCF-7	*MCF-7 <sup>TOPO</sup>	MCF-7 <sup>DOX</sup>
<b>13</b>	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,66 ± 0,39
<b>26</b>	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,06	1,16 ± 0,53
<b>29</b>	0,15 ± 0,06	0,17 ± 0,07	1,93 ± 0,77
<b>32</b>	0,17 ± 0,02	0,52 ± 0,21	1,37 ± 0,68
<b>35</b>	0,43 ± 0,05	0,09 ± 0,01	1,05 ± 0,01

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

\* 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Fumitremorgin C (1,2 µM) zur Inhibierung von P-gp verabreicht.

## 9.2 MTT: Thymochinon (17) und seine Derivate

**Tabelle A-8:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate **17** sowie **40 -78** gegen 518A2 Melanom-Zellen.

Testsubstanz	518A2, IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>17</b>	29,47 ± 6,34	29,53 ± 8,80	28,33 ± 9,17
<b>40</b>	> 100	> 100	22,16 ± 8,00
<b>41</b>	> 100	> 100	66,40 ± 3,97
<b>42</b>	> 100	> 100	66,80 ± 9,32
<b>43</b>	> 100	> 100	52,03 ± 6,61
<b>44</b>	76,31 ± 5,36	46,48 ± 9,12	24,29 ± 7,40
<b>45</b>	82,92 ± 13,67	23,66 ± 5,42	13,51 ± 3,35
<b>46</b>	31,39 ± 8,33	14,68 ± 3,70	11,18 ± 4,01
<b>47</b>	2,69 ± 0,86	1,66 ± 0,56	0,33 ± 0,10
<b>48</b>	> 100	72,36 ± 8,14	48,64 ± 6,04
<b>49</b>	35,34 ± 7,33	18,48 ± 6,29	14,37 ± 3,43
<b>50</b>	34,74 ± 4,32	12,50 ± 4,70	5,74 ± 1,10
<b>51</b>	51,78 ± 11,50	33,83 ± 5,31	20,71 ± 8,69
<b>52</b>	71,24 ± 5,78	52,07 ± 4,83	36,09 ± 4,77
<b>53</b>	40,35 ± 2,77	31,04 ± 1,27	23,03 ± 7,07
<b>56</b>	26,57 ± 2,67	17,14 ± 3,34	3,90 ± 0,74
<b>57</b>	30,88 ± 2,06	17,82 ± 1,10	14,68 ± 1,83
<b>58</b>	> 100	> 100	> 100
<b>59</b>	> 100	> 100	> 100
<b>60</b>	39,27 ± 5,75	27,94 ± 4,24	13,31 ± 5,64
<b>61</b>	> 100	79,47 ± 7,82	51,67 ± 4,81
<b>62</b>	49,24 ± 13,94	28,12 ± 1,90	14,07 ± 6,82
<b>63</b>	> 100	67,31 ± 5,40	60,00 ± 4,21
<b>64</b>	25,70 ± 0,83	20,72 ± 3,65	6,80 ± 0,59
<b>65</b>	20,15 ± 1,23	13,12 ± 1,37	13,09 ± 2,33
<b>66</b>	> 100	> 100	> 100
<b>67</b>	41,44 ± 7,81	41,97 ± 11,45	43,71 ± 8,24
<b>68</b>	> 100	> 100	51,70 ± 2,46
<b>69</b>	52,47 ± 6,68	33,73 ± 4,59	12,23 ± 1,54
<b>70</b>	16,14 ± 4,82	3,69 ± 1,29	2,87 ± 0,32
<b>71</b>	> 100	> 100	53,27 ± 3,19
<b>72</b>	29,13 ± 11,52	12,31 ± 3,81	11,40 ± 2,71
<b>73</b>	50,87 ± 7,78	47,38 ± 11,62	27,31 ± 14,28

<b>74</b>	0,20 ± 0,08	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,02
<b>75</b>	63,13 ± 36,87	34,13 ± 9,63	22,64 ± 9,10
<b>76</b>	-	-	33,95 ± 16,49
<b>77</b>	-	-	16,90 ± 4,59
<b>78</b>	-	-	24,31 ± 8,60

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-11.

**Tabelle A-9:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate **17** sowie **40 -78** gegen HL-60 Leukämie-Zellen.

Testsubstanz	HL-60, IC <sub>50</sub> [µM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>17</b>	32,18 ± 6,45	30,80 ± 8,77	27,81 ± 5,95
<b>40</b>	> 100	9,99 ± 0,77	5,78 ± 1,44
<b>41</b>	88,77 ± 7,99	88,06 ± 4,70	49,87 ± 8,44
<b>42</b>	> 100	> 100	98,06 ± 1,94
<b>43</b>	> 100	> 100	> 100
<b>44</b>	24,44 ± 4,20	15,53 ± 2,73	13,54 ± 5,01
<b>45</b>	44,15 ± 6,88	14,24 ± 2,72	16,77 ± 3,93
<b>46</b>	29,08 ± 6,90	16,26 ± 3,53	20,78 ± 5,24
<b>47</b>	6,81 ± 0,56	2,45 ± 0,31	2,12 ± 0,75
<b>48</b>	79,67 ± 12,22	26,34 ± 9,95	24,31 ± 11,50
<b>49</b>	19,69 ± 3,78	16,15 ± 4,34	17,39 ± 8,98
<b>50</b>	20,11 ± 3,51	12,20 ± 5,17	7,99 ± 2,91
<b>51</b>	16,67 ± 10,41	13,89 ± 6,81	3,31 ± 0,75
<b>52</b>	56,47 ± 6,98	54,43 ± 3,51	53,97 ± 5,25
<b>53</b>	> 100	> 100	29,32 ± 11,97
<b>56</b>	15,69 ± 2,35	6,29 ± 2,21	9,01 ± 2,88
<b>57</b>	19,06 ± 2,54	6,22 ± 1,39	11,71 ± 2,27
<b>58</b>	> 100	> 100	> 100
<b>59</b>	> 100	> 100	> 100
<b>60</b>	8,73 ± 1,21	3,96 ± 0,83	2,28 ± 0,47
<b>61</b>	> 100	> 100	> 100
<b>62</b>	19,96 ± 2,45	7,60 ± 2,74	10,79 ± 3,11
<b>63</b>	> 100	> 100	> 100
<b>64</b>	14,87 ± 3,56	8,54 ± 2,71	9,35 ± 1,29
<b>65</b>	18,10 ± 7,91	3,18 ± 2,16	4,73 ± 1,09
<b>66</b>	40,32 ± 2,41	48,82 ± 10,23	69,86 ± 8,92
<b>67</b>	59,81 ± 28,50	43,08 ± 15,16	33,59 ± 9,47

9 Anhang

<b>68</b>	43,02 ± 4,93	35,78 ± 2,67	31,00 ± 2,68
<b>69</b>	> 100	17,19 ± 7,36	2,50 ± 1,73
<b>70</b>	3,24 ± 0,36	1,60 ± 0,57	1,71 ± 0,17
<b>71</b>	> 100	> 100	13,74 ± 9,50
<b>72</b>	72,25 ± 27,75	1,88 ± 0,63	0,13 ± 0,02
<b>73</b>	54,40 ± 3,16	66,27 ± 9,60	68,34 ± 4,41
<b>74</b>	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,001
<b>75</b>	65,90 ± 20,67	61,65 ± 24,68	79,21 ± 12,39
<b>76</b>	-	-	> 100
<b>77</b>	-	-	3,31 ± 0,75
<b>78</b>	-	-	2,99 ± 0,75

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-11.

**Tabelle A-10:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate **17** sowie **40 -78** gegen HT-29 Kolonkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	HT-29, IC <sub>50</sub> [µM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>17</b>	93,59 ± 6,42	95,03 ± 4,06	46,79 ± 18,76
<b>40</b>	> 100	> 100	> 100
<b>41</b>	> 100	> 100	68,51 ± 13,65
<b>42</b>	> 100	> 100	86,45 ± 13,55
<b>43</b>	> 100	> 100	77,33 ± 3,61
<b>44</b>	> 100	64,89 ± 35,11	73,96 ± 3,07
<b>45</b>	> 100	> 100	65,24 ± 28,82
<b>46</b>	> 100	70,33 ± 29,67	50,11 ± 16,11
<b>47</b>	> 100	27,88 ± 12,88	0,89 ± 0,37
<b>48</b>	> 100	> 100	> 100
<b>49</b>	> 100	59,69 ± 15,31	72,37 ± 2,44
<b>50</b>	> 100	37,96 ± 7,10	33,69 ± 1,37
<b>51</b>	87,07 ± 12,93	75,66 ± 24,35	32,34 ± 1,87
<b>52</b>	> 100	> 100	59,18 ± 4,13
<b>53</b>	> 100	> 100	81,12 ± 4,05
<b>56</b>	> 100	81,42 ± 18,58	39,12 ± 13,86
<b>57</b>	80,52 ± 10,15	80,30 ± 19,71	51,94 ± 8,20
<b>58</b>	> 100	> 100	> 100
<b>59</b>	> 100	> 100	22,45 ± 7,50
<b>60</b>	30,47 ± 19,54	39,39 ± 10,61	53,07 ± 10,32
<b>61</b>	> 100	> 100	> 100

<b>62</b>	78,01 ± 21,99	41,16 ± 33,84	46,42 ± 22,02
<b>63</b>	> 100	> 100	> 100
<b>64</b>	> 100	> 100	81,35 ± 36,52
<b>65</b>	45,56 ± 34,45	11,58 ± 8,43	7,11 ± 0,79
<b>66</b>	> 100	> 100	26,31 ± 11,27
<b>67</b>	> 100	> 100	32,51 ± 9,26
<b>68</b>	> 100	> 100	78,23 ± 2,78
<b>69</b>	> 100	> 100	86,54 ± 13,47
<b>70</b>	2,23 ± 1,75	1,30 ± 0,70	0,39 ± 0,05
<b>71</b>	> 100	> 100	8,07 ± 1,57
<b>72</b>	12,73 ± 9,74	12,16 ± 7,86	5,01 ± 0,32
<b>73</b>	> 100	> 100	> 100
<b>74</b>	0,04 ± 0,004	0,044 ± 0,006	0,05 ± 0,02
<b>75</b>	> 100	34,91 ± 15,09	9,30 ± 1,81
<b>76</b>	-	-	> 100
<b>77</b>	-	-	60,48 ± 18,02
<b>78</b>	-	-	48,90 ± 12,85

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-11.

**Tabelle A-11:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate gegen HT-29 bzw. HT-29<sup>COLC</sup> Kolonkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>				
	°HT-29	*HT-29	HT-29 <sup>COLC</sup>	°HT-29 <sup>COLC</sup>	*HT-29 <sup>COLC</sup>
<b>13</b>	51,44 ± 7,22	21,60 ± 4,83	57,21 ± 27,92	41,67 ± 9,72	77,48 ± 14,10
<b>40</b>	> 100	83,04 ± 16,96	83,32 ± 16,68	19,35 ± 4,95	88,85 ± 11,16
<b>43</b>	> 100	81,20 ± 18,80	> 100	79,96 ± 28,34	95,31 ± 4,69
<b>46</b>	71,36 ± 4,94	24,42 ± 10,03	48,40 ± 2,02	64,31 ± 9,66	32,93 ± 9,80
<b>47</b>	4,05 ± 2,27	2,12 ± 0,66	24,52 ± 8,79	93,89 ± 1,51	97,54 ± 2,46
<b>53</b>	> 100	> 100	> 100	66,16 ± 31,83	88,12 ± 6,63
<b>56</b>	> 100	31,61 ± 14,44	67,89 ± 10,99	87,08 ± 7,58	40,07 ± 23,70
<b>59</b>	> 100	55,49 ± 19,69	> 100	31,95 ± 10,60	81,00 ± 19,01
<b>65</b>	62,27 ± 37,73	0,34 ± 0,30	23,69 ± 3,77	20,31 ± 2,81	28,45 ± 1,20
<b>66</b>	36,76 ± 19,10	> 100	> 100	73,20 ± 26,81	> 100
<b>69</b>	90,86 ± 9,15	27,81 ± 7,48	70,24 ± 20,80	89,68 ± 0,65	39,90 ± 5,86
<b>70</b>	1,82 ± 0,85	0,16 ± 0,01	1,14 ± 0,48	1,58 ± 0,66	0,44 ± 0,22
<b>71</b>	16,34 ± 6,48	30,65 ± 7,05	30,55 ± 4,93	7,59 ± 0,70	37,62 ± 7,12
<b>72</b>	> 100	26,38 ± 6,97	40,96 ± 16,34	7,51 ± 2,15	47,34 ± 0,72
<b>73</b>	> 100	> 100	> 100	75,64 ± 24,36	88,85 ± 11,16

## 9 Anhang

<b>74</b>	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,67 ± 0,11	0,09 ± 0,04
<b>75</b>	> 100	75,63 ± 0,63	27,96 ± 8,95	2,83 ± 1,90	67,64 ± 8,94

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

\* 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Propofol (20 µM) zur Inhibierung der UGT1A9 verabreicht.

° 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde MK571(10 µM) zur Inhibierung von MRP-1 verabreicht.

**Tabelle A-12:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate **17** sowie **40 -78** gegen KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	KB-V1 <sup>VBL</sup> , IC <sub>50</sub> [µM] <sup>a</sup>		
	24 h	48 h	72 h
<b>17</b>	46,19 ± 4,79	34,43 ± 9,86	32,31 ± 6,01
<b>40</b>	> 100	> 100	38,81 ± 12,72
<b>41</b>	71,68 ± 1,04	58,44 ± 1,70	50,57 ± 0,89
<b>42</b>	> 100	56,14 ± 3,47	35,86 ± 2,69
<b>43</b>	> 100	> 100	61,72 ± 4,05
<b>44</b>	91,13 ± 8,87	30,77 ± 4,89	16,39 ± 5,58
<b>45</b>	67,27 ± 3,02	18,59 ± 1,98	13,74 ± 2,90
<b>46</b>	40,69 ± 11,59	18,83 ± 4,20	10,82 ± 4,12
<b>47</b>	3,24 ± 0,68	2,48 ± 0,87	0,55 ± 0,12
<b>48</b>	> 100	82,87 ± 9,63	62,62 ± 11,16
<b>49</b>	35,59 ± 6,03	24,11 ± 5,60	8,50 ± 2,66
<b>50</b>	51,19 ± 8,23	12,19 ± 5,17	7,99 ± 2,91
<b>51</b>	34,89 ± 6,43	36,74 ± 3,32	15,72 ± 4,18
<b>52</b>	75,89 ± 6,42	47,46 ± 7,20	39,98 ± 5,63
<b>53</b>	77,13 ± 8,13	36,81 ± 8,22	16,04 ± 1,47
<b>56</b>	20,65 ± 6,17	13,78 ± 1,87	6,95 ± 1,69
<b>57</b>	44,49 ± 5,89	17,70 ± 3,18	9,15 ± 2,46
<b>58</b>	> 100	> 100	35,14 ± 10,09
<b>59</b>	> 100	70,04 ± 9,16	41,28 ± 10,07
<b>60</b>	29,65 ± 13,28	32,60 ± 10,48	17,63 ± 3,86
<b>61</b>	> 100	61,54 ± 9,47	42,37 ± 7,96
<b>62</b>	> 100	42,35 ± 9,87	27,72 ± 5,88
<b>63</b>	> 100	76,68 ± 6,67	44,68 ± 8,87
<b>64</b>	40,31 ± 2,70	19,85 ± 1,51	12,36 ± 1,44
<b>65</b>	26,87 ± 4,72	21,83 ± 1,67	23,60 ± 1,62
<b>66</b>	69,38 ± 9,06	59,89 ± 20,66	51,19 ± 4,66

<b>67</b>	58,47 ± 6,69	28,31 ± 6,41	24,89 ± 13,28
<b>68</b>	59,31 ± 8,02	40,93 ± 10,93	43,09 ± 5,86
<b>69</b>	42,53 ± 5,54	30,48 ± 2,79	17,93 ± 1,05
<b>70</b>	3,40 ± 0,73	1,99 ± 0,48	1,48 ± 0,11
<b>71</b>	> 100	50,56 ± 3,81	46,21 ± 3,02
<b>72</b>	51,18 ± 22,62	16,07 ± 3,75	13,12 ± 3,50
<b>73</b>	> 100	> 100	> 100
<b>74</b>	0,13 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01
<b>75</b>	69,95 ± 20,87	56,49 ± 7,23	34,52 ± 17,25
<b>76</b>	-	-	29,69 ± 17,18
<b>77</b>	-	-	31,30 ± 4,04
<b>78</b>	-	-	26,41 ± 9,49

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-13.

**Tabelle A-13:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate gegen KB-V1 bzw. KB-V1<sup>VBL</sup> Zervixkarzinom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>	
	KB-V1	*KB-V1 <sup>VBL</sup>
<b>13</b>	25,75 ± 13,37	24,11 ± 3,45
<b>40</b>	57,31 ± 24,20	1,02 ± 0,63
<b>43</b>	31,24 ± 9,34	0,55 ± 0,17
<b>46</b>	15,21 ± 5,21	6,50 ± 0,96
<b>47</b>	0,53 ± 0,13	0,95 ± 0,60
<b>53</b>	20,85 ± 1,13	19,02 ± 2,43
<b>56</b>	20,59 ± 2,52	9,34 ± 4,79
<b>59</b>	31,55 ± 2,47	21,98 ± 1,36
<b>65</b>	18,97 ± 2,00	10,03 ± 4,51
<b>66</b>	83,41 ± 16,59	60,58 ± 12,20
<b>69</b>	15,47 ± 7,41	9,47 ± 5,16
<b>70</b>	1,21 ± 0,21	0,64 ± 0,21
<b>71</b>	45,40 ± 5,00	79,92 ± 1,91
<b>72</b>	23,10 ± 19,99	68,02 ± 6,14
<b>73</b>	27,51 ± 14,01	41,53 ± 4,60
<b>74</b>	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
<b>75</b>	21,29 ± 17,24	47,42 ± 5,89

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

\* 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Verapamil-HCl (24 µM) zur Inhibierung von P-gp verabreicht.

**Tabelle A-14:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate **17** bzw. **40-78** gegen MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen.

Testsubstanz	MCF-7 <sup>TOPO</sup> , IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		
	24 h	48 h	72 h
<b>17</b>	34,23 ± 4,25	27,95 ± 7,67	26,68 ± 5,64
<b>40</b>	> 100	> 100	> 100
<b>41</b>	> 100	> 100	> 100
<b>42</b>	> 100	95,60 ± 4,40	74,55 ± 7,25
<b>43</b>	> 100	> 100	> 100
<b>44</b>	85,12 ± 14,59	21,84 ± 0,79	11,29 ± 5,73
<b>45</b>	56,46 ± 10,18	9,75 ± 2,14	6,77 ± 3,24
<b>46</b>	48,03 ± 10,74	8,77 ± 1,90	7,74 ± 2,46
<b>47</b>	1,08 ± 0,15	1,09 ± 0,19	0,03 ± 0,01
<b>48</b>	> 100	> 100	63,36 ± 13,49
<b>49</b>	23,86 ± 4,90	18,38 ± 8,18	12,93 ± 3,36
<b>50</b>	40,13 ± 3,70	4,17 ± 1,17	2,44 ± 0,31
<b>51</b>	> 100	> 100	30,95 ± 11,05
<b>52</b>	64,80 ± 10,07	41,45 ± 8,63	22,42 ± 7,28
<b>53</b>	44,66 ± 0,95	34,00 ± 19,93	26,72 ± 2,22
<b>56</b>	27,34 ± 8,24	7,70 ± 2,27	5,40 ± 1,75
<b>57</b>	29,05 ± 3,18	8,23 ± 3,40	5,53 ± 1,65
<b>58</b>	> 100	> 100	> 100
<b>59</b>	> 100	> 100	> 100
<b>60</b>	53,65 ± 3,65	7,20 ± 0,43	5,57 ± 0,094
<b>61</b>	> 100	> 100	> 100
<b>62</b>	40,07 ± 9,94	9,55 ± 0,61	6,14 ± 1,04
<b>63</b>	> 100	> 100	> 100
<b>64</b>	16,22 ± 5,45	15,40 ± 4,06	14,02 ± 5,07
<b>65</b>	12,99 ± 2,63	4,88 ± 1,36	3,07 ± 0,59
<b>66</b>	> 100	> 100	86,30 ± 3,21
<b>67</b>	25,29 ± 10,24	23,73 ± 13,22	16,96 ± 6,51
<b>68</b>	35,11 ± 14,09	29,24 ± 7,64	23,03 ± 4,24
<b>69</b>	25,99 ± 7,89	11,24 ± 0,88	2,82 ± 1,80
<b>70</b>	10,73 ± 2,41	1,46 ± 0,69	0,36 ± 0,14
<b>71</b>	69,28 ± 19,28	67,26 ± 12,07	33,63 ± 1,19
<b>72</b>	41,35 ± 23,99	25,53 ± 11,47	10,02 ± 2,53
<b>73</b>	74,09 ± 5,28	79,35 ± 1,64	22,89 ± 0,05
<b>74</b>	0,03 ± 0,01	0,006 ± 0,003	0,005 ± 0,004

<b>75</b>	97,02 ± 2,98	28,83 ± 16,32	12,83 ± 3,70
<b>76</b>	-	-	49,75 ± 3,84
<b>77</b>	-	-	> 100
<b>78</b>	-	-	29,00 ± 3,40

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-15.

**Tabelle A-15:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM]<sup>a</sup> der Thymochinon-Derivate gegen MCF-7 bzw. MCF-7<sup>TOPO</sup> Mammakarzinom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [µM] <sup>a</sup>	
	MCF-7	*MCF-7 <sup>TOPO</sup>
<b>13</b>	20,09 ± 2,00	23,08 ± 2,53
<b>40</b>	93,12 ± 4,88	3,63 ± 0,15
<b>43</b>	25,57 ± 3,33	0,51 ± 0,16
<b>46</b>	11,75 ± 4,93	6,27 ± 1,69
<b>47</b>	0,02 ± 0,01	1,21 ± 0,56
<b>53</b>	7,06 ± 2,33	13,49 ± 4,44
<b>56</b>	16,20 ± 6,60	5,77 ± 3,84
<b>59</b>	44,22 ± 20,64	15,59 ± 3,67
<b>65</b>	8,67 ± 2,57	3,45 ± 0,49
<b>66</b>	70,92 ± 36,46	86,41 ± 9,23
<b>69</b>	6,26 ± 2,65	4,46 ± 2,12
<b>70</b>	0,42 ± 0,26	0,40 ± 0,18
<b>71</b>	41,21 ± 7,86	13,63 ± 5,93
<b>72</b>	22,86 ± 7,17	44,18 ± 7,23
<b>73</b>	> 100	13,48 ± 1,34
<b>74</b>	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,08
<b>75</b>	4,86 ± 2,20	3,96 ± 0,42

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

\* 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Fumitremorgin C (1,2 µM) zur Inhibierung von BCRP verabreicht.

### 9.3 MTT: Doxorubicin (13) und Thymochinon (17)

**Tabelle A-16:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der äquimolaren Mischung aus 13 und 17 gegen 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen.

Zelllinie	13 + 17, IC <sub>50</sub> [μM]		
	24 h	48 h	72 h
518A2	0,77 ± 0,14	0,35 ± 0,20	0,33 ± 0,03
HL-60	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
HT-29	21,50 ± 1,59	14,20 ± 4,20	1,09 ± 0,35
KB-V1 <sup>VBL</sup>	20,26 ± 2,14	19,09 ± 6,86	20,88 ± 3,53
MCF-7 <sup>TOPO</sup>	5,02 ± 2,16	1,15 ± 0,40	0,64 ± 0,22

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-17:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM]<sup>a</sup> der äquimolaren Mischung aus 13 und 17 gegen HT-29-, KB-V1- und MCF-7-Zellen.

Zelllinie	IC <sub>50</sub> [μM]		
	72 h	72 h <sup>o</sup>	72 h <sup>*</sup>
HT-29	1,09 ± 0,35	0,74 ± 0,04	0,10 ± 0,02
HT-29 <sup>COLC</sup>	0,83 ± 0,22	0,51 ± 0,31	0,17 ± 0,03
HT-29 <sup>DOX</sup>	0,35 ± 0,21	-	-
KB-V1	0,18 ± 0,02	-	-
KB-V1 <sup>VBL</sup>	20,88 ± 3,53	-	0,44 ± 0,16
KB-V1 <sup>DOX</sup>	5,60 ± 1,27	-	-
MCF-7	0,26 ± 0,02	-	-
MCF-7 <sup>TOPO</sup>	0,64 ± 0,22	-	0,18 ± 0,01
MCF-7 <sup>DOX</sup>	5,56 ± 1,16	-	-

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, 100%) mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

<sup>o</sup> 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde Propofol (20 μM) zur Inhibierung der UGT1A9 (HT-29) verabreicht.

<sup>\*</sup> 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen wurde MK751 (10 μM) zur Inhibierung von MRP-1 (HT-29), Verapamil-HCl (24 μM) zur Inhibierung von P-gp (KB-V1) und Fumitremorgin C (1,2 μM) zur Inhibierung von BCRP (MCF-7) verabreicht.

## 9.4 Apoptose: Doxorubicin (13) und seine Derivate

**Tabelle A-18:** Relative bax-, bcl-2- und bax / bcl-2-mRNA-Konzentration<sup>a</sup> in 518A2-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Doxorubicin-Derivaten (5 µM).

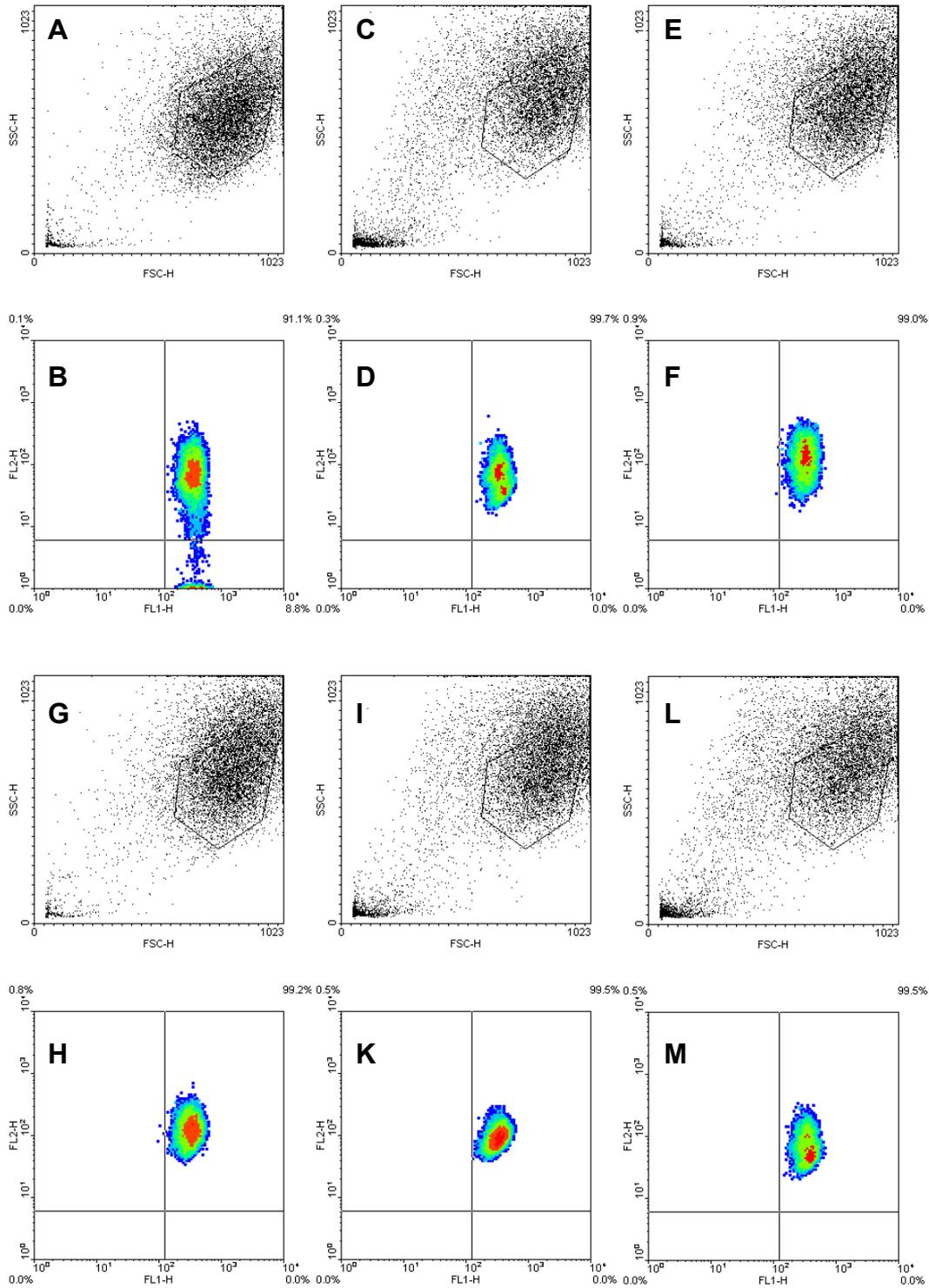
Testsubstanzen	Relative mRNA-Konzentration <sup>a</sup>					
	6 h			18 h		
	bax	bcl-2	bax / bcl-2	bax	bcl-2	bax / bcl-2
<b>13</b>	0,412	0,412	1,001	4,807	1,295	3,711
<b>26</b>	0,309	0,368	0,839	1,585	1,092	1,452
<b>29</b>	0,384	0,910	0,422	2,940	0,858	3,426
<b>32</b>	0,366	0,186	1,968	4,079	1,644	2,481
<b>35</b>	0,428	0,346	1,236	3,014	2,043	1,476

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-19.

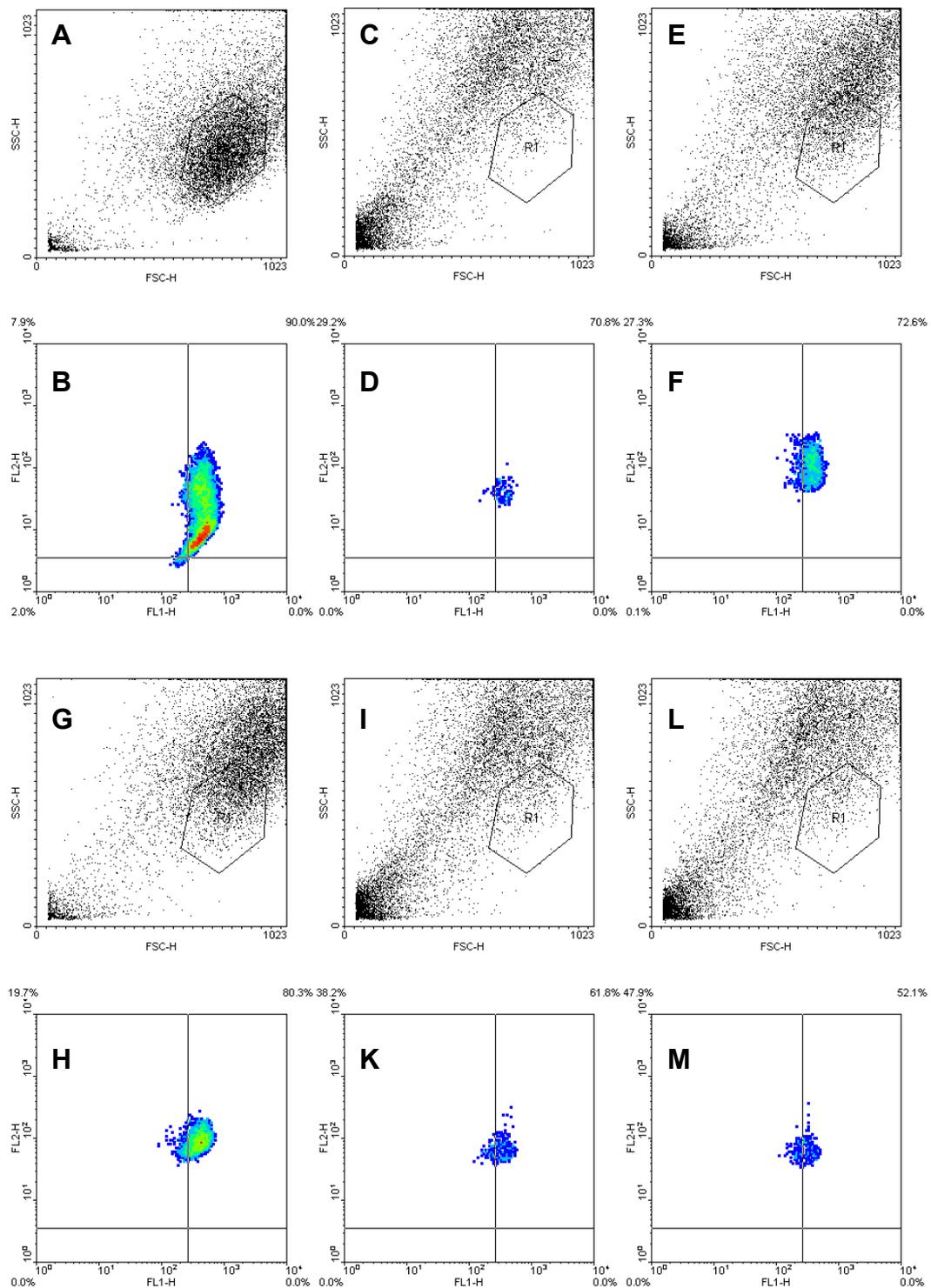
**Tabelle A-19:** Relative bax-, bcl-2- und bax / bcl-2-mRNA-Konzentration<sup>a</sup> in HL-60-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Doxorubicin-Derivaten (5 µM).

Testsubstanzen	Relative mRNA-Konzentration <sup>a</sup>					
	6 h			18 h		
	bax	bcl-2	bax / bcl-2	bax	bcl-2	bax / bcl-2
<b>13</b>	0,370	0,418	0,886	0,058	0,122	0,478
<b>26</b>	0,290	1,545	0,188	0,278	0,650	0,428
<b>29</b>	0,553	4,123	0,134	0,597	0,896	0,666
<b>32</b>	0,969	2,028	0,478	0,068	0,103	0,659
<b>35</b>	0,396	0,973	0,407	0,146	0,067	2,163

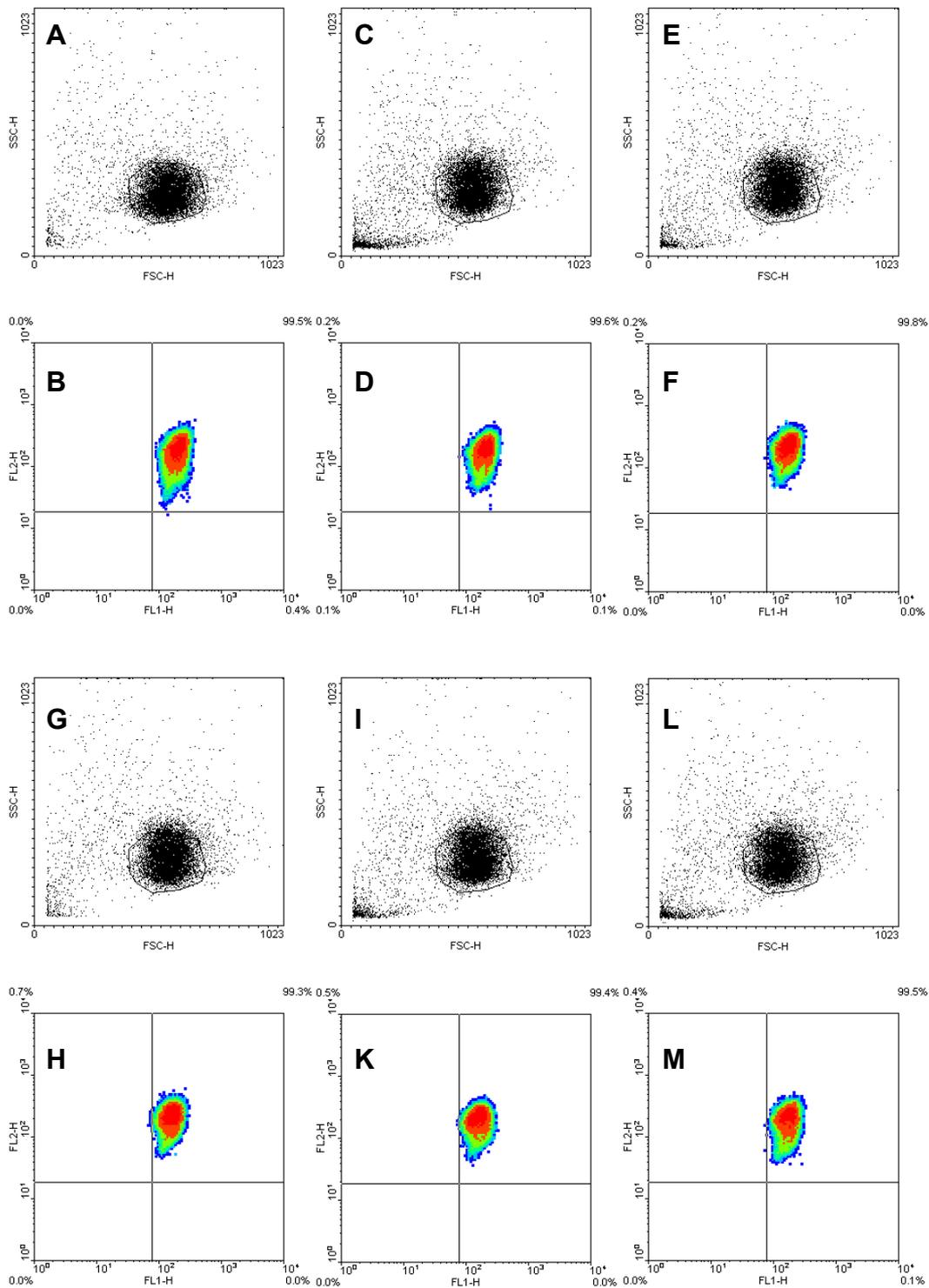
<sup>a</sup> Relative mRNA-Konzentration ermittelt aus quantitativen *real time*-PCR-Analysen, auf das Haushaltsgen der GAPDH normiert (Kontrolle = 1).



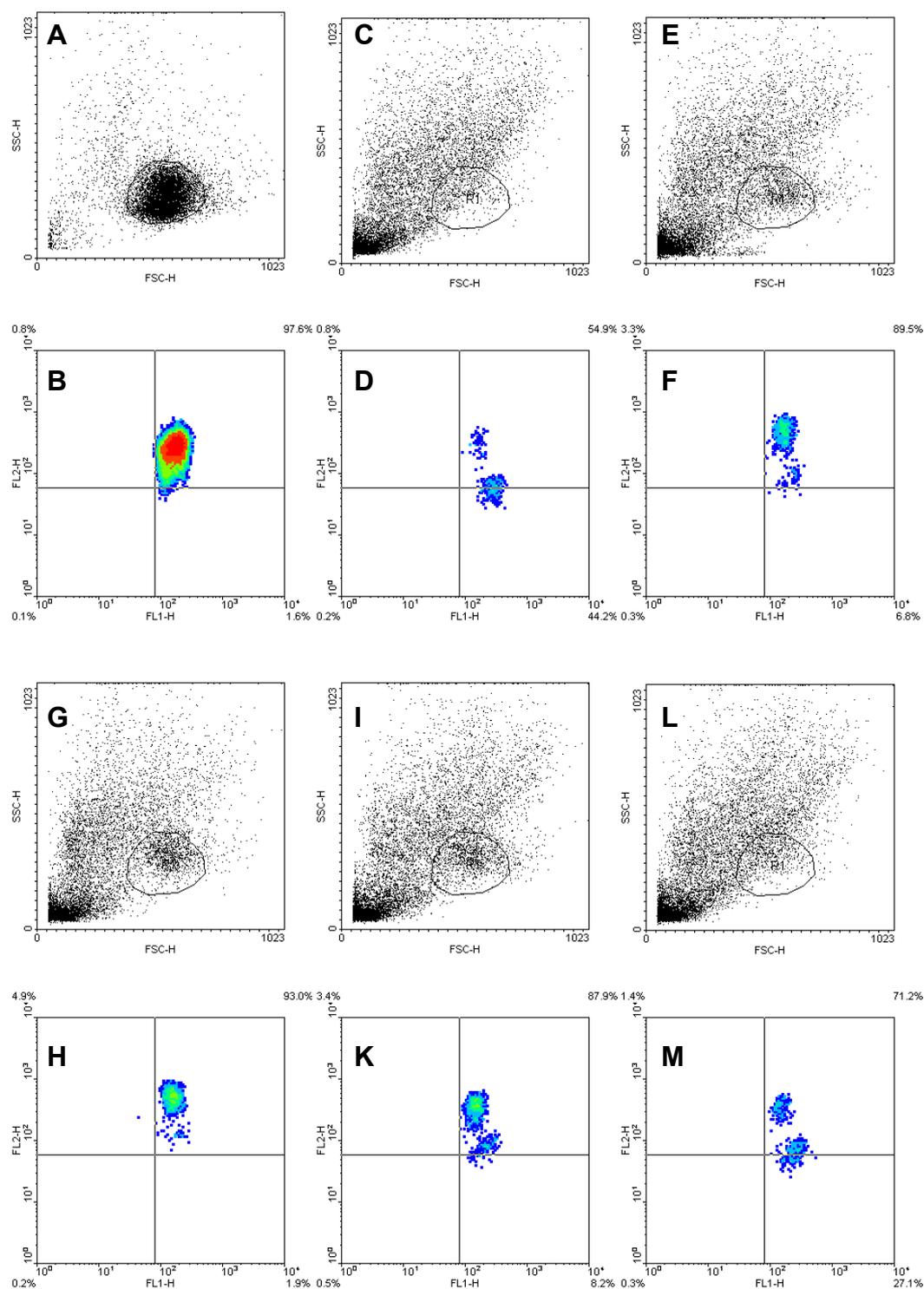
**Abbildung A-1:** Durchflusszytometrische Analyse JC-1-gefärbter, unbehandelter 518A2-Zellen (A-B) bzw. nach 6-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (**13**, 5  $\mu\text{M}$ , C-D) und seinen Derivaten **26** (5  $\mu\text{M}$ , E-F), **29** (5  $\mu\text{M}$ , G-H), **32** (5  $\mu\text{M}$ , I-K) und **35** (5  $\mu\text{M}$ , L-M): A, C, E, G, I, L) DotPlot aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon markiert die vitalen Zellen; B, D, F, H, K, M) DensityPlot (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons.



**Abbildung A-2:** Durchflusszytometrische Analyse JC-1-gefärbter, unbehandelter 518A2-Zellen (A-B) bzw. nach 18-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (13, 5  $\mu$ M, C-D) und seinen Derivaten 26 (5  $\mu$ M, E-F), 29 (5  $\mu$ M, G-H), 32 (5  $\mu$ M, I-K) und 35 (5  $\mu$ M, L-M): A, C, E, G, I, L) *DotPlot* aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon markiert die vitalen Zellen; B, D, F, H, K, M) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons.



**Abbildung A-3:** Durchflusszytometrische Analyse JC-1-gefärbter, unbehandelter HL-60-Zellen (A-B) bzw. nach 6-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (**13**, 5  $\mu\text{M}$ , C-D) und seinen Derivaten **26** (5  $\mu\text{M}$ , E-F), **29** (5  $\mu\text{M}$ , G-H), **32** (5  $\mu\text{M}$ , I-K) und **35** (5  $\mu\text{M}$ , L-M): A, C, E, G, I, L) *DotPlot* aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon markiert die vitalen Zellen; B, D, F, H, K, M) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons.



**Abbildung A-4:** Durchflusszytometrische Analyse JC-1-gefärbter, unbehandelter HL-60-Zellen (A-B) bzw. nach 18-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (**13**, 5  $\mu$ M, C-D) und seinen Derivaten **26** (5  $\mu$ M, E-F), **29** (5  $\mu$ M, G-H), **32** (5  $\mu$ M, I-K) und **35** (5  $\mu$ M, L-M): A, C, E, G, I, L) *DotPlot* aller 10000 Zellen (FSC-H / SSC-H), das Polygon markiert die vitalen Zellen; B, D, F, H, K, M) *DensityPlot* (FL1-H / FL2-H) aller Zellen innerhalb des Polygons.

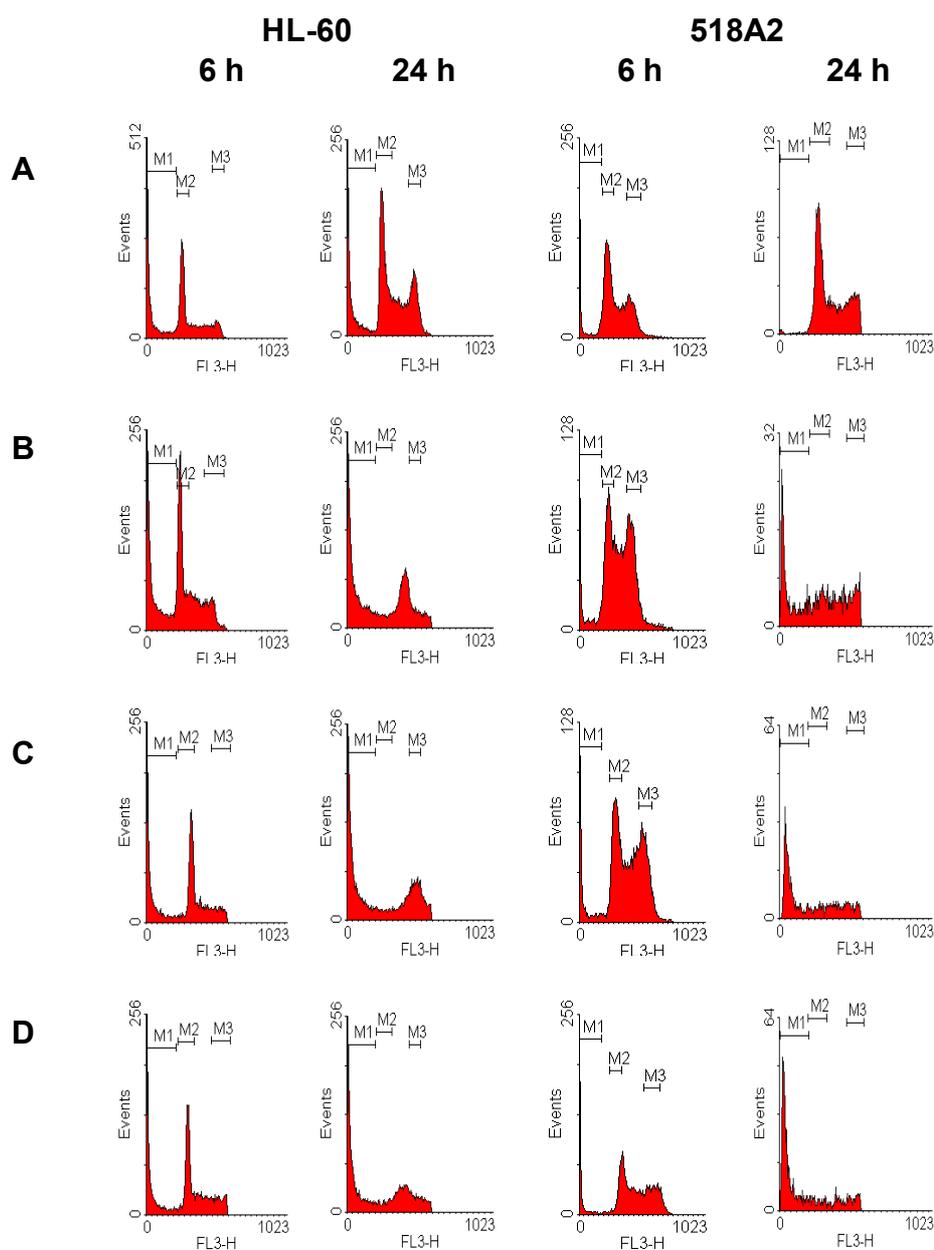
**Tabelle A-20:** Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in 518A2-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Doxorubicin-Derivaten (5 µM).

Inkubations- zeiten [h]	Ca <sup>2+</sup> -Konzentration [nM] <sup>a</sup>				
	13	26	29	32	35
0	25,75 ± 8,47	21,39 ± 7,95	21,39 ± 7,95	22,26 ± 6,85	22,26 ± 6,85
1	28,74 ± 12,25	14,75 ± 11,13	17,72 ± 4,81	19,98 ± 1,04	15,25 ± 5,26
2	36,97 ± 12,03	15,12 ± 6,75	19,83 ± 6,92	27,41 ± 8,57	20,37 ± 10,11
4	32,70 ± 12,13	19,49 ± 4,89	25,51 ± 6,92	12,41 ± 1,95	16,37 ± 5,82
6	29,46 ± 7,96	21,91 ± 6,77	19,66 ± 5,50	18,42 ± 10,52	20,45 ± 6,02
8	36,86 ± 16,79	14,93 ± 10,46	10,89 ± 1,96	21,89 ± 11,27	24,96 ± 4,34
18	20,04 ± 7,83	18,27 ± 12,14	21,20 ± 9,21	20,14 ± 10,27	17,71 ± 12,70
24	31,74 ± 12,56	22,81 ± 0,10	14,66 ± 5,19	14,06 ± 2,22	16,92 ± 1,98
48	12,76 ± 2,85	9,39 ± 0,83	7,50 ± 4,17	5,35 ± 0,60	15,77 ± 6,44
72	16,81 ± 10,45	6,60 ± 4,71	7,91 ± 4,95	4,77 ± 2,34	7,46 ± 0,88

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-21.**Tabelle A-21:** Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in HL-60-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Doxorubicin-Derivaten (5 µM).

Inkubations- zeiten [h]	Ca <sup>2+</sup> -Konzentration [nM] <sup>a</sup>				
	13	26	29	32	35
0	31,36 ± 0,98	30,19 ± 0,19	30,19 ± 0,19	30,19 ± 0,19	30,19 ± 0,19
1	134,28 ± 11,45	51,73 ± 5,95	42,06 ± 3,65	53,17 ± 11,63	45,46 ± 20,62
2	43,50 ± 4,54	43,83 ± 4,01	54,19 ± 3,13	109,69 ± 2,27	54,71 ± 3,50
4	32,52 ± 2,14	55,54 ± 5,32	103,23 ± 34,38	28,42 ± 2,65	54,70 ± 24,03
6	67,50 ± 3,07	56,88 ± 9,49	91,18 ± 5,74	47,23 ± 17,44	49,39 ± 13,17
8	31,96 ± 1,34	51,28 ± 17,67	89,63 ± 19,55	51,64 ± 5,09	65,59 ± 13,56
18	182,01 ± 39,17	31,93 ± 4,84	51,07 ± 20,29	35,73 ± 5,35	54,83 ± 2,87
24	198,83 ± 20,93	131,15 ± 34,14	67,14 ± 17,50	52,05 ± 19,20	77,38 ± 18,17
48	124,16 ± 32,77	107,95 ± 15,50	162,68 ± 6,69	64,71 ± 29,17	112,12 ± 20,81
72	115,11 ± 35,31	48,70 ± 7,46	59,27 ± 3,87	54,44 ± 24,05	40,89 ± 16,75

<sup>a</sup> Calciumkonzentration [nM] in mit den Testsubstanzen behandelten Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 mithilfe der Grynkiewicz-Gleichung [2] bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung A-5:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter, unbehandelter HL-60-Zellen bzw. Propidiumiodid-gefärbter 518A2-Zellen nach 6- bzw. 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin (**13**, B) und seinen Derivaten **26** (C) und **35** (D) (je 5  $\mu\text{M}$ , Kontrolle = A): Histogramme (FL3-H / Events) für die diskriminierten Zellen (Dubletten-Diskriminierung) mit M1 = SubG1, M2 = G1/G0, M3 = G2/M (S zwischen M2 und M3).

## 9.5 Apoptose: Thymochinon (17) und seine Derivate

**Tabelle A-22:** Relative bax-, bcl-2- und bax / bcl-2-mRNA-Konzentration<sup>a</sup> in 518A2 und HL-60-Zellen nach 24 h Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (5 µM).

Testsubstanzen	Relative mRNA-Konzentration <sup>a</sup>					
	518A2			HL-60		
	bax	bcl-2	bax / bcl-2	bax	bcl-2	bax / bcl-2
<b>17</b>	0,300	0,164	1,835	0,022	0,022	1,007
<b>47</b>	0,259	0,056	4,663	6,457	35,479	1,182
<b>70</b>	0,283	0,065	4,357	1,203	0,146	8,256
<b>72</b>	0,365	0,151	2,413	1,310	0,114	11,492

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-24.

**Tabelle A-23:** Relative bax-, bcl-2- und bax / bcl-2-mRNA-Konzentration<sup>a</sup> in 518A2- und HL-60-Zellen nach 48 h Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (5 µM).

Testsubstanzen	Relative mRNA-Konzentration <sup>a</sup>					
	518A2			HL-60		
	bax	bcl-2	bax / bcl-2	bax	bcl-2	bax / bcl-2
<b>17</b>	0,631	0,524	1,205	1248,414	250,444	4,985
<b>47</b>	0,339	0,029	11,626	0,752	0,684	1,099
<b>70</b>	0,182	0,137	1,328	2,254	0,359	6,280
<b>72</b>	0,644	0,593	1,085	2,047	0,039	52,996

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-24.

**Tabelle A-24:** Relative bax-, bcl-2- und bax / bcl-2-mRNA-Konzentration<sup>a</sup> in 518A2- und HL-60-Zellen nach 72 h Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (5 µM).

Testsubstanzen	Relative mRNA-Konzentration <sup>a</sup>					
	518A2			HL-60		
	bax	bcl-2	bax / bcl-2	bax	bcl-2	bax / bcl-2
<b>17</b>	0,662	0,445	1,485	1,504	0,115	13,090
<b>47</b>	0,157	0,244	0,650	43,115	43,097	1,000
<b>70</b>	0,580	0,261	2,220	2,125	2,090	1,016
<b>72</b>	0,564	0,244	2,310	1,599	2,196	0,728

<sup>a</sup> Relative mRNA-Konzentration ermittelt aus quantitativen *real time*-PCR-Analysen, auf das Haushaltsgen der GAPDH normiert (Kontrolle = 1).

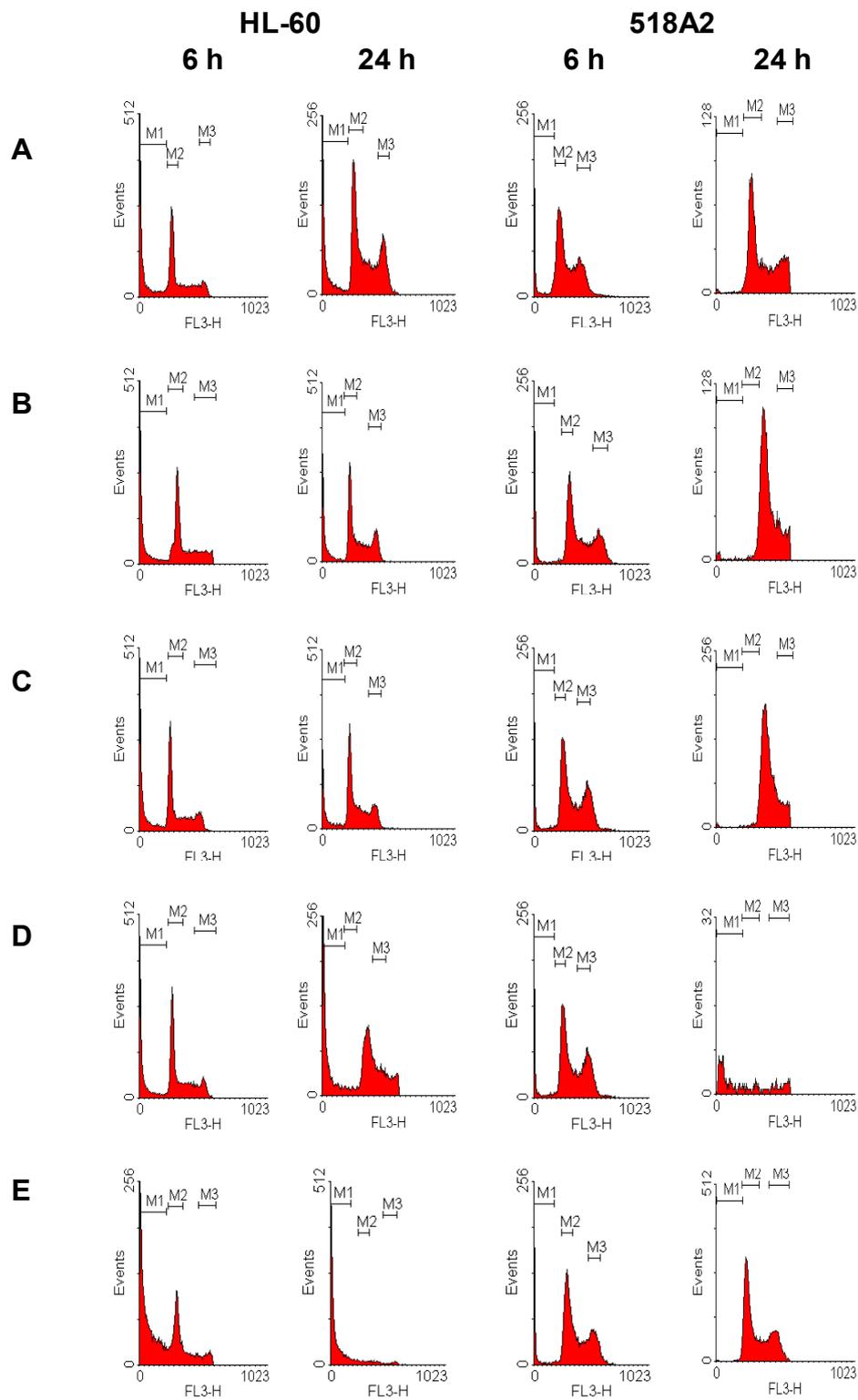
**Tabelle A-25:** Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in 518A2-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (5 µM).

Inkubations- zeiten [h]	Ca <sup>2+</sup> -Konzentration [nM] <sup>a</sup>			
	17	47	70	72
0	26,11 ± 5,60	26,11 ± 5,60	23,59 ± 1,97	23,59 ± 1,97
1	32,41 ± 10,79	22,64 ± 3,85	41,68 ± 16,26	19,91 ± 2,80
2	24,10 ± 4,31	18,60 ± 13,21	49,74 ± 2,97	30,61 ± 16,09
4	32,28 ± 17,76	24,01 ± 2,65	16,17 ± 9,39	27,94 ± 18,97
6	27,43 ± 6,56	14,26 ± 2,93	21,68 ± 10,01	32,53 ± 19,40
8	23,50 ± 4,71	26,79 ± 9,68	36,01 ± 22,88	47,71 ± 28,38
18	39,15 ± 0,14	28,37 ± 6,31	27,55 ± 6,94	26,41 ± 11,52
24	32,83 ± 10,77	26,97 ± 2,87	34,32 ± 8,40	16,97 ± 2,07
48	30,01 ± 8,08	55,63 ± 12,78	54,04 ± 2,99	14,07 ± 1,02
72	32,93 ± 15,04	40,83 ± 7,46	18,95 ± 2,67	30,43 ± 12,76

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-26.**Tabelle A-26:** Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in HL-60-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (5 µM).

Inkubations- zeiten [h]	Ca <sup>2+</sup> -Konzentration [nM] <sup>a</sup>			
	17	47	70	72
0	46,64 ± 6,05	46,64 ± 6,05	34,25 ± 9,46	34,25 ± 9,46
1	28,42 ± 4,56	33,72 ± 6,75	4,26 ± 3,57	29,03 ± 4,80
2	36,56 ± 10,32	42,54 ± 2,70	16,73 ± 4,73	35,99 ± 7,82
4	52,16 ± 6,12	41,61 ± 10,13	15,83 ± 1,96	48,51 ± 1,99
6	58,49 ± 10,27	29,03 ± 4,06	31,07 ± 7,78	44,90 ± 7,41
8	52,21 ± 7,25	33,38 ± 7,15	39,14 ± 15,99	64,39 ± 10,70
18	50,54 ± 4,75	31,65 ± 1,54	19,86 ± 8,63	51,33 ± 7,98
24	41,59 ± 11,64	23,87 ± 10,92	22,14 ± 14,74	53,78 ± 11,49
48	289,72 ± 31,90	583,85 ± 15,85	430,18 ± 26,90	169,52 ± 33,52
72	749,90 ± 27,19	749,90 ± 28,26	71,59 ± 13,04	59,06 ± 7,75

<sup>a</sup> Calciumkonzentration [nM] in mit den Testsubstanzen behandelten Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 mithilfe der Grynkiewicz-Gleichung {2} bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung A-6:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter, unbehandelter HL-60-Zellen bzw. Propidiumiodid-gefärbter 518A2-Zellen nach 6- bzw. 24-stündiger Behandlung mit Thymochinon (**17**, B) und seinen Derivaten **47** (C), **70** (D) und **72** (E) (je 5  $\mu$ M, Kontrolle = A): Histogramme (FL3-H / Events) für die diskriminierten Zellen (Dubletten-Diskriminierung) mit M1 = SubG1, M2 = G1/G0, M3 = G2/M.

**Tabelle A-27:** Inhibierende Eigenschaften von Thymochinon (**17**) und ausgewählten Derivaten auf die Funktion Zellzyklus-relevanter Kinasen.<sup>a</sup>

Testsubstanz	Inhibierung der Kinasen <sup>a</sup>				
	<b>17*</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>70</b>	<b>95*</b>
PIk1	~ 1 µM	79,0 ± 18,7 µM	6,7 ± 0,4 µM	17,2 ± 3,3 µM	4,8 ± 1,3 µM
PIk2	~ 2 µM	9,4 ± 0,9 µM	2,3 ± 0,1 µM	5,9 ± 0,4 µM	18,7 ± 1,8 µM
PIk3	~ 25 µM	44,5 ± 5,0 µM	10,2 ± 0,7 µM	18,0 ± 2,0 µM	53,9 ± 8,5 µM
Chk2	~ 4 µM	-	31,7 ± 2,2 µM	-	~ 20%
Pin1	~ 30 µM	-	~ 10%	79,2 ± 3,3 µM	~ 10%
Stat1	~ 40%	-	~ 45%	~ 18%	~ 20%
Stat3	~ 10 µM	~ 20%	~ 45%	~ 50%	~ 20%
Stat5b	~ 15%	-	-	~ 15%	~ 10%
Lck	~ 40%	~ 30%	~ 45%	~ 40%	~ 10%

<sup>a</sup> Angabe als IC<sub>50</sub>-Werte [µM] bzw. bei IC<sub>50</sub> > 100 µM als prozentuale Inhibierung [%] im Bindungs-Assay (AG um Dr. Thorsten Berg, MPI für Biochemie, Martinsried). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

\* aus [175] entnommen.

## 9.6 Apoptose: Doxorubicin (**13**) und Thymochinon (**17**)

**Tabelle A-28:** Relative bax-, bcl-2- und bax / bcl-2-mRNA-Konzentration<sup>a</sup> in 518A2- und HL-60-Zellen nach der Inkubation mit einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17** (je 5 µM) bzw. **17** allein.

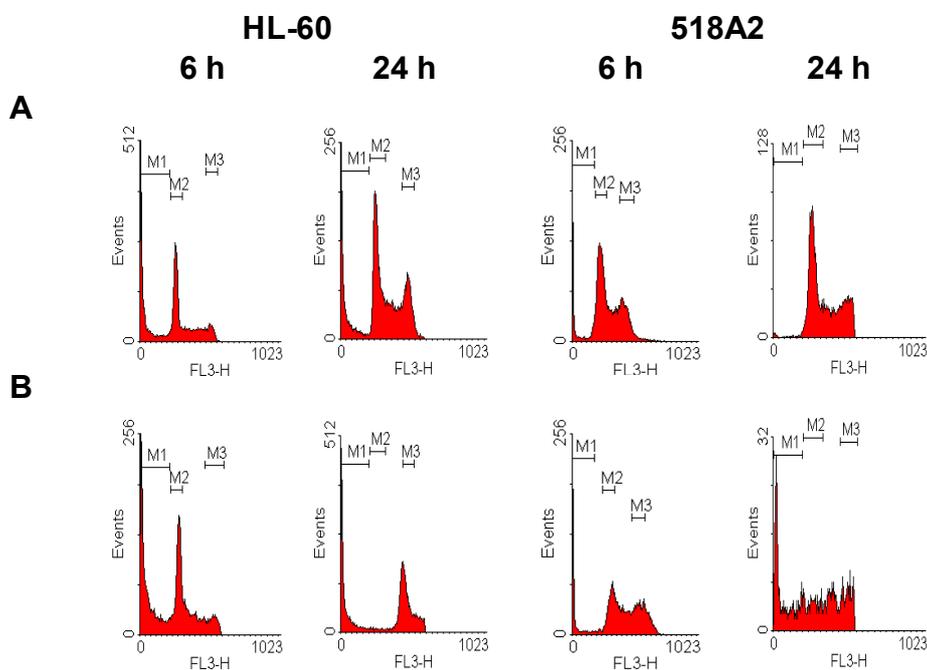
Zelllinien bzw. Testsubstanz	Relative mRNA-Konzentration <sup>a</sup>					
	6 h			18 h		
	bax	bcl-2	bax / bcl-2	bax	bcl-2	bax / bcl-2
518A2						
<b>13 + 17</b>	0,306	0,187	1,630	5,943	13,862	0,425
<b>17</b>	0,309	0,243	1,270	5,493	1,406	3,905
HL-60						
<b>13 + 17</b>	0,841	21,129	0,090	0,278	0,650	0,670
<b>17</b>	0,807	8,666	0,040	0,597	0,896	0,430

<sup>a</sup> Relative mRNA-Konzentration ermittelt aus quantitativen *real time*-PCR-Analysen, auf das Haushaltsgen der GAPDH normiert (Kontrolle = 1).

**Tabelle A-29:** Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in 518A2- bzw. HL-60-Zellen nach der Inkubation mit einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17** (je 5 µM).

Inkubationszeiten [h]	Ca <sup>2+</sup> -Konzentration [nM] <sup>a</sup>	
	518A2	HL-60
0	21,68 ± 1,03	30,87 ± 7,56
1	26,97 ± 9,20	14,68 ± 5,71
2	16,00 ± 9,92	24,68 ± 8,11
4	29,02 ± 2,84	78,01 ± 34,09
6	10,20 ± 5,91	22,59 ± 4,62
8	30,18 ± 12,76	34,95 ± 4,10
18	9,43 ± 3,43	138,47 ± 39,22
24	9,15 ± 1,90	315,24 ± 47,20
48	6,91 ± 4,20	210,57 ± 57,47
72	6,37 ± 3,37	185,70 ± 49,68

<sup>a</sup> Calciumkonzentration [nM] in mit den Testsubstanzen behandelten Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 mithilfe der Grynkiewicz-Gleichung {2} bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung A-7:** Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-gefärbter, un behandelter HL-60-Zellen bzw. Propidiumiodid-gefärbter 518A2-Zellen nach 6- bzw. 24-stündiger Behandlung mit einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17** (B) (je 5 µM, Kontrolle = A): Histogramme (FL3-H / Events) für die diskriminierten Zellen (Dubletten-Diskriminierung) mit M1 = SubG1, M2 = G1/G0, M3 = G2/M.

## 9.7 ROS-Produktion: Doxorubicin (13) und seine Derivate

**Tabelle A-30:** Prozentualer Anteil vitaler 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Doxorubicin-Derivaten (5  $\mu\text{M}$ ) bei gleichzeitiger Verwendung des Radikalfängers NAC (50 mM, 24 h zuvor zugegeben).

Testsubstanz	Anteil vitaler Zellen [%] <sup>a</sup>		
	518A2	HL-60	HT-29
<b>13</b>	12,12 $\pm$ 3,25	11,56 $\pm$ 2,25	1,67 $\pm$ 0,25
<b>26</b>	7,26 $\pm$ 1,23	13,21 $\pm$ 3,69	1,43 $\pm$ 0,69
<b>29</b>	12,63 $\pm$ 2,30	11,09 $\pm$ 2,96	1,37 $\pm$ 0,55
<b>32</b>	10,52 $\pm$ 3,21	12,59 $\pm$ 1,75	0,90 $\pm$ 0,23
<b>35</b>	10,06 $\pm$ 1,33	8,20 $\pm$ 0,79	0,66 $\pm$ 0,11

<sup>a</sup> Prozentuale Absorption mit den Testsubstanzen behandelte Zellen unter Verwendung des Radikalfängers NAC verglichen mit behandelten Zellen ohne Zugabe von NAC (1%) mittels MTT-Test bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-31:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> ausgewählter Doxorubicin-Derivate gegen 518A2-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	<sup>+</sup> 518A2	<sup>++</sup> 518A2	<sup>+++</sup> 518A2	<sup>++++</sup> 518A2
<b>13</b>	0,08 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,09	0,09 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,14
<b>26</b>	0,23 $\pm$ 0,14	0,45 $\pm$ 0,27	0,19 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,36
<b>29</b>	0,25 $\pm$ 0,15	0,72 $\pm$ 0,21	0,63 $\pm$ 0,09	0,64 $\pm$ 0,28
<b>32</b>	2,02 $\pm$ 0,78	7,90 $\pm$ 0,51	1,81 $\pm$ 0,13	1,45 $\pm$ 0,75
<b>35</b>	0,78 $\pm$ 0,49	0,88 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,22	1,17 $\pm$ 0,75

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-33.

**Tabelle A-32:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> ausgewählter Doxorubicin-Derivate gegen HL-60-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	<sup>+</sup> HL-60	<sup>++</sup> HL-60	<sup>+++</sup> HL-60	<sup>++++</sup> HL-60
<b>13</b>	0,01 $\pm$ 0,003	0,09 $\pm$ 0,06	0,06 $\pm$ 0,03	1,72 $\pm$ 0,72
<b>26</b>	0,03 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,34
<b>29</b>	0,06 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,78	4,09 $\pm$ 3,07
<b>32</b>	0,31 $\pm$ 0,10	1,28 $\pm$ 0,84	0,06 $\pm$ 0,04	3,26 $\pm$ 0,93
<b>35</b>	0,33 $\pm$ 0,12	0,03 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,05	3,08 $\pm$ 2,17

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-33.

**Tabelle A-33:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> ausgewählter Doxorubicin-Derivate gegen HT-29-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	+HT-29	**HT-29	***HT-29	****HT-29
<b>13</b>	0,23 ± 0,17	0,49 ± 0,21	0,32 ± 0,22	0,65 ± 0,22
<b>26</b>	0,09 ± 0,04	0,15 ± 0,09	0,11 ± 0,05	0,42 ± 0,24
<b>29</b>	0,79 ± 0,14	2,89 ± 1,70	1,22 ± 0,42	0,68 ± 0,03
<b>32</b>	1,84 ± 0,99	0,94 ± 0,42	1,66 ± 0,95	0,71 ± 0,05
<b>35</b>	0,21 ± 0,08	1,12 ± 0,20	1,11 ± 0,57	0,95 ± 0,00

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Substanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

+ 50  $\mu\text{M}$  PD 98059 zur Inhibierung der ERK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\* 20  $\mu\text{M}$  SP 600125 zur Inhibierung der JNK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\*\* 10  $\mu\text{M}$  SB 202190 zur Inhibierung der p38-MAPK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

\*\*\*\* 50 nM PKC 412 zur Inhibierung der PKC 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

## 9.8 ROS-Produktion: Thymochinon (17) und seine Derivate

**Tabelle A-34:** Prozentualer Anteil vitaler 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (5  $\mu\text{M}$ ) bei gleichzeitiger Verwendung des Radikalfängers NAC (50 mM, 24 h vorher zugegeben).

Testsubstanz	Anteil vitaler Zellen [%] <sup>a</sup>		
	518A2	HL-60	HT-29
<b>17</b>	2,18 ± 0,32	0,63 ± 0,06	0,89 ± 0,26
<b>47</b>	1,15 ± 0,25	1,13 ± 0,31	1,15 ± 0,14
<b>70</b>	1,92 ± 0,96	2,14 ± 0,14	4,45 ± 0,23
<b>72</b>	1,26 ± 0,13	8,89 ± 0,22	1,14 ± 0,36
<b>73</b>	1,19 ± 0,24	0,62 ± 0,07	1,01 ± 0,29
<b>74</b>	2,37 ± 1,35	9,41 ± 0,45	1,81 ± 1,02
<b>75</b>	1,80 ± 0,54	6,52 ± 0,85	1,39 ± 3,42

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-35.

**Tabelle A-35:** Prozentualer Anteil vitaler 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen nach der Inkubation mit ausgewählten Thymochinon-Derivaten (50  $\mu\text{M}$ ) bei gleichzeitiger Verwendung des Radikalfängers NAC (50 mM, 24 h vorher zugegeben).

Testsubstanz	Anteil vitaler Zellen [%] <sup>a</sup>		
	518A2	HL-60	HT-29
<b>17</b>	11,3 $\pm$ 3,35	3,61 $\pm$ 0,58	4,25 $\pm$ 0,18
<b>47</b>	5,95 $\pm$ 2,12	14,35 $\pm$ 4,46	1,22 $\pm$ 0,39
<b>70</b>	2,48 $\pm$ 0,96	3,41 $\pm$ 0,39	0,98 $\pm$ 0,18
<b>72</b>	0,95 $\pm$ 0,21	6,79 $\pm$ 0,78	1,92 $\pm$ 0,27
<b>73</b>	1,89 $\pm$ 0,36	0,93 $\pm$ 0,12	1,06 $\pm$ 0,38
<b>74</b>	16,75 $\pm$ 1,67	1,69 $\pm$ 0,57	2,49 $\pm$ 1,59
<b>75</b>	1,54 $\pm$ 0,78	6,85 $\pm$ 0,16	1,66 $\pm$ 0,44

<sup>a</sup> Prozentuale Absorption mit den Testsubstanzen behandelte Zellen unter Verwendung des Radikalfängers NAC verglichen mit behandelten Zellen ohne Zugabe von NAC (1%) mittels MTT-Test bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-36:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> ausgewählter Thymochinon-Derivate gegen 518A2-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	<sup>+</sup> 518A2	<sup>++</sup> 518A2	<sup>+++</sup> 518A2	<sup>++++</sup> 518A2
<b>17</b>	31,30 $\pm$ 0,68	12,91 $\pm$ 2,39	23,01 $\pm$ 5,72	31,03 $\pm$ 0,25
<b>47</b>	0,47 $\pm$ 0,22	0,65 $\pm$ 0,09	0,35 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,28
<b>70</b>	1,47 $\pm$ 0,62	0,70 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,22	0,79 $\pm$ 0,05
<b>72</b>	93,64 $\pm$ 1,89	2,98 $\pm$ 0,90	27,24 $\pm$ 5,09	13,51 $\pm$ 6,73

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-38.

**Tabelle A-37:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> ausgewählter Thymochinon-Derivate gegen HL-60-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	<sup>+</sup> HL-60	<sup>++</sup> HL-60	<sup>+++</sup> HL-60	<sup>++++</sup> HL-60
<b>17</b>	62,00 $\pm$ 3,25	60,58 $\pm$ 39,42	18,84 $\pm$ 10,61	73,15 $\pm$ 37,97
<b>47</b>	1,41 $\pm$ 0,41	5,17 $\pm$ 3,53	17,26 $\pm$ 0,95	17,89 $\pm$ 7,84
<b>70</b>	2,00 $\pm$ 0,02	12,55 $\pm$ 1,32	1,86 $\pm$ 0,20	88,18 $\pm$ 11,82
<b>72</b>	2,49 $\pm$ 0,96	6,07 $\pm$ 1,77	0,39 $\pm$ 0,09	> 100

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-38.

**Tabelle A-38:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> ausgewählter Thymochinon-Derivate gegen HT-29-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	+HT-29	++HT-29	+++HT-29	++++HT-29
<b>17</b>	27.40 ± 11.21	15.88 ± 2.65	41.53 ± 11.68	> 100
<b>47</b>	6.09 ± 2.15	0.11 ± 0.06	4.43 ± 1.42	72,72 ± 27,23
<b>70</b>	0.03 ± 0.01	0.17 ± 0.07	0.50 ± 0.09	4,9 ± 1,26
<b>72</b>	0.51 ± 0.03	1.03 ± 0.76	0.82 ± 0.31	5,30 ± 0,37

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Substanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

+ 50  $\mu\text{M}$  PD 98059 zur Inhibierung der ERK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

++ 20  $\mu\text{M}$  SP 600125 zur Inhibierung der JNK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

+++ 10  $\mu\text{M}$  SB 202190 zur Inhibierung der p38-MAPK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

++++ 50 nM PKC 412 zur Inhibierung der PKC 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

## 9.9 ROS-Produktion: Doxorubicin (13) und Thymochinon (17)

**Tabelle A-39:** Prozentualer Anteil vitaler 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen nach der Inkubation mit einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17** (je 5  $\mu\text{M}$ ) mit und ohne gleichzeitige Verwendung des Radikalfängers NAC (50 mM, 24 h zuvor zugegeben).

Testsubstanz	Anteil vitaler Zellen [%] <sup>a</sup>		
	518A2	HL-60	HT-29
<b>13 + 17</b>	8,74 ± 1,56	11,14 ± 3,68	1,09 ± 0,39

<sup>a</sup> Prozentuale Absorption behandelter relativ zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-40:** IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu\text{M}$ ]<sup>a</sup> einer äquimolaren Mischung aus **13** und **17** gegen 518A2-, HL-60- und HT-29-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung redox-sensitiver Kinasen.

Zelllinie	<b>13 + 17</b> , IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>			
	+	++	+++	++++
518A2	0,45 ± 0,29	0,45 ± 0,25	0,40 ± 0,06	0,48 ± 0,18
HL-60	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,04 ± 0,03	8,59 ± 0,38
HT-29	0,46 ± 0,23	1,03 ± 0,46	0,98 ± 0,55	1,09 ± 0,16

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten aus den Konzentrations-Reaktions-Kurven nach Behandlung der Zellen mit den Substanzen durch die Messung der prozentualen Absorption lebender Zellen relativ zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

+ 50  $\mu\text{M}$  PD 98059 zur Inhibierung der ERK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

++ 20  $\mu\text{M}$  SP 600125 zur Inhibierung der JNK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

+++ 10  $\mu\text{M}$  SB 202190 zur Inhibierung der p38-MAPK 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

++++ 50 nM PKC 412 zur Inhibierung der PKC 1,5 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

**Tabelle A-41:** Beteiligung der Ceramide an der Wirksamkeit einer äquimolaren Mischung aus Doxorubicin (**13**) und Thymochinon (**17**) in den 518A2 Melanom-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu$ M] <sup>a</sup>			R (+/-) <sup>b</sup>	
	518A2	+518A2	**518A2	$\frac{+518A2}{518A2}$	$\frac{**518A2}{518A2}$
<b>13</b>	0,12 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,8	0,5
<b>13 + 17</b>	0,33 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,42 ± 0,30	0,3	1,3
<b>17</b>	28,33 ± 9,17	18,08 ± 4,47	16,01 ± 0,52	0,6	0,7

<sup>a</sup> Siehe Tabelle A-42.**Tabelle A-42:** Beteiligung der Ceramide an der Wirksamkeit einer äquimolaren Mischung aus Doxorubicin (**13**) und Thymochinon (**17**) in den HL-60 Leukämie-Zellen.

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (72 h) [ $\mu$ M] <sup>a</sup>			R (+/-) <sup>b</sup>	
	HL-60	+HL-60	**HL-60	$\frac{+HL-60}{HL-60}$	$\frac{**HL-60}{HL-60}$
<b>13</b>	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,93 ± 0,08	0,6	11,6
<b>13 + 17</b>	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,69 ± 0,17	0,5	34,5
<b>17</b>	27,81 ± 5,95	23,19 ± 1,09	27,52 ± 1,95	0,8	0,99

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte erhalten nach 72-stündiger Behandlung der Zellen mittels MTT-Test. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.<sup>b</sup> Der Faktor R (+/-) ergibt sich aus den Quotienten der IC<sub>50</sub> (72 h)-Werte mit und ohne Inhibitorzugabe.\* 1  $\mu$ M Fumonisin B1 wurde zur Inhibierung der Ceramid-Synthase 24 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.\*\* 10  $\mu$ M Chlorpromazin wurden zur Inhibierung der Sphingomyelinase 3 h vor der Zugabe der Testsubstanzen verabreicht.

## 9.10 Zelluläre Aufnahme und Verteilung: Doxorubicin (**13**) und seine Derivate

**Tabelle A-43:** Aufnahme (Influx) [%]<sup>a</sup> von Doxorubicin (**13**) und ausgewählten Derivaten in die 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen nach einer 3-stündigen Inkubation (5  $\mu$ M).

Testsubstanz	Anteil vitaler Zellen [%] <sup>a</sup>				
	518A2	HL-60	HT-29	KB-V1 <sup>VBL</sup>	MCF-7 <sup>TOPO</sup>
<b>13</b>	19,9 ± 6,4	14,5 ± 7,8	-	-	7,2 ± 2,5
<b>26</b>	12,1 ± 6,0	14,0 ± 5,7	-	2,4 ± 1,0	23,7 ± 8,4
<b>29</b>	30,4 ± 1,5	19,3 ± 8,0	1,8 ± 1,2	-	2,4 ± 1,2
<b>32</b>	15,9 ± 6,5	13,3 ± 9,1	-	-	-
<b>35</b>	8,3 ± 1,3	30,6 ± 0,4	4,0 ± 3,1	-	-

<sup>a</sup> Zelluläre Aufnahme der Testsubstanzen ermittelt mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz ( $\lambda_{Exc} = 485 / 20$  nm,  $\lambda_{Em} = 590 / 20$  nm) relativ zur unbehandelten Kontrolle (0%). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle A-44:** Ausschleusung (Efflux) [%]<sup>a</sup> Doxorubicin (**13**) und ausgewählten Derivaten aus 518A2-, HL-60-, HT-29-, KB-V1<sup>VBL</sup>- und MCF-7<sup>TOPO</sup>-Zellen innerhalb von 3 h nach der Aufnahme.

Testsubstanz	Anteil vitaler Zellen [%] <sup>a</sup>				
	518A2	HL-60	HT-29	KB-V1 <sup>VBL</sup>	MCF-7 <sup>TOPO</sup>
<b>13</b>	-	-	-	-	-
<b>26</b>	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-	-	1,1 ± 0,0
<b>29</b>	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	-	1,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<b>32</b>	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	-	-	-
<b>35</b>	0,4 ± 0,2	2,0 ± 1,4	4,3 ± 1,4	-	1,5 ± 0,8

<sup>a</sup> Zelluläre Wirkstoffausschleusung der Testsubstanzen ermittelt mithilfe der intrinsischen Fluoreszenz ( $\lambda_{Exc} = 485 / 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em} = 590 / 20 \text{ nm}$ ) relativ zur unbehandelten Kontrolle (0%). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

## 9.11 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
A, mA	Ampere, Milliampere
Ab, pAb, mAb	Antikörper ( <i>antibody</i> ), polyklonaler Ab, monoklonaler Ab
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette-transporter</i>
A.D.E.P.T.	<i>Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
AP	„Alkalische Phosphatase“-Puffer
AP-T	AP-Puffer mit Tween
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BH1-4	<i>Bcl-2 homology</i>
Bid, tBid	<i>BH3 interacting domain death agonist, truncated Bid</i>
Bidest	doppelt destilliertes Wasser
bp, kb	Basenpaare, Kilobasen
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CAD	<i>caspase activated DNase</i>
cDNA	komplementäre <i>DNA (complementary, copy)</i>
COLC	Colchicin
CS	Ceramidsynthase
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DEVD	Peptid-Sequenz: Asp-Glu-Val-Asp
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DOX	Doxorubicin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>fas-associated protein with death domain</i>
FasL	<i>Fas-Ligand</i>
FBS	fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FSC	<i>forward scatter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1 beta converting enzyme</i>
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAD	<i>inhibitor of CAD</i>
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibierende Konzentration ( <i>inhibitory concentration</i> )
JC-1	(5,5'-6,6'-Tetrachloro-1,1'-3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbo- cyanin-Iodid
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Konz.	Konzentration

l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LETD	Peptid-Sequenz: Leu-Glu-Thr-Asp
LEHD	Peptid-Sequenz: Leu-Glu-His-Asp
log	<i>Logarithmus</i>
m, mm, µm, nm	Meter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M	Molare Masse
M, mM, µM, nM	molar, milli-molar, mikro-molar, nano-molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MRP-1	<i>multiple drug resistance protein 1</i>
MSD	Membrandomäne ( <i>membrane spanning domain</i> )
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NAC	<i>N-Acetyl-L-Cystein</i>
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NBT	<i>p</i> -Nitroblautetrazoliumchlorid
n.d.	nicht bestimmt ( <i>not determined</i> )
NTP, dNTP	Nukleotidtriphosphat, Desoxyribonukleotidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	<i>poly ADP ribose polymerase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
P-gp	P-Glycoprotein ( <i>permeability glycoprotein</i> )
PKC	Proteinkinase C
PLK	Pololike Kinase
PQQ	<i>pyrroloquinoline quinone</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA, mRNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid), messenger RNA
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )

RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SM	Sphingomyelinase
sp.	Spezies
SSC	<i>sideward scatter</i>
SYBR Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-3-benzothiazolium-Kation
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TI	Therapeutischer Index
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR 1	TNF-Rezeptor
TOPO	Topotecan
TQ	Thymochinon
Tr.	Tropfen
TRADD	<i>TNFR-associated protein with death domain</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis-induced ligand</i>
TUNEL	<i>terminale deoxytransferase-mediated dUTP nick end labelling</i>
UDP, UTP	Uridindiphosphat, Uridintriphosphat
UGT	UDP-Glycosyltransferase
ü. N.	über Nacht
V, mV	Volt, Millivolt
v.a.	vor allem
VBL	Vinblastin
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel

## 9.12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Katharina Effenberger-Neidnicht (geb. Effenberger)

Albert-Einstein-Ring 18

95448 Bayreuth

Geburtsdatum: 15.05.1984

Geburtsort: Finsterwalde

### **Schul- und Hochschulausbildung**

1990 – 1996	Grundschule in Crinitz
1996 – 2003	Abitur am Sängerstadt-Gymnasium in Finsterwalde mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
2003 – 2005	Grundstudium der Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald mit dem Abschluss Vordiplom
2005 – 2007	Hauptstudium der Biochemie an der Universität in Bayreuth mit dem Abschluss Diplom Diplomarbeit am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biologie, Chemie und Geowissenschaften – der Universität Bayreuth „Wirkmechanismen neuer Doxorubicinderivate in resistenten Tumorzellen“
10 / 2007	Promotionsbeginn am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biologie, Chemie und Geowissenschaften – der Universität Bayreuth

### **Lehre:**

2007	Betreuung der Übung für Biochemiker zur Grundvorlesung OC 1
2007 – 2011	Betreuung von Studenten im Grund- und Hauptpraktikum sowie bei der Bachelor- und Masterarbeit

→ Haupt-Praktikanten:

- 2008 Patrick Weiß (Hauptpraktikum Lehramt, vertieft: „Neue Oxazolderivate – Apoptosedetektion mittels Annexin-V-Fluos- und JC-1-Markierung“), Marc-André Schneider (Praktikum Wirkstoffchemie: „Zytotoxizitätstests neuer Thymochinonderivate“), Katharina Mahal (Praktikum Wirkstoffchemie: „Untersuchungen an *multi-drug* resistenten Tumorzellen“), Michael Ostermeier (Praktikum Wirkstoffchemie: „Synthese von Thymochinonderivaten und Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Test“).
- 2009 Susanne Ruch und David Heinrich (Organisches Forschungspraktikum: „Zytotoxizitätstests neuer Doxorubicin- und Thymochinonderivate an resistenten Tumorzellen“), Alexandra Heichwald (Praktikum Naturstoffchemie II: „Charakterisierung von Ruthenium-Steroid-Komplexen: Zytotoxizitätsbestimmung und Bandshift-Assay“), Isabel Wittmann (Praktikum Wirkstoffchemie: „Zytotoxizitätstests neuer Doxorubicinderivate unter dem Einfluss des spezifischen MRP-Inhibitors MK571 bzw. eines Caspase-8-Inhibitors“), Benjamin Christen (Praktikum Wirkstoffchemie: „Zytotoxizitätstests neuer Thymochinonderivate unter dem Einfluss des spezifischen MRP-Inhibitors MK571“).
- 2010 Katharina Mahal (Forschungsorientiertes Praktikum: „Ceramide als *second messenger* der Doxorubicin-induzierten Apoptose in Melanomzellen“), Karolin Kempf (Forschungsorientiertes Praktikum: „Zytotoxizitätstests verschiedener Kombinationen von Kinase-Inhibitoren mit Doxorubicinderivaten“), Julienne Münzner (Forschungsorientiertes Praktikum: „Zelluläre Aufnahme eines neuen Gold-Imidazol-Komplexes“), Tobias Bock (Praktikum Wirkstoffchemie: „Optimierung der Gelelektrophorese als Nachweismethode für die DNA-Fragmentierung während der Apoptose“).
- 2011 Katharina Ruhnke (Praktikum Wirkstoffchemie, „Einfluss der MAP-Kinasen ERK und JNK auf die Wirkung verschiedener Imidazol- und Oxazol-Derivate“)

→ Bachelorarbeit:

2008 Katharina Mahal: „Auswirkungen neuer Doxorubicinderivate auf die Mitochondrienmembranpermeabilität humaner Tumorzellen“

2009 Corinna Bayreuther: „Synthese und Charakterisierung von Ruthenium-Steroid-Komplexen“

2010 Julia Stich: „Signaltransduktion in den Kolonkarzinomzellen HT-29“

→ Masterarbeit:

2010 Katharina Mahal: „Wirkmechanismen neuer Illudin M-Derivate“

2011 Julienne Münzner: „Biochemie und Wirkmechanismen neuer Imidazol-Carbenkomplexe mit anti-angiogener und vaskular-disruptiver Antitumorwirkung“

### 9.13 Publikationsliste

Vorabveröffentlichung der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften, vertreten durch Prof. Dr. Rainer Schobert, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

#### **Publikationen:**

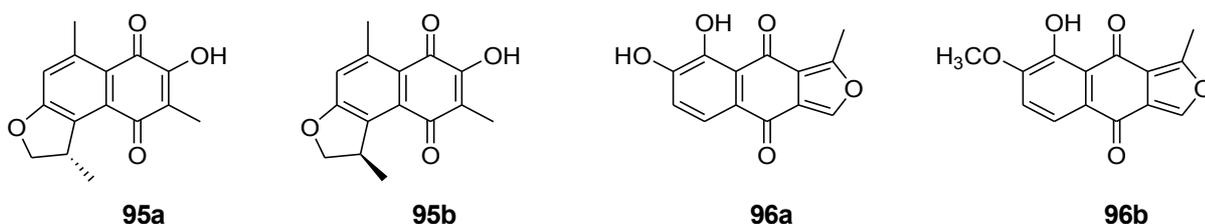
- Breyer S, Effenberger K, Schobert R (2009) Effects of thymoquinone-fatty acid conjugates on cancer cells. *ChemMedChem* 4: 761–768.
- Effenberger K, Breyer S, Schobert R (2010) Terpene conjugates of *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chem Biodivers* 7: 129–139.
- Effenberger K, Breyer S, Schobert R (2010) Modulation of doxorubicin activity in cancer cells by conjugation with fatty acyl and terpenyl hydrazones. *Eur J Med Chem* 45: 1947–1954.
- Effenberger-Neidnicht K, Schobert R (2011) Combinatorial effects of thymoquinone on the anticancer activity of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 67: 867–874.
- Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Mahal K, Diestel R, Sasse F, Schobert R (2011) Cellular localisation of antitumoral 6-alkyl thymoquinones via an alkyne-azide click reaction and the streptavidin-biotin system. *ChemBioChem* 12: 1237–1241.
- Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Mahal K, Sasse F, Schobert R (2011) Modification of uptake and subcellular distribution of doxorubicin by *N*-acylhydrazone residues as visualised by intrinsic fluorescence. *Cancer Chemother Pharmacol*, in press (DOI: 10.1007/s00280-011-1675-z).

**Extended Abstracts und Poster:**

- Breyer S, Effenberger K, Schobert R (2009) Synthesis and anticancer activities of thymochinone-fatty acid conjugates. *10<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium*, 23. – 26. June, Paris.
- Effenberger K, Breyer S, Ocker M, Schobert R (2009) New doxorubicin *N*-acyl hydrazones with improved efficacy and cell line specificity show modes of action different from the parent drug. *7<sup>th</sup> CESAR Annual Meeting*, 29. – 31. October, Heidelberg.
- Schobert R, Sasse F, Biersack B, Effenberger K, Breyer S, Diestel R (2010) Tumor-selective amphiphilic *para*-quinones and tetramic acids. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48: 459–461.
- Effenberger K, Breyer S, Ocker M, Schobert R (2010) New doxorubicin *N*-acyl hydrazones with improved efficacy and cell line specificity show modes of action different from the parent drug. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48: 485–486.
- Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Schobert R (2010) Improvement of the therapeutic effect of the *Nigella sativa* constituent thymochinone by chemical functionalisation. *8<sup>th</sup> CESAR Annual Meeting*, 01. – 03. July, St. Gallen.
- Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Mahal K, Diestel R, Sasse F, Csuk R, Schobert R (2011) Subcellular localisation of various anticancer agents monitored via their intrinsic fluorescence and specific alkyne-azide click reaction. *9<sup>th</sup> CESAR Annual Meeting*, 16. – 18. June, Greifswald.

**Anderweitige Veröffentlichungen:****Bioaktive Chinone**

Neben Doxorubicin (**13**) und Thymochinon (**17**) wurden weitere pharmakologisch interessante natürliche Chinone, die ebenfalls von Frau Dr. Sandra Breyer synthetisiert wurden, auf ihre biologische Aktivität hin untersucht: Zum einen handelte es sich um Thespeson (**95**), ein Sesquiterpen der Familie der Mansonone, welches erstmals 1983 aus dem Portiabaum (*Thespesia populnea*), einem Malvengewächs, isoliert wurde (vgl. Abbildung A-1). Der Naturstoff (–)-Thespeson (**95a**) zeigt im MTT-Test anders als sein Enantiomer (+)-Thespeson (**95b**) oder das Racemat (±)-Thespeson deutliche Aktivität an verschiedenen Krebszelllinien, ohne jedoch gesunde, nicht-maligne Fibroblasten (HF) zu beeinflussen.<sup>[187-188]</sup>



**Abbildung A-1:** Strukturformeln der bioaktiven Chinone (–)- Thespeson (**95a**), (+)-Thespeson (**95b**), 7,8-Dihydrox-1-methylnaphtho[2,3-c]-furan-4,9-dion (**96a**) und des Methylethers **96b**.

Desweiteren wurde das Isofuranonaphthochinon 7,8-Dihydrox-1-methylnaphtho[2,3-c]-furan-4,9-dion (**96a**), ein *Actinoplanes*-Sekundärmetabolit, mittels MTT-Test untersucht. Verbindung (**96a**) zeigte jedoch kaum Aktivität an den getesteten Zelllinien, was mit dessen siderophoren Eigenschaften (Komplexbildung mit Metallen, vor allem Eisen) und einer resultierenden verminderten Aufnahme in die Zelle erklärt werden konnte. Der Methylether **96b** komplexierte deutlich weniger Eisen und war daher wirksamer im Zelltest.<sup>[189-190]</sup> Sowohl die Mansonone wie etwa das Thespeson (**95**) als auch Isofuranonaphthochinone stellen interessante Kandidaten für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika dar.

**Publikationen:**

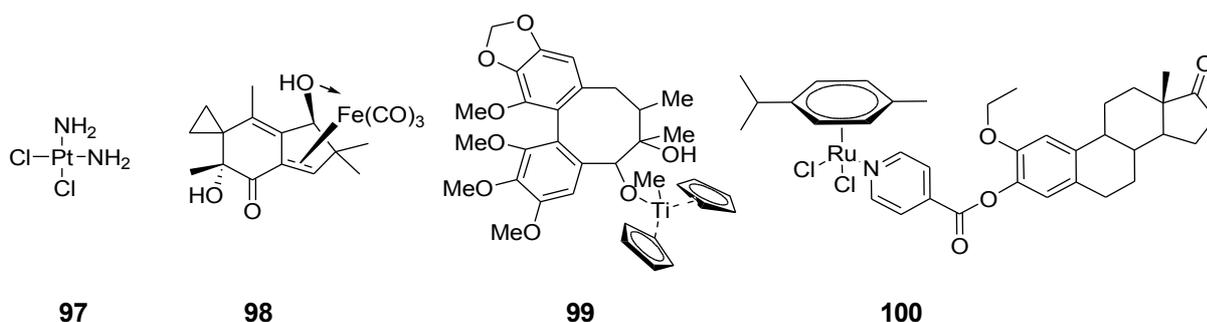
- Breyer S, Effenberger-Neidnicht K, Schobert R (2010) Total synthesis and anticancer activities of (-)- and (+)-Thespesone. *J Org Chem* 75: 6214–6218.
- Breyer S, Effenberger-Neidnicht K, Knauer S, Schobert R (2011) Synthesis, anticancer activity, and iron affinity of the Actinoplanes metabolite 7,8-dihydroxy-1-methylnaphtho[2,3-c]furane-4,9-dione. *Bioorg Med Chem* 19: 1264–1267.

**Extended Abstracts und Poster:**

- Breyer S, Effenberger-Neidnicht K, Schobert R (2010) Total Synthesis and Anticancer Activities of (-)- and (+)-Thespesone. *3<sup>rd</sup> EuCheMS Chemistry Congress, 29. August – 02. September, Nürnberg.*

Metallkomplexe

Der Erfolg der antitumoraktiven Platinverbindung Cisplatin (**97**) steigert das Interesse an anderen Metallkomplexen wie etwa Ruthenium- oder Eisenverbindungen.<sup>[191-192]</sup> So beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe u.a. mit der Wirkoptimierung von verschiedensten Naturstoffen durch die Einführung von Metallen (vgl. Abbildung A-2). Aus dem Pilz *Omphalotus olearius* kann ein potentes Sesquiterpen namens Illudin M (**74**) gewonnen werden (Dipl.-Biol. Sebastian Knauer). Leider weist **74** aufgrund seiner hohen Toxizität einen eher ungünstigen TI < 1 auf, was einen möglichen Einsatz als Chemotherapeutikum verhindert. Um die Selektivität von **74** für Krebszellen im Vergleich zu nicht-malignen Zellen zu steigern, wurden verschiedene Ferrocen-Ester von Dr. Bernhard Biersack synthetisiert und auf ihre Wirkung hin untersucht. Mit Erfolg, denn die Ester wiesen eine hohe Selektivität für Melanomzellen auf.<sup>[72]</sup> Durch die Bildung des Eisen-Komplexes **98** (Dr. Alexander Gmeiner) konnte TI immerhin auf > 500 verbessert werden.<sup>[193]</sup> Eine ähnliche Wirkungssteigerung ergab sich aus der Titanocen-Komplexierung von Schisadrol A, einem Bestandteil des Sternanisgewächses *Schisandra chinensis*, zum entsprechenden Methyltitanocen-Komplex **99** (Dr. Alexander Gmeiner).<sup>[194]</sup>



**Abbildung A-2:** Strukturformeln der antitumoraktiven Platinverbindung Cisplatin (**97**) sowie der neuen Metallkomplexe: Illudin M-Eisen-Komplex (**98**) und Schisandroxy-(methyl)-Titanocen (**99**) und 2'-Ethoxyestrone-Ruthenocen **100**.

Weiterhin wurden Hormon-Ruthenocen-Komplexe mit antiproliferierenden und antimetastasierenden Eigenschaften entwickelt (Dipl.-Chem. Sebastian Seibt), die zudem eine hohe Affinität zum Steroid-Transporter SHBG aufweisen (vgl. **100**).<sup>[195]</sup>

**Publikationen:**

- Knauer S, Biersack B, Zoldakova M, Effenberger K, Milius W, Schobert R (2009) Melanoma-specific ferrocene esters of the fungal cytotoxic illudin M. *Anti-Cancer Drugs* 20: 676–681.
- Biersack B, Effenberger K, Zoldakova M, Schobert R (2010) (Arene)-Ru(II) complexes of EGFR-inhibiting tyrophostins with enhanced cytotoxicity in multi-drug resistant cancer cells. *Eur J Med Chem* 45: 1972–1975.
- Gmeiner A, Effenberger-Neidnicht K, Zoldakova M, Schobert R (2011) A methyltitanocene complex of schisandrol A with high efficacy against multi-drug resistant cervix and breast carcinoma cells. *Appl Organometal Chem* 25: 117–120.
- Schobert R, Seibt S, Effenberger-Neidnicht K, Underhill C, Biersack B, Hammond GL (2010) (Arene)Cl<sub>2</sub>Ru(II) complexes with *N*-coordinated estrogen and androgen isonicotinate: Interaction with sex hormone binding globulin and anticancer activity. *Steroids* 76: 393–399.

**Extended Abstracts und Poster:**

- Mahal K, Seibt S, Biersack B, Effenberger-Neidnicht K, Schobert R (2011) New metallocene derivatives of the fungal cytotoxin illudin M with improved cancer selectivity and the contribution of MAPK signaling to their mode of action. *9<sup>th</sup> CESAR Annual Meeting, 16. – 18. June, Greifswald.*

### Combretastatin A -Analoga

Eine weitere interessante Gruppe von Naturstoffen, die innerhalb der Arbeitsgruppe optimiert werden, bilden die Combretastatine – bioaktive Bestandteile aus der Borke der südafrikanischen Buschweide (*Combretum caffrum*). Besonders Combretastatin A-4 (**101**, CA-4) besitzt neben antitumoralen auch vaskular-disruptive Eigenschaften und ist zudem in der Lage, die Tubulin-Polymerisation zu inhibieren.<sup>[196]</sup> Die klinische Anwendung ist aber aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von **101** und der Ausbildung von Resistenzen limitiert, weshalb auch hier eine chemische Funktionalisierung (Dr. Bernhard Biersack) notwendig war, um den therapeutischen Effekt zu verbessern. So wurde unter anderem das Oxazol-verbrückte Analogon **102** synthetisiert, welches eine deutliche Aktivität gegen verschiedenste Tumorzellen aufweist, insbesondere gegen die CA-4-resistenten Kolonkarzinom-Zellen HT-29 (vgl. Abbildung A-3).<sup>[197]</sup>

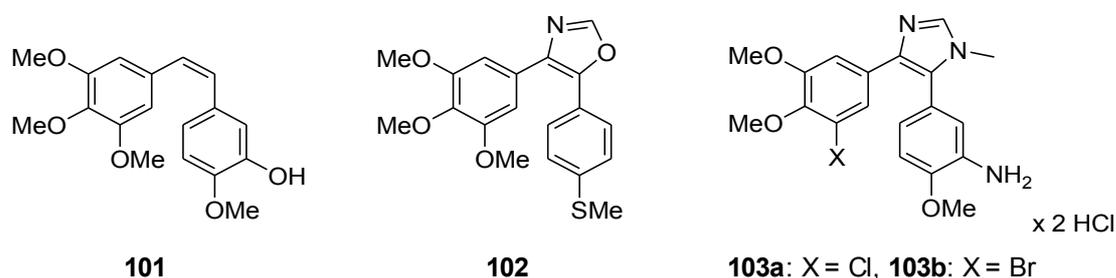


Abbildung A-3: Strukturformeln von Combretastatin A-4 (**101**) und seinen Derivaten **102** und **103**.

Eine bessere Wasserlöslichkeit mit gleichzeitiger Verbesserung der Wirksamkeit und der vaskular-disruptiven Eigenschaften konnte mit dem Imidazol-verbrückten Derivat **103** erreicht werden (vgl. Abbildung A-3).<sup>[198]</sup>

**Publikationen:**

- Biersack B, Effenberger K, Ocker M, Schobert R (2010) Oxazole-bridged combretastatin A analogues with improved anticancer properties. *ChemMedChem* 5: 420–427.
- Biersack B, Effenberger K, Knauer S, Ocker M, Schobert R (2010) Ru( $\eta^6$ -arene) complexes of combretastatin-analogous oxazoles with enhanced anti-tumoural impact. *Eur J Med Chem* 45: 4890–4896.
- Schobert R, Biersack B, Dietrich A, Effenberger K, Knauer S, Müller T (2010) 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxy-phenyl)-5-aryl-oxazoles and -N-methyl-imidazoles that are cytotoxic against combretastatin A resistant tumor cells and vascular disrupting in a cisplatin resistant germ cell tumor model. *J Med Chem* 53: 6595–6602.

**Extended Abstracts und Poster:**

- Schobert R, Biersack B, Müller T, Effenberger-Neidnicht K, Knauer S (2010) Stable Non-toxic Combretastatin A Analogues with Superior Efficacy against Chemoresistent Tumors. *8<sup>th</sup> CESAR Annual Meeting, 01. – 03. July, St. Gallen.*
- Schobert R, Effenberger-Neidnicht K, Biersack B (2011) Stable combretastatin A-4 analogues with sub-nanomolar efficacy against chemoresistent HT-29 cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 49: 71–72.

### 9.14 Literaturverzeichnis

- [1] Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z (1985) Medicinal plants in therapy. *Bull WHO* 63: 965–981.
- [2] Fabricant DS, Farnsworth NR (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 106: 69–75.
- [3] Lafont O (2007) From the willow to aspirin. *Rev Hist Pharm* 55: 209–216.
- [4] Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10: 226–236.
- [5] Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ (2009) Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 109: 3012–3043.
- [6] Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461–477.
- [7] Gordaliza M (2007) Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol* 9: 767–776.
- [8] Henkel T, Brunne RM, Müller H, Reichel F (1999) Statistische Untersuchungen zur Strukturkomplementarität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen. *Angew Chem* 111: 688–691.
- [9] Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13: 135–160.
- [10] Colucci MA, Moody CJ, Couch GD (2007) Natural and synthetic quinones and their reduction by the quinone reductase enzyme NQO1: from synthetic organic chemistry to compounds with anticancer potential. *Org Biomol Chem* 6: 637–656.
- [11] Di Marco A, Gaetani M, Scarinato B (1969) Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* 53: 33–37.
- [12] Robert J, Anthracyclines. in: Grochow LB, Ames MM (1998) A clinician's guide to chemotherapy, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Williams&Wilkins, Baltimore* 93–173.
- [13] Tomasz M (1995) Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* 2: 575–579.

- [14] Harding MM, Long GV (1997) Interaction of the antitumor antibiotic streptonigrin with metal ions and DNA. *Curr Med Chem* 4: 405–420.
- [15] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89: 239–250.
- [16] Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R (2006) Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1249–1253.
- [17] Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, Evert M, El-Najjar N, Peters B, Jurjus A, Roessner A, Schneider-Stock R (2008) Thymoquinone reduces mouse colon tumour cell invasion and inhibits tumour growth in murine colon cancer models. *J Cell Mol Med* 12: 330–342.
- [18] Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R (2004) Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol* 25: 857–866.
- [19] El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA (2005) Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer* 117: 409–417.
- [20] Al-Shabanah OA, Badary OA, Nagi MN, Al-Gharably NM, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM (1998) Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *J Exp Clin Cancer Res* 17: 193–198.
- [21] Nagi MN, Mansour MA (2000) Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res* 41: 283–289.
- [22] Paterno E (1882) Ricerche sull acido lapachico. *Gazz Chem Ital* 12: 337–392.
- [23] Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR (2007) Lapachol: An overview. *ARKIVOK* 2: 145–171.
- [24] de Almeida ER (2009) Preclinical and clinical studies of lapachol and beta-lapachone. *Bentham Open TONPJ* 2: 42–47.

- [25] Guerra M de O, Mazoni ASB, Brandao MAF, Peters VM (2001) Toxicology of lapachol in rats: embryoletality. *Rev Brasil Biol* 61: 171–174.
- [26] Dayan FE, Rimando AM, Pan Z, Baerson SR, Gimsing AL, Duke SO (2010) Sorgoleone. *Phytochem* 71: 1032–1039.
- [27] Nimbal CI, Yerkes CN, Weston LA, Weller SC (1996) Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pesticide Biochem Physiol* 54: 73–83.
- [28] Powis G (1989) Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radical Biol Med* 6: 63–101.
- [29] Silverman RB, Metabolisierung von Wirkstoffen. in : Seydel JK (1995) Medizinische Chemie. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim* 285 –359.
- [30] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor-activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185–229.
- [31] Eckford PDW, Sharom FJ (2008) ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 109: 2989–3011.
- [32] Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Eichler HG, Wolff K, van Elsas A, Schrier PI, Pehamberger H (1997) Activated *N*-ras contributes to the chemoresistance of human melanoma in severe combined immunodeficiency (SCID) mice blocking apoptosis. *Cancer Res* 57: 362–365.
- [33] Benimetskaya L, Ayyanar K, Kornblum N, Castanotto D, Rossi J, Wu S, Lai J, Brown BD, Popova N, Miller P, McMicken H, Chen Y, Stein CA (2006) Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells *in vivo* and *in vitro*. *Clin Cancer Res* 12: 4940–4948.
- [34] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269–290.
- [35] Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LTC Schrier PI (1999) P53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Brit J Cancer* 79: 921–926.
- [36] Gahr S, Peter G, Wissniowski TT, Hahn EG, Herold C, Ocker M (2008) The histone-deacetylase inhibitor MS-275 and the CDK-inhibitor CYC-202 promote anti-tumor effects in hepatoma cell lines. *Oncol Rep* 20:1249–1256.

- [37] Zopf S, Neureiter D, Bouralexis S, Abt T, Glaser KB, Okamoto K, Ganslmayer M, Hahn EG, Ocker M (2007) Differential response of p53 and p21 on HDAC inhibitor-mediated apoptosis in HCT116 colon cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 31:1391–1402.
- [38] Neureiter D, Zopf S, Leu T, Dietze O, Hauser-Kronberger C, Hahn EG, Herold C, Ocker M (2007) Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol* 42: 103–116.
- [39] Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemia cells in suspension culture. *Nature* 270: 347–349.
- [40] Gallagher R, Collins S, Trujillo JM, McCredie KB, Ahearn MJ, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979) Characterization of continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713–733.
- [41] Dalton WT, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71: 242–247.
- [42] Wolf D, Rotter V (1985) Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 790–794.
- [43] Fogh J. (1975) Human tumor cells in vitro. *Plenum Press, New York* 115–159.
- [44] Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M (2008) Mechanism of resistance to chemoradiation in p53 mutant human colon cancer. *Int J Oncol* 32: 1305–1310.
- [45] Kok JW, Veldman RJ, Klappe K, Koning H, Filipeanu CM, Müller M (2000) Differential expression of spingolipids in MRP-1 overexpressing HT-29 cells. *Int J Cancer* 87: 172–178.
- [46] Roninson IB, Chin JE, Choi K, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Patsan I (1986) Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4538–4564.

- [47] Akiyama S, Foji A, Hanover JA, Pastan I, Gottesman MM (1985) Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somat Cell Mol Genet* 11: 117–126.
- [48] Kühnle M, Egger M, Müller C, Mahringer A, Bernhardt G, Fricker G, König B, Buschauer A (2009) Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J Med Chem* 52: 1190–1197.
- [49] Shen DW, Cardarelli C, Hwang J, Cornwell M, Richert N, Ishii S, Pastan I, Gottesman MM (1986) Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicin, adriamycin, or vinblastin show changes in expression of specific proteins. *J Biol Chem* 261: 7762–7770.
- [50] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleura effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409–1413.
- [51] Monneret C (2001) Recent developments in the field of antitumor anthracyclines. *Eur J Med Chem* 36: 483–493.
- [52] Wang Y, Li L, Jiang W, Yang Z, Zhang Z (2006) Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 2974–2977.
- [53] Unger C, Häring B, Medinger M, Drevs J, Steinbild S, Kratz F, Kross K (2007) Phase I and pharmacokinetic study of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin. *Clin Cancer Res* 13: 4858–4866.
- [54] Godwin A, Hartenstein M, Müller AHE, Brocchini S (2001) Narrow molecular weight distribution precursors for polymer-drug conjugates. *Angew Chem* 113: 614–617.
- [55] Rho YS, Kim W-J, Park S, Yoo DJ, Kang HS, Chung S-R (2001) Synthesis of new anthracycline derivatives including butyric or retinoic acid moiety. *Bull Korean Chem Soc* 22: 581–586.
- [56] Rho YS, Kim W-J, Yoo DJ, Kang HS, Chung S-R (2001) Synthesis and antitumor activity of new anthracycline analogues. *Bull Korean Chem Soc* 22: 963–968.

- [57] Rho YS, Kim W-J, Yoo DJ (2006) Synthesis of new anthracycline derivatives containing lactic or stearic acid moiety. *Bull Korean Chem Soc* 27: 1359–1363.
- [58] Breyer S (2010) Synthese, Funktionalisierung und Wirkoptimierung natürlicher Chinone. *Dissertation, 2007 – 2010, Bayreuth*.
- [59] Effenberger K (2007) Wirkmechanismen neuer Doxorubicinderivate in resistenten Tumorzellen. *Diplomarbeit, 2007, Bayreuth*.
- [60] Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE (2000) Mechanism for the antitumor and anticachetic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res* 60: 5289–5295.
- [61] Schobert R, Biersack B, Dietrich A, Grotemeier A, Müller T, Kalinowski B, Knauer S, Voigt W, Paschke R (2007) Monoterpenes as drug-shuttles: cytotoxic (6-aminomethylnicotinate)dichloridoplatinum(II) complexes with potential to overcome cisplatin resistance. *J Med Chem* 50:1288–1293.
- [62] Padhye S, Banerjee S, Ahmed A, Mohamed R, Sarkar FH (2008) From here to eternity - the secret of pharaohs: therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Ther* 6: 495–510.
- [63] Ali BH, Blunden G (2003) Pharmacological and toxicological properties of *nigella sativa*. *Phytother Res* 17: 299–305.
- [64] Couladouros EA, Stronggilos AT, Papageorgiou VP, Plyta ZF (2002) A new efficient route for multigram asymmetric synthesis of alkannin and shikonin. *Chem Eur J* 8: 1795–1803.
- [65] Sansom CE, Larsen L, Perry NB, Berridge MV, Chia EW, Harper JL, Webb VL (2007) An antiproliferative bis-prenylated quinone from the new zealand brown alga *perithalia capillaris*. *J Nat Prod* 70: 2042–2044.
- [66] Edris AE (2009) Anti-cancer properties of *nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymochinone and  $\beta$ -elemene. *Curr Clin Pharmacol* 4: 43–46.
- [67] Miguel del Corral JM, Angeles Castro M, Lucena Rodriguez M, Chamorro P, Cuevas C, San Feliciano A (2007) New cytotoxic diterpenylnaphthoquinone derivatives obtained from a natural diterpenoid. *Bioorg Med Chem* 15: 5760–5774.
- [68] Li Y, Zhang Y, Shen X, Guo Y-W (2009) A novel sesquiterpene quinone from hainan sponge *dysidea villosa*. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 390–392.

- [69] Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, Juniperus. in: von Bruchhausen N (1993) Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Band 5, Drogen E-O. *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* 561–591.
- [70] Ivancheva S, Kikolova M, Tsvetkova R, Pharmacological activities and biologically active compounds of bulgarian medical plants. in: Imperato F (2006) *Phytochemistry: Advances in Research. Research Signpost, Kerala, India* 87–103.
- [71] Schobert R, Biersack B, Knauer S, Ocker M (2008) Conjugates of the fungal cytotoxin illudin M with improved tumour specificity. *Bioorg Med Chem* 16: 8592–8597.
- [72] Knauer S, Biersack B, Zoldakova M, Effenberger K, Milius W, Schobert R (2009) Melanoma-specific ferrocene esters of the fungal cytotoxic illudin M. *Anti-Cancer Drugs* 20: 676–681.
- [73] Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, Kodym R (2000) Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 114: 935–940.
- [74] Santos RC, Salvador JAR, Marin S, Cascante M (2009) Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* 17: 6241–6250.
- [75] Karukstis KK, Thompson EHZ, Whiles JA, Rosenfeld RJ (1998) Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophys Chemist* 73: 249–263.
- [76] Diamandis EP, Christopoulos TK (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 37: 625–636.
- [77] Sivakumar K, Xie F, Cash BM, Long S, Barnhill HN, Wang Q (2004) A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. *Org Lett* 6: 4603–4606.
- [78] Boxberger HJ, Routinemethoden in der Zellkultur etablierter Zelllinien. in: Boxberger HJ (2006) *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur – Einführung in Grundlagen und Techniken. WILEY-VCH Verlag Weinheim* 113–148.

- 
- [79] Heilmann J, Moderne Bioassay-Methoden. in Hänsel R, Sticher O (2007) Pharmakognosie – Phytopharmazie. *Springer Medizin Verlag Heidelberg* 125–149.
- [80] Berridge M, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochem J* 4: 14–19.
- [81] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
- [82] Sebaugh JL, McCray PD (2003) Defining the linear portion of a sigmoid shape curve: bend points. *Pharmaceut Statist* 2: 167–174.
- [83] Sebaugh JL (2010) Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceut Statist*, DOI 10.1002/pst426.
- [84] Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*: 455: 152–162.
- [85] Eckford PDW, Sharom FJ (2009) ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 109: 2989–3011.
- [86] Liu R, Sharom FJ (1996) Site-directed fluorescence labeling of p-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* 35: 11865–11873.
- [87] Sauna ZE, Ambudkar SV (2000) Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human p-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2515–2520.
- [88] Krishnamachary N, Center MS (1993) The MRP gene associated with a non-p-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res* 53: 3658–3661
- [89] Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR; Almquist KC, Cole SPC, Deeley RG (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 54: 357–361.
- [90] Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y (2002) Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as

drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* 97: 626–630.

- [91] Doyle LA, Yang WD, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao YM, Rishi AK, Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15665–15670.
- [92] Cramer N, Helbig S, Baro A, Laschat S, Diestel R, Sasse F, Mathieu D, Richter C, Kummerlöwe G, Luy B, Schwalbe H (2008) Synthesis and biological properties of cylindramide derivatives: evidence for calcium-dependent cytotoxicity of tertramidic acid lactams. *ChemBioChem* 9: 2474–2486.
- [93] Ethell BT, Beaumont K, Rance DJ, Burchell B (2001) Use of cloned and expressed human UDP-glucuronosyltransferase for the assessment of human drug conjugation and identification of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos* 29: 48–53.
- [94] Cummings J, Zelcer N, Allen JD, Yao D, Boyd G, Maliepaard M, Friedberg TH, Smyth JF, Jodrell DI (2004) Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins. *Biochem Pharmacol* 67: 31–39.
- [95] van Cruchten S, van den Broeck, W (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31: 214–223.
- [96] Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV (1995) Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46: 1–27.
- [97] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sassob SA (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493–501.
- [98] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215–1216.
- [99] Sambrook J, Russel DW, Gel electrophoresis of DNA and pulse-field agarose gel electrophoresis. in Sambrook J (2006) The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* 187–236.
- [100] Krauss G, Apoptosis. in Krauss G (2008) Biochemistry of signal transduction and regulation. *WILEY-VCH Verlag Weinheim* 589–615.

- 
- [101] Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415–1430.
- [102] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383–424.
- [103] McCarty NJ, Evan GI (1998) Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 36: 259–278.
- [104] Bradford, M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- [105] Lämmlli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- [106] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350–4354.
- [107] Stott RAW, Enhanced Chemilumineszenz-Immunoassay. in Walker JM (2002) The Protein Protocols Handbook. *Humana Press Inc. Totowa, New Jersey* 1089–1096.
- [108] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnology* 75: 291–295.
- [109] Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou J-C (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345: 271–278.
- [110] Desagher S, Osen-Sand A, Nicholas A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144: 891–901.
- [111] Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol* 10: 413–317.
- [112] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol* 11: 1026–1030.

- [113] Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström M-L (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA,  $\beta$ -actin and glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 59: 566–573.
- [114] Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Chen LB (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3671–3675.
- [115] Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi A (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 197: 40–45.
- [116] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11: 372–380.
- [117] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloidbeta. *Nature* 403: 98–103.
- [118] Malgaroli A, Milani D, Meldolesi J, Pozzan T (1987) Fura-2 measurements of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in monolayers and suspensions of various cell types of animal cells. *J Cell Biol* 105: 2145–2155.
- [119] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450.
- [120] Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biol Med* 48: 794–762.
- [121] Rook GAW, Steele J, Umar S, Dockrell HM (1985) A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by  $\gamma$ -interferon. *J Immunol Methods* 82: 161–167.
- [122] Das UN, Begin ME, Eells G, Huang YS, Horrobin DF (1987) Polyunsaturated fatty acids augment free radical generation in tumor cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 15–24.

- [123] Krauss G, Intracellular signal transduction: protein cascades of the mitogen-activated protein kinase pathways. in Krauss G (2008) Biochemistry of signal transduction and regulation. *WILEY-VCH Verlag Weinheim* 441–456.
- [124] Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN, Fuks Z (1997) Ceramide signaling in apoptosis. *Brit Med Bull* 53: 539–553.
- [125] Ballou LR, Laulederkind SJF, Rosloniec EF, Raghov R (1996) Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* 1301: 273–287.
- [126] Delpy E, Hatem SN, Andrieu N, de Vaumes C, Henaff M, Rücker-Martin C, Jaffrézou J-P, Laurent G, Levade T, Mercadier J-J (1999) Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 43: 398–407.
- [127] Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, Takenaka K, Sakai H, Nishimura Y, Sakai N, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Nozawa Y (1998) Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxia-induced PC12 cell death. *J Biol Chem* 273: 6921–6927.
- [128] Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Wang AH-J (1990) Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochem* 29: 2538–2549.
- [129] Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene* 2: 95–113.
- [130] Keck MV, Lippard SJ (1992) Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *J Am Chem Soc* 114: 3386–3390.
- [131] Grotemeier AS (2006) Bioevaluation und Wirkmechanismen neuer Pt(II)-Komplex-Konjugate. *Diplomarbeit, Dezember 2005 – Juli 2006, Bayreuth*.
- [132] Howard A, Pelc SR (1986) Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Int J Radiat Biol* 49: 207–218.
- [133] Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66:188–193.
- [134] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 243: 167–190.

- [135] Du H, Fuh RA, Li J, Corkan A, Lindsey JS (1998) PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochem Photobiol* 68:141–142.
- [136] Munnier E, Tewes F, Cohen-Jonathan S, Linassier C, Douziech-Eyrolles L, Marchais H, Soucé M, Hervé K, Buboïs P, Choupra I (2007) On the interaction of doxorubicin with oleat ions: fluorescence spectroscopy and liquid-liquid extraction study. *Chem Pharm Bull* 55: 1006–1010.
- [137] Barabas K, Sizensky JA, Faulk WP (1992) Transferrin conjugates of adriamycin are cytotoxic without intercalating nuclear DNA. *J Biol Chem* 267: 9437–9442.
- [138] Luk CK, Tannock IF (1989) Flow cytometric analysis of doxorubicin accumulation in cells from human and rodent cell lines. *J Natl Cancer Inst* 81: 55–59.
- [139] Xie HP, Chu X, Jiang JH, Cui H, Shen GL, Yu RQ (2003) Competitive interactions of adriamycin and ethidium bromide with DNA as studied by full rank parallel factor analysis of fluorescence three-way array data. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 59:743–749.
- [140] Homolya L, Holló M, Müller M, Mechetner EB, Sarkadi B (1996) A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer* 73: 849–855.
- [141] Diestel RE (2010) Biologische Charakterisierung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten unter besonderer Berücksichtigung von High-Content Analyse-Methoden. *Dissertation, 2007 – 2010, Braunschweig*.
- [142] Shinozawa S, Fukuda T, Araki Y, Oda T (1982) Pharmacokinetic analyses of adriamycin (doxorubicin) and related fluorescent compounds in Ehrlich tumor-bearing mouse plasma and tissues. *Acta Med Okayama* 36: 125–132.
- [143] Bachur NR, Moore AL, Bernstein JG, Liu A (1970) Tissue distribution and disposition of daunorubicin (NSC-82151) in mice: fluorometric and isotopic methods. *Cancer Chemother Rep* 54: 89–94.
- [144] Egorin MJ, Hildebrand RC, Cimino EF, Bachur NR (1974) Cytofluorescence localisation of adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res* 34: 2234–2245.

- [145] Gitlin G, Bayer A, Wilchek M (1990) Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin: Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochem J* 269: 527–530.
- [146] Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Mahal K, Diestel R, Sasse F, Schobert R (2011) Cellular localisation of antitumoral 6-alkyl thymoquinones via an alkyne-azide click reaction and the streptavidin-biotin system. *ChemBioChem*, accepted.
- [147] Hassan YI, Zempleni J (2006) Epigenetic Regulation of Chromatin Structure and Gene Function by Biotin. *J Nutr* 136: 1763–1765.
- [148] Baumgartner ER, Suormala T (1997) Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 377–384.
- [149] Huisgen R (1963) Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. *Angew Chem Int Ed* 2: 633–645.
- [150] Huisgen R (1963) 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew Chem Int Ed* 2: 565-598.
- [151] Effenberger K, Breyer S, Schobert R (2010) Modulation of doxorubicin activity in cancer cells by conjugation with fatty acyl and terpenyl hydrazones. *Eur J Med Chem* 45: 1947–1954.
- [152] Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S (2005) Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 76: 1439–1453.
- [153] Mahal K (2008) Auswirkungen neuer Doxorubicinderivate auf die Mitochondrienmembranpermeabilität humaner Tumorzellen. *Bachelorarbeit, 2008, Bayreuth*.
- [154] Brewis IA, Morton IE, Mohammad SN, Browes CE, Moore HDM (2000) Measurement of intracellular calcium concentration and plasmalemma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *J Androl* 21: 238–249.
- [155] Yedjou CG, Tchounwou PB (2007) N-Acetyl-L-Cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 4: 132–137.

- [156] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153–183.
- [157] Blenis J, Roux PP (2004) Erk and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Mikrobiol Mol Biol Rev* 68: 320–344.
- [158] Conklin KA (2004) Free Radicals: the pros and cons of antioxidants. Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr* 134: 3201 S–3204 S.
- [159] Subtil A, Hemar A, Dautry-Varsat A (1994) Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J Cell Sci* 107: 3461–3468.
- [160] Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Mahal K, Sasse F, Schobert R (2011) Modification of uptake and subcellular distribution of doxorubicin by N-acylhydrazone residues as visualised by intrinsic fluorescence. *Cancer Chemother Pharmacol*, Submitted.
- [161] Peetla C, Bhave R, Vijayaraghavalu S, Stine A, Kooijman E, Labhasetwar V (2010) Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of and doxorubicin interactions with membrane lipids. *Mol Pharmaceutics* 7: 2334–2348.
- [162] Noel G, Peterson C, Trouet A, Tulkens R (1978) Uptake and subcellular localization of daunorubicin and adriamycin in cultured fibroblasts. *Eur J Cancer* 14: 363–368.
- [163] Hurwitz SJ, Terashima M, Mizunuma N, Slapka CA (1997) Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. *Blood* 89: 3745–3754.
- [164] Effenberger K, Breyer S, Ocker M, Schobert R (2010) New doxorubicin N-acyl hydrazones with improved efficacy and cell line specificity show modes of action different from the parent drug. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48: 485–486.
- [165] Breyer S, Effenberger K, Schobert R (2009) Effects of thymoquinone-fatty acid conjugates on cancer cells. *ChemMedChem* 4: 761–768.

- [166] Effenberger K, Breyer S, Schobert R (2010) Terpene conjugates of *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chem Biodivers* 7: 129–139.
- [167] Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 17: 37–49.
- [168] Qadri SM, Mahmud H, Föller M, Lang F (2009) Thymoquinone-induced suicidal erythrocyte death. *Food Chem Toxicol* 47: 1545–1549.
- [169] Badary OA, Taha RA, Gamel El-Din AM, Abdel-Wahab MH (2003) Thymoquinone is a potent superoxid anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 26: 87–98.
- [170] Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW (2010) *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biol Med* 48: 664–672.
- [171] El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H (2010) Reactive oxygen species mediate thymoquinone induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis* 15: 183–195.
- [172] Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC (2010) Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Exp Biol Med* 235: 751–760.
- [173] Mahal K (2010) Wirkmechanismen neuer Illudin M-Derivate. *Masterarbeit, 2010, Bayreuth*.
- [174] Jasper NGJ, Raams A, Kelner MJ, Ng JMY, Yamashita YM, Takeda S, McMorris TC, Hoeijmakers JHJ (2002) Anti-tumour compounds illudin S and irofulven induce DNA lesions ignored by global repair and exclusively processed by transcription- and replication-coupled repair pathways. *DNA Repair* 1: 1027–1038.

- [175] Reindl W, Yuan J, Krämer A, Strebhardt K, Berg T (2008) Inhibition of polo-like kinase 1 by blocking polo-box domain-dependent protein-protein interactions. *Chem Biol* 15: 459–466.
- [176] Wang Q, Chan TR, Hilgraf R, Fokin VV, Sharpless KB, Finn MG (2003) Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* 125: 3192–3193.
- [177] Lewis WG, Green LG, Grynszpan F, Radic Z, Carlier PR, Taylor P, Finn MG, Sharpless KB (2002) Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed* 41: 1053–1057.
- [178] Beatty KE, Liu JC, Xie E, Dieterich DC, Schuman EM, Wang Q, Tirrell DA (2006) Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed* 45: 7364–7367.
- [179] Maschauer S, Einsiedel J, Haubner R, Hocke C, Ocker M, Hübner H, Kuwert T, Gmeiner P, Prante O (2010) Labeling and glycosylation of peptides using click chemistry: a general approach to <sup>18</sup>F-glycopeptides as effective imaging probes for positron emission tomography. *Angew Chem Int Ed* 49, 976–979.
- [180] Raghavan AS, Hang HC (2009) Seeing small molecules in action with bioorthogonal chemistry. *Drug Discovery Today* 14: 178–184.
- [181] Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA (2009) Anti-inflammatory effects of the nigella sativa seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB* 11: 373–381.
- [182] Unnikrishnan A, Gafken PR, Tsukiyama T (2010) Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nature Struct Mol Biol* 17: 430–439.
- [183] Chou TC, Talalay P (1981) Generalized equations for the analysis of inhibitors of Michaelis-Menten and higher order kinetic systems with two or more mutually exclusive and non-exclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 115: 207–216.
- [184] Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose effect relationship: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzymol Regul* 22: 27–55.

- [185] Effenberger-Neidnicht K, Schobert R (2010) Combinatorial effects of thymoquinone on the anticancer activity of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*, in press.
- [186] Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanarama B (2004) Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. *J Biol Chem* 279: 25535–25543.
- [187] Neelakantan S, Rajagopalan W, Raman PV (1983) Thespesone and thesponone, two new mansonones of heartwood of *Thespesia populnea* sol. ex corr. (Fam. Malvaceae). *Ind J Chem* 22B: 95–96.
- [188] Breyer S, Effenberger-Neidnicht K, Schobert R (2010) Total synthesis and anticancer activities of (-)- and (+)-Thespesone. *J Org Chem* 75: 6214–6218
- [189] Zhang Q, Peoples AJ, Rothfelder MT, Millet WP, Pescatore BC, Ling LL, Moore CM (2009) Isofuranonaphthoquinone produced by an actinoplanes isolate. *J Nat Prod* 72: 1213–1215.
- [190] Breyer S, Effenberger-Neidnicht K, Knauer S, Schobert R (2011) Total synthesis and anticancer activities of 7,8-dihydroxy-1-methylnaphtho-[2,3]-furan-4,9-dione. *Bioorg Med Chem* 19:1264–1267.
- [191] Alderden RA, Hall MD, Trevor W (2006) The discovery and development of cisplatin. *J Chem Educ* 83: 728–734.
- [192] Becouarn Y, Ychou M, Ducreux M, Borel C, Bertheault-Cvitkovic F, Seitz JF, Nasca S, Nguyen TD, Paillot B, Raoul JL, Duffour J, Fandi A, Dupont-Andre G, Rougier P (1998) Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 16: 2739–2744.
- [193] Gmeiner A, Effenberger-Neidnicht K, Milius W, Schobert R (2011) A tricarbonyliron complex of the fungal cytotoxin illudin M with unusual structure, chemistry and cancer specificity. unpublished results.
- [194] Schobert R, Gmeiner A, Effenberger-Neidnicht K, Zoldakova M (2011) A methyl-titanocene complex of schisandrol A with high efficacy against multi-drug resistant cervix and breast carcinoma cells. *Appl Organometal Chem* 25:117–120.
- [195] Schobert R, Seibt S, Effenberger-Neidnicht K, Underhill C, Biersack B, Hammond GL (2010) (Arene)Cl<sub>2</sub>Ru(II) complexes with *N*-coordinated estrigen

and androgen isonicotinates: Interaction with sex hormone binding globulin and anticancer activity. *Steroids* 76: 393–399.

- [196] West CM, Price P (2004) Combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Drugs* 15: 179–187.
- [197] Schobert R, Effenberger-Neidnicht K, Biersack B (2011) Stable combretastatin A-4 analogues with sub-nanomolar efficacy against chemoresistent HT-29 cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 49: 71–72.
- [198] Schobert R, Biersack B, Dietrich A, Effenberger K, Knauer S, Müller T (2010) 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxy-phenyl)-5-aryl-oxazoles and -N-methylimidazoles that are cytotoxic against combretastatin A resistant tumor cells and vascular disrupting in a cisplatin resistant germ cell tumor model. *J Med Chem* 53: 6595–6602.

## 9.15 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. Rainer Schobert für die interessante Aufgabenstellung, die wissenschaftliche Anregung und Förderung, sowie für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht der Arbeit.
- meiner Projektpartnerin Frau Dr. Sandra Breyer für die Bereitstellung der Testsubstanzen und das Korrekturlesen, für die sehr gute und angenehme Zusammenarbeit, für aufbauende und vorantreibende Gespräche; einfach für eine schöne Zeit.
- Herrn Prof. Dr. med. Matthias Ocker für die umfassende Betreuung während meiner Laborzeit an der Universitätsklinik in Erlangen, für die Ermöglichung der Caspase-Kinetik-, RT-PCR- und Western Blot-Untersuchungen, für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche und der histologischen Untersuchungen sowie für die Überlassung der Panc-1-, HT-29-, HCT-116- bzw. HCT-116 p53 (-/-)- und HF-Zellen.
- Herrn Dr. Florenz Sasse für die nette Betreuung während meines Aufenthalts am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig und die Ermöglichung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.
- Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang und Herrn Dr. med. Dr. Michael Föller vom Institut für Physiologie der Universität in Tübingen für die Messung der Ceramid-Produktionen.
- Herrn Dr. Thorsten Berg vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für die Ermöglichung der Messung der Plk-Inhibierung.
- Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann und Herrn Markus Herrmann (Genetik, Universität Bayreuth) sowie Herrn Prof. Dr. Dietrich von Holst und Frau Kerstin Schunke (Tierphysiologie, Universität Bayreuth) für die Ermöglichung der FACS-Analysen.
- Frau Prof. Dr. Planer-Friedrich und Herrn Dr. Sasan Rabieh für die gute fachübergreifende Zusammenarbeit mit dem Institut für Geowissenschaften und die Messung verschiedener ICP-OES/MS-Proben.

- Herrn PD Dr. Reinhard Paschke von der Uni Halle-Wittenberg sowie Herr Prof. Dr. Günther Bernhardt von der Universität Regensburg für die Überlassung der 518A2-Zellen sowie KB-V1- und MCF-7-Zellen.
- dem gesamten Arbeitskreis der OCI: insbesondere bei Frau Katharina Mahal, Frau Julienne Münzner und Herrn Sebastian Knauer für die schöne Zeit im „Biologen-Labor“, bei Herrn Dr. Bernhard Biersack und Herrn Sebastian Seibt für die Bereitstellung weiterer Testsubstanzen, die Unterstützung bei fachlichen Problemen sowie für das Korrekturlesen, bei Herrn Dr. Bertram Barnickel, Frau Tamara Ackermann, Herrn Anders Kroscky, Herrn Michael Ostermeier, Frau Cornelia Spörlein, Frau Julia Beneke, Herrn Karl Kempf, Herrn Sebastian Loscher, Herrn Markus Winterer, Herrn Hussein Kalie und Frau Marina Harras für das angenehme Klima am Lehrstuhl. Danke für die Unterstützung bei fachlichen Problemen und die gute Zusammenarbeit im Labor und am Lehrstuhl. Außerdem möchte ich mich bei Frau Silvia Kastner, Herrn Werner Kern, Frau Kerstin Hannemann und Frau Dr. Ulrike Lacher für die Unterstützung bei organisatorischen Fragen sowie bei der Durchführung diverser Praktika bedanken.
- Frau Isabel Zeitträger und Frau Astrid Taut für die Unterstützung beim Erlernen und der Durchführung der RT-PCR- sowie Western Blot-Untersuchungen, für die Erstellung der histologischen Schnittserien sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der histologischen Färbungen während meiner Laborzeit an der Universitätsklinik in Erlangen.
- Frau Dr. Randi Diestel, Frau Wera Collisi und Frau Bettina Hinkelmann für die Unterstützung bei der Zellkultur der PtK<sub>2</sub>-Zellen und bei der Durchführung der Fluoreszenzfärbungen.
- meinen Grund- und Haupt-Praktikanten sowie meinen Kandidatinnen zur Bachelor- bzw. Masterarbeit für die Unterstützung bei zahlreichen Zelltests.