

**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

- Lehrstuhl für Organische Chemie I -

Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

Universität Bayreuth

**Biologische Evaluation der Wirkmechanismen neuartiger NHC-
Metallkomplexe mit antitumoraler und antivaskulärer Aktivität**

—

**Biological evaluation of the mechanisms of action of novel NHC
metal complexes with antitumoral and antivascular activity**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Julienne Kathrin Münzner

Bayreuth, 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2011 bis November 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl für Organische Chemie (OC I) unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. Rainer Schobert angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	09.12.2015
Zulassung durch die Promotionskommission:	17.12.2015
Wissenschaftliches Kolloquium:	02.03.2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Rainer Schobert	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Ingo Ott	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Matthias Ullmann	(Vorsitz)
Prof. Dr. Frank Hahn	

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Krebs, eine Volkskrankheit - ihre Entstehung und Charakteristika	1
1.2 Bioaktive Platinkomplexe und ihre Bedeutung in der Chemotherapie	5
1.3 Goldkomplexe als neue, potentielle Wirkstoffe für die Krebstherapie	13
1.4 Zielsetzung	23
2 Materialien	24
2.1 Zelllinien	24
2.2 Testverbindungen	27
2.3 Chemikalien	27
2.4 Zellkulturmedien und Puffer	30
2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien	35
2.6 Verwendete Software	37
3 Methoden.....	38
3.1 Zellkultivierung.....	38
3.2 Kryokonservierung.....	40
3.3 MTT-basierter Proliferationsassay zur Bestimmung der Effektivität und Selektivität gegenüber Krebszellen	40
3.3.1 Toxizitätsbestimmung	41
3.3.2 Ermittlung von Resistenzen	43
3.3.3 Selektivitätsbestimmung	44
3.4 Zelluläre Aufnahme und Verteilung von Metallcarbenkomplexen.....	44
3.4.1 Zelluläre Akkumulation von Gold(I)- und Platin(II)-NHC-Komplexen	45
3.4.2 Ermittlung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten	45
3.4.3 Untersuchung der an der zellulären Aufnahme von Gold(I)-NHC-Komplexen beteiligten Transportwege	46
3.4.4 Zelluläre Lokalisierung eines fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplexes.....	48
3.5 Zytoskelettfärbungen.....	49
3.5.1 Fluoreszenzfärbung der Mikrotubuli.....	50

INHALTSVERZEICHNIS

3.5.2 Fluoreszenzfärbung von F-Aktin	50
3.6 Zellzyklusanalysen	50
3.7 <i>Wound-Healing</i> Assay.....	54
3.8 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels NBT-Test.....	55
3.9 Effekte auf das Mitochondrienmembranpotential.....	57
3.10 Enzymaktivitätstests.....	59
3.10.1 Inhibition der Thioredoxinreduktase.....	59
3.10.2 Inhibition der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1.....	60
3.11 Interaktion mit DNA	61
3.11.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	61
3.11.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz Assay.....	62
3.11.3 Kovalente Wechselwirkung mit doppelsträngiger CT-DNA.....	63
3.11.4 Aggregation von CT-DNA.....	63
3.11.5 Effekte auf die Morphologie und Untersuchung zur Induktion des lysogenen Zyklus von <i>E. coli</i> -Zellen	64
3.12 Zymographie zum Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen.....	65
3.13 Nachweise antiangiogener und vaskular-disruptiver Effekte.....	68
3.13.1 Tube Formation Assay	68
3.13.2 CAM Assay.....	69
3.14 <i>Ex vivo</i> Toxizität.....	70
3.15 Xenograft-Mausmodell	72
4 Ergebnisse und Diskussion	74
4.1 Antiproliferative und antivaskuläre Eigenschaften von Gold(I)-NHC-Komplexen	74
4.1.1 Combretastatin A4 abgeleitete Gold(I)-NHC-Komplexe	74
4.1.2 Beispiel eines fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplexes mit einem Anthracen- substituierten NHC-Liganden.....	99
4.1.3 Fluor-substituierte Gold(I)-Carbenkomplexe mit 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotiv	108

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.4 Gold(I)-Biscarbenkomplexe mit 1,3-Diarylimidazol-basierten NHC-Liganden ...	119
4.1.5 Ferrocen-substituierte Gold(I)-NHC-Komplexe	126
4.1.6 Ferrocen-verbrückte, trinukleare Gold(I)-NHC-Komplexe	143
4.2 Neuartige Platin(II)-NHC-Komplexe als potentielle Antitumorwirkstoffe	152
4.2.1 Auswirkungen der Zweitliganden auf den Wirkmechanismus von 1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden-Platin(II)-Komplexen	152
4.2.2 Effekte verschiedener NHC- und Zweitliganden auf die biologischen Eigenschaften von Platin(II)-Komplexen.....	172
5 Zusammenfassung	180
6 Summary	184
7 Literaturverzeichnis.....	188
8 Anhang.....	218
8.1 Zusätzliche Informationen, Daten und Abbildungen	218
8.2 Genehmigungen/Lizenzen von Journalen	240
9 Danksagung.....	242

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> ; ATP-bindende Kassette
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i> ; Brustkrebs-Resistenz-Protein
bidest.	bidestilliert/doppelt destilliert
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
CAM	<i>chorioallantoic membrane</i> ; Chorioallantoismembran
ccc	<i>covalently closed circular</i> (superspiralisierte Plasmidform)
CCM	<i>Czech Collection of Microorganisms</i> , Tschechische Sammlung von Mikroorganismen
Cdk(s)	<i>Cyclin-dependent kinase(s)</i> ; Cyclin-abhängige Kinase(n)
Ctr	<i>copper transporter</i> ; Kupfertransporter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLC(s)	<i>delocalized, lipophilic cation(s)</i> ; delokalisierte(s), lipophile(s) Kation(en)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d2pypp	1,3-Bis(dipyridylphosphino)propan
dppe	1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> ; extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	<i>endothelial cell growth medium</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FAAS	<i>flame atomic absorption spectroscopy</i> ; Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales Rinderserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	<i>forward scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
Fumitr. C	Fumitremorgin C (BCRP-Inhibitor)
GR	Glutathionreduktase(n)
GSH	Glutathion
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
HUVEC(s)	<i>human umbilical vein endothelial cell(s)</i> ; humane, vaskuläre Nabelschnur-Endothelzelle(n)
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (in Braunschweig)
I	Intensität
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> ; halbmaximale, inhibitorische Konzentration
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ; Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
i.p.	intraperitoneal
JC-1	5,5'-6,6'-Tetrachloro-1,1'-3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-Iodid
MMP(s)	<i>matrix metalloproteinase(s)</i> ; Matrix-Metalloproteinase(n)
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHC(s)	<i>N-heterocyclic carbene(s)</i> ; N-heterozyklische(s) Carben(e)
oc	<i>open circular</i> (entspannte, zirkuläre Plasmidform)
OCT(s)	<i>organic cation transporter(s)</i> ; organische(r) Kationentransporter
OSW	<i>octanol-saturated water</i> ; Octanol-gesättigtes Wasser
P	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PCTS/PCKS	<i>precision-cut tissue/kidney slices</i>
P-gp	P-Glykoprotein
PI	Propidiumiodid
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> ; relative Fluoreszenzeinheit

ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SPF	<i>specific pathogen free</i> ; spezifisch pathogenfrei
SS	<i>side scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TrxR	Thioredoxinreduktase(n)
Topo	Topotecan
TV	Tumorvolumen
Vbl	Vinblastin
Verap.	Verapamil (P-gp-Inhibitor)
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WSO	<i>water-saturated octanol</i> ; Wasser-gesättigtes Octanol

1 Einleitung

1.1 Krebs, eine Volkskrankheit - ihre Entstehung und Charakteristika

Nach Krankheiten, die das Herz-Kreislauf-System betreffen, stellen Krebserkrankungen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Laut des aktuellen Berichts der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) traten im Jahr 2012 etwa 14 Millionen Neuerkrankungen und 8,2 Millionen Krebs-assoziierte Todesfälle auf.^{1,2} Darüber hinaus erwartet die WHO, dass die Zahl der Neuerkrankungen innerhalb der nächsten 20 Jahre um weitere ~ 70 % ansteigen wird. Dieser Anstieg ist vor allem auf eine höhere Lebenserwartung der Menschen und den Rückgang an lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten zurückzuführen, da das Risiko an Krebs zu erkranken mit zunehmendem Alter exponentiell zunimmt.¹⁻⁴ So liegt das Durchschnittsalter aller Krebspatienten bei etwa 70 Jahren. In Deutschland rechnet das Statistische Bundesamt bis 2060 mit einer erhöhten Lebenserwartung von ca. 89 Jahren für Frauen und etwa 86 Jahren für Männer (Abbildung 1).⁵ Dies stellt einen Zuwachs der Lebenserwartung von ~ 6 Jahren bei Frauen bzw. ~ 8 Jahren bei Männern im Vergleich zur Lebenserwartung der Menschen in Deutschland, die 2010/2012 geboren wurden, dar.⁵ Mit dieser Entwicklung einhergehend wird daher auch die Anzahl an Krebs-Neuerkrankungen in Deutschland weiterhin deutlich zunehmen.

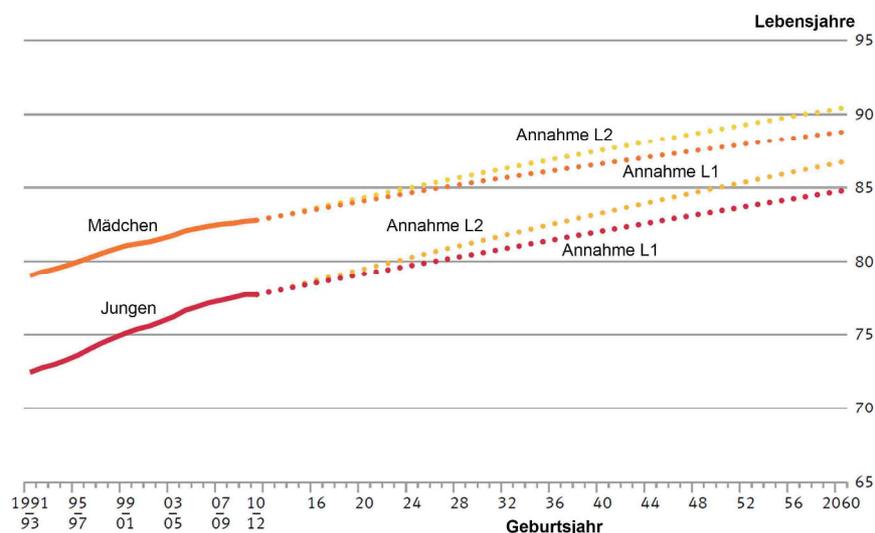


Abbildung 1: Lebenserwartung von Mädchen und Jungen in Deutschland in den Geburtsjahren von 1991/1993 bis 2060. Ab 2014 sind Annahmen der 13. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des Statistischen Bundesamtes dargestellt. Die Grundlage für die Basisannahme L1 lieferte eine Kombination aus der kurzfristigen Trendentwicklung seit 1970/1972 und der langfristigen Trendentwicklung seit 1871/1881. Die Annahme L2 stützt sich dagegen auf die Voraussetzung, dass sich die Verbesserung der medizinischen Versorgung und damit die Verringerung des Sterberisikos in den höheren Altersstufen ähnlich wie in den letzten 40 Jahren bis zum Jahr 2060 fortsetzen werden.⁵

Aufgrund dieser Prognose hat nicht nur die Weiterentwicklung von bereits bestehenden Therapieansätzen eine zentrale Bedeutung im Kampf gegen Krebserkrankungen, sondern auch die Erforschung ihrer Entstehung und der für die verschiedenen Krebsarten spezifischen Eigenschaften. So versucht man im Rahmen der sogenannten molekularen Onkologie ein erweitertes Verständnis der molekularen Grundlagen von Krebserkrankungen zu erlangen, um neue, effektivere Wirkstoffe und innovative Behandlungsstrategien zu entwickeln.⁴ Darüber hinaus geht man davon aus, dass durch neue Erkenntnisse aus dem Bereich der molekularen Onkologie auch wirkungsvollere Diagnoseverfahren entwickelt werden können, die eine verlässliche Früherkennung von Krebserkrankungen ermöglichen. Da fast alle Tumorarten in ihren frühen Entwicklungsstadien erfolgreicher therapiert werden können als in fortgeschrittenen Stadien, ist dies von besonders großem Interesse.^{1,2,4}

Im Allgemeinen entwickeln sich Tumorzellen aus gesunden Gewebezellen durch einen Prozess, der als Transformation bezeichnet wird. Die Transformation zu malignen Zellen wird dabei in normalen, ausdifferenzierten Zellen durch solche Gendefekte vermittelt, die ein unkontrolliertes Wachstum ermöglichen und so die Gewebshomöostase stören. Gene, in denen solche Mutationen auftreten können, bezeichnet man als sogenannte Proto-Onkogene oder Tumorsuppressorgene, deren Expressionsprodukte maßgeblich an der Regulation der Zellproliferation bzw. des programmierten Zelltods, der Apoptose, beteiligt sind.⁶⁻⁸ Durch genetische Veränderungen entstehen schließlich die entsprechenden Onkogene, deren fehlerhafte Expressionsprodukte eine ständige Aktivierung der Zellteilung bzw. eine Inhibition der Apoptose zur Folge haben.⁶ Ursachen für diese genetischen Defekte können neben einer Vererbung energiereiche Strahlung (z.B. UV- oder ionisierende Strahlung), chemische Karzinogene, wie z.B. Asbest oder Komponenten des Zigarettenrauchs, und Infektionen mit bestimmten Bakterien oder Viren (biologische Karzinogene) sein.¹ Normalerweise ist für die Entstehung von malignen Tumoren dabei nicht nur eine einzelne, sondern eine Reihe von Mutationen notwendig, die oft über Jahre oder sogar Jahrzehnte hinweg entstehen und erst im Zusammenspiel zu einer Krebserkrankung führen.^{7,8}

Tumorzellen unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihres unkontrollierten und potentiell unendlichen Wachstums (Immortalität) grundlegend von gesunden Zellen, sondern weisen auch darüber hinaus weitere, für Krebszellen eindeutig charakteristische Eigenschaften auf. Die wesentlichen Charakteristika von Tumorzellen bzw. Tumoren wurden bereits im Jahr 2000 von Hanahan & Weinberg als „*Hallmarks of Cancer*“ beschrieben und schließlich 2011 von den Autoren um einige, weitere Faktoren ergänzt (Abbildung 2).^{9,10}

Hierzu zählen die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, eine geringe oder gänzlich fehlende Sensitivität gegenüber proliferationshemmenden oder Apoptose-induzierenden Signalen, die Fähigkeit den programmierten Zelltod zu umgehen (Resistenzmechanismen) sowie die Ausbildung von neuen Blutgefäßen (Tumorangiogenese) zur eigenen Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu initiieren. Darüber hinaus besitzen viele Tumorzellen die Fähigkeit sich vom Primärtumor zu lösen (Evasion), über das Blutgefäßsystem in andere, auch weit entfernte Gewebe zu gelangen, in diese einzudringen (Invasion) und neue Tochtergeschwülste zu formieren (Metastasierung). Für solche, das Tumorwachstum und die Metastasierung fördernde Prozesse spielt die Interaktion der Tumorzellen mit dem umliegenden Gewebe (*tumor microenvironment*) und der extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*) eine essentielle Rolle.^{9,10}

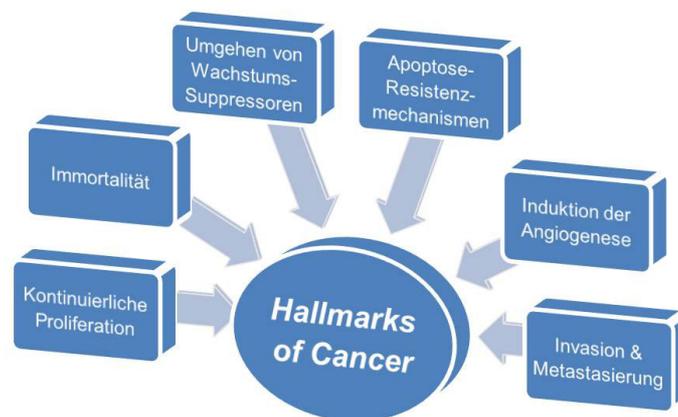


Abbildung 2: Die „Hallmarks of Cancer“ wie von Hanahan & Weinberg in *Cell* (2000) beschrieben.⁹

Die charakteristischen Eigenschaften von Krebszellen, welche sie von nicht-malignen Zellen deutlich unterscheiden, bieten also eine Vielzahl an therapeutischen Angriffspunkten und somit die Basis für die Entwicklung von neuen Wirkstoffen für die Chemotherapie. Diese stellt neben operativen Eingriffen und der Strahlentherapie die dritte Säule der medizinischen Behandlung von Krebserkrankungen dar und wird häufig in Kombination mit einer der beiden zuerst genannten Methoden eingesetzt.^{1,2} In der modernen Chemotherapie werden sogenannte Zytostatika eingesetzt. Hierbei handelt es sich um natürliche, semi- oder auch vollsynthetische Verbindungen, welche durch verschiedenste molekulare Wirkmechanismen das Zellwachstum bzw. die Zellteilung hemmen und letztendlich den programmierten Zelltod auslösen. So besitzen zum Beispiel verschiedene, in der Chemotherapie eingesetzte Platinverbindungen aufgrund ihrer Wechselwirkung mit der DNA und der damit einhergehenden Inhibition der Replikation bzw. Transkription eine signifikante zytostatische Wirkung.¹¹⁻¹³

Durch die im Vergleich zu nicht-malignen Zellen erhöhte Proliferationsrate von Tumorzellen, wirken Zytostatika stärker auf maligne Zellen und besitzen daher eine gewisse Selektivität für diese. Dennoch beeinflussen diese Substanzen auch die Teilungsfähigkeit von normalen Zellen und schädigen so gesundes Körpergewebe, wodurch teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen entstehen können. Hiervon sind vor allem Knochenmarkzellen, Zellen der Haarwurzeln sowie Zellen der Schleimhäute im Gastrointestinaltrakt betroffen, da es sich hierbei ebenfalls um rasch proliferierende Zellen handelt, die eine ständige Erneuerung des entsprechenden Gewebes ermöglichen.^{14,15} Eine gestörte Blutbildung, Haarausfall, starke Übelkeit und Erbrechen (Emetogenität) sowie Entzündungen sind die Folge. Aufgrund der häufig gravierenden Nebenwirkungen für Patienten und der vermehrt auftretenden Resistenzen gegenüber den derzeit in den Standardtherapien eingesetzten Zytostatika wird in der (prä-)klinischen Forschung weiterhin nach neuen, optimierten und selektiveren Wirkstoffen für die Tumorthherapie gesucht.

Darüber hinaus treten auch immer mehr antimetastatische Verbindungen in den Vordergrund der medizinischen Forschung, da die meisten Patienten nicht aufgrund ihres Primärtumors sterben, sondern in der Regel den durch Metastasen ausgelösten Folgeschäden erliegen.¹⁶ Eine weitere vielversprechende Klasse an Wirkstoffkandidaten für die Tumorthherapie stellen sogenannte antivaskuläre Verbindungen dar, welche die Ausbildung eines eigenen Blutgefäßsystems in Tumoren verhindern (antiangiogene Wirkung) oder bereits bestehende Gefäßsysteme zerstören (vaskular-disruptive Wirkung) können.¹⁷⁻²⁰ Antivaskuläre Verbindungen beeinträchtigen dabei nicht nur das reine Wachstum von Tumoren, sondern verhindern zusätzlich metastatische Prozesse, da das tumorale Blutgefäßsystem bei der Metastasierung von Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielt.²¹ Wie zuvor erwähnt, werden Platinkomplexe, wie zum Beispiel Cisplatin (Abbildung 3) und hiervon abgeleitete Analoga, bereits in der modernen Chemotherapie eingesetzt und bilden somit eine gute Grundlage für die Entwicklung effektiverer bzw. selektiverer metallbasierter Wirkstoffe für die Krebstherapie.²²⁻²⁴ Auch bei der Suche nach neuen antivaskulären bzw. antimetastatischen Verbindungen sind Metallkomplexe vermehrt auf dem Vormarsch und stellen erfolgsversprechende, neue Wirkstoffkandidaten dar. Der Fokus liegt dabei neben Platin-haltigen Verbindungen vor allem auf Ruthenium- und Gold-basierten Komplexen,²⁴⁻²⁶ wobei *N*-heterozyklische Carbene (NHCs) vielversprechende Liganden für biologisch aktive Metallkomplexe darstellen, da sie unter anderem einfach zu synthetisieren und zu variieren sind.^{27,28}

1.2 Bioaktive Platinkomplexe und ihre Bedeutung in der Chemotherapie

Den entscheidenden Grundstein für den Einsatz von metallbasierten Verbindungen in der modernen Krebstherapie legte die zufällige Entdeckung der antiproliferativen und antitumoralen Eigenschaften von *cis*-Diammindichloridoplatin(II), kurz Cisplatin genannt (Abbildung 3), durch Rosenberg *et al.* in den 1960er-Jahren.^{29–33} Der Biophysiker Rosenberg wollte mit seiner Arbeitsgruppe eigentlich die Effekte eines elektrischen Feldes auf das Wachstum von *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) untersuchen. Sie vermuteten nämlich, dass sie mit diesem die Orientierung der mitotischen Spindel, welche sich während der Zellteilung bildet und morphologisch den charakteristischen Feldlinien zwischen zwei Polen ähnelt, beeinträchtigen zu können und so das Wachstum bzw. die Teilung der Bakterien zu stören.^{22,34} Tatsächlich beobachteten die Forscher eine Hemmung der bakteriellen Zellteilung, welche zu einem filamentösen Wachstum der *E. coli*-Zellen mit einer Länge von annähernd 1 cm führte. Nach einiger Zeit stellte sich jedoch heraus, dass hierfür nicht der angelegte Wechselstrom an sich ursächlich war. Stattdessen wurde die Teilung der Bakterien durch in Lösung gegangene Platin-Ionen inhibiert, die sich aus den Elektroden lösten und mit Ammoniumchlorid aus dem Nährmedium der Bakterien unter Lichteinwirkung zu bioaktiven Platinkomplexen reagierten.^{22,29–31,34}

Zwei von diesen Komplexen, nämlich die in Abbildung 3 dargestellten Verbindungen *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (*cis*-Diammindichloridoplatin(II), Cisplatin) und *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₄] (*cis*-Diammin-tetrachlorido-platin(IV), **1**), induzierten auch in Abwesenheit eines elektrischen Feldes ein filamentöses Wachstum der *E. coli*-Zellen. Da zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt war, dass Verbindungen, die eine solche Veränderung im Bakterienwachstum auslösen, auch eine antitumorale Aktivität aufweisen können, testeten Rosenberg *et al.* ihre Platinkomplexe im Mausmodell an Sarkom-Xenograften.^{22,32,33}



Abbildung 3: Strukturformeln von *cis*-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin) und *cis*-Diammin-tetrachloridoplatin(IV) **1**.

Hierbei konnten die Forscher zeigen, dass Cisplatin bereits nach wenigen Tagen Nekrose in den implantierten Xenograften auslöste, im weiteren Verlauf das Tumolvolumen deutlich verringerte und letztendlich zu einem vollständigen Verschwinden der Tumore führte. Nach weiteren (prä-)klinischen Studien wurde Cisplatin schließlich 1979 von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für die Chemotherapie zugelassen.²² Heute wird Cisplatin vor allem für die Therapie von Hodenkrebs, Ovarialkarzinomen, Tumoren des Hals-Kopf-Bereichs und des kleinzelligen Bronchialkarzinoms eingesetzt, da sich der Platinkomplex bei der Behandlung dieser Krebsarten als sehr effektiv erwiesen hat.¹¹⁻¹³

Die starke antitumorale Aktivität von Cisplatin beruht auf einer Wechselwirkung mit DNA, die das primäre *target* des Wirkstoffs darstellt. Die Interaktion führt zu DNA-Schäden sowie einer Behinderung der Replikations- und Transkriptionsmaschinerien, wodurch es in den betroffenen Zellen nach gescheiterten DNA-Reparaturversuchen schließlich zur Induktion der Apoptose kommt.^{11-13,33,35,36} Die Bindung an die DNA basiert wiederum auf der generellen Fähigkeit des quadratisch planaren Komplexes mit Nukleophilen interagieren und koordinativ an diese binden zu können. Solche nukleophilen Substitutionen am Platin finden vor allem mit schwefelhaltigen Verbindungen, wie sie auch als Aminosäuren in Proteinen vorkommen (Cystein und Methionin), statt, da S-haltige Nukleophile eine hohe Affinität zu derartigen Platinkomplexen aufweisen.¹²

Aufgrund der Tatsache, dass die Verabreichung von Cisplatin in der Chemotherapie intravenös erfolgt, wird ein großer Teil des Wirkstoffs somit zunächst direkt von Serumproteinen im Blut gebunden. Der restliche, noch freie Anteil an ungebundenem Cisplatin gelangt vor allem durch passive Diffusion in das Zytoplasma von Zellen, idealerweise von Tumorzellen.³⁷ Die Aufnahme in das Zellinnere kann jedoch auch durch verschiedene aktive Transportprozesse, wie z.B. über Kupfertransporter oder organische Kationentransporter vermittelt werden.^{11,38} Im Zytosol findet aufgrund der geringen intrazellulären Konzentration an Chlorid-Ionen ein Austausch der Chlorid-Liganden gegen Wasser statt. Die so entstehenden, reaktiven Aquaplatin(II)-Komplexe können nun mit verschiedenen Bionukleophilen reagieren, wobei es sich bei der DNA, wie bereits eingangs erwähnt, um den primären Angriffspunkt von Cisplatin handelt.^{12,36} Die Aufnahme von Cisplatin in Tumorzellen, seine Aktivierung im Zellinneren sowie die Interaktion mit der DNA im Zellkern sind schematisch in der nachfolgenden Abbildung 4 dargestellt.^{12,36,37}

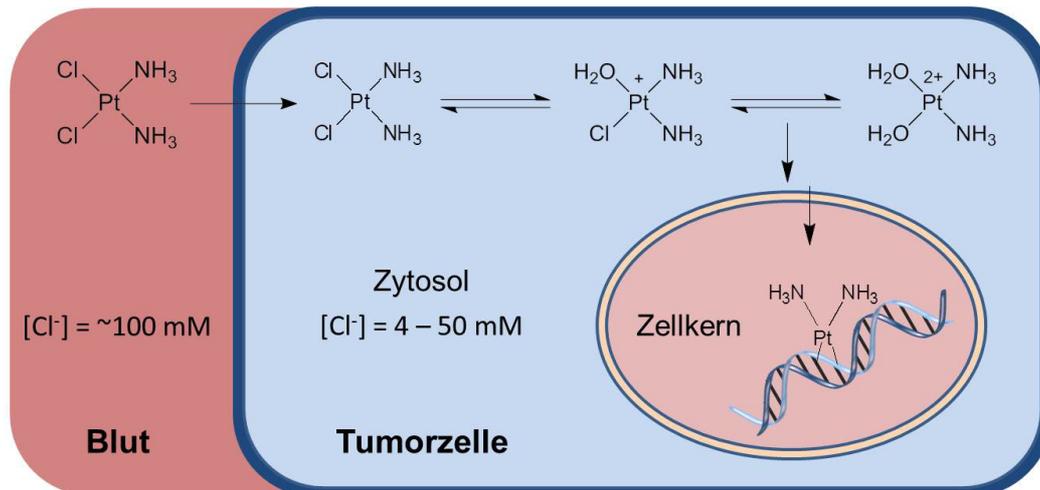


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufnahme von Cisplatin in eine Tumorzelle, der intrazellulären Reaktionen zu reaktiven Aquaplatin(II)-Komplexen und der Bindung von Cisplatin an nukleare DNA. Eigene Darstellung nach Ott & Gust (*Pharm. Unserer Zeit*, 2006), Alderden *et al.* (*J. Chem. Educ.*, 2006) und Ott (*Biodistribution of Metals and Metallo drugs*, 2013).^{12,36,37}

Die kovalente Bindung von Cisplatin kann prinzipiell an jede der in der DNA vorhandenen vier Nukleobasen erfolgen, jedoch stellt das N7-Atom des Guanins das stärkste Nukleophil dar (Abbildung 5).^{11,12,36} Aus diesem Grund bindet Cisplatin vorrangig an Guanin-Basen und erzeugt hierdurch verschiedene Cisplatin-DNA-Addukte, die für den Wirkmechanismus des Platinkomplexes eine zentrale Rolle spielen. Bei etwa 65 % dieser Addukte handelt es sich um sogenannte 1,2-Intrastrang-Quervernetzungen, in denen zwei benachbarte Guanin-Basen des gleichen DNA-Strangs durch Cisplatin miteinander verknüpft werden. Einen kleineren Anteil von ca. 25 % bilden Verknüpfungen von Guanin mit einem im selben Strang direkt daneben liegenden Adenin. Interstrang-Verknüpfungen, d.h. Quervernetzungen zwischen zwei Basen in den beiden verschiedenen Strängen der DNA-Doppelhelix, tragen nur mit einem äußerst geringen Prozentsatz von $\sim 1 \%$ zur Wirkung von Cisplatin bei. Daneben können auch DNA-Protein-Quervernetzungen und eine N-O-Chelatbildung im selben Guanin durch den Platinkomplex auftreten. Diese Arten der Wechselwirkung von Cisplatin mit DNA spielen jedoch für den eigentlichen Wirkmechanismus keine Rolle. Die an der anti-proliferativen bzw. antitumoralen Wirkung von Cisplatin beteiligten DNA-Quervernetzungen sind in Abbildung 5 dargestellt und haben deutliche Konformations-änderungen der DNA-Doppelhelix zur Folge. Diese führen wiederum zu der bereits oben erwähnten Inhibition von Transkription und Replikation, einem Zellzyklusarrest und bei einer erfolglosen Reparatur der entstandenen DNA-Schäden schließlich zur Apoptose.^{11–13}

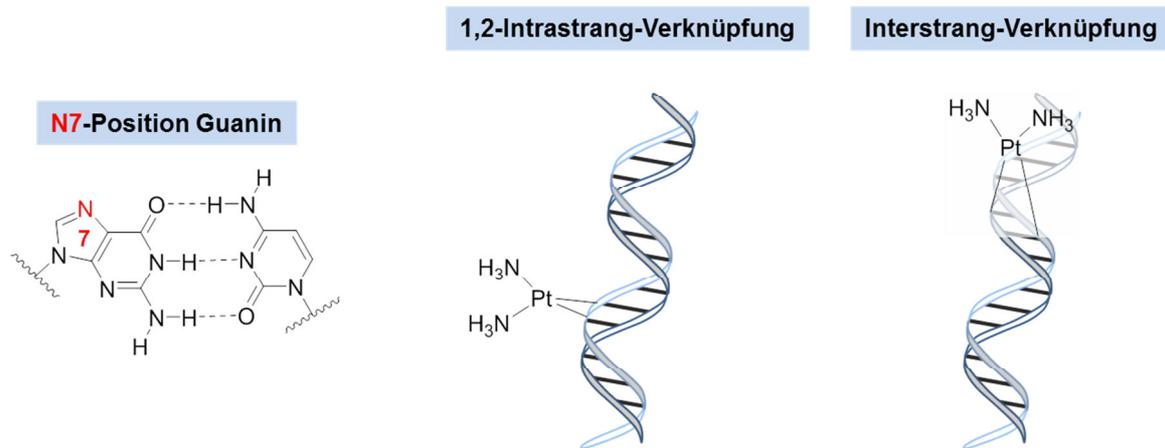


Abbildung 5: Bindungsmöglichkeiten von Cisplatin an Guanin-Basen in doppelsträngiger DNA. Das N7-Atom im Guanin stellt das nukleophilste Zentrum aller vier DNA-Basen dar, weshalb Cisplatin bevorzugt an dieses bindet. Die 1,2-Intrastrang- und Interstrang-Quervernetzungen durch Cisplatin und die hiermit verbundenen Konformationsänderungen der DNA sind die zentrale Ursache für die antitumorale Wirkung von Cisplatin. Eigene Darstellung nach Wang & Lippard (*Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005) sowie Ott & Gust (*Pharm. Unserer Zeit*, 2006).^{11,12}

Trotz des erfolgreichen Einsatzes von Cisplatin in den Therapieschemata verschiedenster Krebserkrankungen bestehen bei der Anwendung des Wirkstoffs auch einige gravierende Nachteile. So weist Cisplatin, genau wie viele andere in der Chemotherapie eingesetzte Zytostatika (vgl. Abschnitt 1.1), eine nur geringe Selektivität für Tumorzellen auf und schädigt daher auch gesundes Gewebe. Die Folge sind starke Nebenwirkungen, zu denen u.a. eine dosislimitierende Nephrotoxizität, Neuro- und Ototoxizität sowie starke Übelkeit und Erbrechen zählen.^{11,13,39,40}

Darüber hinaus stellen verschiedene Resistenzmechanismen ein weiteres Problem bei der Verwendung von Cisplatin dar.⁴¹⁻⁴³ Während einige Tumorarten, wie z.B. kolorektale Karzinome, von vornherein eine intrinsische Resistenz gegenüber Cisplatin besitzen, erlangen andere diese erst im Laufe der Chemotherapie. Neben einem erhöhten Efflux des Wirkstoffs aus Zellen oder effizienteren DNA-Reparaturmechanismen spielen auch hohe intrazelluläre Konzentrationen an S-haltigen Molekülen (wie z.B. Glutathion) eine entscheidende Rolle bei der Cisplatin-Resistenz. Diese binden, ähnlich wie die Serumproteine im Blut, über eine nukleophile Substitution kovalent an Cisplatin, inaktivieren den Platinkomplex und/oder vermitteln dessen Ausschleusung aus der Zelle, noch bevor dieser sein eigentliches *target*, die DNA, erreichen kann. Auch Mechanismen, welche die Einleitung der Apoptose durch Cisplatin-DNA-Addukte inhibieren, tragen zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber dem Metallkomplex bei.

Aufgrund dieser negativen Aspekte bei der Anwendung von Cisplatin in der Chemotherapie war es für die medizinische Forschung bereits kurze Zeit nach der Entdeckung und Zulassung von Cisplatin als Chemotherapeutikum ein wesentliches Ziel, neue Platinverbindungen mit einem breiteren Wirkungsspektrum bei gleichzeitig verminderten Nebenwirkungen zu finden und diese in der Tumorthherapie zu etablieren. Obwohl seither weltweit unzählige neue, potentielle Platin-basierte Antitumorwirkstoffe synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht wurden, haben heutzutage neben Cisplatin nur fünf weitere Platinverbindungen eine klinische Relevanz (Abbildung 6).^{11,12,44} Von diesen Cisplatin-analogen Pt(II)-Komplexen sind Carboplatin und Oxaliplatin weltweit für die Krebstherapie zugelassen, während die anderen drei Platinverbindungen jeweils lediglich eine regionale Zulassung besitzen. Da Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin eine geringere Nephrotoxizität, schwächere emetogene Wirkung sowie quasi keine Neuro- und Ototoxizität aufweist, wird es in der modernen Chemotherapie bei verschiedenen Krebsarten als gängige Alternative zu Cisplatin eingesetzt.⁴⁵ Diesen positiven Aspekten steht jedoch ein starker myelosuppressiver Effekt gegenüber, der die Blutbildung bei mit Carboplatin behandelten Patienten drastisch beeinträchtigt.^{45,46} Die Folgen sind eine erhöhte Blutungsneigung, Anämie sowie ein deutlich geschwächtes Immunsystem, weshalb eine solche Myelosuppression auch lebensbedrohlich sein kann. Einen weiteren Nachteil von Carboplatin stellt die Kreuzresistenz mit Cisplatin dar.^{47,48} Oxaliplatin ist dagegen auch bei Cisplatin-resistenten Krebsarten wirksam und wird heutzutage überwiegend in Kombination mit 5-Fluoruracil und Calciumfolinat (FOLFOX-Therapie) zur Therapie von kolorektalen Karzinomen eingesetzt.⁴⁹⁻⁵¹

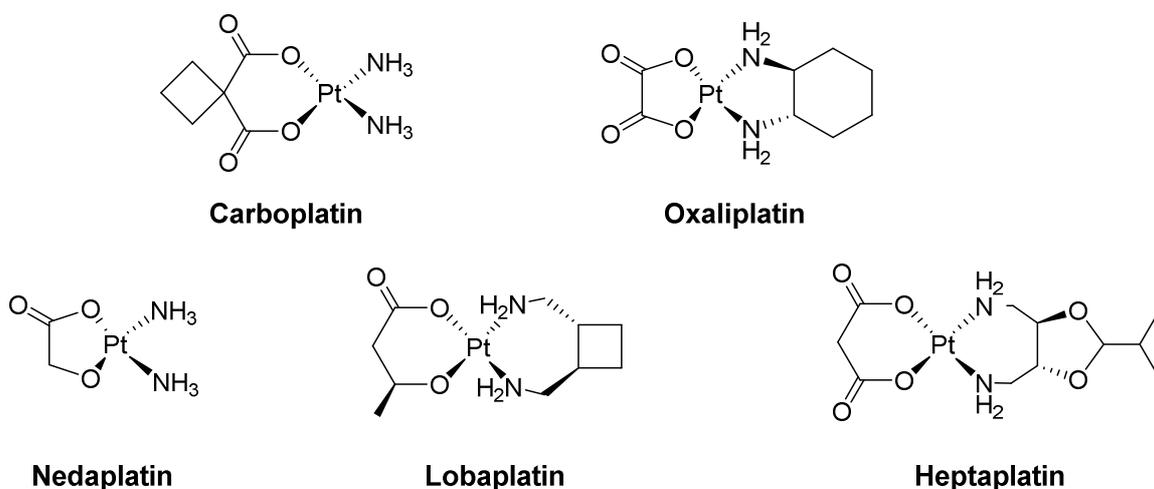


Abbildung 6: Strukturformeln Platin-basierter Zytostatika der zweiten und dritten Generation. Carboplatin und Oxaliplatin sind weltweit für die Chemotherapie zugelassen. Im Gegensatz dazu besitzen die anderen drei Platin(II)-Komplexe jeweils nur eine regionale Zulassung: Nedaplatin in Japan, Lobaplatin in China und Heptaplatin in Südkorea.^{11,12,44}

Nedaplatin, welches 1983 von dem Unternehmen *Shionogi Pharmaceutical* entwickelt wurde, erhielt von der japanischen Regierung im Jahr 1995 die Zulassung zur Behandlung von Ovarial- und Cervixkarzinomen.^{12,52-54} Seine Effektivität ist vergleichbar mit der von Cisplatin, wobei gleichzeitig die renale und gastrointestinale Toxizität verringert werden konnten. Jedoch sinkt bei einer Behandlung mit Nedaplatin der Anteil an Thrombozyten im Blut der betroffenen Patienten (Thrombozytopenie). Mit Hilfe von Lobaplatin, das in China bei der Therapie von Leukämien, Brustkrebs und des kleinzelligen Bronchialkarzinoms eingesetzt wird, konnten Resistenzen bei Leukämieerkrankungen überwunden werden.^{51,55,56} Obwohl der Wirkmechanismus von Heptaplatin nicht vollständig aufgeklärt ist und man lediglich eine zu Cisplatin und Oxaliplatin ähnliche Interaktion mit DNA vermutet, wurde dieser von *SK Chemicals* (Kyungki-Do, Korea) entwickelte Platin(II)-Komplex in Südkorea für die Behandlung von Magenkarzinomen zugelassen.⁵⁷⁻⁵⁹

Durch die Verwendung verschiedener, chelatisierender Liganden bei den Platin-basierten Zytostatika der zweiten und dritten Generation (vgl. Abbildung 6) konnte die Wirksamkeit der Platinverbindungen in einigen Fällen deutlich verbessert und/oder die von Cisplatin bekannten Nebenwirkungen reduziert werden. Dennoch treten auch beim Einsatz dieser Cisplatin-Analoga in der Chemotherapie teilweise noch gravierende Nebenwirkungen auf. Darüber hinaus stellen Resistenzen gegenüber den Platinverbindungen nach wie vor ein zentrales Problem dar. Die Entwicklung und Untersuchung von in ihrer Wirkung und Selektivität optimierten Platinkomplexen für die Krebstherapie bilden daher weiterhin ein wesentliches Forschungsfeld innerhalb der medizinischen Chemie. Hierbei sind in den letzten Jahren vermehrt Platin- aber auch andere Metallkomplexe mit *N*-heterozyklischen Carbenen (NHCs) als Liganden in den Vordergrund gerückt.^{27,28,60-62} Bei NHCs handelt es sich um Verbindungen, die in wenigen Schritten herstellbar und leicht zu variieren bzw. zu derivatisieren sind. Die wohl größte Gruppe der bisher synthetisierten Carbene stellen die ungesättigten Imidazol-2-ylidene **2** dar (Abbildung 7).²⁸

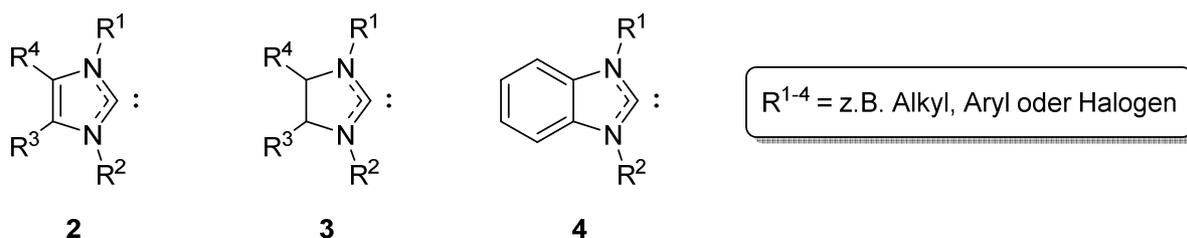


Abbildung 7: Die in der medizinischen Chemie am häufigsten verwendeten NHC-Liganden sind ungesättigte (**2**) und gesättigte (**3**) Imidazol-2-ylidene sowie Benzimidazol-2-ylidene (**4**).²⁸

Aus diesen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an verschiedenen Metallkomplexen hergestellt, die zunächst vor allem für katalytische Zwecke eingesetzt wurden.^{63,64} Aufgrund ihrer einfachen Synthese und einem hohen Maß an Variabilität stellen NHCs jedoch auch vielversprechende Liganden für biologisch aktive Metallkomplexe dar. So lassen sich die Aktivität, Selektivität oder physikochemischen Eigenschaften der NHC-Metallkomplexe leicht über die verschiedenen Substituenten anpassen und optimieren. Auch ihre zumeist hohe Luft- und Wasserstabilität sind von großem Vorteil bei der Herstellung, Lagerung und potentiellen therapeutischen Verabreichung der Metallverbindungen, z.B. als Zytostatika in der Tumortherapie. In Abbildung 7 sind die drei am häufigsten in der medizinischen Chemie eingesetzten NHC-Liganden aufgeführt.²⁸ Aus den Strukturen der NHCs wird schnell deutlich, dass durch Modifikation der verschiedenen Reste bereits eine Vielzahl an möglichen Liganden entsteht.

Durch weitere Variation der Metalle und deren Hilfsliganden ergeben sich bei der Entwicklung von neuen, biologisch aktiven NHC-Metallkomplexen quasi unendlich viele Möglichkeiten an Kombinationen. Einige bereits auf ihre antitumorale Wirkung getestete Pt(II)-NHC-Komplexe sind in Abbildung 8 dargestellt.^{27,28} Während die klassischen Platinbasierten Komplexe, wie zuvor beschrieben, kovalent an DNA binden und so Quervernetzungen zwischen den Nukleobasen ausbilden, können Pt(II)-NHC-Komplexe auch durch Interkalation (nicht-kovalente Wechselwirkung) mit der DNA interagieren oder weisen sogar DNA-unabhängige Wirkmechanismen auf.^{27,28,65} So zeigen die Komplexe **5a-d** zum Beispiel nur eine geringe Interaktion mit DNA *in vitro*, weshalb ein hauptsächlich DNA-abhängiger Wirkmechanismus für diese Art von *trans*-Platinkomplexen ausgeschlossen werden kann.⁶⁵

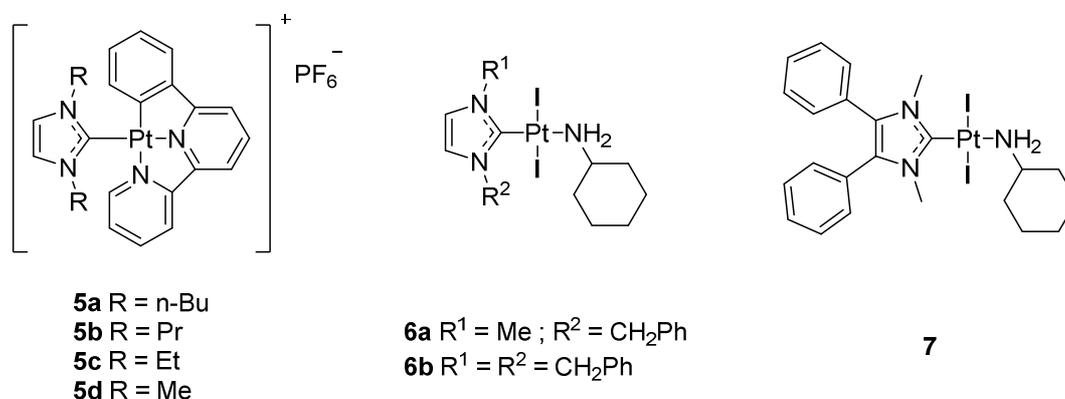


Abbildung 8: Beispiele von bereits untersuchten Pt(II)-NHC-Komplexen mit antitumoraler Wirkung.^{27,28,60,65}

Stattdessen inhibieren **5a-d** Survivin, ein Protein, das in Tumorzellen überexprimiert wird und durch Hemmung der Caspasen-Kaskade die Einleitung der Apoptose verhindert. Darüber hinaus führen diese Platinkomplexe vermehrt zu gespaltenem PARP-1, welches als intaktes Volllängenprotein an der DNA-Reparatur und somit ebenfalls an Resistenzmechanismen von Tumorzellen beteiligt ist. Die Inhibition von Survivin und die Spaltung von PARP-1 führen also letztendlich zum programmierten Zelltod und vermitteln die antitumorale Wirkung der Platin-NHC-Komplexe **5a-d**. Auch weisen viele Platin-basierte NHC-Komplexe mit IC₅₀-Werten im einstelligen mikromolaren oder sogar submikromolaren Bereich eine deutlich stärkere zytotoxische Wirkung als Cisplatin auf. Des Weiteren konnte für einige Komplexe, wie zum Beispiel Verbindung **5a**, mit Hilfe von Mausexperimenten bereits eine gute antitumorale Aktivität *in vivo* nachgewiesen werden.

Die NHC-Platinkomplexe stellen also nicht nur durch ihre relativ einfache Handhabung hinsichtlich der Synthese sowie der hohen Variabilität vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuartiger Chemotherapeutika dar, sondern auch aufgrund ihrer zumeist im Vergleich zu Cisplatin und dessen Analoga deutlich besseren Wirkung gegenüber Tumorzellen. Weiterhin eröffnen neuartige Wirkmechanismen die Möglichkeit Resistenzen gegenüber Platinverbindungen zu umgehen, was einen weiteren, signifikanten Vorteil der NHC-Metallkomplexe gegenüber den bisher in der Chemotherapie eingesetzten und von Cisplatin abgeleiteten Komplexen darstellt.

1.3 Goldkomplexe als neue, potentielle Wirkstoffe für die Krebstherapie

Aufgrund seiner mutmaßlichen magischen Eigenschaften und seiner Ähnlichkeit mit der „Essenz“ der Sonne verwendeten schon Priester, Heiler und Schamanen der frühesten Hochkulturen bei ihren Ritualen Gold und aus dem Metall hergestellte Tränke.^{66,67} So ist zum Beispiel bekannt, dass Gold, aber auch andere Edelmetalle, bereits bis zu ~2500 Jahre vor Christus in der traditionellen, chinesischen Medizin eingesetzt wurden, um die Qualität von Heilmitteln zu verbessern.^{67,68} Die Verwendung der Metalle bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen in der damaligen Zeit basierte jedoch weniger auf deren heute bekannten therapeutischen Effekten, sondern erfolgte lediglich aufgrund des schon damals hohen materiellen Werts der Edelmetalle.²³

Die rationalere, moderne Anwendung von Gold in der Medizin wurde schließlich durch die Arbeiten von Chrestien und Figuier aus dem frühen 19. Jahrhundert auf den Weg gebracht.^{67,69} Die beiden Wissenschaftler entwickelten an der Universität von Montpellier in Frankreich verschiedene Goldsalze, denen sie, vor allem für die Behandlung von Tuberkulose, eine therapeutische Wirkung zuschrieben. Auch die Beobachtungen von Robert Koch, dass Goldzyanide *in vitro* eine starke bakterizide Wirkung auf Tuberkelbazillen haben, trugen zur weiteren Erforschung von Goldkomplexen für die Therapie der humanen und bovinen Tuberkulose bei.^{67,70} So wurden im Zeitraum von 1925 bis 1935, welcher auch als das „Gold-Jahrzehnt“ bezeichnet wird, bereits verschiedene Gold(I)-Zyanide und Thiosulfate zur Therapie der Tuberkulose eingesetzt.^{24,71}

In den 1930er Jahren erkannte Forestier schließlich auch das Potential von Goldverbindungen für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis.^{24,67,72,73} Auch diese Entdeckung war jedoch, ähnlich wie bei Cisplatin, eher zufällig, da sie auf einer falschen Annahme von Forestier basierte. Damals hielt man bakterielle Infektionen auch für die Ursache der rheumatoiden Arthritis, weshalb Forestier begann Patienten mit dieser Erkrankung ebenfalls mit verschiedenen Goldsalzen zu behandeln. Der Erfolg dieser ersten Experimente resultierte darin, dass schon im frühen 20. Jahrhundert verschiedene Goldverbindungen Einzug in die medizinische Therapie dieser Erkrankung erhielten. Aufgrund des guten Ansprechens der Patienten werden viele dieser Gold(I)-Komplexe auch heute noch bei der Behandlung von rheumatischen Erkrankungen in der sogenannten Chrysotherapie eingesetzt.²⁴ Dabei handelt es sich meistens um geladene, polymere Goldverbindungen, die wasserlöslich sind und direkt in die Muskeln injiziert werden (Abbildung 9).

Lediglich bei dem Wirkstoff Auranofin ((2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosato)-(triethylphosphin)gold; Abbildung 9), welcher 1985 von der FDA für die Therapie der rheumatoiden Arthritis zugelassen wurde, handelt es sich um einen ungeladenen, monomeren Gold(I)-Komplex, der oral appliziert wird. Neben seiner antirheumatischen Wirkung konnte für Auranofin auch eine antitumorale Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden, wobei der Goldkomplex zum Teil eine bessere Zytotoxizität als Cisplatin aufweist und sogar gegenüber Cisplatin-resistenten Zellen aktiv ist.⁷⁴⁻⁷⁸

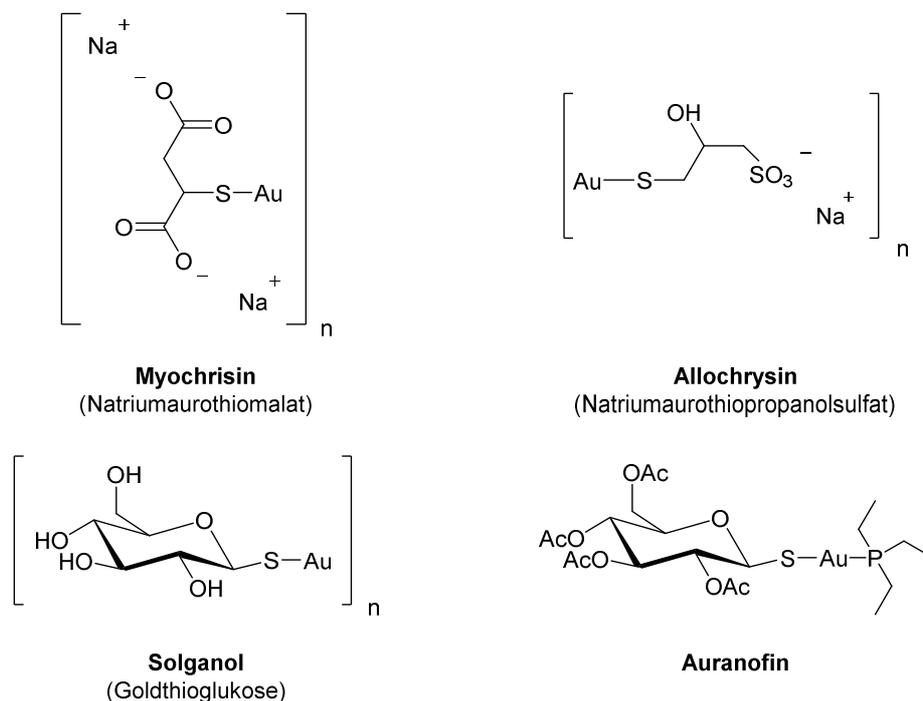


Abbildung 9: Für die Arthritistherapie zugelassene Gold(I)-Komplexe. Auranofin weist neben seiner antirheumatischen Wirkung zusätzlich eine signifikante antitumorale Aktivität auf.^{24,79}

Der molekulare Wirkmechanismus von Auranofin basiert jedoch nicht wie bei Cisplatin auf einer direkten Interaktion mit DNA, sondern auf einer äußerst effektiven Inhibition der Thioredoxinreduktase (TrxR), einem Selenocystein-haltigen Enzym der Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen.⁷⁹⁻⁸² Die Hemmung der TrxR wird dabei durch eine irreversible, kovalente Bindung des stark elektrophilen Goldzentrums an die nukleophile, Selen-haltige Aminosäure im katalytischen Zentrum des Enzyms vermittelt. Trotz der großen Homologie des Enzyms zur Glutathionreduktase (GR) besitzt Auranofin eine deutliche Selektivität für die TrxR mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich, was sich durch die Abwesenheit des Selenocysteins im aktiven Zentrum der GR und eine damit einhergehende geringere Affinität des Goldkomplexes für diese erklären lässt (Auranofin hat eine etwa 1000-fach geringere Affinität zur Cystein-haltigen GR im Vergleich zur TrxR).^{79,80}

Die TrxR und die GR stellen jeweils homodimere Proteine dar, die NADPH-abhängig unter anderem die Reduktion des 12 kDa großen Proteins Thioredoxin (Trx) bzw. von Glutathion-disulfid (GSSG) zu Glutathion (GSH) katalysieren, aber auch verschiedene andere oxidierte Zellbestandteile als Substrate aufweisen.⁸³⁻⁸⁵ So spielen sowohl das Trx- als auch das GSH-System durch ihre antioxidativen Eigenschaften eine essentielle Rolle bei der intrazellulären Redoxhomöostase und der Vermeidung von oxidativem Stress. Aus diesem Grund resultiert eine Inhibition der TrxR auch in einer deutlich erhöhten intrazellulären Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), was wiederum eine massive Schädigung verschiedener Zellkomponenten (Membranen, Proteine oder auch DNA), den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) und damit einhergehend eine Initiation des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs zur Folge haben kann.^{78,79,81,82,86} Da die TrxR in verschiedenen Tumorzellen überexprimiert wird, handelt es sich bei dem Enzym um ein interessantes und vielversprechendes *target* für neuartige *metallo*drugs in der Krebstherapie. So wurden bereits verschiedene Analoga von Auranofin aber auch andere Gold(I)- und sogar einige Gold(III)-Komplexe als neue, potentielle TrxR-Inhibitoren synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht.^{79,87-90}

Aufgrund der intrinsischen Instabilität der Gold(III)-Komplexe unter physiologischen Bedingungen liegt der Fokus bei der Suche nach neuen Chemotherapeutika insgesamt jedoch auf den deutlich stabileren Goldverbindungen der Oxidationsstufe +I.⁷⁹ Im Rahmen früher Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung von Auranofin und seinem Chlorid-Analogon Et₃PAuCl (**8**, Abbildung 10) konnte bereits im Jahr 1986 durch Mirabelli *et al.* festgestellt werden, dass der Phosphinligand eine weitaus entscheidendere Rolle für die antitumorale Aktivität dieser Goldkomplexe spielt als die Thioglukose oder der Halogenligand.^{27,77,79} So zeigten Derivate der Leitstrukturen ohne Phosphinligand eine deutlich geringere Aktivität, während der Austausch des Zuckerrestes bzw. des Chlorids keine signifikanten Auswirkungen auf die biologische Wirksamkeit hatte. Aus diesem Grund wurden verschiedenste lineare Gold(I)-Verbindungen hergestellt, in denen lediglich die Thioglukose bzw. der Chloridligand variiert wurden, da diese vermutlich eher für die Aufnahme und Verteilung der Komplexe als für deren pharmakodynamischen Effekte verantwortlich sind.^{79,90} Hierzu zählt unter anderem der Naphthalimid-haltige Gold(I)-Phosphinkomplex Au-Naphth-1 (**9**, Abbildung 10), welcher von Ott *et al.* synthetisiert und auf seine antitumorale und antiangiogene Wirkung hin untersucht wurde.⁹⁰

Durch die Beibehaltung des Gold(I)-Phosphin-Rests aus der Leitstruktur von Auranofin und dessen Verknüpfung mit einem Liganden, welcher ebenfalls bereits eine antiproliferative Aktivität aufweist, sollte ein neuer Goldkomplex mit zusätzlichen biologischen Eigenschaften hergestellt werden. Neben einer im Vergleich zu Et_3PAuCl (**8**) verbesserten Zytotoxizität, konnte für Au-Naphth-1 (**9**) auch eine erhöhte Aufnahme des Goldkomplexes in den Nukleus von Krebszellen nachgewiesen werden. Beide Beobachtungen lassen sich gut durch den Austausch des Chlorids gegen den nachweislich mit DNA interagierenden Naphthalimid-Liganden⁹¹ erklären (erweiterter Wirkmechanismus und *drug-targeting* Effekt). Zusätzlich handelt es sich bei dem Au-Naphth-1-Komplex **9** sowohl um einen potenten Inhibitor der TrxR als auch der Angiogenese im Zebrafisch-Modell.⁹⁰

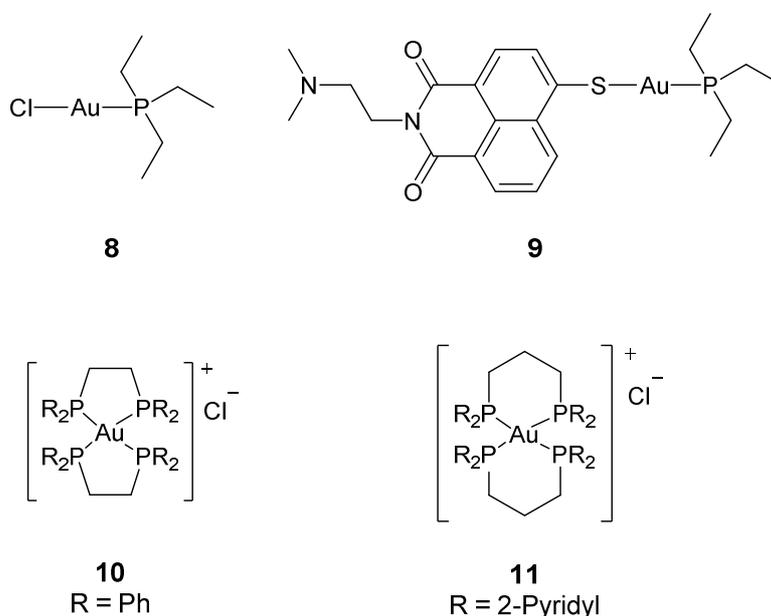


Abbildung 10: Lineare und tetraedrische Gold(I)-Phosphinkomplexe mit antitumoraler sowie im Fall von Komplex **9** zusätzlicher antiangiogener Wirkung.^{90,92,93}

Weitere Naphthalimid-Gold(I)-Derivate, welche Gold(I)-NHCs als Metalleinheiten aufweisen, zeigten ebenfalls eine gute antiproliferative Aktivität sowie TrxR inhibierende Eigenschaften, interagierten durch Interkalation mit DNA und beeinträchtigten darüber hinaus nachweislich den Metabolismus von Tumorzellen.⁹⁴ Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Kombination von Goldfragmenten mit bioaktiven Liganden eine vielversprechende Strategie zur Entwicklung neuer, aktiver *metallo*drugs darstellt.

Neben linearen Gold(I)-Phosphinkomplexen wie den beschriebenen Auranofin-Derivaten, wurden auch viele tetraedrische Komplexe, wie z.B. das von Berners-Price *et al.* synthetisierte $[\text{Au}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$ (**10**, Abbildung 10, dppe = 1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan),⁹⁵

auf ihre antitumoralen Eigenschaften hin untersucht. Im Gegensatz zu den linearen Vertretern weisen solche bischelatisierten Gold(I)-Phosphin-Verbindungen wie **10** die Fähigkeit auf, eine direkte Interaktion mit DNA einzugehen, DNA-Protein-Quervernetzungen auszubilden und sogar Strangbrüche zu induzieren. Es handelt sich bei dieser Art von Gold(I)-Komplexen um sogenannte delokalisierte, lipophile Kationen (DLCs - *delocalized, lipophilic cations*), welche dafür bekannt sind, die Doppellipidmembran der Mitochondrien leicht zu überwinden und aufgrund ihrer positiven Ladung sowie der negativ geladenen Innenseite der Mitochondrienmembran in den Organellen zu akkumulieren.^{37,79,96-98} Hier stören sie die Atmungskette und lösen schließlich durch einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ die Apoptose aus. Aufgrund der Tatsache, dass viele Tumorzellen ein erhöhtes $\Delta\psi_m$ besitzen und DLCs sich daher verstärkt in diesen anreichern (Selektivität), stellen derartige Goldverbindungen eine weitere interessante Klasse an neuen, potentiellen Wirkstoffkandidaten für die Krebstherapie dar. Obwohl der Gold(I)-Phosphin-Komplex **10** auch *in vivo* eine sehr gute Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorentitäten zeigte, verhinderte seine drastische kardiovaskuläre und renale Toxizität weitere Untersuchungen und ein Fortschreiten in die klinischen Phasen.^{95,96,99,100} Die Ursache der starken generellen Toxizität des Goldkomplexes **10** sahen die Forscher in der hohen Lipophilie der Verbindung, welche vermutlich eine unspezifische Interaktion mit unterschiedlichen (intra-)zellulären Komponenten zur Folge hat. Im Rahmen von Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung analoger, tetraedrischer Gold(I)-Phosphinkomplexe und ihrer Aufnahme in Tumorzellen konnte festgestellt werden, dass eine Korrelation zwischen der Lipophilie der Substanzen, ihrer zellulären Aufnahme und Aktivität besteht.^{79,95,101,102} Die Lipophilie des $[\text{Au}(\text{d}2\text{pypp})_2]\text{Cl}$ (**11**, Abbildung 10, $\text{d}2\text{pypp}$ = 1,3-Bis(dipyridylphosphino)propan) liegt laut eines Modells zur Vorhersage der selektiven Akkumulation von DLCs in Krebszellen im optimalen Bereich.^{98,103} Für den Goldkomplex **11** konnte *in vitro* tatsächlich gezeigt werden, dass er in Krebszellen eine ähnliche Effektivität wie der Komplex **10** aufweist, dabei jedoch deutlich selektiver für diese ist.^{92,93} Eine geeignete Lipophilie stellt also ein entscheidendes Kriterium für die Entwicklung von neuen Gold(I)-Phosphin-Analoga mit signifikanter Zytotoxizität bei gleichzeitiger Tumorselektivität dar. Wie andere DLCs reichte sich auch **11** in den Mitochondrien von Krebszellen an und zeigte des Weiteren im Gegensatz zu **10** eine starke, inhibitorische Aktivität gegenüber der TrxR. Letzteres begründet sich vermutlich auf den konformativ beweglicheren Phosphinliganden von **11**, welche die Bindung des Goldfragments an das im aktiven Zentrum der TrxR vorliegende Selenocystein erleichtern.^{92,93}

Eine weitere, vielversprechende Klasse an Goldverbindungen, die in den letzten Jahren bei der Suche nach neuartigen, metallbasierten Wirkstoffen für die Tumorthherapie in den Vordergrund gerückt ist, stellen Goldkomplexe mit NHC-Liganden dar.^{27,28,104} Neben der bereits in Abschnitt 1.2 erwähnten einfachen Synthese und hohen Variabilität machen auch ihre zu Phosphinliganden vergleichbaren Donoreigenschaften NHCs zu hervorragenden Liganden bei der Synthese neuer, optimierter *metallodrugs*. So stellten Berners-Price *et al.* nach ihren Erfolgen mit Gold(I)-Phosphin-Komplexen auch verschiedene lineare, kationische Gold(I)-Biscarbenkomplexe (**12 a-e**, Abbildung 11) mit Imidazol-2-ylidenen als Liganden her, bei denen die Substituenten an den Stickstoffen der Imidazole variiert wurden, um die Lipophilie der Komplexe zu modulieren bzw. die Selektivität für Krebszellen zu erhöhen.^{105–107} Die Komplexe **12 a-e** zeigten deutliche antimitchondriale Effekte und induzierten ein starkes Anschwellen von aus Rattenlebern isolierten Mitochondrien, was einen Indikator für die Permeabilität der Organellen darstellt. Da der Komplex **12b** mit seiner mittleren Lipophilie eine signifikante antimitchondriale Aktivität aufwies, untersuchte die Arbeitsgruppe um Berners-Price diesen in weiterführenden Experimenten. Hierbei konnten sie nachweisen, dass **12b** in den Mitochondrien akkumuliert, selektiv in Krebszellen die Apoptose über den intrinsischen Signalweg auslöst und darüber hinaus auch eine gute inhibitorische Aktivität gegenüber der TrxR, nicht aber der GR, in Tumorzellen besitzt.

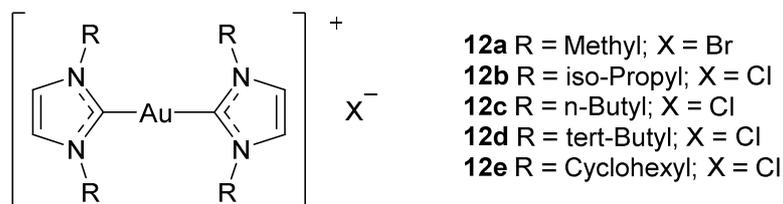


Abbildung 11: Beispiele von Imidazol-abgeleiteten, kationischen Gold(I)-Biscarbenkomplexen mit unterschiedlicher Lipophilie und antimitchondriale Wirkung.^{105–107}

Insgesamt weisen geladene Gold(I)-Biscarbenkomplexe eine bessere antimitchondriale und somit auch antitumorale Aktivität als ihre analogen, neutralen Monocarbenkomplexe auf. Dies lässt sich durch ihren kationischen, lipophilen Charakter erklären, welcher es diesen Verbindungen, genau wie auch anderen DLCs, ermöglicht, Lipiddoppelschichten zu überwinden, in den Mitochondrien zu akkumulieren, hier essentielle zelluläre Prozesse zu stören und schließlich die Apoptose einzuleiten. So zeigte sich auch bei den von Ott *et al.* synthetisierten Benzimidazol-2-yliden-basierten Gold(I)-NHC-Komplexen **13a-c** mit verschiedenen Zweitliganden (Cl, PPh₃ oder einem zweiten NHC-Liganden, Abbildung 12),

dass der Austausch des Chlorids (**13a**) gegen einen weiteren NHC-Liganden (**13b**) eine deutliche Wirkungssteigerung zur Folge hatte.^{108,109} Während der Komplex **13c** mit PPh₃ als Zweitligand zwar eine ähnlich gute antiproliferative Aktivität wie **13b** mit IC₅₀-Werten im submikromolaren Bereich gegenüber Krebszellen besitzt, weist dieser im Gegensatz zum analogen Biscarbenkomplex (**13b**) jedoch keine Selektivität für die malignen Zellen auf. Dies lässt sich möglicherweise mit einer zu hohen Lipophilie des Komplexes **13c** erklären, welche eine selektive Akkumulation in Krebszellen verhindert. Die erhöhte antiproliferative Aktivität der Gold(I)-NHC-Komplexe **13b** und **13c** durch Einführung der beiden zusätzlichen, neutralen Liganden (NHC oder PPh₃) und die damit einhergehende Ausbildung von kationischen Verbindungen korrelierte mit einer verstärkten Aufnahme in Krebszellen, einer Anreicherung in den Mitochondrien sowie einer verstärkten ROS-Produktion, wodurch letztendlich die Apoptose über den intrinsischen Signalweg eingeleitet wurde. Hierbei handelt es sich, wie bereits oben beschrieben, um für DLCs charakteristische Effekte.

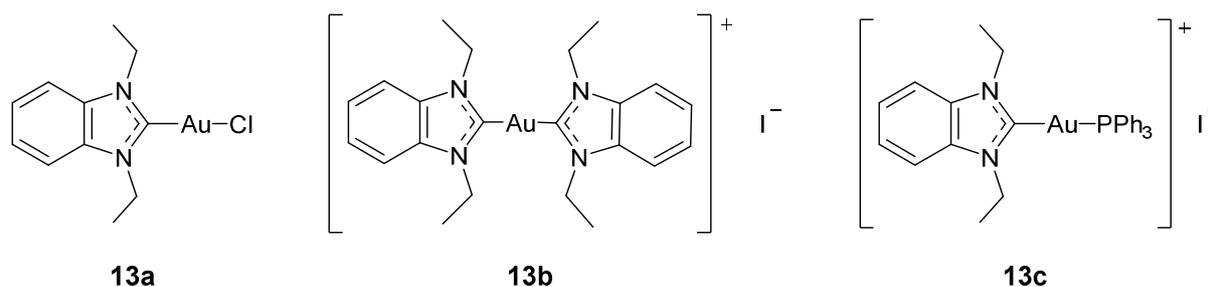


Abbildung 12: Antitumorale Gold(I)-Carbenkomplexe mit Benzimidazol-2-yliden-Liganden.^{108,109}

Alle drei Komplexe (**13a-c**) hemmten darüber hinaus die Aktivität der TrxR, welche für Gold(I)-NHC-Komplexe im Allgemeinen ein essentielles *target* darstellt.^{27,28,110} Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Zweitligand am Goldzentrum eine entscheidende Rolle für die Effektivität der TrxR-Inhibition spielt. Obwohl es sich bei dem Monocarbenkomplex **13a** um den Goldkomplex mit der geringsten zytotoxischen Wirkung handelt, zeigte dieser die stärkste Inhibition der Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu vermittelten die zwar allgemein aktiveren, kationischen Gold(I)-NHC-Komplexe **13b** und **13c** eine geringere Hemmung der TrxR, wobei sich der sonst aktivste Komplex **13b** als schlechtester TrxR-Inhibitor erwies. Die Ursache hierfür liegt in der unterschiedlichen Stabilität der Verbindungen: Während Goldkomplex **13a** mit Chlorid als zweitem Liganden eine gute Abgangsgruppe aufweist, besitzen die beiden kationischen Komplexe **13b** und **13c** wesentlich weniger gute Abgangsgruppen (zweiter NHC-Ligand bzw. PPh₃), welche die für die Inhibition der TrxR notwendige nukleophile Substitution im aktiven Zentrum des Enzyms erschweren.^{27,28,110}

Durch die komplette Desorganisation des Zytoskeletts, die Störung der Zell-Zell-Kontakte und die Inhibition der Zellproliferation in vaskulären Endothelzellen kommt es zu einer deutlich verringerten Ausbildung neuer Kapillaren im Tumor sowie der Zerstörung bereits vorhandener tumoraler Blutgefäße und damit schließlich zum sogenannten *vascular shutdown*.^{118,119} Der Zusammenbruch des Blutgefäßsystems resultiert zum einen in einer Unterversorgung des Tumors sowohl mit Sauerstoff als auch Nährstoffen und zum anderen in einem verringerten Abtransport von metabolischen Abfallprodukten, wodurch letztendlich die sekundäre Tumornekrose induziert wird. Aufgrund der hohen Proliferations- und somit Mitoserate von Tumorzellen haben Tubulinbinder wie CA-4 und dessen Imidazol-verbrückte Derivate (**14**) auch eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen und weisen für diese im Vergleich zu nicht-malignen Zellen eine gewisse Selektivität auf.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Da sich die von CA-4 abgeleiteten Imidazole hervorragend als NHC-Liganden für Goldkomplexe eignen und sich diese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits als vielversprechende antivaskuläre und antitumorale Wirkstoffe herausgestellt hatten,¹¹⁴⁻¹¹⁶ sollte ihre intrinsische antivaskuläre Aktivität mit der bekannten antiproliferativen Wirkung von Gold(I)-Fragmenten kombiniert werden. In diesem Rahmen hat unsere Arbeitsgruppe bereits vor einigen Jahren erste Combretastatin A4 (CA-4)-basierte NHC-Gold(I)-Komplexe (**15** und **16**, Abbildung 14) hergestellt und auf ihre Aktivität gegenüber Krebszellen verschiedener Entitäten getestet.¹²⁰⁻¹²² Während es sich bei den CA-4-abgeleiteten Imidazol-Derivaten **14** (vgl. Abbildung 13), wie bereits oben beschrieben, um effektive Tubulinbinder handelt, die gegenüber Tumorzellen IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich aufweisen, zeigten die neuartigen Goldkomplexe keinerlei Interaktion mit Tubulin *in vitro* und eine Toxizität, die lediglich im unteren mikromolaren Bereich liegt.^{120,121}

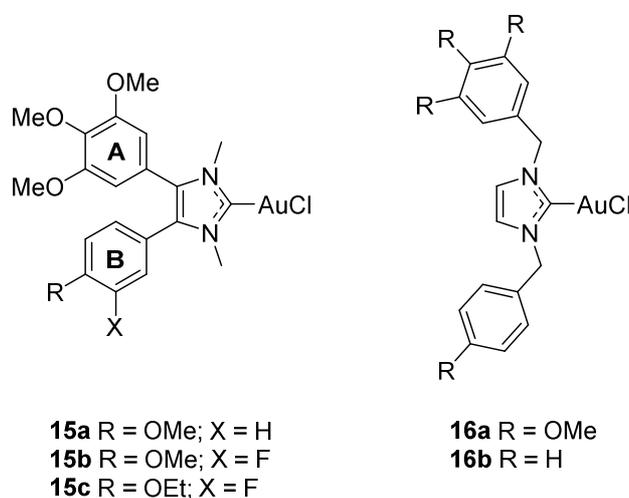


Abbildung 14: Strukturen der ersten Serie an CA-4 abgeleiteten Gold(I)-NHC-Komplexen.^{120,121}

Somit konnte eine eindeutige Korrelation zwischen einer bestehenden Tubulinbindung und der antiproliferativen Aktivität der Verbindungen festgestellt werden. Dennoch wiesen auch die von CA-4 abgeleiteten Gold(I)-Carbenkomplexe **15** und **16** eine gute Selektivität für Tumorzellen auf und zeigten darüber hinaus trotz der fehlenden Interaktion mit Tubulin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikante antivaskuläre Effekte.¹²² So inhibierten die Komplexe **15a** und **16b** die Ausbildung von tubulären Netzwerken durch vaskuläre Endothelzellen auf Matrigel (*Tube Formation Assay*) und zerstörten die Blutgefäße in der Chorioallantoismembran (CAM) befruchteter Hühnereier, wobei sich **16b** jeweils als die deutlich aktivere Substanz herausstellte. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass beide Goldkomplexe auch Auswirkungen auf die Expressions- und Sekretionslevel aktiver Matrix-Metalloproteinasen (*matrix metalloproteinases*, MMPs) haben.¹²² Hierbei handelt es sich um proteolytische Enzyme, die während der Angiogenese aber auch für die Metastasierung von Tumorzellen eine entscheidende Rolle beim Abbau bzw. der Umorganisation der extrazellulären Matrix spielen. Auch hier erwies sich Komplex **16b** als die deutlich effektivere Verbindung und führte bei HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) zu einer signifikanten Verringerung der intra- und extrazellulären Anteile an aktiver MMP-2.¹²²

Insgesamt handelt es sich bei dieser Art von Gold(I)-NHC-Komplexen also ebenfalls um vielversprechende zytotoxische Verbindungen, die darüber hinaus auch antivaskuläre Eigenschaften aufweisen und so die Tumorprogression unterbinden können, was neben der Bekämpfung von Primärtumoren ein wesentliches Ziel der Chemotherapie darstellt. Durch weitere Optimierung der äußerst variablen NHC-Liganden lassen sich durchaus noch effektivere und selektivere antitumorale Goldkomplexe herstellen. Darüber hinaus können erweiterte bzw. zusätzliche Wirkmechanismen eine Umgehung der, bei den zurzeit eingesetzten und metallbasierten Chemotherapeutika auftretenden, Resistenzmechanismen ermöglichen. Die Resistenzüberwindung stellt neben einer Erhöhung der Selektivität von Wirkstoffen immer noch eine der zentralen Herausforderungen bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffkandidaten für die Tumorthherapie dar.

1.4 Zielsetzung

Metalle werden in der Medizin schon seit tausenden von Jahren für die Behandlung verschiedenster Krankheiten eingesetzt. Eine rationale medizinische Anwendung von Metallverbindungen erfolgte jedoch erst ab dem frühen 19. Jahrhundert. Durch die zufällige Entdeckung der antitumoralen Eigenschaften von Cisplatin in den 1960er Jahren und der Aufklärung seines molekularen Wirkmechanismus rückten Platinkomplexe in den Fokus bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffen für die Krebstherapie. Seither wurde eine Vielzahl an neuartigen Platinverbindungen synthetisiert und diese hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht, was die gegenwärtige Chemotherapie stark beeinflusste. Dennoch spielen in der heutigen Zeit neben Cisplatin nur wenige von dieser Leitstruktur abgeleitete Platinanaloga eine zentrale Rolle in der modernen Krebstherapie, da gravierende Nebenwirkungen und das Auftreten von Resistenzen die klinische Anwendung der Platinverbindungen limitieren.

Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahrzehnten weiter nach neuen Platinverbindungen sowie auch vermehrt nach nicht-platinhaltigen Metallkomplexen gesucht, die eine optimierte Selektivität für Krebszellen sowie im Vergleich zu den etablierten Platinkomplexen einen veränderten Wirkmechanismus aufweisen. Hierdurch sollen eine verbesserte Wirkung und eine Umgehung auftretender Resistenzen erreicht werden, was zwei zentrale Ziele der medizinischen Chemie darstellt. Darüber hinaus rücken Metallkomplexe zunehmend nicht nur als reine Zytostatika zur Behandlung von Primärtumoren in den Vordergrund, sondern auch als antivaskuläre und antimetastatische Wirkstoffe zur Prävention der Tumorprogression bzw. Metastasierung. Als vielversprechende Liganden zur Herstellung solcher biologisch aktiven Metallkomplexe haben sich in den letzten Jahren vor allem *N*-heterozyklische Carbene (NHC) erwiesen, da diese einfach zu synthetisieren und zu variieren sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine biologische Evaluation neuartiger Gold(I)- und Platin(II)-NHC-Komplexe erfolgen. Neben Untersuchungen zur Effektivität und Selektivität der Verbindungen gegenüber humanen Tumorzelllinien, sollten über verschiedenste biochemische und zellbasierte *in vitro* Assays auch die zellulären bzw. molekularen Wirkmechanismen der Metallkomplexe aufgeklärt werden. Darüber hinaus sollten auch die antivaskulären Eigenschaften der Metallkomplexe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden. Die aus den präklinischen Untersuchungen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Wirkung der Gold- und Platinkomplexe sollen schließlich als Grundlage für die weitere Entwicklung und Optimierung metallbasierter NHC-Komplexe als potentielle, neue Wirkstoffkandidaten für die Tumorthherapie dienen.

2 Materialien

2.1 Zelllinien

518A2

Bei der verwendeten Zelllinie 518A2 handelt es sich um humane Melanomzellen, die mit einer Epithel-ähnlichen Morphologie in adhärenter Kultur wachsen und von Prof. Dr. R. Paschke (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Biocenter) erhalten wurden.^{123–125} Neben einer Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2,^{126,127} liegt in den 518A2-Zellen eine Mutation des Tumorsuppressorprotein p53 kodierenden Gens (TP53) vor,¹²⁸ welche zu einem inaktiven Transkriptionsprodukt führt. Dennoch handelt es sich bei den Melanomzellen um eine eher sensitiver Zelllinie, da keine erhöhte Expression von *multidrug*-Resistenzen vermittelnden Efflux-Transportern vorliegt. Die 518A2-Zellen wurden in DMEM-Zellkulturmedium kultiviert.

Panc-1

Die Panc-1-Zellen wurden 1975 aus dem primären Pankreaskarzinom eines 56-jährigen männlichen Patienten isoliert (ATCC® CRL-1469™) und wurden ebenfalls in DMEM kultiviert.¹²⁹ Sie wachsen ebenfalls in adhärenter Kultur und besitzen eine Epithelzell-ähnliche Morphologie. Des Weiteren weisen die Panc-1-Zellen, wie viele andere Pankreas-krebszellen, eine *missense*-Mutation im TP53-Gen auf.^{130,131}

MCF-7/Topo

Die MCF-7-Zellen stellen eine Brustkrebszelllinie dar, die 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom isoliert und etabliert wurde (ATCC® HTB-22™).^{132,133} Die MCF-7-Zellen bilden während des Wachstums *in vitro* adhärente Kolonien aus. Durch Behandlung der MCF-7-Zellen mit steigender Konzentration an Topotecan (Endkonzentration 550 nM) über einen Zeitraum von 90 Tagen, wurde die BCRP-überexpmierende (BCRP - *breast cancer resistance protein*) Zelllinie MCF-7/Topo erhalten. Um die durch diesen ABC-Transporter (ABC - *ATP binding cassette*) vermittelte Resistenz längerfristig beizubehalten, wurden die Zellen im Anschluss in regelmäßigen Abständen (alle 1-2 Wochen) mit Topotecan behandelt.^{134,135} Die Kultivierung der MCF-7/Topo-Zellen erfolgte in DMEM-Zellkulturmedium.

KB-V1/Vbl

Bei den KB-V1-Zervixkarzinomzellen (DSM ACC 149) handelt es sich um eine mehrfach resistente Zelllinie, welche von den KB-3-1-Zellen (DSM ACC 158) abgeleitet ist und 1985 etabliert wurde. Die KB-3-1-Zellen stammen wiederum ursprünglich von HeLa-Zellen (DSM ACC 57) ab. Diese wurden 1951 aus einer 31-jährigen Patientin isoliert und stellen die erste sowie die in der Forschung am häufigsten verwendete humane Zelllinie dar.¹³⁶ Die KB-V1-Zellen weisen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine starke Expression des *mdr1* Gens auf, welches das P-Glykoprotein (P-gp) kodiert. Bei diesem handelt es sich genau wie beim BCRP um einen Efflux-Transporter der ABC-Membranproteinfamilie. Durch Behandlung der KB-V1-Zellen mit steigender Menge an Vinblastin (Endkonzentration 340 nM) über einen Zeitraum von 90 Tagen, wurde die P-gp-überexpressierende Zelllinie KB-V1/Vbl erhalten. Um die P-gp-vermittelte *multidrug*-Resistenz langfristig aufrechtzuerhalten, wurden die Zellen im Anschluss in regelmäßigen Abständen (alle 1-2 Wochen) mit Vinblastin behandelt.^{137,138} Auch für die KB-V1/Vbl-Zelllinie wurde DMEM als Kulturmedium verwendet.

HCT-116

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 (ATCC® CCL-247™) wurde ursprünglich 1981 aus der primären Zellkultur eines Dickdarmkarzinoms durch Brattain *et al.* isoliert und etabliert.¹³⁹ Es handelt sich hierbei um in Kultur adhärent wachsende Zellen mit epithelähnlicher Morphologie, die in DMEM-Zellkulturmedium kultiviert wurden.

HT-29

Bei den HT-29-Zellen handelt es sich ebenfalls um eine Kolonkarzinomzelllinie, deren Kultivierung in DMEM erfolgte. Die Zellen wurden 1964 aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Patientin mit einem kolorektalen Adenokarzinom gewonnen.¹⁴⁰ In Kultur bilden die HT-29-Zellen adhärent wachsende Kolonien und stellen aufgrund ihrer Überexpression von *multidrug*-Resistenz assoziierten Proteinen eine mehrfach resistente Zelllinie dar.^{141–143} Darüber hinaus liegt wie in vielen Kolonkarzinomzellen eine p53-*missense*-Mutation vor, die wie schon bei den 518A2-Zellen zu einem funktionslosen Transkriptionsprodukt führt.¹⁴⁴

DLD-1

Auch die DLD-1-Zelllinie stammt von einem kolorektalen Adenokarzinom ab und wurde im Zeitraum von 1977-1979 von Dexter *et.al.* etabliert.¹⁴⁵ Genau wie die HT-29-Zellen bilden auch die DLD-1-Zellen *in vitro* adhärenente Kolonien aus, weisen eine epithelähnliche Morphologie auf und wurden in DMEM-Zellkulturmedium kultiviert.

HeLa

Wie bereits oben beschrieben, handelt es sich bei den HeLa-Zellen um Zervixkarzinomzellen, die 1951 aus einer 31-jährigen Patientin isoliert wurden.^{136,146,147} Die Zellen wachsen als Monolayer mit epithelähnlicher Morphologie. Für die Kultivierung der HeLa-Zellen wurde ebenfalls DMEM verwendet.

CCD-18Co

Die CCD-18Co-Zellen sind nicht-maligne, humane Myofibroblasten, welche aus dem Dickdarm eines zweieinhalb Monate alten, weiblichen Kleinkinds isoliert wurden.¹⁴⁸ Die Zellen wachsen *in vitro* adhärenent und weisen eine für Fibroblasten charakteristische, gestreckte Morphologie auf. Für die CCD-18Co-Zellen wurde DMEM als Kulturmedium verwendet.

HUVEC

Bei den HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) handelt es sich um eine humane, primäre Endothelzelllinie, die aus der Nabelschnur isoliert werden kann und in adhärenenter Kultur wächst (Lonza, CC-2517).¹⁴⁹ Die HUVECs wurden vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig zur Verfügung gestellt und in einem speziellen Endothelzellmedium (EGM-2 - *endothelial cell growth medium*; Lonza, CC-3162) kultiviert.

EaHy.926

Bei den EaHy.926-Zellen handelt es sich um eine Hybridzelllinie, die aus einer Fusion von HUVECs mit einem Thioguanin-resistenten Klon der A549-Lungenkarzinom-Zelllinie (ATCC® CRL-2922™) entstanden ist.¹⁵⁰⁻¹⁵² Die Hybridzellen wurden in HAT-Medium und anhand des Faktor-VIII-assoziierten Antigens selektiert. Die Kultivierung der permanenten, vaskulären Endothelzelllinie fand in DMEM-Zellkulturmedium statt.

PtK2

Bei den PtK2-Zellen handelt es sich um gesunde Nierenzellen einer Beutelratte,¹⁵³ die mit einer Epithel-ähnlichen Morphologie in adhärenter Kultur wachsen und ebenfalls vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig zur Verfügung gestellt wurden. Für die Kultivierung wurde DMEM-Zellkulturmedium verwendet. Aufgrund ihrer Größe und flachen Morphologie eignen sich die PtK2-Zellen hervorragend für fluoreszenzmikroskopische Analysen.

2.2 Testverbindungen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Au(I)- und Pt(II)-basierten NHC-Komplexe wurden von Dr. Bernhard Biersack, Tobias Rehm (M.Sc.) und Hussein Kalie (M.Sc.) am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Bayreuth hergestellt. Die Strukturen der Komplexe sind in den entsprechenden Ergebnisteilen 4.1.1 bis 4.2.2 dargestellt. Alle Testverbindungen wurden in DMF oder DMSO gelöst (10 mM Stammlösungen) und bis zu ihrer Verwendung bei 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3 Chemikalien

Acrylamid-Bis, 30 % (w/v)	Serva Electrophoresis
Agarose	Roth
Albumin Fraktion V (BSA, <i>bovine serum albumin</i>)	Roth
Alexa Fluor® 488 <i>anti-mouse</i> (Ziege)	Invitrogen
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Invitrogen
Amilorid	Calbiochem
<i>Antibiotic-Antimycotic</i>	Gibco
Penicillin G (Na-Salz) 10 000 units/ml	
Streptomycin-Sulfat 10 000 µg/ml	
Amphotericin B 25 µg/ml in 0,85 % Saline	
Aprotinin	AppliChem
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche
<i>Bradford Reagent</i> (5x)	Serva Electrophoresis
Bromphenolblau	Merck Millipore
BSA Standard-Lösungen (0,125-2 mg/ml)	Fermentas

Calciumchlorid	Roth
Chlorpromazin, Hydrochlorid (2-Chloro-10-[3'-(dimethylamino)propyl]phenothiazine, HCl)	Calbiochem
Cisplatin (<i>cis</i> -Diammindichloridoplatin)	Sigma-Aldrich
CT-DNA (<i>calf thymus</i> DNA)	Sigma-Aldrich
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R-250	Merck
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; D9542)	Sigma-Aldrich
DCT TM Protein Assay Kit II	Bio-Rad
D-Glukose Monohydrat	Sigma-Aldrich
Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat	Merck Millipore
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , FG 0445)	Biochrom
DMF (<i>N,N</i> -Dimethylformamid)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka
DNA-Probenpuffer / <i>DNA-Native Sample Buffer</i> (4x)	Serva Electrophoresis
DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure))	Sigma-Aldrich
EBM-2 (<i>Endothelial Basal Medium-2</i> ; CC-3156)	Lonza
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	BDH Prolabo
EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (CC-4176)	Lonza
Eisessig (100 % Essigsäure)	VWR
Eosin-Y Lösung (Eosin-Y <i>Cytolasmic Counterstain</i>)	Thermo Scientific
Essigsäure	Roth
Ethanol (99,8 % / 96 % AnalaR NORMAPUR)	VWR
Ethidiumbromid-Lösung (1 % in H ₂ O)	Merck
FBS (<i>fetal bovine serum</i> , S 0115)	Biochrom
Formaldehyd-Lösung (37 %)	Roth
Fumitremorgin C	Calbiochem
Gelatine	Roth
Gentamycin-Lösung (50 mg/ml)	Serva Electrophoresis
Glycerin	Roth
Hämatoxylin	Thermo Scientific
HCl	Roth

HindIII Restriktionsenzym	New England BioLabs
Histosolve (Shandon, Xylol-Ersatz)	Thermo Scientific
Isopropanol	Roth
JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	Cayman
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich
Kupfer(II)chlorid	Sigma-Aldrich
Lachssperma-DNA Natriumsalz	Roth
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich
Matrigel	BD Biosciences
Methanol p.A.	Sigma-Aldrich
MitoTracker® Deep Red FM (M22426)	Life Technologies
<i>Monoclonal anti-α-Tubulin</i> (Maus)	Sigma-Aldrich
Mowiol 4-88	Roth
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid)	Roth
NADPH (Nicotinamidadeninukleotidphosphat, red.)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Roth
Natriumperchlorat-Monohydrat	Merck Millipore
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)	Roth
n-Octanol	Sigma-Aldrich
Ouabain Octahydrat (Strophantin G)	Calbiochem
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific
Paraffin KP Paraclean	KliniPath
pBR322 Plasmid DNA	Thermo Scientific
Propidiumiodid	Roth
Ribonuklease A	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth

TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin)	Sigma-Aldrich
Tetraethylammoniumbromid (TEA-Br)	Acros Organics
Thioredoxinreduktase (T9698)	Sigma-Aldrich
Topotecan	Sigma-Aldrich
Tris	VWR
Triton X-100	Roth
Trypsin/EDTA-Lösung (1 x in PBS, L 2143) 0,05 % Trypsin, 0,02% EDTA	Biochrom
Universal PARP Colorimetric Assay Kit	Trevigen
Verapamil-HCl	Prof. Dr. med. M. Ocker, Uniklinik Marburg
Vinblastin-Sulfat	Calbiochem
William's E Medium	Gibco
Wortmannin (KY 12420)	Calbiochem

2.4 Zellkulturmedien und Puffer

Coomassie-Färbelösung

500 mg Coomassie Brilliant Blue R-250

454 mL Methanol p.A.

100 mL Eisessig

454 mL bidestilliertes (bidest.) H₂O

DMEM-Zellkulturmedium

500 mL D-MEM

55 mL FBS

5,5 mL *Antibiotic-Antimycotic*

2 mL Gentamycin

DMSO-SDS-AA-Lösung

40 mL DMSO

4 g SDS

240 µL Essigsäure

DNA-Färbelösung

10 µg/mL Ethidiumbromid in 0,5× TBE-Puffer

EGM-2-Medium für HUVECs

500 mL EBM-2

EGM-2 *SingleQuot Kit Supplements & Growth Factors*:

10 mL FBS

200 µL Hydrocortison

2 mL nFGF

500 µL VEGF

500 µL R3-ICF-1

500 µL Ascorbinsäure

500 µL nEGF

500 µL GA-1000

500 µL Heparin

Krebs-Henseleit-Puffer

112 mM NaCl

25 mM NaHCO₃

1,2 mM MgSO₄

1 mM KH₂PO₄

5 mM KCl

1,2 mM CaCl₂

11 mM D-Glukose

in bidest. H₂O, pH 7,4

Mowiol-Einbettungslösung

6,0 g Glycerin

2,4 g Mowiol 4-88

6,0 mL bidest. H₂O

12,0 mL 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)

1µg/mL DAPI

PBS (1x)

136 mM NaCl

2,8 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O

1,5 mM KH₂PO₄

in bidest. H₂O, pH 7,4

Propidiumiodid-Färbelösung

69 µM Propidiumiodid (PI)

38 mM Natriumcitrat

50 µg/mL RNase A

in PBS

Proteinprobenpuffer (5x), nicht reduzierend

10 % SDS in 5 mL einer 0,5 M Tris-HCl Lösung (pH 6,8)

5 mL Glycerin

~ 0,0001% Bromphenolblau

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl

0,4 % SDS

in bidest. H₂O, pH 6,8

SDS-PAGE-Laufpuffer

25 mM Tris

250 mM Glycin

0,1 % SDS

in bidest. H₂O, pH 8,3

SDS-PAGE-Sammelgel (3%)

3,1 mL bidest H₂O

1,25 mL Trenngelpuffer

0,65 mL 30 % Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1)

25 µL 10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat)

5 µL TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin)

SDS-PAGE-Trenngel (10 %)

3,2 mL bidest H₂O

2,5 mL Trenngelpuffer

3,3 mL 30 % Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1)

1 mL (10 mg/mL) Gelatine-Lösung

50 µL 10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat)

10 µL TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin)

Substratpuffer

50 mM Tris-HCl

1 % Triton X-100

5 mM CaCl₂

in bidest. H₂O, pH 7,4

TBE-Puffer (10x)

900 mM Tris

900 mM Borsäure

25 mM EDTA

in bidest. H₂O, pH 8,3

TE-Puffer (1x)

10 mM Tris

1 mM EDTA

in bidest. H₂O, pH 8,0

Trenngelpuffer(4x)

1,5 M Tris-HCl

0,4 % SDS

in bidest. H₂O, pH 8,8

TrxR-Reaktions-Mix

pro 1 mL Reaktions-Mix:

500 µL Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)

80 µL einer 100 mM EDTA-Lösung (in bidest. H₂O, pH 7,5)

20 µL einer 0,05 %-igen BSA-Lösung (in Kaliumphosphatpuffer)

100 µL einer 20 mM NADPH-Lösung (in bidest. H₂O)

300 µL bidest. H₂O

Waschpuffer I

50 mM Tris-HCl

2 % Triton X-100

in bidest. H₂O, pH 7,4

Waschpuffer II

50 mM Tris-HCl

in bidest. H₂O, pH 7,4

Zellyse-Puffer

0,1 M Tris-HCl

0,2 % Triton X-100

in bidest. H₂O, pH 7,4

unmittelbar vor Verwendung zugeben:

200 kIU Aprotinin/mL

2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Autoklav Varioklav 135	H+P/Thermo Scientific
HERATHERM Inkubator	Thermo Scientific
Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektrophotometer	Agilent
CO ₂ -AUTO-ZERO Inkubator	Heraeus
Cryo 1 °C <i>Freezing Container</i>	Nalgene
Deep Freezer VX490 Juoan (-80 °C)	Thermo Scientific
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckman Coulter
Ein- und Mehrkanal-Pipetten (0,5-1000 µL)	Eppendorf/Brand
ELISA-Platereader, <i>Power Wave 340</i>	BIO-TEK
Eppendorfzentrifugen 5417R/5418R/5810R	Eppendorf
Eppendorfzentrifuge <i>minispin</i>	Eppendorf
Flammen-Atomabsorptionsspektrometer AA240Z Zeeman mit einem GTA120 <i>graphite tube atomizer</i>	Varian/Agilent
Fluoreszenzmikroskop, AxioCam MRc5	Zeiss, Axiovert 135
Fluoreszenzmikroskop, AxioCam MRm	Zeiss, Axioplan
Geldokumentation	LTF Labortechnik
HERACELL 240 CO ₂ -Inkubator	Heraeus
Krumdieck Tissue Slicer	Alabama Research & Development
Lichtmikroskop, AxioCam color	Zeiss, Axiovert 35
MAXI-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-kammer mit Blottingmodul, kühlbar	Roth
Mehrkanal-Pipetten <i>Transferpette electronic</i>	Brand
Mikrotom (Leica RM2135)	Leica Biosystems
MiniBead Beater	BioSpec Products
Neubauer-Zählkammer	Brand
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph
Stromquelle 2197 <i>Power Supply</i>	LKB Bromma
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte

Plattenlesegeräte

TECAN *Plate Reader*

TECAN

Perkin-Elmer Victor X4

Perkin-Elmer

Plattformschüttler Titramax 1000

Heidolph

Ultraschall- und Heizbad SONOREX

Digital 10 P (DK 102P)

BANDELIN electronic

USB-Lichtmikroskop

Traveler

UV-Transilluminator/Geldokumentation

Vilber Lourmat

Vertikalstromwerkbank(AURA Vertical S.D.4)

Nunc/Thermo Scientific

Vortexer VF2 Janke+Kunkel

IKA Labortechnik

Zentrifuge Heraeus Multifuge X3FR

Thermo Scientific

Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatten

Greiner bio-one

24-Well-Mikrotiterplatten

Greiner bio-one

6-Well-Mikrotiterplatten

Greiner bio-one

BD Falcon Tubes (5 mL, mit Zellsieb)

BD Biosciences

Biopsy Pads

Leica Biosystems

Deckgläser (Ø 10 mm)

neoLab

Fixierpflaster (Leukosilk)

BSN medical GmbH

Histosetten

Simport

Kryoröhrchen *Cryo vials* (2ml, steril)

Greiner bio-one

µ-Slide 8-well Platte

ibidi

MiniBeads (Glasperlen)

BioSpec Products

Objektträger

Thermo Scientific

Petrischalen (steril)

Sarstedt/Greiner bio-one

Pipettenspitzen für Mikroliterpipetten

Roth/Brand

Reaktionsgefäße (0,5 mL/1,5 mL/2 mL)

Sarstedt/Eppendorf

Serologische Pipetten (2 mL/5 mL/10 mL)

Greiner bio-one

Sterilfilter (0,22 µm)

Roth

Zellkulturflaschen (25 cm²/75 cm²)

Greiner bio-one

Zellschaber (32 cm)

Nunc

Zentrifugenröhrchen (15 mL/50 mL)

Greiner bio-one

2.6 Verwendete Software

Adobe® Photoshop® CS6 Extended Version 13.0.1	Adobe Systems Incorp.
AxioVision/AxioVs40 Version 4.6.1.0	Carl Zeiss
CamApp Version 1.0.0.2	AVEO Corporation
ChemDraw® Std. 13.0	Cambridge Software
CXP Acquisition/Analysis Software Version 2.2	Beckman Coulter
GraFit 3.0	Erithacus Software
ImageJ 1.49h	Wayne Rasband, NIH
Origin 8.5	OriginLab

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

Sämtliche im Nachfolgenden beschriebenen Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellkultivierung und Inkubation der Zellen während der unterschiedlichen Experimente erfolgte für alle verwendeten Krebszelllinien sowie nicht-malignen Zellen in einem HERACELL 240 CO₂-Inkubator (Heraeus) bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Eine Ausnahme hiervon bilden die humanen, vaskulären Endothelzellen (HUVECs – *human umbilical vein endothelial cells*). Diese wurden ebenfalls in einem CO₂-Inkubator (CO₂-AUTO-ZERO, Heraeus) bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert, allerdings lag der CO₂-Gehalt für die HUVECs bei 10 %. Die für die verschiedenen Zelllinien verwendeten Kulturmedien wurden vor Gebrauch jeweils auf 37 °C temperiert.

Die adhärent wachsenden Krebs- sowie nicht-malignen Zelllinien wurden alle 2-7 Tage passagiert und subkultiviert. Hierfür wurde das alte Kulturmedium vollständig abgesaugt und verworfen. Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und dieses ebenfalls entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1,5 mL Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und je nach Zelllinie für 2-4 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, sodass sich alle Zellen vom Kulturflaschenboden ablösen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 3 mL frischem Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 150 g, 4 °C) pelletiert wurden, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3-5 mL frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurden 30 µL der jeweiligen Zellsuspension mit 270 µL PBS verdünnt (1:10 Verdünnung) und hiervon wiederum ca. 10 µL auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen, welche ein sogenanntes Zählnetz besitzt (Abbildung 15). Für die Bestimmung der Zellzahl wurden ausschließlich die Zellen innerhalb der vier großen Eckquadrate Q ausgezählt und anschließend ein Mittelwert der erhaltenen Zellzahlen gebildet. Die Auszählung der Zellen erfolgte dabei mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiovert 135, 10× Achromat-Objektiv). Durch Multiplikation des erhaltenen Mittelwerts mit 1×10^4 und unter Berücksichtigung der 10-fachen Verdünnung der Zellsuspension erhält man schließlich die Zellzahl pro Milliliter.

Die Zellen wurden in neuen Kulturflaschen je nach Zelllinie bzw. Bedarf verdünnt und die Subkulturen bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Sofern notwendig, wurde das verbrauchte Medium zwischen den Passagen durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

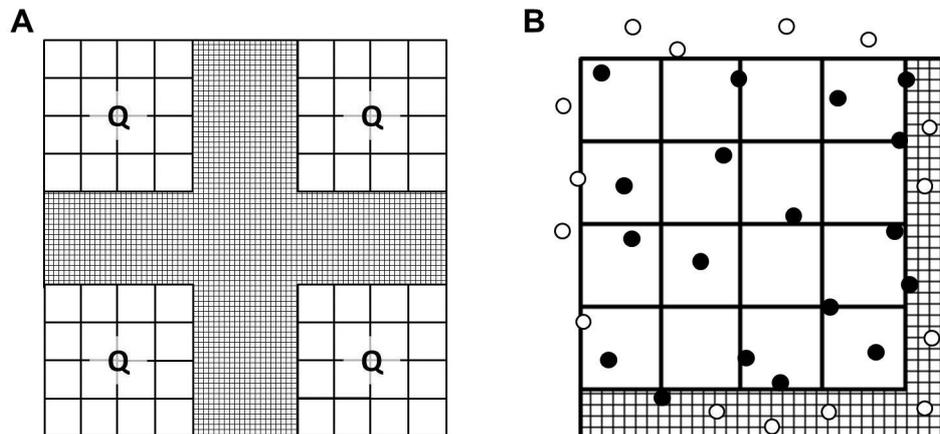


Abbildung 15: Neubauer-Zählkammer. **A** - Zählnetz aus neun Großquadraten; Q - Großquadrate, die für die Bestimmung des Mittelwerts der Zellzahl ausgezählt werden; **B** - Innerhalb der Großquadrate Q werden nur solche Zellen bei der Auszählung berücksichtigt (schwarze Punkte), die innerhalb der 16 Kleinquadrate bzw. auf zwei ausgewählten Begrenzungslinien liegen (hier: Begrenzungslinien unten und rechts). Eigene Darstellung nach Vorlage von Lindl in Zell- und Gewebekultur (Spektrum Akademischer Verlag, 2002).¹⁵⁴

Bei den HUVECs handelt es sich ebenfalls um eine in adhärenter Kultur wachsende Zelllinie, jedoch unterscheidet sich die Durchführung des Passagierens dieser Endothelzellen von der oben beschriebenen Methode in einigen Punkten. Die HUVECs wurden nur alle 1-4 Tage passagiert und subkultiviert. Hierfür wurde das Medium ebenfalls vollständig entfernt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-Lösung versetzt, sodass der komplette Zellrasen benetzt war. Damit sich alle Zellen vom Kulturflaschenboden ablösen, folgte eine Inkubation von 5 min bei 37 °C im Brutschrank. Durch Zusetzen einer Trypsin-Inhibitor-Lösung (2 mL) wurde die enzymatische Reaktion zum Ablösen der Zellen gestoppt und die Endothelzellen mit weiteren 8 mL frischem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert (5 min, 1000 rpm, RT) und je nach Pelletgröße in 3-10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte in diesem Fall automatisch mit Hilfe eines *Cedex XS Cell Analyzers*. Hierfür wurden 20 µL der Zellsuspension mit 20 µL einer *Trypan Blue*-Lösung versetzt und davon zweimal jeweils 10 µL auf ein *Cedex Smart Slide* aufgetragen.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte anhand von Doppelmessungen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Die Subkulturen der HUVECs wurden je nach Zelldichte durch 10- bis 20-fache Verdünnung in 20-30 mL Zellkulturmedium angesetzt und bis zur erneuten Verwendung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2 Kryokonservierung

Um die Zelllinien längerfristig zu lagern, wurden die adhärenen Zellen bei Konfluenz wie unter 3.1 beschrieben passagiert und in 3 mL frischem Medium resuspendiert. Nach dem Zusatz von 860 µL FBS (20 %) sowie 430 µL DMSO (10 %) wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Kryoröhrchen wurden anschließend für weitere 24 h in einem mit Isopropanol gefüllten *Cryo Container* bei -80 °C gelagert, wodurch die Temperatur kontinuierlich in 1 °C-Schritten herabgesenkt wurde. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Für die Reaktivierung der Zellen wurden diese bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 mL frischem Medium aufgenommen. Zur vollständigen Entfernung des DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 150 g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellkultivierung wie oben unter Abschnitt 3.1 beschrieben.

3.3 MTT-basierter Proliferationsassay zur Bestimmung der Effektivität und Selektivität gegenüber Krebszellen

Der MTT-Test stellt eine Standardmethode zur Quantifizierung vitaler Zellen dar, bei der die zu untersuchenden Zellen den gelben, wasserlöslichen Farbstoff MTT **17** (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) aufnehmen. Dieser wird anschließend in vitalen, metabolisch aktiven Zellen durch endogene NADH-Dehydrogenasen der Mitochondrien bzw. des Endoplasmatischen Retikulums zum violetten, wasserunlöslichen Formazan **18** umgesetzt (Abbildung 16).^{155,156} Da das Formazan **18** in einem Wellenlängenbereich von 550-570 nm absorbiert, kann dieses spektroskopisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Menge an dem gebildeten Farbstoff **18** ist direkt proportional zum Anteil an vitalen Zellen in der jeweiligen Probe. Aus diesem Grund stellt der MTT-Test eine einfache Methode zum Nachweis von vitalen, metabolisch aktiven Zellen dar.

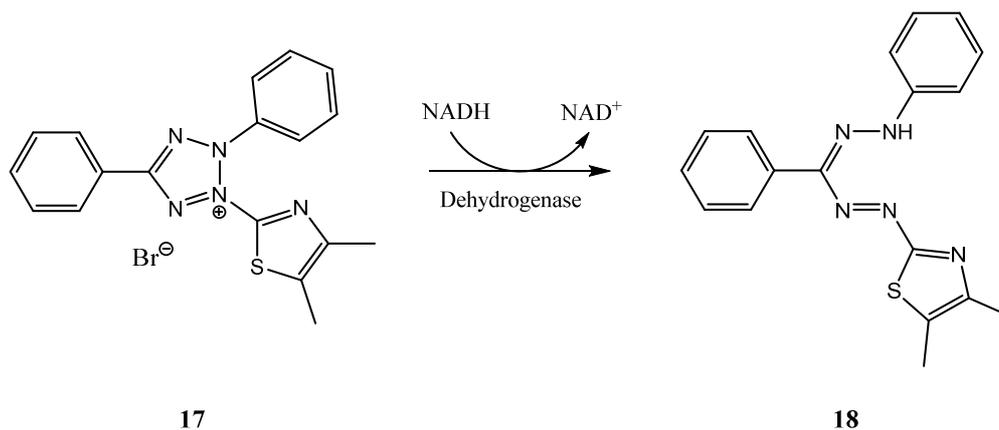


Abbildung 16: Reaktionsschema zur Umsetzung von MTT **17** zum Formazan **18** durch zelluläre NADH-abhängige Dehydrogenasen in vitalen, metabolisch aktiven Zellen.

3.3.1 Toxizitätsbestimmung

Zur Bestimmung der antiproliferativen Aktivität der Testverbindungen wurden je 100 μL Zellsuspension der untersuchten Krebszelllinien mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/mL in die *wells* von 96-*well*-Platten gegeben. Um ein effektives Anheften der adhärennten Zellen an die Oberfläche der *wells* zu gewährleisten, wurden die Mikrotiterplatten zunächst für 24 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Metallkomplexe in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungsreihe von 100 μM bis 25 nM). Für die Lösungsmittelkontrollen wurden analoge Mengen an DMF bzw. DMSO zu den Zellen pipettiert. Nach 72 h Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen wurden die 96-*well*-Platten bei 300 g zentrifugiert (5 min, 4 °C), das Medium abgenommen und pro *well* 50 μL einer 0,05 %-igen MTT-Lösung (in PBS) zu den Zellen gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, bevor die Platten erneut zentrifugiert (5 min, 300 g, 4 °C), die überstehende MTT-Lösung verworfen und das in vitalen Zellen gebildete, wasserunlösliche Formazan in einem DMSO-SDS-AA-Gemisch gelöst (25 $\mu\text{L}/\text{well}$) wurden. Die Absorptionsmessungen bei 570 nm und 630 nm erfolgten unter Verwendung des Plattenlesegeräts *Infinite® F200* (TECAN) sobald sich die Formazankristalle nach weiterer Inkubation bei 37 °C im Brutschrank (> 1 h) vollständig gelöst hatten. Für die Auswertung des MTT-Tests und die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Testsubstanzen gegenüber den verwendeten Zelllinien wurde zunächst jeweils die Absorptionsdifferenz zwischen den bei 570 nm und 630 nm erhaltenen Absorptionswerten gebildet. Hierbei entspricht der bei 630 nm gemessene Wert ausschließlich der Hintergrundabsorption.

Die Absorptionsdifferenz (Menge an gebildetem Formazan **18**) stellt ein direktes Maß für die Vitalität und metabolische Aktivität der Zellen dar. Die für die unbehandelten Zellen (Zugabe von reinem DMF oder DMSO) erhaltene Absorptionsdifferenz wird gleich 100 % gesetzt (= 100 % vitale Zellen) und dient somit als Referenz für die Werte, welche für die mit den Metallkomplexen behandelten Zellen berechnet wurden. Durch Auftragung der prozentualen Anteile an vitalen Zellen (Proliferation) gegen die logarithmisch skalierten, eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen erhält man jeweils einen sigmoidalen Kurvenverlauf, welcher die konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition der Zellen beschreibt. Mit Hilfe einer nicht-linearen Regression nach dem 4-Parameter-Hill-Modell (Gleichung 1) konnten schließlich die IC₅₀-Werte (IC – *inhibitory concentration*) der Metallkomplexe an den verschiedenen Zelllinien ermittelt werden.

$$F(x) = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{l}\right)^s} + b \quad (1)$$

mit	F(x)	Anteil der vitalen Zellen [%]
	x	Wirkstoffkonzentration
	$a = (max. \times 1,05 - min \times 0,95)$	gewichtete Spanne der rel. Lebensfähigkeit
	s	Gradient (Regressionsparameter)
	$l = (e^{IC})^{(-s)}$	IC ₅₀ -Wert
	$b = min \times 0,95$	Hintergrund

Der IC₅₀-Wert beschreibt diejenige Substanzkonzentration, bei der die Menge an vitalen Zellen innerhalb der Inkubationszeit (hier: 72 h) im Vergleich zur Kontrolle um 50 % reduziert wurde (Anteil an vitalen Zellen ist halbmaximal, Abbildung 17). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Datenanalyse- und Grafikprogrammes GraFit 3.0 (Erithacus Software). Aus den einzeln berechneten IC₅₀-Werten wurde anschließend ein Mittelwert gebildet und dessen Standardabweichung (SD – *standard deviation*) berechnet, da der MTT-Test für jeden Metallkomplex an allen untersuchten Zelllinien mindestens vierfach durchgeführt wurde.

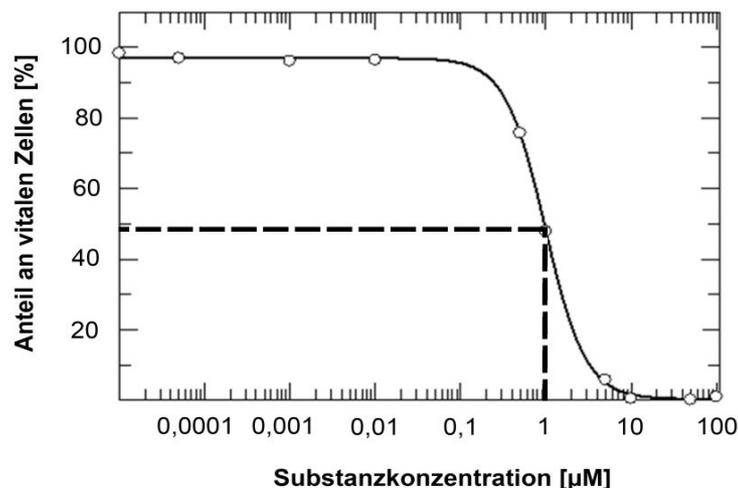


Abbildung 17: Auftragung der Anteile an vitalen Zellen gegen die logarithmisch skalierte Substanzkonzentration und die Bestimmung des IC_{50} -Werts als diejenige Konzentration, bei der der Anteil an vitalen Zellen halbmaximal ist (50 % im Vergleich zur Kontrolle).

3.3.2 Ermittlung von Resistenzen

Die *multidrug*-Resistenz von humanen Krebszellen stellt ein großes Problem in der Krebstherapie dar.^{157,158} So weisen viele Tumorzellen eine (Über-)Expression von ABC-Transportproteinen auf, die Xenobiotika aktiv aus den Zellen schleusen und somit für eine erhöhte Toleranz der Krebszellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika sorgen. In diesem Rahmen stellen das Brustkrebs-Resistenzprotein (BCRP, *breast cancer resistance protein*) und das P-Glycoprotein (P-gp, *permeability glycoprotein*) zwei der wichtigsten Vertreter der ABC-Transporter dar, die eine *multidrug*-Resistenz in Krebszellen vermitteln und von der Brustkrebszelllinie MCF-7 bzw. der Zervixkarzinomzelllinie KB-V1 exprimiert werden.^{134,135,137,138} Wie bereits unter Abschnitt 2.1 beschrieben, wurden durch Behandlung der MCF-7-Zellen mit Topotecan und der KB-V1-Zellen mit Vinblastin die BCRP- bzw. P-gp-überexprimierenden Zelllinien MCF-7/Topo und KB-V1/Vbl erhalten. Um nun zu untersuchen, ob die Testverbindungen Substrate für die ABC-Transporter darstellen oder aber die Fähigkeit besitzen *multidrug*-Resistenzen zu überwinden, wurden die IC_{50} -Werte ausgewählter Komplexe in Gegenwart geeigneter Inhibitoren der Efflux-Transporter in den MCF-7/Topo- und KB-V1/Vbl-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests (vgl. Abschnitt 3.3.1) bestimmt. Hierfür wurden die MCF-7/Topo- und KB-V1/Vbl-Zellen 24 h vor Zugabe der Testverbindungen analog zur Toxizitätsbestimmung in 96-well Platten pipettiert und mit 1,2 µM Fumitremorgin C (BCRP-Inhibitor)¹⁵⁹ bzw. 24 µM Verapamil-Hydrochlorid (P-gp-Inhibitor)^{160,161} versetzt.

Ein Vergleich der IC_{50} -Werte für die einzelnen Komplexe in An- und Abwesenheit der spezifischen Inhibitoren erlaubt es, eine Aussage über die Affinität der Testverbindungen zum entsprechenden ABC-Transporter zu treffen. Liegt in Gegenwart des Inhibitors eine deutlich höhere Toxizität und somit ein deutlich geringerer IC_{50} -Wert vor, so handelt es sich bei der betreffenden Substanz wahrscheinlich um ein Substrat des untersuchten ABC-Transporters (BCRP oder P-gp). Verändert sich der IC_{50} -Wert durch Zugabe des Inhibitors dagegen nicht, so ist die Testverbindung scheinbar in der Lage, den von der entsprechenden Efflux-Pumpe vermittelten Resistenzmechanismus zu umgehen (kein Substrat von BCRP bzw. P-gp).

3.3.3 Selektivitätsbestimmung

Die in der Tumorthherapie eingesetzten Zytostatika sollten eine deutliche Selektivität für Krebszellen gegenüber nicht-malignen Zellen besitzen, damit gesunde Zellen bzw. gesundes Gewebe nicht oder nur minimal durch den Wirkstoff geschädigt werden. Eine geringe Selektivität bei Antitumormitteln geht in der Regel mit starken Nebenwirkungen, wie z.B. extremer Übelkeit, Nephro- oder auch Neurotoxizität einher.^{11,13,39} Um die in dieser Arbeit verwendeten Metallkomplexe auf ihre Selektivität für Krebszellen zu testen, wurden die humanen Dickdarmfibroblasten CCD18-Co als Referenz für nicht-maligne Zellen herangezogen. Diese wurden aufgrund ihrer deutlich geringeren Teilungsrate im Vergleich zu der Proliferationsrate von Tumorzellen mit einer höheren Zelldichte von 1×10^5 Zellen/mL im MTT-Assay ausgesät. Mit Ausnahme dieser veränderten, eingesetzten Zellzahl wurde der MTT-Assay zur Bestimmung der Selektivität wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

3.4 Zelluläre Aufnahme und Verteilung von Metallcarbenkomplexen

Ein essentieller Aspekt für die Effektivität von Antitumorwirkstoffen stellt die zelluläre Aufnahme und Akkumulation der jeweiligen Verbindungen dar. Je besser ein Wirkstoff in Zellen aufgenommen wird, desto stärker ist auch seine antitumorale Aktivität. Die zelluläre Aufnahme hängt dabei u.a. stark von der Lipophilie der Verbindung ab. Die Bestimmung des Metallgehalts in Krebszellen (s. Abschnitt 3.4.1) nach Behandlung mit ausgewählten Komplexen und die Ermittlung der Lipophilie (s. Abschnitt 3.4.2) der Testverbindungen wurden von Ing. Olga Stuchlíková, Prof. Dr. Jana Kašpárková und Prof. Dr. Viktor Brabec (*Department of Biophysics, Palacky University in Olmütz, Tschechien* und *Institute of Biophysics, Academy of Science in Brünn, Tschechien*) durchgeführt.

Neben der Bestimmung der von behandelten Zellen aufgenommenen Menge eines Wirkstoffs, ist es weiterhin möglich die an der aktiven Aufnahme dieser Verbindungen beteiligten zellulären Transportwege zu untersuchen (vgl. Abschnitt 3.4.3) oder z.B. bei fluoreszierenden Derivaten die Verteilung des Wirkstoffs innerhalb der Zelle zu verfolgen. So kann die Akkumulation einer Verbindung in einem bestimmten Zellkompartiment erste Hinweise auf ein molekulares *target* bzw. einen möglichen Wirkmechanismus geben. Die Co-Lokalisations-Experimente mit dem fluoreszierenden, Anthracen-substituierten Goldkomplex (**25**) in HeLa-Zellen wurden von Sebastian Schrüfer (B.Sc., Universität Bayreuth & HZI) und Dr. Verena Fetz (AG Chemische Biologie, HZI) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt (s. Abschnitt 3.4.4).

3.4.1 Zelluläre Akkumulation von Gold(I)- und Platin(II)-NHC-Komplexen

Um die Aufnahme ausgesuchter Metallkomplexe in humane Krebszellen zu quantifizieren, wurden HCT-116-Kolonkarzinomzellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät (3×10^6 Zellen pro Petrischale). Nach Inkubation im Brutschrank über Nacht wurden die Zellen mit den Komplexen (identische Konzentrationen für die einzelnen Verbindungen jeder Serie) versetzt und es folgte eine weitere Inkubation für 12 h. Anschließend wurden die HCT-116-Zellen mit Trypsin vom Boden der Petrischalen gelöst und die nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Mittels eines Mikrowellen-Druckaufschluß-Systems (MARS5, CEM) und unter Verwendung einer 11 M HCl-Lösung wurden die Zellpellets vollständig homogenisiert. Der Metallgehalt in den Zellen wurde schließlich via Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (FAAS) bzw. ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) ermittelt. Für jeden Komplex wurde das Experiment dreimal durchgeführt und hieraus der Metallgehalt als Mittelwert \pm SD berechnet.¹⁶²

3.4.2 Ermittlung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient P beschreibt gemäß Gleichung 2 das Verhältnis der Konzentrationen einer Substanz in einem Zweiphasensystem aus *n*-Octanol und Wasser. Dieser stellt somit ein direktes Maß für die Hydro- bzw. Lipophilie einer chemischen Verbindung dar. Ist eine Substanz lipophil, d.h. besser löslich in hydrophoben Lösungsmitteln wie *n*-Octanol, so ist $P > 1$. Umgekehrt hat eine hydrophile Verbindung, die besser wasserlöslich ist, einen Verteilungskoeffizient von $P < 1$. Hieraus folgt, dass $\log P$ für lipophile Verbindungen positiv und für hydrophile negativ ist (Gleichung 3).

$$P = \frac{c_{WSO}}{c_{OSW}} \quad (2)$$

$$\log P = \log \frac{c_{WSO}}{c_{OSW}} \quad (3)$$

Um den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient P und somit die Lipophilie, welche eine entscheidende Bedeutung für die Aufnahme von Wirkstoffen und somit deren biologische Aktivität hat, für ausgewählte Gold(I)- und Platin(II)-Carbenkomplexen zu bestimmen, wurde die *shake-flask* Methode verwendet. Hierfür wurden mit Wasser-gesättigtes Octanol (WSO, *water-saturated octanol*) und Octanol-gesättigtes Wasser (OSW, *octanol-saturated water*) vorbereitet. Um eine Hydrolyse der Chlorido-Liganden an den Metallkomplexen zu verhindern, wurden dem Milli-Q-Wasser 0.2 M NaCl hinzugesetzt. Die zu untersuchenden Komplexe wurden in WSO gelöst, mit der gleichen Menge an OSW versetzt und für 1 h bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurden die beiden Phasen mittels Zentrifugation (5 min, 3000 g, RT) voneinander getrennt und vorsichtig Proben aus beiden Phasen entnommen, die mittels FAAS oder ICP-MS auf ihren Metallgehalt hin untersucht wurden. Mit Hilfe der so ermittelten Konzentrationen der Komplexe in den beiden Phasen und Gleichung 3 wurde für jeden Komplex der $\log P$ ermittelt. Da das Experiment für jede Testverbindung dreimal durchgeführt wurde, handelt es sich bei den angegebenen $\log P$ -Werten ebenfalls um Mittelwerte \pm SD.¹⁶²

3.4.3 Untersuchung der an der zellulären Aufnahme von Gold(I)-NHC-Komplexen beteiligten Transportwege

Um aufzuklären, welche Transportwege an der Akkumulation ausgewählter Gold(I)-NHC-Komplexe in 518A2-Melanomzellen beteiligt sind, wurde ein MTT-basierter Test zur Untersuchung der zellulären Aufnahme mit leichten Veränderungen nach Zoldakova *et al.* durchgeführt.^{163,164} Hierfür wurden in die *wells* von 96-*well*-Platten 100 μ L einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/mL gegeben und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium entfernt und durch 100 μ L frisches DMEM ersetzt, welches zuvor mit den unterschiedlichen Inhibitoren der einzelnen zellulären Aufnahmewege versetzt wurde. Die nicht-toxischen Endkonzentrationen der Inhibitoren betragen hierbei: 0,8 nM CuCl₂, 0,1 mM TEA, 5 μ M Ouabain, 10 μ M Amilorid, 14 μ M Chlorpromazin und 10 nM Wortmannin.^{163,164}

Die *wells* der Referenzproben wurden entsprechend mit jeweils 100 μ L reinem DMEM (ohne Inhibitor) versetzt. Es erfolgte eine Vorinkubation der 518A2-Zellen mit den Inhibitoren über 2 h, bevor die Testsubstanzen zugegeben wurden. Für die Negativkontrollen wurden entsprechende Mengen an reinem DMF bzw. DMSO zugesetzt. Die 96-*well*-Platten wurden dann für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen in den Mikrotiterplatten abzentrifugiert (5 min, 300 g, 4 °C) und das Medium verworfen. Analog zum unter 3.3.1 beschriebenen MTT-Test, wurden zu den Melanomzellen 50 μ L einer 0,05 %-igen MTT-Lösung (in PBS) pipettiert und die Platten weitere 2 h inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 300 g, 4 °C) wurde die MTT-Lösung entfernt und pro *well* 25 μ L der DMSO-SDS-AA-Lösung zu den 518A2-Zellen gegeben. Bevor schließlich die Absorptionsmessungen bei 570 und 630 nm erfolgten, wurden die 96-*well*-Platten zum vollständigen Lösen des Formazans für mindestens 1 h im Inkubator gelagert. Wie beim MTT-Test (vgl. Abschnitt 3.3.1) wurde für die Auswertung für jeden einzelnen Transportweg zunächst die Absorptionsdifferenz zwischen den bei 570 nm und 630 nm erhaltenen Absorptionswerten gebildet, welche ein direktes Maß für die Vitalität der Zellen darstellt. Die für die unbehandelten Zellen (Negativkontrollen, Zugabe von reinem DMF bzw. DMSO und dem jeweiligen Inhibitor) erhaltene Absorptionsdifferenz wurde ebenfalls gleich 100 % gesetzt (= 100 % vitale Zellen) und dient somit als Referenz für die Werte, welche für die mit den Metallkomplexen behandelten Zellen berechnet wurden. Die so erhaltenen Anteile an vitalen Zellen nach Inhibition der einzelnen Transportwege wurden um den Anteil an vitalen Zellen, der nach alleiniger Behandlung mit dem jeweiligen Komplex (Referenzproben, kein Inhibitor) erhalten wurde, korrigiert. Der so erhaltene Mehranteil an vitalen Zellen (korrigierte Proliferationen) durch Inhibition eines bestimmten Transportwegs kann nun in den prozentualen Anteil an der zellulären Gesamtaufnahme des jeweiligen Komplexes umgerechnet werden. Hierfür wurden die Mehranteile an vitalen Zellen summiert, die Summe gleich 100 % gesetzt und schließlich die einzelnen prozentualen Anteile der verschiedenen Aufnahmewege berechnet. Der Assay wurde für jeden Komplex und jeden Transportweg dreimal durchgeführt, weshalb die ermittelten prozentualen Anteile der Aufnahmewege als Mittelwerte \pm SD dargestellt sind. Eine vollständige Beispielrechnung zur Bestimmung der Anteile der einzelnen Transportwege für einen ausgewählten Goldkomplex (**23a**) ist im Anhang (Tabelle A-1) aufgeführt.

3.4.4 Zelluläre Lokalisierung eines fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplexes

Um erste Hinweise auf ein molekulares *target* bzw. den möglichen Wirkmechanismus der Gold(I)-Biscarbenkomplexe zu erhalten, wurde die zelluläre Verteilung des fluoreszierenden Anthracen-Derivats **25** stellvertretend in humanen 518A2-Melanomzellen und PtK2-Nierenzellen der Beutelratte untersucht. Zusätzlich wurde in HeLa-Zellen ein Co-Lokalisationsexperiment durchgeführt.

Die 518A2- bzw. PtK2- wurden hierfür in 24-*well*-Mikrotiterplatten kultiviert (25.000 Zellen pro *well*) und nach 24 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂) mit 10 µM des Anthracenkomplexes versetzt. Die Zellen wurden für weitere 2 h mit dem Anthracen-Gold(I)-Biscarbenkomplex **25** inkubiert, bevor sie einmal mit PBS gewaschen und anschließend vital in PBS unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden, um die zelluläre Lokalisierung des Komplexes zu dokumentieren.

Mitochondriale Prozesse bzw. die Mitochondrien selbst stellen, wie bereits unter Abschnitt 1.3 beschrieben, ein häufiges *target* von Gold(I)-NHC-Komplexen dar.^{27,28,104,106,108,109} Eine Akkumulation solcher Komplexe in den Mitochondrien konnte dabei für verschiedene Derivate und insbesondere kationische Biscarbenkomplexe nachgewiesen werden, bei denen es sich, wie ebenfalls unter 1.3 erwähnt, um sogenannte DLCs handelt. Aus diesem Grund sollte mittels Co-Lokalisierung und unter Verwendung des roten MitoTracker®-Fluoreszenzfarbstoffs (*MitoTracker® Deep Red FM*, Life Technologies, Katalog-Nr. M22426) überprüft werden, ob auch der blau-fluoreszierende Gold(I)-Anthracen-Biscarbenkomplex **25** in die Mitochondrien aufgenommen wird und sich in diesen anreichert. Für die Co-Lokalisierung wurden HeLa-Zellen in den *wells* einer µ-Slide Platte von *ibidi* nach Herstellerangaben ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Den Zellen wurden 10 µM des Anthracen-Goldkomplexes **25** zugesetzt und diese zunächst für 75 min weiter inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe des *MitoTrackers®* mit einer Konzentration von 300 µM und eine Inkubation der HeLa-Zellen für zusätzliche 45 min im Brutschrank. Vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung (in PBS) fixiert und schließlich für die Dokumentation mit 200 µL PBS überschichtet.

3.5 Zytoskelettfärbungen

Das eukaryotische Zytoskelett stellt ein äußerst dynamisches System dar, welches aus drei verschiedenen Arten von Proteinfilamenten aufgebaut ist: den Mikrotubuli, den Aktin- und den Intermediärfilamenten. Neben seiner Funktion den Zellen Form und Stabilität zu verleihen, vermittelt das Zytoskelett auch alle Arten von Zellmotilität und ist daher an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z.B. dem intrazellulären Vesikel- oder Organellentransport, der Zellteilung und der Fortbewegung von Zellen, beteiligt. Für den Ablauf dieser Prozesse in gesunden, aber auch in Krebszellen spielt vor allem die Zytoskelettdynamik eine essentielle Rolle. Daher haben Verbindungen, die die Dynamik des Zytoskeletts stören, als potentielle Wirkstoffe in der Antitumorthherapie ein großes Interesse erlangt.^{165,166} Bei dem bereits in der Einleitung vorgestellten Naturstoff Combretastatin A-4 (CA-4) und hiervon abgeleiteten Imidazol-Derivaten wie **14** handelt es sich um Verbindungen, die sowohl Auswirkungen auf die Mikrotubuli als auch auf das Aktinzytoskelett haben (vgl. Abschnitt 1.3).^{111–115,117,167} Ob die ursprünglich von CA-4-analogen Imidazolen abgeleiteten Gold(I)- und Platin(II)-Carben-komplexe ebenfalls Effekte auf die Dynamik und Organisation des Zytoskeletts zeigen, sollte daher exemplarisch in den 518A2-Melanomzellen sowie, in ausgewählten Fällen, in humanen, vaskulären Endothelzellen (HUVECs) fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

Für die beiden durchgeführten Fluoreszenzfärbungen des Zytoskeletts wurden die HUVECs und 518A2-Zellen auf sterilen Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 mm in 24-well-Mikrotiterplatten kultiviert (HUVEC: 50.000 Zellen pro well; 518A2: 25.000 Zellen pro well). Im Fall der HUVECs wurden die Glasplättchen zuvor mit 1 M HCl/Ethanol behandelt. Die Zellen wurden zunächst über Nacht im Brutschrank inkubiert, bevor die zu untersuchenden Metallkomplexe in geeigneten Konzentrationen zugegeben wurden. Für die Negativkontrollen wurden analoge Mengen an reinem DMF bzw. DMSO zugesetzt.

Die für die unterschiedlichen Fluoreszenzfärbungen notwendigen Fixierungs- und Färbeschritte erfolgten nach weiterer Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen für 24 h und sind in den Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2 detailliert beschrieben.

3.5.1 Fluoreszenzfärbung der Mikrotubuli

Bei der Färbung der Mikrotubuli wurde zunächst das Medium abgenommen und verworfen, bevor die Zellen zweimal mit PBS (37 °C) gewaschen und mit einer 3,7 %-igen Formaldehyd-Lösung (PBS) für 10 min fixiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min mit einer Permeabilisierungs-/Blockierungs-Lösung (0,1 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS) versetzt. Anschließend folgte die Inkubation der Zellen mit dem anti- α -Tubulin-Antikörper (Verdünnung: 1:500 in PBS mit 1 % BSA) pro *well* für 1 h bei 37 °C. Reste an ungebundenem Antikörper wurden anschließend durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 488 *anti-mouse*, Verdünnung: 1:200 in PBS mit 1 % BSA) im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit bidest. Wasser überschichtet, die Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus den *wells* genommen und die Zellen in Mowiol (mit 1 μ g/mL DAPI) auf einem Objektträger eingebettet. Diese wurden zum Aushärten des Einbettungsmittels über Nacht bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

3.5.2 Fluoreszenzfärbung von F-Aktin

Im Fall der Fluoreszenzfärbung von F-Aktin fanden alle Schritte zur Fixierung, Permeabilisierung sowie der abschließenden Einbettung der Zellen analog zur oben für die Fluoreszenzfärbung der Mikrotubuli unter 3.5.1 beschriebenen Vorgehensweise statt. Lediglich die Färbung des F-Aktin erfolgte abweichend durch einmalige Inkubation mit dem Phalloidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 (240 μ L pro *well*, Verdünnung: 1:100 in PBS mit 1 % BSA) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank.

3.6 Zellzyklusanalysen

Der Zellzyklus beschreibt den Vorgang eines geordnet ablaufenden Prozesses, den jede eukaryotische Zelle im Rahmen ihres Wachstum und der Proliferation durchläuft (Abbildung 18).^{168–170} Dieser kann in vier verschiedene Phasen unterteilt werden, welche zyklisch nacheinander durchlaufen werden. Während in der S-Phase des Zellzyklus die DNA der Zellen repliziert wird, bereiten sich diese in der darauffolgenden G2-Phase (G – *gap*, Lücke) auf die Mitose (M-Phase) vor, in der schließlich die gleichmäßige Aufteilung der DNA und des Zytoplasmas auf die beiden entstehenden Tochterzellen erfolgt.

Diese gehen im Anschluss an die Mitose in die G1-Phase über, welche für das Zellwachstum genutzt wird und den zeitlich gesehen längsten Abschnitt des Zellzyklus darstellt. Zellen, die sich z.B. aufgrund ihrer Ausdifferenzierung nicht mehr teilen, können von der G1-Phase in einen Art Ruhezustand übergehen, den man als G0-Phase bezeichnet. Spezifische äußere und innere Signale, welche die erneute Zellteilung anregen, sind dann notwendig, damit G0-Zellen über die G1-Phase zurück in den Zellzyklus eintreten können. Die Kontrolle und Regulation des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, Cdk) bzw. deren Cyclin-Komplexe (Cyclin-Cdks) vermittelt, die als Kontrollpunkte wirken und für die Initiation der einzelnen Phasen essentiell sind.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰



Abbildung 18: Schematische Darstellung des Zellzyklusablaufs. Die Größen der Abschnitte repräsentieren die relative Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen.

So stellen diese regulatorischen Enzyme sicher, dass der nächste Abschnitt des Zellzyklus nur dann begonnen wird, wenn der vorhergehende vollständig und korrekt abgeschlossen ist. Ist dies nicht der Fall, so können an den Kontrollpunkten Unterbrechungen des Zellzyklus erfolgen (Arretierung), die bei zu langer Dauer zu einer Initiation der Apoptose führen. Den wichtigsten Kontrollpunkt des Zellzyklus stellt dabei der sogenannte Restriktionspunkt in der G1-Phase dar. Dieser muss passiert werden, damit eine Zelle die restlichen Phasen des Zellzyklus durchlaufen kann.

Aufgrund ihrer erhöhten Zellteilungs- und/oder einer verminderten Apoptoserate besitzen Tumorzellen die Eigenschaft sich unkontrolliert zu vermehren. Daher haben Wirkstoffe, die Zellen in einer Phase des Zellzyklus arretieren (Zytostatika) und hierdurch letztendlich den programmierten Zelltod einleiten, in der Chemotherapie eine große Bedeutung erlangt. Ob die zu untersuchenden Gold(I)- und Pt(II)-Carbenkomplexe die Fähigkeit besitzen, eine solche Arretierung der Zellen auszulösen, sollte beispielhaft an den 518A2-Melanomzellen mittels einer Propidiumiodidfärbung (PI-Färbung) durchflusszytometrisch analysiert werden.

Hierfür wurden die 518A2-Zellen in 6-*well*-Platten ausgesät (1×10^5 Zellen/mL; 3 mL pro *well*) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe der Testverbindungen in geeigneten Konzentrationen folgte eine weitere Inkubation der Melanomzellen für 24 h. Den Negativkontrollen wurden analoge Mengen des jeweiligen Lösungsmittels (DMF oder DMSO) zugesetzt. Im Anschluss an die Inkubation mit den Metallkomplexen wurde das Medium abgenommen und in eisgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, welches ebenfalls in die Röhrchen überführt wurde, und dann durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung sowie Inkubation im Brutschrank bei 37 °C vom Boden der *wells* abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion direkt in das zuvor abgenommene Medium (und PBS) gegeben. Schließlich wurden die *wells* ein weiteres Mal mit PBS gewaschen, um auch die hierin noch verbliebenen Zellen in das Zentrifugenröhrchen zu überführen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 g (5 min, 4 °C) wurde das überstehende Medium verworfen, die 518A2-Zellen in jeweils 1 mL eiskaltem Ethanol fixiert und in 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bis zur Propidiumiodidfärbung und durchflusszytometrischen Analyse bei 8 °C im Kühlschrank gelagert, mindestens jedoch über Nacht. Vor der Färbung wurden die Zellen pelletiert (2400 rpm, 5 min, RT), das Ethanol verworfen und die 518A2-Melanomzellen zur Rehydratisierung für 5 min mit 1 mL PBS versetzt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (2400 rpm, 5 min, RT), anschließend in 200 µL Propidiumiodid-Färbelösung resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen mit 300-800 µL PBS verdünnt und in entsprechende Probenröhrchen zur Messung am Durchflusszytometer überführt.

Die anschließende Messung von 10.000 Einzelzellen erfolgte am Durchflusszytometer bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer detektierten Emissionswellenlänge von 620 nm (CXP Acquisition Software, Beckman Coulter). Hierbei wurden drei verschiedene Parameter, nämlich das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FS), das seitliche Streulicht (*side scatter*, SC; Messung im 90° Winkel zum Ausgangsstrahl) und die Fluoreszenzintensität (FL3), der mit Propidiumiodid gefärbten Zellen gemessen. Während das Vorwärtstreulicht (FS) ein Maß für die Größe der Zellen darstellt, beschreibt die Menge an seitlich abgelenktem Licht (SS) die Granularität, d.h. die Komplexität einer Zelle. Die bei 620 nm detektierte Fluoreszenzintensität (FL3) ist direkt proportional zum DNA-Gehalt der analysierten Zellen.

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte mit Hilfe der *CXP Analysis Software* (Beckman Coulter). Zur Bestimmung der Hauptpopulation der Zellen ist in Abbildung 19-A die Granularität der Einzelzellen gegen die Zellgröße (SS Lin/FS Lin) aufgetragen und eine Begrenzungslinie, ein sogenanntes *gate*, um die entsprechend ermittelte Hauptpopulation gelegt worden.

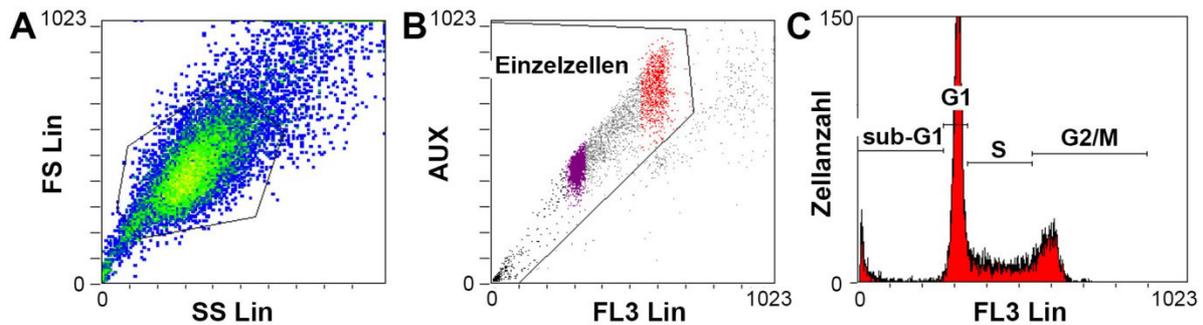


Abbildung 19: Zellzyklusanalyse von mit Propidiumiodid gefärbten 518A2-Melanomzellen mittels Durchflusszytometrie. **(A)** Auftragung des Vorwärtsstreulicht (FS Lin) gegen das Seitwärtsstreulicht (SS Lin) zur Bestimmung der Hauptpopulation. **(B)** Auswahl der Einzelzellen unter Ausschluss von Zelldubletten durch Auftragung des Höhengsignals der Fluoreszenz (AUX) gegen das Flächensignal (FL3 Lin, Fluoreszenzintensität). **(C)** Charakteristisches Zellzyklushistogramm einer 518A2-Melanomzellpopulation nach Auftragung der Anzahl an Einzelzellen mit einem bestimmten Fluoreszenzsignal gegen die Fluoreszenzintensität (FL3 Lin), welches die Verteilung der 518A2-Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S- und G2/M-Phase) sowie den Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1-Bereich) darstellt.

Durch Auftragung der Höhen- und Flächensignale der Propidiumiodidfluoreszenz gegeneinander (vgl. Abbildung 19-B) können sogenannte Zelldubletten von der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten ausgeschlossen werden, da diese ein verfälschtes Ergebnis liefern würden. Bei Zelldubletten handelt es sich um zwei Zellen in der G1-Phase (einfacher DNA-Gehalt), die aneinander haften (es war keine Vereinzelung möglich) und hinsichtlich der Intensität der gemessenen Fluoreszenz (Peakfläche) dasselbe Signal liefern, wie eine einzelne Zelle in der G2-Phase (doppelter DNA-Gehalt). Lediglich die Peakhöhe des Fluoreszenzsignals unterscheidet sich bei diesen beiden Fällen, weshalb G1-Zelldubletten mit einer geringeren Peakhöhe von G2/M-Einzellzellen differenziert werden können. Aufgrund ihres identischen DNA-Gehalts können die G2- und die M-Phase des Zellzyklus bei der durchflusszytometrischen Analyse nicht unterschieden werden und werden daher als G2/M-Phase zusammengefasst. Trägt man die Anzahl an Einzelzellen mit einem bestimmten Fluoreszenzsignal gegen die entsprechende, linear skalierte Fluoreszenzintensität (FL3 Lin) auf, so erhält man ein typisches Zellzyklushistogramm (vgl. Abbildung 19-C).

Nach Anpassung der Markerregionen (Position und Länge) der einzelnen Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2/M-Phase) sowie des sub-G1-Bereichs (apoptotische Zellen) in den Negativkontrollen wurden diese auf die behandelten Proben übertragen. Hierdurch wird es möglich, Veränderungen in der prozentualen Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus und des Anteils an apoptotischen Zellen nach Behandlung mit den Metallkomplexen zu erkennen.

3.7 *Wound-Healing Assay*

Die Motilität von Zellen spielt sowohl während der Tumorangiogenese als auch bei der Metastasierung von Tumorzellen eine entscheidende Rolle.^[10,53] So müssen vaskuläre Endothelzellen während der Angiogenese in der Lage sein, sich durch die extrazelluläre Matrix zu bewegen um tubuläre Strukturen auszubilden, die das Grundgerüst für neue Blutgefäße darstellen.^[10] Im Gegensatz dazu besteht für Tumorzellen die Möglichkeit durch die Zellmotilität in das Blutkreislaufsystem zu gelangen, über dieses in weit entfernte Gewebe des Körpers einzudringen und dort neue Tumore auszubilden (Metastasierung).^[53] Aus diesem Grund stellt die Inhibition der Zellmotilität ein weiteres interessantes *target* in der Antitumortherapie dar. Bei dem sogenannten *Wound-Healing Assay* handelt es sich um eine geeignete zweidimensionale *in vitro*-Methode, mit der durch Wirkstoffe hervorgerufene inhibitorische Effekte auf die Motilität von Zellen untersucht werden können.^[54]

Die potentielle inhibitorische Aktivität ausgewählter Gold(I)- und Pt(II)-Carbenkomplexe wurde exemplarisch an 518A2-Melanomzellen untersucht. Zunächst wurden die 518A2-Zellen hierfür mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-*well*-Platten kultiviert (500 μ l der Zellsuspension pro *well*), welche man innerhalb einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) zu einer annähernd konfluenten Monolayerschicht heranwachsen ließ. Durch das Abkratzen von Zellen mit Hilfe einer Plastikpipettenspitze (2-200 μ l) wurde eine künstliche Wunde in Form eines schmalen Streifens in den Zellrasen eingeführt. Anschließend wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um die abgelösten 518A2-Zellen zu entfernen und die Zugabe der Testverbindungen erfolgte in geeigneten Konzentrationen. Erneut wurden analog mit reinem DMF/DMSO behandelte Zellen als Negativkontrollen verwendet. Schließlich wurde die potentielle inhibitorische Wirkung der Verbindungen auf die Fortbewegung der Zellen und somit auf die Fähigkeit, die Wunde wieder zu schließen, lichtmikroskopisch analysiert.

Hierfür wurde die Größe der Wunde direkt vor Zugabe der Substanzen bzw. den entsprechenden Mengen an DMF/DMSO (0 h) sowie nach 24 h und 48 h Inkubation im Brutschrank an immer der gleichen Stelle innerhalb des jeweiligen *wells* dokumentiert. Die lichtmikroskopischen Bilder des *Wound-Healing* Assays wurden unter Zuhilfenahme der Adobe® Photoshop® CS6 Extended Software ausgewertet. Hierbei erfolgte eine Vermessung der Wunden an drei verschiedenen, definierten Stellen in jedem einzelnen Bild (oben, mittig und unten im Bild) bei Substanzzugabe (0 h) und nach 24 h bzw. 48 h Inkubation. Aus den drei Einzelwerten wurde für jedes Bild die mittlere Wundbreite berechnet und diese anschließend prozentual im Vergleich zur Breite der Wunde bei 0 h (100 %) angegeben. Hieraus wurde nun die prozentuale Wundheilung ermittelt, indem die Breite (in %) der Wunde nach 24 h bzw. 48 h von der Ausgangsbreite (100 %) subtrahiert wurde. Pro getestete Substanz wurde der *Wound-Healing* Assay dreifach durchgeführt, weshalb aus den einzelnen erhaltenen Werten für die Wundheilung schließlich die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet wurden.

3.8 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels NBT-Test

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) entstehen während der normalen Zellatmung in den Mitochondrien, treten aber auch als zelluläre Antwort auf Xenobiotika oder bakterielle Infektionen auf.¹⁷¹⁻¹⁷³ In geringen, physiologischen Konzentrationen spielen sie eine essentielle Rolle als sogenannte *redox messenger* intrazellulärer Signalwege und haben eine große Bedeutung bei der Regulation der Zellproliferation sowie antiapoptotischer Prozesse (Zellüberleben). Im Gegensatz dazu kann eine hohe ROS-Konzentration, die z.B. durch eine Exposition von toxischen Verbindungen hervorgerufen wurde, zu oxidativem Stress führen. Ist die Zelle nicht in der Lage diesem hohen Level an ROS mittels ihrer eigenen Redoxsysteme, wie z.B. dem Glutathion- oder Thioredoxin-System, entgegen zu wirken, so kommt es aufgrund übermäßiger Schädigungen verschiedener Zellkomponenten (Membranen, Proteine oder auch DNA) schließlich zur Initiation der Apoptose. Da die ROS-Konzentration in Krebszellen generell erhöht ist und reaktive Sauerstoffspezies an der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren beteiligt sein können, hat man diesen weiterhin auch eine karzinogene Wirkung zugeschrieben.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Paradoxerweise stellt die gezielte Produktion hoher ROS-Konzentrationen in Tumorzellen eine gute Strategie zur Apoptoseinduktion dar, weil diese aufgrund ihres bereits erhöhten ROS-Levels im Vergleich zu nicht-malignen Zellen anfälliger gegenüber oxidativem Stress sein sollten.

Aus diesem Grund und da es sich vor allem bei Goldkomplexen häufig um Verbindungen handelt, die Auswirkungen auf Redox-regulierende Enzyme wie die Thioredoxinreduktase (TrxR) haben,^{108,176–178} sollte mit Hilfe des Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Tests (NBT-Test) untersucht werden, ob einige ausgewählte Gold(I)- und Pt(II)-Carbenkomplexe das ROS-Level in 518A2-Melanomzellen erhöhen. Bei diesem Assay wird der gelbe, wasserlösliche Redoxfarbstoff NBT **19** durch Superoxidradikale zum violetten, wasserunlöslichen Diformazan **20** reduziert (Abbildung 20).^{179,180} Die Menge an gebildetem Diformazan korreliert dabei direkt mit der zellulären ROS-Konzentration. So kann ein Anstieg des ROS-Levels über die Zunahme von **20** nachgewiesen und quantifiziert werden.

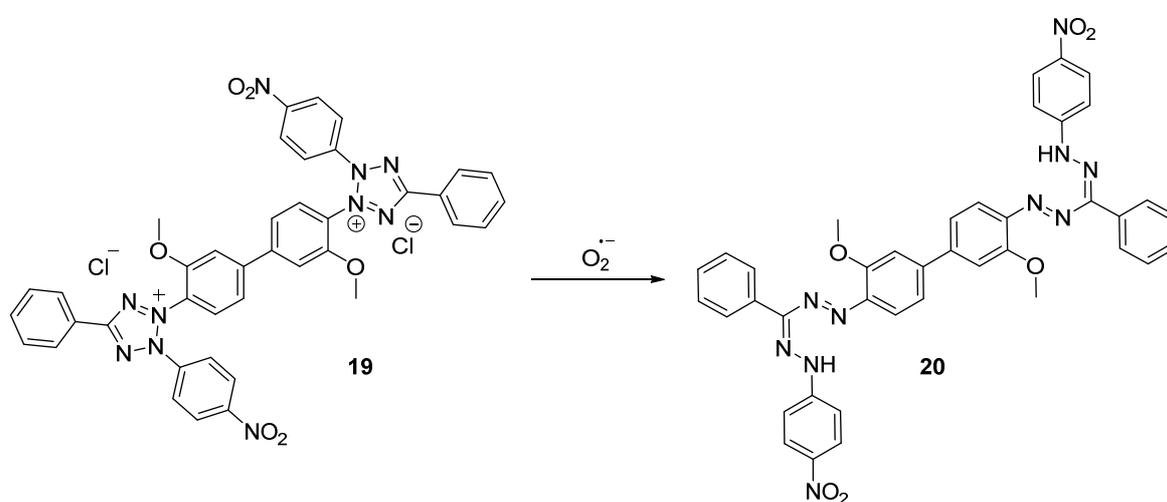


Abbildung 20: Reaktionsschema der Reduktion von NBT **19** zum Diformazan **20** durch elektronenübertragene Superoxidradikale.

Für die Bestimmung der zellulären ROS-Level mittels NBT wurden die 518A2-Melanomzellen zunächst in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät (100 μ L einer Suspension mit 1×10^5 Zellen/mL pro well). Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden geeignete Verdünnungsreihen der zu testenden Metallkomplexe bzw. entsprechende Mengen des jeweiligen Lösungsmittels (DMF oder DMSO) als Kontrolle zu den Zellen gegeben und diese für weitere 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurden die 96-well-Platten zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), das Medium verworfen und jedes well mit 50 μ L einer 0,1 %-igen NBT-Lösung (in PBS) versetzt. Die Inkubation der Zellen mit dem Redoxfarbstoff erfolgte für 4 h im Brutschrank, bevor die Zellkulturplatten erneut zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C) und die überstehende NBT-Lösung verworfen wurden. Das in den Zellen entstandene Diformazan **20** wurde durch Zugabe von 50 μ L einer 2 M KOH-Lösung und 65 μ L DMSO sowie einer Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 30 min vollständig gelöst.^{179,180}

Schließlich erfolgte die Messung der Diformazan- (630 nm) und Hintergrundabsorption (405 nm) mit Hilfe eines TECAN-Plattenlesegeräts. Für die Auswertung wurde die Hintergrundabsorption jeweils von der Diformazanabsorption subtrahiert und die Differenz, welche ein Maß für die ROS-Produktion darstellt, auf den entsprechenden Anteil an vitalen Zellen bezogen, der parallel und analog zu dem unter 3.3.1 beschriebenen MTT-Test ermittelt wurde. Die ROS-Konzentration der Negativkontrollen wurde gleich 1 gesetzt und die jeweiligen ROS-Level der behandelten Proben relativ zu diesem Referenzwert bestimmt. Für jede Testsubstanz und Konzentration wurde der NBT-Test mindestens in dreifacher Auftrugung durchgeführt. So wurden aus den erhaltenen Werten der Einzelmessungen Mittelwerte und deren Standardabweichungen berechnet.

3.9 Effekte auf das Mitochondrienmembranpotential

Bei der Initiation der Apoptose über den intrinsischen Signalweg stellt der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\psi_m$ ein zentrales Ereignis des programmierten Zelltods dar.^{181,182} Der elektrochemische Gradient bricht dabei aufgrund der Ausbildung von Poren in der Mitochondrienmembran (*mitochondrial permeability transition pores*), welche durch eine Oligomerisierung von pro-apoptotischen Membranproteinen der Bcl-2-Familie (Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*) entstehen, zusammen.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Als Folge werden Cytochrom c und andere pro-apoptotische Faktoren, wie z.B. Apaf-1 (*apoptotic protease activation factor-1*), aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Hier formieren Cytochrom c, Apaf-1 sowie ATP und die Procaspase-9 das Apoptosom, welches nach Aktivierung der Caspase-9 durch autokatalytische Spaltung die Caspase-Kaskade in Gang setzt. Durch die Effektorcaspasen-3, -7 bzw. -9 wird letztendlich der Abbau zellulärer Komponenten und somit der Zelltod induziert. Das Mitochondrienmembranpotential $\Delta\psi_m$ kann daher als Indikator für den Vitalitätszustand von Zellen verwendet und mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbo-cyanine-Iodid) untersucht werden.^{181,186} Der kationische, jedoch gleichzeitig lipophile Charakter des JC-1 ermöglicht es dem Farbstoff in das Innere der Mitochondrien zu gelangen, in denen er bei hoher Konzentration aggregiert. Diese sogenannten *J*-Aggregate liegen in den Mitochondrien vitaler Zellen vermehrt vor und zeichnen sich durch eine rote Fluoreszenz aus. Gleichzeitig liegen im Zytoplasma der Zellen JC-1-Monomere vor, die eine grüne Fluoreszenz aufweisen.

In apoptotischen Zellen kann der Fluoreszenzfarbstoff aufgrund des Zusammenbruchs des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\psi_m$ nicht mehr in die Zellorganellen gelangen und hier rot fluoreszierende *J*-Aggregate ausbilden. Daher verschiebt sich das Verhältnis von roter und grüner Fluoreszenz in apoptotischen Zellen so, dass eine geringere rote, dafür aber eine erhöhte grüne Fluoreszenz vorliegt.^{187–189}

Wie bereits zuvor beschrieben, ist für verschiedene Gold(I)-NHC-Komplexe bekannt, dass diese in den Mitochondrien von Zellen akkumulieren und/oder mitochondriale Prozesse stören, wodurch letztendlich das Membranpotential $\Delta\psi_m$ abnimmt bzw. vollständig zusammenbricht.^{27,28,104,106} Daher sollte mit Hilfe des *JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Kits* von Cayman untersucht werden, ob einige der in dieser Arbeit untersuchten Goldkomplexe ebenfalls einen Effekt auf $\Delta\psi_m$ in 518A2-Melanomzellen haben. Auch ausgewählte Pt(II)-NHC-Komplexe wurden so auf eine mögliche antimitochondriale Aktivität hin untersucht. Hierfür wurde der JC-1 Assay, wie im Nachfolgenden beschrieben, nach Herstellerangaben durchgeführt. Die 518A2-Zellen wurden zunächst für 24 h in schwarzen 96-well-Mikrotiterplatten kultiviert (100 μ L einer Suspension mit 1×10^5 Zellen/mL pro well), bevor geeignete Verdünnungsreihen der Komplexe hinzugegeben wurden. Für die Kontrollen wurden erneut analoge Mengen an DMF bzw. DMSO zugesetzt. Die Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen erfolgte für weitere 24 h im Brutschrank, bevor pro well 5 μ L der *JC-1 Staining Solution* hinzugegeben wurden. Die 518A2-Zellen wurden für 15 min im Brutschrank mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 100 μ L frischem PBS versetzt, bevor die Fluoreszenzmessungen am TECAN-Plattenlesegerät erfolgten. Die Messung der Fluoreszenz der roten *J*-Aggregate wurde bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden die grün fluoreszierenden JC-1-Monomere bei 485 nm angeregt und ihre Emission bei 535 nm bestimmt.

Für die Auswertung wurde das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz in den behandelten Proben ermittelt und dieses auf das für die entsprechende Negativkontrolle bestimmte, normale Fluoreszenzverhältnis (100 % intakte Mitochondrien bzw. 100 % intaktes mitochondriales Membranpotential) bezogen. Für jede Testsubstanz und Konzentration wurde der JC-1 Assay mindestens dreifach durchgeführt. Daher wurden aus den Daten der Einzelmessungen Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen berechnet.

3.10 Enzymaktivitätstests

Gold-NHC-Komplexe weisen, wie bereits zuvor unter Abschnitt 1.3 beschrieben, verschiedene zelluläre *targets* auf und beeinflussen daher auch unterschiedliche zelluläre Prozesse.^{27,28,104,190} Hierbei stellen viele dieser Gold-Komplexe Inhibitoren essentieller Enzyme, wie der Thioredoxinreduktase (TrxR)^{88,94,106,108,191} und der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1^{192–194}, dar. Ob ausgewählte Gold(I)-NHC-Komplexe dieser Arbeit die beiden Enzyme ebenfalls inhibieren, sollte daher anhand der im Nachfolgenden beschriebenen Methoden analysiert werden.

Die Untersuchungen zur TrxR-Inhibition fanden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig statt (*Bioinorganic Medicinal Chemistry Group* unter der Leitung von Prof. Dr. Ingo Ott), wurden zum Teil aber auch von Dr. JingJing Zhang und Dr. Julia Schur durchgeführt. Die Inhibition von PARP-1 wurde dagegen während eines Auslandsaufenthalts am Institut für Pharmazie (*Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting* unter der Leitung von Prof. Dr. Angela Casini) der Universität Groningen (Niederlande) untersucht. Für einige Testverbindungen wurde der Enzymaktivitätstest von Prof. Dr. Angela Casini durchgeführt.

3.10.1 Inhibition der Thioredoxinreduktase

Die Analyse der Thioredoxinreduktase-Inhibition erfolgte mit leichten Veränderungen nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ingo Ott (*Bioinorganic Medicinal Chemistry Group*, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig).^{108,195} Für den Enzymaktivitätstest wurde die aus Rattenleber isolierte TrxR (Sigma-Aldrich, T9698) zunächst mit bidest. Wasser verdünnt, sodass sich eine Enzymkonzentration von 5,0 U/mL ergab. Aus den 10 mM Stammlösungen der Gold(I)-NHC-Komplexe wurden 200-fach konzentrierte Vorverdünnungen (im Vergleich zur Endkonzentration) in DMF hergestellt, die anschließend mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) 100-fach weiter verdünnt wurden (10 μ L der Vorverdünnungen + 990 μ L Puffer). Zu je 25 μ L der Enzymlösung, die in die *wells* einer 96-well-Platte vorgelegt wurden, wurden 25 μ L der in Kaliumphosphatpuffer verdünnten Komplexe in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Die Endkonzentrationen der Goldkomplexe betragen 0,078 μ M, 0,156 μ M, 0,312 μ M, 0,625 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M. Für die Positivkontrolle der TrxR-Aktivität wurde eine zur höchsten eingesetzten Konzentration der Komplexe analoge Menge an DMF in Kaliumphosphatpuffer verdünnt und hiervon anschließend 25 μ L zu der Enzymlösung pipettiert.

In weiteren *wells* wurden 25 μL Puffer mit 25 μL der höchsten eingesetzten Konzentration des jeweiligen Komplexes versetzt. Dieser Ansatz diene als Kontrolle dafür, dass die Testsubstanzen keinerlei Wechselwirkungen mit den verschiedenen Komponenten des Assay-Puffers eingehen. Darüber hinaus wurden in ein *well* 50 μL reinen Kaliumphosphatpuffers pipettiert, um die Hintergrundabsorption bestimmen zu können. Die 96-*well*-Mikrotiterplatten wurden für 75 min bei 37 °C und unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Danach wurden pro *well* 225 μL eines frisch hergestellten TrxR-Reaktions-Mixes und zum Starten der Enzymreaktion 25 μL einer 20 mM DTNB-Lösung (in Ethanol) zugesetzt. Nach gründlicher Durchmischung der Proben mit Hilfe einer Multikanalpipette wurde die Absorption bei 405 nm zehnmal alle 35 s an einem Plattenlesegerät (Perkin-Elmer Victor X4) gemessen. Für jede Messung wurden die Absorptionswerte der Positivkontrolle und der mit den Testverbindungen behandelten Proben um die Hintergrundabsorption (50 μL Puffer) korrigiert. Die Zunahme der Absorption erfolgt linear, wobei das Bestimmtheitsmaß $r^2 \geq 0,99$ sein sollte. Die TrxR-Aktivität wurde als Steigung der jeweiligen linearen Regression (Anstieg der Absorption pro s) berechnet. Die Aktivität der Positivkontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und die Aktivitäten der behandelten Enzymproben auf diesen Referenzwert bezogen. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50} -Wert) wurde anschließend über die Boltzmann-Funktion in Origin (*OriginLab Corp.*) als diejenige Konzentration ermittelt, bei der eine 50 %-ige Inhibition der Enzymaktivität vorlag. Aus den EC_{50} -Werten der Einzelmessungen wurden Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen berechnet.

3.10.2 Inhibition der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1

Die Aktivität der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) wurde mit Hilfe des *Trevigen HT Universal Colorimetric PARP Assay Kits* im 96-*well*-Format bestimmt. Dieser basiert auf dem Einbau von Biotin-markierter Poly(ADP-ribose) bei der PARP-vermittelten Markierung von Histonen, welche ein Substrat für das Enzym darstellen. Für den Assay wurde die im Kit mitgelieferte rekombinante, humane PARP-1 verwendet. Pro 96-*well*-Platte wurden in doppelter Auftragung eine Positivkontrolle von PARP-1 (ohne Inhibitor, 100 % Enzymaktivität) und eine Negativkontrolle (nur Assay-Puffer-Komponenten ohne PARP-1) zur Bestimmung der Hintergrundabsorption mitgeführt. Vor Zugabe der behandelten Enzymproben in die mit Histonen beschichteten *wells* der Mikrotiterplatten, wurde PARP-1 für 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Gold(I)-NHC-Komplexe bei RT inkubiert.

Anschließend wurden je 25 μL dieser Enzymproben in die *wells* pipettiert, mit 25 μL 1x PARP-Cocktail versetzt und diese für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach jeweils zwei Waschschrritten mit einer 0,1 %-igen Triton X-100-Lösung (in PBS) und reinem PBS, wurde zu den nun mit Poly(ADP-ribose) markierten Histonen eine Strep-HRP-Lösung (50 μL pro *well*) gegeben und die Platten erneut für 1 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden ein weiteres Mal mit 0,1 %-iger Triton X-100-Lösung (in PBS) sowie reinem PBS gewaschen, bevor pro *well* 50 μL *TACS-Sapphire*-Lösung hinzugegeben und die Absorption des kolorimetrischen Substrats der HRP (*horse radish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei 630 nm gemessen wurden. Die Absorption bei 630 nm stellt ein direktes Maß für die Aktivität der PARP-1 dar. Die Aktivität der mit den Goldkomplexen behandelten PARP-Proben wurde relativ zur Positivkontrolle (100 % Enzymaktivität) ermittelt und anschließend, wie bereits für die Thioredoxin-Reduktase beschrieben, der jeweilige EC_{50} -Wert für die Goldkomplexe bestimmt. Der Assay wurde pro Substanz zweimal in doppelter Auftragung durchgeführt, sodass aus den einzelnen EC_{50} -Werten Mittelwerte und deren Standardabweichungen berechnet wurden.

3.11 Interaktion mit DNA

Wie zuvor in der Einleitung unter Abschnitt 1.2 beschrieben, stellt die DNA den primären, zellulären Angriffspunkt für Cisplatin und hiervon abgeleitete Pt(II)-Komplexe dar.^{11,13,35,196} Aus diesem Grund sollten auch die in dieser Arbeit verwendeten Platin(II)-NHC-Komplexe auf eine Interaktion mit DNA hin untersucht werden. Die Analysen zur kovalenten Wechselwirkung mit CT-DNA (CT - *calf thymus*/Kalbsthymus; Abschnitt 3.11.3), Initiation einer CT-DNA-Aggregation (Abschnitt 3.11.4) sowie zur Morphologie und Induktion von lysogenen *E. coli*-Bakterien (Abschnitt 3.11.5) wurden von Prof. Dr. Jana Kašpárková und Prof. Dr. Viktor Brabec (*Department of Biophysics, Palacky University* in Olmütz, Tschechien und *Institute of Biophysics, Academy of Science* in Brünn, Tschechien) durchgeführt.

3.11.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Die Interaktion der Platin(II)-Carbenkomplexe mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA), welcher auch als Bandenretardations-Assay bekannt ist, untersucht. Dieser wird normalerweise für die Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen verwendet, kann jedoch auch zur Untersuchung der Interaktion von niedermolekularen Verbindungen mit DNA eingesetzt werden.^{197,198}

Für den Assay wurden entweder 1.5 µg zirkulärer oder 0.5 µg linearisierter, doppelsträngiger pBR322-Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen der Komplexe (5, 10, 25 und 50 µM) für 24 h bei 37 °C in TE-Puffer inkubiert (Gesamtvolumen der einzelnen Proben 20 µL). Unbehandelte DNA-Proben dienten als Negativkontrollen. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte durch Restriktionsverdau des pBR322-Plasmids mit HindIII (New England Biolabs; 50 U/µg DNA, 1 h, 37 °C) und anschließende Hitzeinaktivierung (20 min bei 65 °C). Nach der Inkubation wurden zu jedem Ansatz 5 µL DNA-Probenpuffer gegeben und die DNA-Proben in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (4 h bei 66 V). Das Gel wurde für 30 min in Ethidiumbromid-Färbelösung (EtBr-Lösung) gefärbt und die DNA-Banden mit einem UV-Transilluminator-System detektiert.

3.11.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz Assay

Um die Interaktion ausgewählter Pt(II)-NHC-Komplexe mit DNA anhand einer weiteren Methode zu analysieren bzw. zu bestätigen, wurde ein Fluoreszenz-basierter EtBr-Sättigungs-Assay durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität von EtBr wird durch eine Interkalation in die DNA deutlich verstärkt.¹⁹⁹ Sind die Interkalationsstellen für EtBr jedoch aufgrund kovalenter oder nicht-kovalenter Wechselwirkungen von Substanzen mit der DNA nicht mehr zugänglich, so liegt eine reduzierte Fluoreszenzintensität vor.

In die *wells* einer schwarzen 96-*well*-Platte wurden 90 µL TE-Puffer gegeben und mit jeweils 10 µL Lachsspermien-DNA (0,1 mg/mL, Endkonzentration: 1 µg/100 µL) versetzt. Zusätzlich wurden in jedes *well* 11,1 µL von 10-fach höher konzentrierten Vorverdünnungen der Metallkomplexe (in bidest. H₂O) gegeben, sodass sich analog zum EMSA jeweils Endkonzentrationen von 5, 10, 25 und 50 µM ergaben. Für die Negativkontrollen wurden, der höchsten eingesetzte Konzentration der Komplexe entsprechend (50 µM), analoge Mengen an DMF bzw. DMSO (in bidest. H₂O) verwendet. Jede Probe wurde dabei in Doppelauftragung angesetzt. Um eine mögliche Hintergrundfluoreszenz der Substanzen zu berücksichtigen, wurden entsprechende Verdünnungsreihen der Komplexe ohne DNA (100 µL TE-Puffer + 11,1 µL der Vorverdünnungen) vorbereitet. Die Platten wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µL einer 10 µg/mL konzentrierten EtBr-Lösung pro *well* und eine Inkubation für 5 min bei RT, bevor die EtBr-Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm am TECAN-Plattenlesegerät gemessen wurde.

Für die Auswertung wurden zunächst die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aus den jeweiligen identischen Ansätzen gebildet und die Testreihen anschließend um die entsprechende Hintergrundfluoreszenz (jeweiliger Komplex in verschiedenen Konzentrationen + EtBr) korrigiert. Die Fluoreszenzintensität der Negativkontrollen wurde gleich 100 % gesetzt (100 % EtBr-Fluoreszenzintensität bzw. 100 % Sättigung der DNA mit EtBr) und die Intensitäten der behandelten DNA-Proben auf diesen Referenzwert bezogen.^{162,200}

3.11.3 Kovalente Wechselwirkung mit doppelsträngiger CT-DNA

Doppelsträngige CT-DNA (42% G + C, mittlere Molmasse ca. 2×10^7 g/mol) wurde in einer Konzentration von 0,32 mg CT-DNA/mL mit ausgewählten Pt(II)-Carbenkomplexen (5×10^{-5} M) bei einem r_i von 0,05 (r_i - Molverhältnis von freiem Platin zu den Nukleotidphosphatresten der DNA zu Beginn der Inkubation) und 37 °C in 10 mM NaClO₄-Lösung inkubiert. In regelmäßigen Intervallen wurden Proben aus der Lösung entnommen, welche zur vollständigen Entfernung ungebundener sowie nicht-kovalent gebundener Moleküle der Platinkomplexe zunächst gegen 1 M NaCl-Lösung und anschließend gegen MilliQ Wasser dialysiert wurden (jeweils 1 h, bei 4 °C). Bevor der Platingehalt an der DNA (entspricht dem Anteil an kovalent gebundenen Molekülen der Platinkomplexe) schließlich mittels FAAS ermittelt wurde, wurde die DNA-Konzentration der Proben photometrisch bestimmt ($\epsilon_{260} = 6400 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹⁶²

3.11.4 Aggregation von CT-DNA

Die Fähigkeit einiger Platinkomplexe, eine Aggregation bzw. Kondensation von DNA zu verursachen, wurde über die bei diesem Prozess auftretende erhöhte Lichtstreuung nach einem Protokoll von Vijayanathan *et al.* untersucht.²⁰¹ Zunächst wurden die 10 mM Stammlösungen der Komplexe sowie der Kakodylat-Puffer (10 mM, pH 7,2) sterilfiltriert (0,22 µm Spritzenfilter), um eine Verfälschung/Störung der Analyse durch Staubpartikel zu vermeiden. In einer Quarz-Küvette (Schichtdicke 1 cm) wurde eine 1,5 µM Lösung der CT-DNA in einem Gesamtvolumen von 2,5 mL hergestellt. Die Pt(II)-Komplexe wurden in einem Volumen von 1 µL zu der DNA gegeben, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Die Proben wurden gründlich durchmischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensität der Lichtstreuung wurde im 90°-Winkel zur Lichtquelle mit Hilfe eines Varian Cary Eclipse Spectrofluorophotometer bei gleicher Exzitations- und Emissionswellenlänge von 305 nm gemessen.

Die Breite der Strahlengänge für die Anregung und Emission betrug jeweils 5 nm, während die Integrationszeit des gemessenen Signals auf 5 s festgesetzt wurde. Darüber hinaus wurde die Absorption der mit den Pt-Komplexen behandelten CT-DNA bei einer Wellenlänge von 350 nm ermittelt, dessen Zunahme ebenfalls als Maß für eine DNA-Aggregation bzw. Kondensation induzierende Wirkung der Testsubstanzen verwendet werden kann.^{162,202}

3.11.5 Effekte auf die Morphologie und Untersuchung zur Induktion des lysogenen Zyklus von *E. coli*-Zellen

Die für die Untersuchungen zur Morphologie verwendeten *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*, CCM 7929) wurden von der Tschechischen Sammlung von Mikroorganismen (*Czech Collection of Microorganisms*, CCM) als gefriergetrocknetes Pellet erhalten. Die Bakterienzellen wurden zunächst rehydratisiert und nach Angaben der CCM auf LB-Agarplatten (LB - *lysogeny broth*) kultiviert. Der *E. coli*-Stamm GY 5027 envA uvrB (λ), welcher mit dem Bakteriophagen λ infiziert ist, wurde dagegen von Dr. Vojtiskova (*Institute of Biophysics, v.v.i* in Brünn, Tschechien) als bereits bestehende Kultur auf Agarplatten zur Verfügung gestellt. Die Effekte auf die Morphologie sowie die Induktion des lysogenen Zyklus von *E. coli*-Zellen wurden nach Behandlung mit den Platinkomplexen **49** anhand von bekannten Protokollen untersucht.^{203,204}

Für die Untersuchungen der Bakterienmorphologie wurde eine Kolonie des *E. coli*-Stamm CCM 7929 über Nacht bei 37 °C in LB-Medium bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Aus der Zellsuspension wurden 100 μ L entnommen und diese in 6 mL LB-Medium weiterinkubiert bis bei 600 nm eine optische Dichte von 0,5 erreicht war. 50 μ L-Aliquots dieser Bakteriensuspension wurden in frische 6 mL LB-Medium gegeben, welches zusätzlich 30 μ M der zu testenden Pt(II)-NHC-Komplexe **49** oder 30 μ M Cisplatin enthielt. Als Kontrolle wurden unbehandelte *E. coli*-Zellen verwendet. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte für 5 h, bevor jeweils 5 μ L der behandelten Bakteriensuspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Konfokalmikroskop (Leica TSC SP-5 X, HCX PL APO lambda blue 63.0x1.20 water UV Objektiv, Leica EL6000 Lichtquelle und micro max CCD Kamera HCX 365 FX) analysiert wurden.

Für die Analysen zur lytischen Transformation wurden 6 mL LB-Medium mit GY 5027 envA uvrB (λ) *E. coli*-Bakterien beimpft und diese bei 37 °C über Nacht bis zur Sättigung kultiviert. Aus der Zellsuspension wurden ebenfalls 100 μ L entnommen und diese in 6 mL LB-Medium weiterinkubiert bis bei 600 nm eine optische Dichte von 0,5 erreicht war. 50 μ L-Aliquots dieser Bakteriensuspension wurden in frische 6 mL LB-Medium gegeben, welches zusätzlich 30 μ M der zu testenden Pt(II)-NHC-Komplexe **49** oder 30 μ M Cisplatin enthielt. Als Kontrolle wurden unbehandelte *E. coli*-Zellen verwendet. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte für weitere 5 h. Anschließend wurden jeweils 10 μ L 1000-facher Verdünnungen der verschiedenen behandelten Suspensionen auf eine LB-Agarplatte (Top-Agar 0,5 %) gegeben, auf der bereits ein Rasen an nicht-infizierten *E. coli*-Zellen (CCM 7929) besteht. Als Kontrollen wurden auch 10 μ L der reinen Platinkomplexe (30 μ M) sowie unbehandelte GY 5027 envA uvrB (λ) *E. coli*-Zellen auf die Agarplatte aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde die Platte auf die Ausbildung von Plaques (Lyse der Bakterienzellen) hin untersucht.

3.12 Zymographie zum Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (*matrix metalloproteinases*, MMPs) stellen eine Familie von zinkhaltigen proteolytischen Enzymen dar, die sowohl bei der (Tumor-) Angiogenese als auch bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine essentielle Rolle spielen.^{205–208} Während der normalen Angiogenese exprimieren und sekretieren aktivierte, vaskuläre Endothelzellen die MMPs, welche in der Lage sind, die extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) abzubauen bzw. umzustrukturieren. Der Abbau der ECM ermöglicht es den Endothelzellen, sich durch das umliegende Gewebe zu bewegen und schließlich tubuläre Strukturen auszubilden, die das Grundgerüst für neue Blutgefäße darstellen.^{206,207} Durch Quervernetzung und Stabilisierung dieser tubulären Strukturen mittels spezieller Muskel- und Bindegewebszellen (glatte Muskelzellen bzw. Perizyten) entsteht letztendlich ein Netzwerk aus reifen Blutgefäßen. Die Ausbildung neuer Blutgefäße ausgehend von einem bereits existierenden Netzwerk an Kapillaren (Angiogenese) spielt für verschiedene physiologische Abläufe im menschlichen Organismus eine entscheidende Rolle. So stellt das Wachstum neuer Blutgefäße vor allem bei der Entstehung und Differenzierung von Organen während der Embryogenese einen essentiellen Prozess dar.^{209–211} Darüber hinaus tritt die Angiogenese bei Erwachsenen während der Wundheilung sowie des Reproduktionszyklus von Frauen auf. Die Neuentstehung von Blutgefäßen wird im erwachsenen Menschen also ausschließlich lokal

und für einen begrenzten Zeitraum aktiviert.^{205,209–211} Sämtliche angiogene Prozesse werden dabei durch pro- und antiangiogene Faktoren gesteuert, deren Gleichgewicht wiederum zeitlich und räumlich strikt reguliert ist. Kommt es jedoch zu einer Disregulation der Angiogenese, kann eine verringerte oder verstärkte Blutgefäßausbildung auftreten, was letztendlich die Entstehung verschiedener Krankheiten zur Folge haben kann.^{205,208–211} So spielt die pathologische Angiogenese u.a. auch beim Tumorwachstum und der Ausbreitung von Krebszellen im Körper (Metastasierung) eine entscheidende Rolle. Während sich ein kleiner, lokaler Tumor noch ausreichend über das entsprechende umliegende Gewebe und die hierin vorliegenden Blutgefäße mit Nährstoffen sowie Sauerstoff versorgen kann, ist für das Wachstum über einen Durchmesser von einigen Millimetern hinaus sowie die Metastasierung ein eigenes, internes Blutgefäßnetzwerk notwendig.^{208,212,213} Für die Rekrutierung von neuen Blutgefäßen können Zellen des unterversorgten Tumors spezielle Wachstumsfaktoren sekretieren, die zu einer Aktivierung von umliegenden Endothelzellen und somit letztlich zu einer Initiation der Tumorangiogenese führen.

Darüber hinaus exprimieren und sekretieren viele Tumorzellen selbst MMPs.^{214–218} Diese proteolytischen Enzyme ermöglichen es den malignen Zellen sich durch den Abbau bzw. eine Reorganisation der ECM sich durch das umliegende Gewebe zu bewegen bzw. in neues Gewebe (Invasion) oder umliegende Blutgefäße einzudringen (Intravasation). Hierbei handelt es sich um Prozesse, die eine entscheidende Rolle für die Metastasierung von Tumorzellen spielen. Aus diesen Gründen stellen die von Endothelzellen exprimierten, aber auch die tumoralen MMPs vielversprechende *targets* dar, um ein Wachstum von Tumoren oder deren Metastasierung zu inhibieren. Sowohl die in dieser Arbeit verwendeten HUVECs^{219,220} als auch die humane Melanomzelllinie 518A2^{217,218,221} exprimieren und sekretieren die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Wird die Expression und/oder die Sekretion dieser proteolytischen Enzyme durch Behandlung der Zellen mit antiangiogenen bzw. anti-metastatischen Wirkstoffen gehemmt, so kann dies mit Hilfe eines einfachen Zymographie-Assays sichtbar gemacht werden.²²² Die Untersuchung, ob ausgewählte Gold(I)-NHC-Komplexe Veränderungen bei der Expression und/oder Sekretion aktiver Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) in HUVECs oder 518A2-Zellen auslösen, erfolgte weitestgehend nach einem durch Rodríguez-Nieto *et al.* beschriebenen Protokoll einer Gelatine-Zymographie.²²³ Diese wurde für die Komplexe **29** und **30a** zur Verifizierung der eigenen Ergebnisse zusätzlich von Matthias Rothmund (M.Sc., Universität Bayreuth) durchgeführt.

Die HUVECs (6×10^5 Zellen pro *well*) bzw. 518A2-Zellen (3×10^5 Zellen pro *well*) wurden in 6-*well*-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nachdem das alte Medium abgenommen und verworfen wurde, wurden zu den Zellen jeweils 1,5 mL frisches Medium mit 0,1 % BSA gegeben und jedes *well* mit 200 kIU Aprotinin/mL versetzt. Darüber hinaus erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Metallkomplexe in geeignete Verdünnungsreihen. Als Negativkontrollen wurden Proben der vaskulären Endothelzellen bzw. Melanomzellen verwendet, die ausschließlich mit analogen Mengen an DMF behandelt wurden. Im Anschluss an eine Inkubation der Zellen über 24 h im Brutschrank wurde das Medium abgenommen und jeweils in ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (Medium-Proben). Die Zellen am Boden der 6-*well*-Platten wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit Hilfe eines Zellschabers in jeweils 0,5 mL Zellyse-Puffer gekratzt und anschließend ebenfalls in 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert wurden. Die so gewonnenen Zellysat-Proben wurden 10 s gründlich mit einem Vortexer durchmischt und für 15 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Medium- und Zellysat-Proben für 20 min bei 14000 rpm und 4 °C. Nachdem die Überstände der Proben in neue Reaktionsgefäße überführt wurden, konnten diese für die Zymographie verwendet werden. Die Proteinkonzentration der Proben (Medium- und Zellysat-Proben) wurde nach Bradford bestimmt.²²⁴

Die Proteinproben wurden anschließend mittels einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt, wobei ein 3 %-iges Sammelgel sowie ein gelatinehaltiges (1 mg/mL) 10 %-iges Trenngel verwendet und von den Proben einer Serie jeweils identische Mengen an Gesamtprotein (10-30 µg) auf das Gel aufgetragen wurden. Als Referenz für das Molekulargewicht der Proteine wurden auf jedes Gel in mindestens einer Bahn 5 µL der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) als Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst für ca. 30 min bei 80 V in SDS-Laufpuffer. Sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Auftrennung der Proteine für etwa eine weitere Stunde bei 130 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter kontinuierlichem Schwenken für jeweils 10 min zunächst in Waschpuffer I und anschließend in Waschpuffer II gewaschen. Durch diese Waschschrte wurde das SDS aus dem Gel entfernt und eine partielle Rückfaltung der MMPs in den nativen, aktiven Zustand ermöglicht. Danach wurde das Gel für 18 h bei 37 °C in Substratpuffer inkubiert.

Anschließend erfolgten die Färbung des Gels für 30 min mit *Coomassie Brilliant Blue R-250* sowie die Entfärbung für mehrere Stunden, bis die MMP-2 und MMP-9 aufgrund ihrer Gelatinase-Aktivität als ungefärbte Banden in einem dunklen, gefärbten Hintergrund eindeutig zu erkennen waren.

3.13 Nachweise antiangiogener und vaskular-disruptiver Effekte

Nicht nur die Tumorangiogenese sondern auch das bereits bestehende tumorale Blutgefäßsystem stellen interessante und vielversprechende *targets* in der Antitumorthherapie dar.^{17,18,21} So werden antiangiogene Wirkstoffe häufig in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika eingesetzt, um das Wachstum und/oder die Metastasierung von Tumoren zu verhindern. Im Gegensatz dazu zerstören vaskular-disruptive Verbindungen selektiv das unregelmäßige Blutgefäßsystem von Tumoren. Die Untersuchung der Metallkomplexe auf eine antiangiogene und/oder vaskular-disruptive Wirkung hin erfolgte sowohl in einem *in vitro* System mit vaskulären Endothelzellen (HUVECs oder EaHy.926, *Tube Formation Assay*) als auch an den sich entwickelnden Blutgefäßen in der Chorioallantoismembran (CAM) befruchteter Hühnereier (CAM Assay, *in vivo* Modellsystem). Die Arbeiten mit den HUVECs wurden im Rahmen mehrerer Forschungsaufenthalte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) in der Chemischen Biologie unter der Leitung von Dr. Florenz Sasse durchgeführt.

3.13.1 *Tube Formation Assay*

Um zu analysieren, ob die in dieser Arbeit untersuchten Metallkomplexe eine antiangiogene und/oder vaskular-disruptive Aktivität aufweisen, wurde zunächst ein zellbasierter *in vitro Tube Formation Assay* im 96-well-Mikrotiterplatten-Format eingesetzt. Bei dieser Methode nutzt man aus, dass vaskuläre Endothelzellen (HUVEC oder EaHy.926) auf Matrigel (BD Biosciences), welches *in vitro* eine biologisch aktive Matrix nachahmt und der zellulären Basalmembranmatrix von Säugetieren ähnelt, tubuläre Netzwerke ausbilden.^{225,226} Die Inhibition des Aufbaus solcher Netzwerke und/oder die Zerstörung der tubulären Strukturen durch Behandlung der Zellen mit antiangiogenen bzw. vaskular-disruptiven Wirkstoffen können lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert werden.

Zum Nachweis einer Angiogenese-inhibierenden Aktivität wurden in die *wells* einer schwarzen 96-well-Mikrotiterplatte zunächst jeweils 35 µL eines Matrigel/Medium-Gemischs (Verhältnis 1:1) gegeben und die Platten anschließend zur Polymerisation des Matrigels für

30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden Suspensionen der HUVECs (20.000 Zellen pro *well*) bzw. EaHy.926-Zellen (30.000 Zellen pro *well*) in die *wells* gegeben und diese direkt im Anschluss mit unterschiedlichen Konzentrationen der Metallkomplexe versetzt. Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Um dagegen eine vaskular-disruptive Wirkung der Testverbindungen nachzuweisen, wurden die Endothelzellen zunächst über einen Zeitraum von 24 h alleine auf Matrigel im Brutschrank inkubiert, sodass diese tubuläre Strukturen und schließlich verzweigte Netzwerke ausbilden konnten. Erst im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden die Metallkomplexe in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Die Effekte auf die von den Endothelzellen gebildeten Netzwerke wurden schließlich nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C lichtmikroskopisch untersucht und dokumentiert.

3.13.2 CAM Assay

Mit Hilfe des sogenannten CAM Assays wurden die Testsubstanzen in einem *in vivo* System auf ihre antivaskuläre Wirkung hin getestet. Bei diesem Assay dient das Blutgefäßsystem in der Chorioallantoismembran (CAM) von befruchteten Hühnereiern als Modell, um Angiogenese-inhibierende (antiangiogene) und Blutgefäß-zerstörende (vaskular-disruptive) Eigenschaften von potentiellen Antitumorwirkstoffen nachzuweisen.^{225,227–230}

Hierfür wurden befruchtete Hühnereier (SPF Eier, VALO BioMedia) bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 % inkubiert. Am Tag 5/6 wurden am flacheren Ende des Eis, an dem auch der Luftsack liegt, Fenster mit einem Durchmesser von 1,5 - 2 cm in die Schale der Eier geschnitten. Nach dem vorsichtigen Entfernen der Eimembran wurden die Eier mit Fixierpflaster (Leukosilk, Hansaplast) wieder verschlossen und über Nacht im Brutschrank weiter inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurden Ringe aus Silikonfolie (Innendurchmesser $\varnothing_1 = 5$ mm; Außendurchmesser $\varnothing_A = 6$ mm) auf die stark vaskularisierte CAM gelegt und die Metallkomplexe in einem Gesamtvolumen von 10 μ L (in bidest. H₂O) in den Ring gegeben. Die applizierten Stoffmengen betragen hierbei 2,5 nmol, 5 nmol oder 10 nmol. Für die Negativkontrollen wurden analoge Mengen an DMF bzw. DMSO (ebenfalls in bidest. H₂O, Gesamtvolumen 10 μ L) auf die CAM gegeben. Die Effekte der Testverbindungen auf die sich entwickelnden Blutgefäße der CAM wurden nach 6 h und 24 h Inkubation mit einem USB-Lichtmikroskop dokumentiert und mit dem Ausgangszustand vor Zugabe der Komplexe (0 h) verglichen. Für jede Testverbindung und Konzentration wurde der Assay mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Auswertung der Bilder erfolgte i.d.R. rein qualitativ. Für einige Metallkomplexe wurde jedoch zusätzlich eine quantitative Auswertung der antivaskulären Effekte nach 6 h Inkubation mit Hilfe einer Fraktalanalyse zur Bestimmung der Fläche, die die Blutgefäße in den einzelnen Bildausschnitten ausmachen, durchgeführt (*Vessel Area Analysis*).¹⁶⁴ Die von Blutgefäßen bedeckte Fläche nach 6 h Inkubation mit den Testsubstanzen wurde prozentual auf die Fläche der Blutgefäße vor Beginn der Inkubation bezogen (100 %), wodurch letztendlich eine quantitative Auswertung der durch die Metallkomplexe induzierten antivaskulären Effekte erfolgen konnte.

3.14 *Ex vivo* Toxizität

Wie bereits eingangs in der Einleitung (vgl. 1.1) und unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben, führt die Anwendung von vielen Wirkstoffen in der Chemotherapie aufgrund ihrer meist geringen Selektivität für Krebszellen häufig zu starken Nebenwirkungen, wie z.B. extremer Übelkeit, Nephro- oder auch Neurotoxizität. Zu diesen in der Tumorthherapie eingesetzten und mit Nebenwirkungen behafteten Antitumorwirkstoffen gehören auch Cisplatin und dessen Pt(II)-Analoge.^{11,13,39} Vor allem die hohe Nephrotoxizität von Platinverbindungen stellt einen äußerst limitierenden Faktor bei ihrem Einsatz in der Chemotherapie dar.

Um zu überprüfen, ob die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gold(I)- und Platin(II)-Komplexe ebenfalls nephrotoxisch sind, wurde mit Hilfe von aus Rattennieren hergestellten *precision-cut tissue slices* (PCTS, Gewebeschnitte)^{231,232} die *ex vivo* Nephrotoxizität ausgewählter Komplexe im Vergleich zu Cisplatin ermittelt. Die PCTS repräsentieren vitale Explantate des Nierengewebes, bei denen alle Zelltypen in ihrer ursprünglichen Umgebung vorliegen und daher auch alle natürlichen interzellulären sowie Zell-Matrix-Interaktionen in den Gewebeschnitten vorhanden sind.¹⁶² Aus diesem Grund handelt es sich bei den PCTS um geeignete *in vitro* Organmodelle, mit denen die Toxizität von Wirkstoffen in verschiedenen Geweben analysiert werden kann. So wurde bereits die Toxizität von Cisplatin (Niere)²³³, verschiedenen Goldkomplexen (Leber, Niere und Kolon)²³⁴ sowie Ferrocen-basierten *prodrugs* (Leber)²³⁵ anhand von PCTS untersucht.¹⁶² Die Untersuchungen zur *ex vivo* Toxizität der Metallkomplexe erfolgten am Institut für Pharmazie (*Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting*) der Universität Groningen (Niederlande) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Angela Casini (heute: *Chair of Medicinal and Bioinorganic Chemistry*, Cardiff University, Cardiff, Wales) und wurden zum Teil von Pawida Worawutputtapong (B.Sc) durchgeführt.

Die *precision-cut kidney slices* (PCKS) wurden aus männlichen, 250 - 450 g schweren Wistar-Ratten (Charles River, Kisslegg) präpariert, die unter einem 12 h-Hell-/Dunkelzyklus bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten wurden. Die Tiere hatten dabei freien Zugang zu Wasser und Standard-Trockenfutter. Alle Tierexperimente wurden vom *Committee for Care and Use of Laboratory Animals* der Universität Groningen bewilligt und strikt nach den Regierungs- bzw. internationalen Richtlinien durchgeführt.

Die aus den Ratten frisch isolierten Nieren wurden sagittal geschnitten und anschließend mit Hilfe einer manuellen Biopsie-Stanze zylindrische Blöcke ($\varnothing = 7$ mm) aus dem Cortex der Nieren (Nierenrinde) hergestellt. Aus diesen Blöcken wurden dann die PCKS mit einem Feuchtgewicht von 5 mg in eiskaltem, mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) gesättigtem Krebs-Henseleit-Puffer an einem Krumdieck Mikrotom (Krumdieck *tissue slicer*; Alabama R&D, Munford, AL, USA) geschnitten. Vor Zugabe der Testverbindungen wurden die PCKS für 1 h bei 37 °C in Williams Medium E inkubiert. Das Medium (pH 7,4) war ebenfalls mit einem Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch (80 % O₂ und 20 % CO₂) gesättigt und mit D-Glucose-Monohydrat (275 mg/mL) sowie Penicillin-Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL) versetzt. Danach wurden die Gewebeschnitte in frisches Medium überführt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cisplatin bzw. der Metallkomplexe für 24 h unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Unbehandelte PCKS wurden entsprechend als Negativkontrollen verwendet. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die PCKS einzeln in Eppendorf *Safe-Lock Tubes*, die je mit 1 mL Ultraschall-Puffer (70 % Ethanol, 2 mM EDTA) und Glasperlen (Glas-MiniBeads) gefüllt waren, überführt. Die Gewebeschnitte wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Bestimmung der Vitalität durch Messung der ATP-Level (*ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II*, Roche) in den PCKS bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der ATP-Level wurden die Proben wieder aufgetaut und mit einem *MiniBead-Beater* (Biospec Products) für 45 s homogenisiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des ATP-Gehalts der Proben nach Herstellerangaben. Für die Normalisierung der ATP-Level wurden die Proteinkonzentrationen der PCKS-Proben nach Lowry bestimmt (*Bio-Rad DC Protein Assay*, Bio-Rad), wobei BSA für eine Eichgerade verwendet wurde. Die Gewebeproben wurden dafür über Nacht bei 37 °C getrocknet, mit 200 µL einer 5 M NaOH-Lösung versetzt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden je 800 µL Milli-Q Wasser zu den Proben gegeben und diese erneut am *MiniBead-Beater* für 40 s homogenisiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand des *Bio-Rad DC Protein Assay* Protokolls. Der ATP-Gehalt der Proben wurde schließlich anhand der jeweiligen Proteinkonzentration normiert und in pmol/ μ g Protein angegeben. Die Vitalität der unbehandelten PCKS (Negativkontrollen) wurde gleich 100 % gesetzt und die der behandelten Proben zu diesem Referenzwert ins Verhältnis gesetzt. Für jeden Komplex wurde die *ex vivo* Toxizität in mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Ansätzen pro Konzentration ermittelt.

Darüber hinaus wurden morphologische Veränderungen in den PCKS, die durch die Behandlung mit den Metallkomplexen ausgelöst wurden, für jeweils drei Gewebeschnitte (pro Komplex und Konzentration) untersucht. Die PCKS wurden hierfür mit geeigneten Konzentrationen analog zur oben bereits beschriebenen Vorgehensweise für 24 h mit den Testsubstanzen behandelt. Anschließend erfolgte über Nacht eine Fixierung in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung (4 °C), bevor die PCKS in 70 %-iges Ethanol überführt wurden. Die Dehydratisierung und die Einbettung der PCKS in Paraffin sowie die Herstellung der histologischen Schnitte und deren Färbung mit Hämatoxylin und Eosin erfolgten nach histologischen Standardprotokollen.

3.15 Xenograft-Mausmodell

Um die antitumorale Wirkung ausgewählter Goldkomplexe auch *in vivo* zu untersuchen wurde ein Xenograft-Mausmodell herangezogen. Die Tierexperimente wurden von Leonard Kaps (M.Sc.) am Institut für Translationale Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Detlef Schuppan durchgeführt und von der Landesregierung in Rheinland-Pfalz genehmigt.

Die für das Xenograft-Mausmodell verwendeten Balb/c Mäuse wurden unter einem 12 h-Hell-/Dunkelzyklus bei konstanter Temperatur sowie Luftfeuchtigkeit gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und konventionellem Trockenfutter. Für die Erzeugung der künstlichen Tumore wurde die stark metastasierende, von Mäusen abstammende B16-F10 Melanomzelllinie (Abteilung für Dermatologie, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) verwendet und von dieser pro Flanke einer Maus 2×10^5 Zellen (in 200 mL PBS) subkutan appliziert. Die Goldkomplexe wurden für die *in vivo* Studien zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit PBS weiter verdünnt.

Pro Substanz wurden zwei bis drei Mäuse verwendet und diese durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen mit den Goldkomplexen behandelt. Die Behandlung der Kontrollmäuse erfolgte mit einer analogen Menge an reinem DMSO (in PBS). Beginnend mit dem Tag der ersten Injektion wurde die Größe der Tumor-Xenografte täglich dokumentiert. Die Volumina der Tumore (V_T) wurden mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung 4 ermittelt, wobei a die kürzere und b die längere Dimension des Tumors darstellt.

$$V_T = a^2 \times b \times 0,5 \quad (4)$$

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Antiproliferative und antivaskuläre Eigenschaften von Gold(I)-NHC-Komplexen

4.1.1 Combretastatin A4 abgeleitete Gold(I)-NHC-Komplexe

Ungesättigte Imidazole stellen einen der häufigsten Ligandentypen von *N*-heterozyklischen Carbenkomplexen dar (vgl. Abbildung 7, Abschnitt 1.2), welche zunächst vor allem bei der Katalysatoren in der organischen Chemie eingesetzt wurden. Mittlerweile sind Imidazolbasierte Carbenkomplexe verschiedener Übergangsmetalle, insbesondere solche mit Goldfragmenten, auch in den Fokus der medizinischen Chemie gerückt und werden als potentielle neue Antitumorwirkstoffe untersucht.^{27,28,104} Ihre einfache Synthese sowie hohe Variabilität machen NHC-Metallkomplexe zu vielversprechenden, neuartigen *metallo*drugs mit unterschiedlichen antitumoralen Eigenschaften, die genau wie die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe leicht angepasst und optimiert werden können. Dabei zeigen NHC-Metallkomplexe ein breites Spektrum an Wirkmechanismen, welches unter anderem die direkte Interaktion mit DNA oder Apoptose-relevanten Proteinen, die Störung des Zellzyklus und mitochondrialer Prozesse sowie die Inhibition bzw. Modulation essentieller, zellulärer Enzyme beinhaltet. Die Kombination von Goldfragmenten mit bioaktiven Liganden stellt eine vielversprechende Strategie zur Entwicklung effektiver, metallbasierter Wirkstoffe dar, wie es z.B. auch bereits durch *Ott et al.* für verschiedene Naphthalimid-substituierte Gold(I)-Phosphin- oder auch Gold(I)-NHC-Komplexe gezeigt werden konnte (vgl. Abschnitt 1.3).^{90,94} In diesem Rahmen synthetisierte unsere Arbeitsgruppe Gold(I)-Komplexe mit Imidazolyl-Liganden, die von dem natürlich auftretenden, vaskular-disruptiven Naturstoff CA-4 abgeleitet und bezüglich ihrer antitumoralen Aktivität optimiert waren. So sollte die intrinsische antivaskuläre Aktivität der CA-4-analogen Imidazole mit den bekannten antiproliferativen Eigenschaften von Goldfragmenten kombiniert werden. Erste Ergebnisse zur Toxizität und dem möglichen zellulären Wirkmechanismus einer kleinen Serie dieser CA-4 abgeleiteten Gold(I)-NHC-Komplexe (**15** und **16** in Abbildung 14, Abschnitt 1.3) wurden bereits veröffentlicht.^{121,122} Goldkomplex **15a**, welcher die für die antitumorale sowie vaskular-disruptive Wirkung von CA-4 essentiellen Methoxy-Substitutionen aufweist, zeigte dabei eine gute antiproliferative Aktivität gegenüber einer Auswahl an Krebszellen mit IC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich sowie eine deutliche Selektivität für diese im Vergleich zu nicht-malignen Fibroblasten.

Darüber hinaus konnten für Komplex **15a** sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antivaskuläre Eigenschaften nachgewiesen werden. Überraschenderweise beruhten diese jedoch nicht, wie im Fall der natürlichen Leitstruktur CA-4 und der hiervon abgeleiteten Imidazole (**14**), auf einer Interaktion mit Tubulin. Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden in einer *meta*-Position des A-Rings Halogen-substituierte Derivate (**21**) von **15a** hergestellt (Abbildung 21), da sich solche Substitutionen in vorherigen Studien mit ähnlichen Oxazolen und Imidazolen als äußerst effektiv erwiesen hatten. Des Weiteren wurden auch die entsprechenden Halogen-haltigen *N*-Ethyl-Analoga (**22b/c**) synthetisiert (Abbildung 21). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde der zelluläre Wirkmechanismus dieser Gold(I)-Monocarbenkomplexe näher beleuchtet und die Ergebnisse der hierfür durchgeführten biologischen Analysen sind im Nachfolgenden beschrieben.

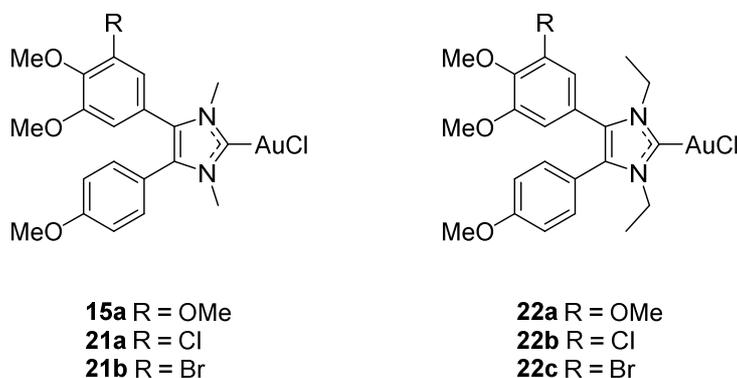


Abbildung 21: CA-4-abgeleitete *N*-heterozyklische Gold(I)-Carbenkomplexe (**15a**, **21a/b** und **22a-c**) mit antitumoraler und antivaskulärer Wirkung.

Zunächst wurde jedoch mittels eines Vitalitätstests die Zytotoxizität der Goldkomplexe **15a**, **21** und **22** gegenüber einer kleinen Auswahl an humanen Krebszellen bestimmt und diese untereinander verglichen (Tabelle 1). Hierbei konnte festgestellt werden, dass auch die neuartigen, CA-4-abgeleiteten Goldkomplexe nach 72 h Inkubationszeit IC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Bereich erreichen. Eine deutliche Wirkungssteigerung konnte dabei durch eine Bromid-Substitution in *meta*-Position des A-Rings (**21b**) bzw. einen Austausch der *N*-Methylgruppen des Imidazols durch Ethylreste (**22a**) erreicht werden, sodass die beiden entsprechenden Komplexe einstellige mikromolare IC_{50} -Werte aufweisen. Eine Kombination der beiden genannten Substitutionen führte jedoch nicht zu einer weiteren Erhöhung der antiproliferativen Wirkung (vgl. Komplex **22c**). Insgesamt zeigten sich alle Goldkomplexe gegenüber der multiresistenten KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzelllinie am unwirksamsten und wiesen für diese IC_{50} -Werte auf, die um ein Vielfaches höher waren als die Werte gegenüber den anderen untersuchten Tumorzellen.

Eine Ausnahme hiervon bildet der Chlorid-substituierte Komplex **21a**, welcher an allen Zelllinien ähnliche antiproliferative Eigenschaften zeigte. Der größte und interessanteste Unterschied trat bei den Zytotoxizitäten der beiden rein Methoxy-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **15a** und **22a** auf, welche sich lediglich durch ihre Methyl- bzw. Ethylsubstitution an den Stickstoffatomen des Imidazolrings unterscheiden und auch gegenüber der CA-4-resistenten HT-29-Kolonkarzinomzelllinie wirksam sind. Während der *N*-Methyl-substituierte Komplex **15a** lediglich IC₅₀-Werte im Bereich von 10,8-14,0 µM gegenüber den untersuchten Tumorzelllinien zeigte, war sein entsprechendes *N*-Ethyl-Analogon **22a** um etwa das Vier- bis Zehnfache effektiver (IC₅₀-Werte: 1,1-3,5 µM).

Tabelle 1: IC₅₀-Werte [µM] der CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Carbenkomplexe **15a**, **21** und **22** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszellen. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± Standardabweichung (SD), die jeweils mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests nach 72 h Inkubation bestimmt wurden.

Zelllinie	15a	21a	21b	22a	22b	22c
518A2	12,0 ± 0,3	14,5 ± 1,7	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,3	10,9 ± 1,8	2,0 ± 0,3
Panc-1	14,0 ± 1,0	13,6 ± 0,6	1,6 ± 0,5	2,7 ± 0,2	11,5 ± 1,0	4,4 ± 0,2
MCF-7/Topo	10,9 ± 1,0	24,2 ± 2,0	2,0 ± 0,7	2,2 ± 0,5	10,5 ± 1,0	3,9 ± 0,1
KB-V1/Vbl	> 50	18,4 ± 1,9	23,6 ± 1,2	28,1 ± 1,0	> 50	41,1 ± 1,4
HT-29	10,8 ± 0,7	n.b.	n.b.	1,1 ± 0,2	n.b.	n.b.

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, kolorektale HT-29-Adenokarzinomzellen; n.b. – nicht bestimmt

Aus diesem Grund wurden diese beiden Derivate für weitere Untersuchungen ausgewählt, um Hinweise auf die zellulären Wirkmechanismen der CA-4-basierten Gold(I)-Carbenkomplexe und möglicherweise somit auch Aufschluss über die Gründe für die unterschiedliche antiproliferative Aktivität der Komplexe zu erhalten. Neben den Auswirkungen der beiden Goldkomplexe **15a** und **22a** auf die Organisation des Zytoskeletts sowie auf den Ablauf des Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen, wurden auch ihre antimetastatischen und antivaskulären Eigenschaften sowohl mit Hilfe von *in vitro* als auch *in vivo* Modellen analysiert. Wie bereits zuvor für **15a** beschrieben (vgl. Abschnitt 1.3), konnte anhand von *in vitro* Polymerisationsassays im Gegensatz zum zugrundeliegenden Naturstoff und den hiervon

abgeleiteten Imidazolen (**14**) keine Interaktion des Komplexes mit Tubulin festgestellt werden.¹²¹ In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurden sowohl für den Komplex **15a** als auch für **22a** keinerlei Effekte auf das Mikrotubulizytoskelett von 518A2-Melanomzellen beobachtet (s. Anhang, Abbildung A-1). Vermutlich resultiert die Komplexierung der Imidazol-Liganden, deren Salze (**14**) äußerst potente Tubulinbinder darstellen,¹¹⁴⁻¹¹⁶ mit Gold in Konformationsänderungen oder schlicht in zu großen Verbindungen, was eine Interaktion der Goldkomplexe mit der Colchicin-Bindestelle des Tubulins sterisch verhindert. Im Gegensatz dazu führten beide Komplexe zu einer Reorganisation von filamentösem Aktin (F-Aktin) in 518A2-Zellen, wobei das *N*-Ethyl-Derivat **22a** die deutlicheren Veränderungen im Aufbau dieser Zytoskelettkomponente hervorrief (Abbildung 22). Während in Kontrollzellen die charakteristische Verteilung von Aktinfilamenten,²³⁶ welche hauptsächlich in der Zellperipherie entlang der Plasmamembran auftreten, beobachtet werden konnte und die 518A2-Zellen viele Aktin-vermittelte Zell-Zellkontakte aufwiesen, führte eine Behandlung der Melanomzellen mit Goldkomplex **15a** bereits zu einer Verringerung der interzellulären Kontakte sowie zu einer leichten Umstrukturierung der typischen F-Aktin-Organisation. Mit **22a** behandelte 518A2-Melanomzellen zeigten weitaus stärkere Veränderungen im Aktinzytoskelett. So lagen hier deutlich weniger Zell-Zellkontakte vor. Die Aktinfilamente erschienen darüber hinaus zum Teil fragmentiert und es konnten vermehrt Aktinstrukturen, die sich über den gesamten Zellkörper erstreckten, detektiert werden. Bei letzteren handelt es sich vermutlich um sogenannte *stress fibers*, die aus Aktinbündeln bestehen und von Zellen unter anderem als Reaktion auf chemischen Stress ausgebildet werden.^{236,237}

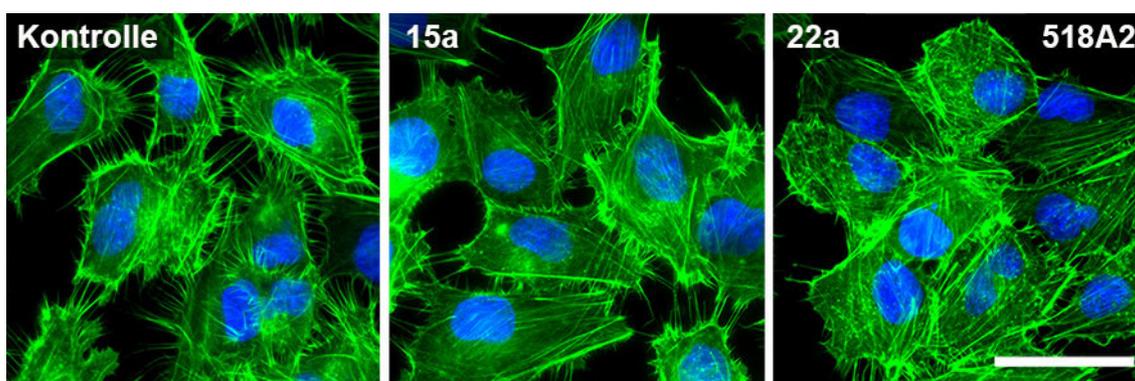


Abbildung 22: Effekte der Goldkomplexe **15a** (10 µM) und **22a** (2,5 µM) auf die Organisation von F-Aktin in 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testverbindungen oder DMF (Kontrolle) behandelt, bevor sie fixiert und anschließend das Aktinzytoskelett (grün) mit Alexa Fluor® 488-konjugiertem Phalloidin sowie die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 µm.

Neben seiner Funktion, der Zelle Form und Stabilität zu verleihen, spielt das Aktinzytoskelett unter anderem auch beim Ablauf des Zellzyklus und der Zellteilung eine entscheidende Rolle, weshalb Störungen in der Dynamik bzw. Organisation dieser Zytoskelettkomponenten auch Auswirkungen auf den Zellzyklus haben können.²³⁸ Daher sollte mit Hilfe einer Propidiumiodidfärbung durchflusszytometrisch untersucht werden, ob die Goldkomplexe **15a** und **22a** Effekte auf den Ablauf des Zellzyklus in 518A2-Melanomzellen zeigen. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Behandlung der 518A2-Zellen mit 10 μM von **15a** hatte keinerlei Effekt auf den Zellzyklus der Tumorzellen, sodass bei der durchflusszytometrischen Analyse eine ähnliche Verteilung der Melanomzellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus erhalten wurde wie bei den unbehandelten Proben. Der *N*-Ethyl-substituierte Goldkomplex **22a** führte dagegen zu einer signifikanten Veränderung des Zellzyklusprofils und arretierte die 518A2-Melanomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Die stärkere Beeinträchtigung des Aktinzytoskeletts durch **22a** korreliert also mit einem signifikanten G1-Arrest der 518A2-Zellen, welcher sich durch einen starken Anstieg der G1-Zellen auf etwa 70% der gesamten Population sowie eine deutliche Verringerung der Zellen in den darauf folgenden Zellzyklusphasen (S und G2/M) auszeichnet.

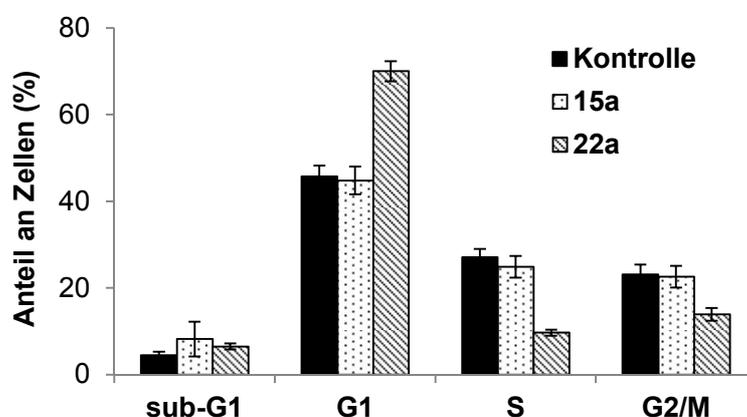


Abbildung 23: Auswirkungen der Gold(I)-NHC-Komplexe **15a** (10 μM) und **22a** (2,5 μM) auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und der G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Das Aktinzytoskelett übernimmt auch bei der Zellmigration eine essentielle Funktion und ist daher auch direkt an der Tumordinvasion und Metastasierung von Krebszellen beteiligt.^{236,239,240} Aus diesem Grund stellt F-Aktin neben den Mikrotubuli ebenfalls ein vielversprechendes *target* in der Tumorthherapie und für die Entwicklung von neuen, antimetastatischen Wirkstoffen dar.^{165,241–243}

Da vor allem der *N*-Ethyl-substituierte Goldkomplex **22a** signifikante Effekte auf das Aktinzytoskelett gezeigt hatte, wurden die beiden Testverbindungen **15a** und **22a** auf ihr Potential, die Migration von 518A2-Melanomzellen zu inhibieren, in sogenannten *Wound-Healing* Assays analysiert. Dieser Assay stellt eine einfache *in vitro* Methode dar, mit deren Hilfe erste Hinweise auf eine mögliche antimigratorische bzw. antimetastatische Wirkung von Testverbindungen erhalten werden können. Hierfür lässt man die 518A2-Melanomzellen zunächst über einen Zeitraum von 24 h zu einer annähernd konfluenten Monolayerschicht heranwachsen und führt eine künstliche Wunde in Form eines schmalen Streifens in den Zellrasen ein. Die potentielle inhibitorische Wirkung der Komplexe **15a** und **22a** auf die Fortbewegung der 518A2-Zellen und somit auf die Fähigkeit die Wunde wieder zu schließen wurde anschließend im Vergleich zu einer unbehandelten Negativkontrolle lichtmikroskopisch analysiert (Abbildung 24). Dabei konnte festgestellt werden, dass der Komplex **15a**, welcher bereits in den zuvor beschriebenen Assays keine oder nur eine geringe Aktivität zeigte, scheinbar keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber der Motilität der Melanomzellen aufweist. So waren die Zellen der mit **15a** behandelten Proben genau wie die der unbehandelten Negativkontrollen in der Lage die künstlich eingeführten Wunden innerhalb von 48 h wieder zu schließen. Komplex **22a** hemmte den Wundheilungsprozess dagegen deutlich, sodass auch nach 48-stündiger Inkubation der 518A2-Zellen mit der Testsubstanz immer noch ein Spalt im Zellrasen zu beobachten war.

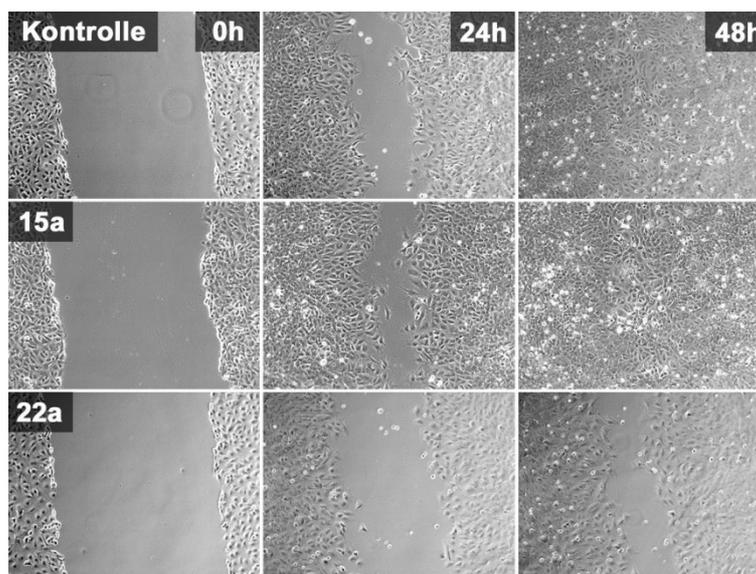


Abbildung 24: Inhibitorische Effekte der Goldkomplexe **15a** (10 μ M) und **22a** (2,5 μ M) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Ob dieser Effekt das Resultat einer direkten Inhibition der Zellmigration ist, oder auch die Arretierung der Melanomzellen im Zellzyklus für die Inhibition der Wundheilung mitverantwortlich ist, lässt sich jedoch nicht aus einem solchen einfachen *Wound-Healing* Assay erschließen. Auch weitere Faktoren, die *in vivo* für eine aktive Migration von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix und somit bei der Invasion von Gewebe und der Metastasierung notwendig sind, werden in diesem zweidimensionalen Modellsystem nicht berücksichtigt. Hierzu zählt unter anderem der Abbau bzw. die Reorganisation der extrazellulären Matrix durch proteolytische Enzyme, die sogenannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Da diese Enzyme somit ein vielversprechendes *target* für anti-metastatische Verbindungen darstellen, wurden die Effekte der Gold(I)-NHC-Komplexe **15a** und **22a** auf die Expressions- und Sekretionslevel der aktiven MMP-2 und MMP-9 in 518A2-Melanomzellen mit Hilfe einer Gelatine-Zymographie untersucht. Die Aufnahmen repräsentativer Zymographie-Gele sind in Abbildung 25 zusammengefasst. Erneut war lediglich der *N*-Ethyl-substituierte Komplex **22a** gegenüber den 518A2-Melanomzellen aktiv und bewirkte eine deutliche Verringerung des intra- (Zelllysate) sowie extrazellulären (Medium) Levels an aktiver MMP-2 in den beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen. Ein Effekt auf die MMP-9 konnte für den Komplex **22a** nicht beobachtet werden.

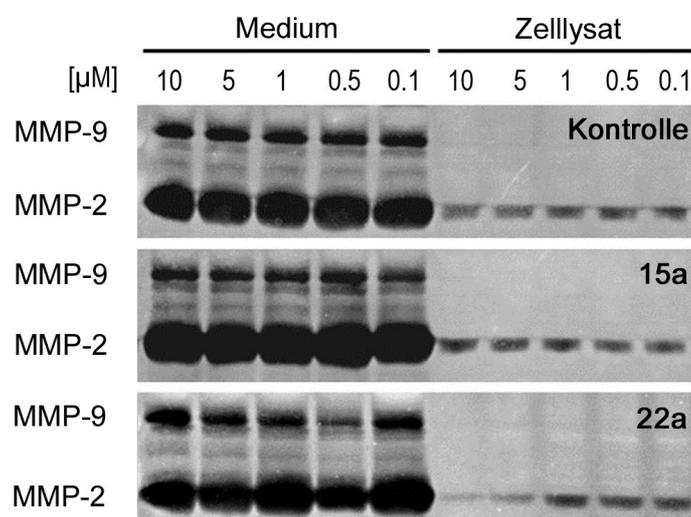


Abbildung 25: Effekte der CA-4-abgeleiteten Goldkomplexe **15a** und **22a** auf die extra- (Medium) und intrazellulären (Zelllysate) Anteile an aktiver MMP-9 und MMP-2 von 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe (0,1 - 10 µM) inkubiert, bevor die Medium- und Zelllysateproben aufbereitet und anschließend elektrophoretisch in einem Gelatine-haltigen Gel aufgetrennt wurden. Pro Probe wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Es sind die Negativbilder der Coomassie-gefärbten Gele gezeigt.

Insgesamt konnte die MMP-9 bei allen analysierten Proben jedoch auch ausschließlich im Zellkulturmedium (extrazellulär) detektiert werden, da die Proteinase scheinbar fast vollständig von den 518A2-Zellen sekretiert wird und somit intrazellulär nur in einer äußerst geringen Menge vorliegt, die anhand der Gelatine-Zymographie nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz zu seinem *N*-Ethyl-Analogon **22a** führte die Behandlung der 518A2-Zellen mit dem Goldkomplex **15a** genau wie bei den mit DMF versetzten Kontrollproben weder im Medium noch im Zellysate zu einer Veränderung der Mengen der beiden untersuchten MMPs. Die Ergebnisse aus dem *Wound-Healing* Assay und der Gelatine-Zymographie zusammenfassend, konnte also lediglich für den Gold(I)-NHC-Komplex **22a** ein vielversprechendes, antimetastatisches Potential festgestellt werden.

Schließlich sollte die antivaskuläre Aktivität der beiden CA-4-abgeleiteten Komplexe **15a** und **22a** sowohl *in vitro* anhand von *Tube Formation* Assays mit vaskulären Endothelzellen als auch *in vivo* mit Hilfe des CAM Assays untersucht werden. Beim *Tube Formation* Assay werden vaskuläre Endothelzellen, wie z.B. HUVECs, auf Matrigel kultiviert, welches die biologisch aktive extrazelluläre Matrix nachahmt und der Basalmembranmatrix von Säugtieren ähnelt. Die HUVECs bauen innerhalb dieser Matrix stark verzweigte Netzwerke aus tubulären Strukturen auf (vgl. Abbildung 26), welche den Vorläufern von reifen Blutgefäßen *in vivo* entsprechen. Die Inkubation der HUVECs mit **15a** hatte nur einen geringen Effekt auf die Ausbildung der tubulären Strukturen. So konnten die Endothelzellen immer noch Netzwerke ausbilden, wobei die einzelnen Verknüpfungen und Knotenpunkte jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle nicht mehr genauso definiert erschienen.

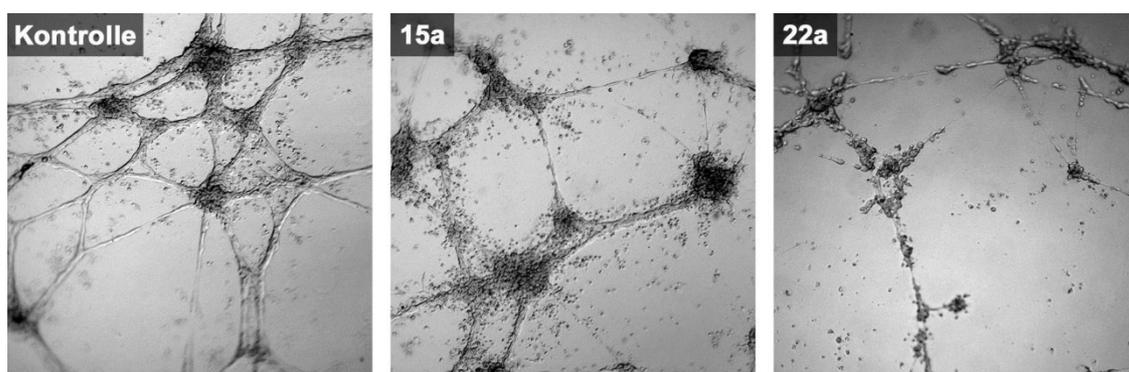


Abbildung 26: Inhibitorische Effekte der Goldkomplexe **15a** und **22a** auf die Ausbildung von hoch organisierten, tubulären Netzwerken durch HUVECs auf Matrigel. Die vaskulären Endothelzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Testverbindungen versetzt und für 24 h auf Matrigel inkubiert, bevor die lichtmikroskopische Dokumentation erfolgte. Gezeigt sind diejenigen Bilder der HUVECs, welche der geringsten effektiven Konzentration der Komplexe entsprechen (**15a**: 19 μ M und **22a**: 6,2 μ M).

Komplex **22a** inhibierte dagegen fast vollständig die Entstehung der für HUVECs typischen Netzwerke, sodass nach 24 h nur noch vereinzelte „Knotenpunkte“ und Fragmente von tubulären Strukturen beobachtet werden konnten. Die beschriebenen Ergebnisse des *Tube Formation Assays* konnten anhand einer quantitativen Auswertung der in Abbildung 26 dargestellten Aufnahmen mit Hilfe von *ImageJ* sowie dem integrierten *Angiogenesis Analyzer Plugin* (G. Carpentier, *Angiogenesis Analyzer for ImageJ*) eindeutig bestätigt werden. Die aus der Analyse erhaltenen Daten für die Anzahl an Maschen und Segmenten sowie die Gesamtlänge der Segmente in den durch die HUVECs aufgebauten Netzwerken sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengefasst. Hierbei handelt es sich um Parameter, die die Komplexität der Netzwerke charakterisieren und eine Quantifizierung der inhibitorischen Effekte von antiangiogenen Substanzen ermöglichen. Die Analyse der Aufnahme mit den Kontrollzellen ergab typischerweise hohe Werte für die genannten Parameter. Hieraus wird, wie schon bei der rein qualitativen Analyse der Bilder, deutlich, dass die unbehandelten HUVECs nach 24 h ein großes, tubuläres Netzwerk mit vielen Verzweigungen ausgebildet haben. Die mit dem *N*-Methyl-substituierten Komplex **15a** behandelten, vaskulären Endothelzellen waren, wie bereits oben beschrieben, in der Lage ein ähnlich verzweigtes Netzwerk aufzubauen, auch wenn dessen Segmente und Knotenpunkte etwas weniger definiert waren. Dies bestätigt sich auch anhand der im Vergleich zur Kontrolle sehr ähnlichen Werte für die untersuchten Parameter. Im Gegensatz dazu sind HUVECs, die mit dem *N*-Ethyl-substituierten Goldkomplex **22a** behandelt wurden, kaum noch in der Lage geordnete, tubuläre Strukturen auszubilden, was sich auch in der deutlichen Reduktion der Anzahl an bestehenden Maschen bzw. Segmenten sowie der Verringerung der Gesamtlänge der Segmente widerspiegelt. Die Ergebnisse des *Tube Formation Assays* weisen also insgesamt eindeutig auf eine signifikante antivaskuläre Wirkung von **22a** hin.

Tabelle 2: Ergebnisse der quantitativen Analyse der inhibitorischen Effekte von **15a** (19 μ M) und **22a** (6,2 μ M) auf die Ausbildung von hoch organisierten, tubulären Netzwerken durch HUVECs auf Matrigel nach 24 h Inkubation. Angegeben sind die mit Hilfe von *ImageJ* und dem *Angiogenesis Analyzer Plugin* erhaltenen Werte für die Anzahl an Maschen bzw. Segmenten sowie die Gesamtlänge der Segmente in den durch die HUVECs aufgebauten Netzwerken. Analysiert wurden die in Abbildung 26 gezeigten Aufnahmen des *Tube Formation Assays*.

	Kontrolle	15a	22a
Anzahl der Maschen	49	46	3
Anzahl der Segmente	182	182	32
Gesamtlänge der Segmente (Pixel)	7091	6620	2336

Mit Hilfe des CAM Assays können neben einer antiangiogenen Aktivität auch vaskulär-disruptive Effekte in einem *in vivo*-Modellsystem einfach nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen von **15a** und **22a** im CAM Assay konnte festgestellt werden, dass beide Komplexe, genau wie der Naturstoff CA-4 und seine analogen Imiadzol-Derivate, von denen die Gold(I)-NHC-Komplexe abgeleitet sind, eine signifikante Blutgefäß-zerstörende Wirkung besitzen. Überraschenderweise zeigte sich hierbei der *N*-Methyl-substituierte Goldkomplex **15a** im Gegensatz zu allen anderen durchgeführten Experimenten als die Effektivere der beiden Verbindungen. **15a** hatte jedoch auch starke Auswirkungen auf das umliegende Gewebe der Blutgefäße, wodurch sich dieses nach 24 h deutlich zusammengezogen und eine Art „Vernarbung“ gebildet hatte. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine Entzündungsreaktion der Membran und somit um eine Nebenwirkung, die für einen potentiellen antivaskulären Wirkstoff unerwünscht ist und für das *N*-Ethyl-Analogon **22a** nicht beobachtet werden konnte.

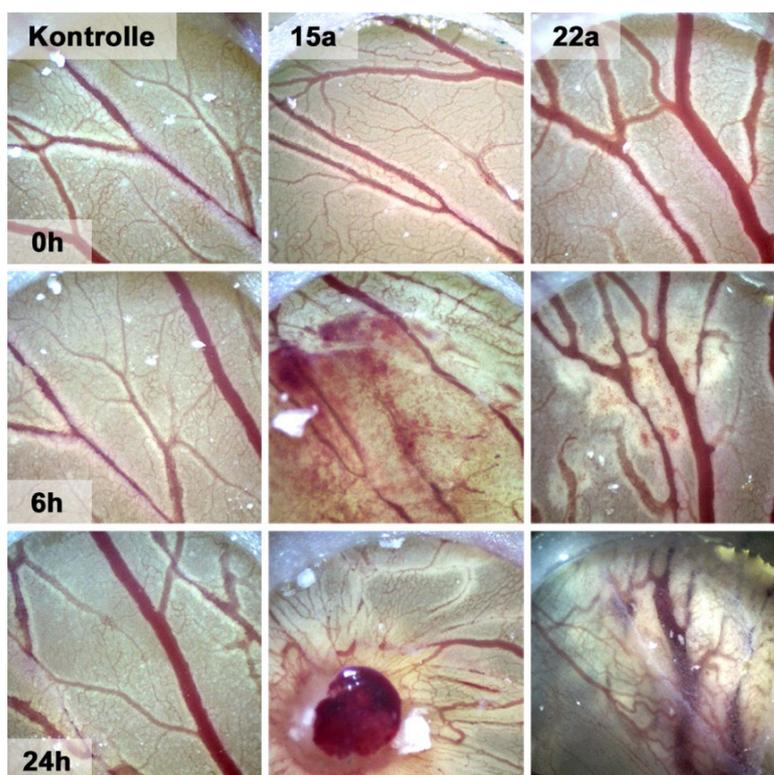


Abbildung 27: Antivaskuläre Aktivität der Gold(I)-NHC-Komplexe **15a** und **22a** im CAM Assay. Es wurden jeweils 10 nmol der Komplexe bzw. eine analoge Menge an DMF (Kontrolle) aufgetragen und Veränderungen der Blutgefäße nach 6 h und 24 h Inkubation mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops dokumentiert (60× Vergrößerung).

Wie bereits in der Einleitung unter Abschnitt 1.3 beschrieben, stellen Gold(I)-Biscarbenkomplexe im Vergleich zu ihren Monocarben-Analoga in der Regel die effektiveren, antitumoralen Verbindungen dar.^{27,28} Daher wurden die entsprechenden Biscarbenkomplexe (**23** und **24**, Abbildung 28) von **15a**, **21** und **22** hergestellt und in Analogie zu den Monocarbenkomplexen auf ihre antiproliferative sowie antivaskuläre Wirkung hin untersucht.¹⁶⁴ Neben den bereits für die Gold(I)-NHC-Komplexe **15a**, **21** und **22** durchgeführten Assays, wurden darüber hinaus auch die zelluläre Aufnahme (**23a** und **24a**) sowie die antitumorale *in vivo*-Aktivität (**24a** und **24c**) von jeweils zwei ausgewählten Biscarben-komplexen analysiert.

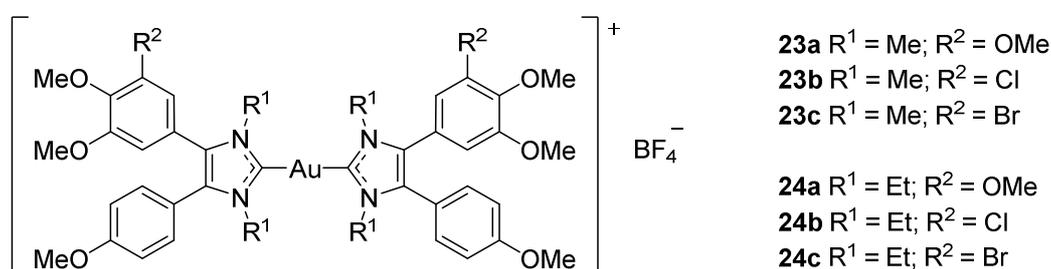


Abbildung 28: CA-4-abgeleitete Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23a-c** und **24a-c** mit antimetastatischem Potential.

Tatsächlich konnte mit Hilfe von Proliferationsassays festgestellt werden, dass die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** deutlich effektiver gegenüber den untersuchten Tumorzelllinien sind als ihre analogen Monocarben-Derivate **15a**, **21** und **22**. So zeigten alle Biscarbenkomplexe signifikante antiproliferative Eigenschaften mit IC₅₀-Werten, die vorwiegend im unteren submikromolaren Bereich liegen (Tabelle 3). Dabei konnte jedoch weder durch die Variation der Stickstoff-Substituenten im Imidazolring noch durch eine Halogen-Substitution ein eindeutiger Trend für eine signifikante Wirkungssteigerung beobachtet werden, wie es zum Beispiel bei der *N*-Ethyl-Substitution im Monocarbenkomplex **22a** im Vergleich zum entsprechenden *N*-Methyl-Derivat **15a** der Fall war. Während sich die vollständig Methoxy-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23a** und **24a** gegenüber der CA-4-resistenten HT-29-Kolonkarzinomzelllinie am effektivsten erwiesen, besitzen ihre Chlor-substituierten Analoga **23b** und **24b** die stärkste antiproliferative Aktivität gegenüber den mehrfach resistenten MCF-7/Topo-Brustkrebszellen. Im Gegensatz dazu konnte für die Brom-Derivate **23c** und **24c** keine eindeutige Zelllinienspezifität nachgewiesen werden.

Genau wie die Gold(I)-Monocarbenkomplexe **15a**, **21** und **22** waren auch die Biscarbenkomplexe **23** und **24** gegenüber der multi-resistenten KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzelllinie am unwirksamsten (IC_{50} -Werte $> 1 \mu\text{M}$). Die kontinuierlich mit Vinblastin behandelten KB-V1/Vbl-Zellen überexprimieren das P-Glykoprotein (P-gp), welches die *multidrug*-Resistenz in diesen Krebszellen vermittelt und bei dem es sich um einen sogenannten ABC-Efflux-Transporter handelt.^{137,138} Daher sollte nun überprüft werden, ob die Komplexe **23** und **24** Substrate für P-gp darstellen und möglicherweise aufgrund dieser Tatsache eine solch geringe Effektivität gegen die Zervixkarzinomzellen zeigen. Hierfür wurden die KB-V1/Vbl-Zellen mit dem kompetitiven P-gp-Inhibitor Verapamil vorbehandelt und anschließend die antiproliferative Aktivität der Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** erneut bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den untersuchten Biscarbenkomplexen tatsächlich um P-gp-Substrate handelt, da ihre Aktivität durch Inhibition des Efflux-Transporters gesteigert werden konnte. Dabei war das Ausmaß der Wirkungssteigerung von der *meta*-Substitution am A-Ring abhängig.

Tabelle 3: IC_{50} -Werte [μM] der CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszellen. Bei den IC_{50} -Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen \pm Standardabweichung (SD), die jeweils mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests nach 72 h Inkubation bestimmt wurden.¹⁶⁴

	23a	23b	23c	24a	24b	24c
518A2	0,46 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02	0,43 \pm 0,04	0,43 \pm 0,04	0,23 \pm 0,06
Panc-1	0,40 \pm 0,07	0,16 \pm 0,01	0,26 \pm 0,00	0,19 \pm 0,07	0,36 \pm 0,04	0,18 \pm 0,01
HT-29	0,08 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
MCF-7/Topo	0,18 \pm 0,04	0,06 \pm 0,00	0,15 \pm 0,06	0,08 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02
MCF-7/Topo + Fumitr. C	0,19 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,10 \pm 0,01
KB-V1/Vbl	7,7 \pm 0,3	2,0 \pm 0,3	3,9 \pm 0,5	3,7 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,0
KB-V1/Vbl + Verapamil	2,9 \pm 0,3	0,23 \pm 0,03	0,45 \pm 0,06	1,3 \pm 0,1	0,22 \pm 0,02	0,20 \pm 0,05

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, kolorektale HT-29-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen (optional für 24 h mit Fumitremorgin C vorbehandelt), KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen (optional für 24 h mit Verapamil vorbehandelt)

Während sich die IC_{50} -Werte für die Halogen-Derivate **23b/c** und **24b/c** auf ein Fünftel bis Zehntel verringerten, erhöhte sich die Aktivität der rein Methoxy-substituierten Komplexe **23a** und **24a** in Anwesenheit des kompetitiven Substrats Verapamil nur um etwa das Zweieinhalb- bis Dreifache. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Vorbehandlung der MCF-7/Topo-Brustkrebszelllinie, die das Brustkrebs-Resistenzprotein (*breast cancer resistance protein*, BCRP) exprimiert,^{134,135} mit dem spezifischen BCRP-Inhibitor Fumitremorgin C¹⁵⁹ zu keinerlei Veränderungen in der ohnehin bereits starken antiproliferativen Aktivität der Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24**. Dies lässt darauf schließen, dass die Komplexe keine Substrate von BCRP sind, und stellt vor allem vor dem Hintergrund, dass BCRP auch an den Resistenzmechanismen von Tumorstammzellen beteiligt ist,²⁴⁴ eine interessante Beobachtung dar.

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde durch Bestimmung der Toxizität der Biscarbenkomplexe **23a** und **24a** in An- und Abwesenheit spezifischer Inhibitoren für einzelne, zelluläre Transporter auch beispielhaft ermittelt, welche Transportwege an der Aufnahme dieser Art von Komplexen in 518A2-Melanomzellen beteiligt sind (Abbildung 29). Für den CA-4- Gold(I)-Monocarbenkomplex **15a** war bereits bekannt, dass dieser trotz seines neutralen Charakters hauptsächlich über die organischen Kationentransporter OCT-1/2 (*organic cation transporters-1/2*, 32 %) und den Kupfertransporter Ctr1 (*copper transporter 1*, 22 %) in 518A2-Zellen aufgenommen wird.¹²¹ Überraschenderweise gelangten die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23a** und **24a**, obwohl es sich hierbei um kationische Verbindungen handelt, zu einem deutlich geringeren Anteil über die OCTs in die Melanomzellen (**23a**: 16 %, **24a**: 19 %), während die Beteiligung des Kupfertransporters Ctr1 annähernd gleich blieb (**23a**: 21 %, **24a**: 14 %). Stattdessen fand die Akkumulation der Biscarbenkomplexe **23a** und **24a** vermehrt über endozytotische Prozesse statt, wobei insbesondere die prozentualen Anteile der über den Na/K-Gradienten (**15a**: 4 %, **23a**: 18 %, **24a**: 10 %) sowie der Clathrin-vermittelten (**15a**: 14 %, **23a**: 21 %, **24a**: 29 %) Endozytose stark anstiegen. Möglicherweise lässt sich dieses veränderte Aufnahmeprofil aufgrund der Tatsache erklären, dass es sich bei den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23a** und **24a** im Vergleich zu den Monocarbenen um relativ große Verbindungen handelt, die nicht mehr durch die Kanäle der Transporter (OCT-1/2 und Ctr1) passen und somit in Vesikel verpackt durch endozytotische Prozesse in die 518A2-Melanomzellen aufgenommen werden.

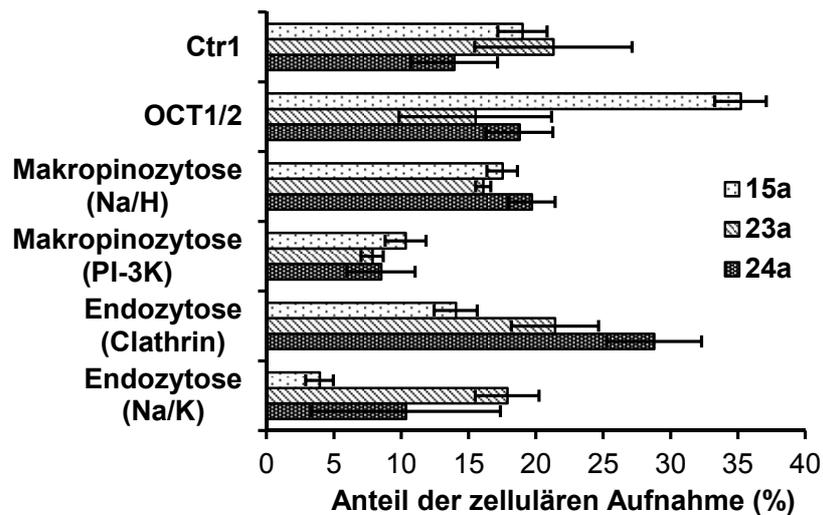


Abbildung 29: Zelluläre Aufnahme der Gold(I)-NHC-Komplexe **15a**, **23a** und **24a** in 518A2-Melanomzellen. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der einzelnen Transportwege an der Gesamtaufnahme (100 %) der Komplexe. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Messungen.

Da die Gold(I)-Monocarbenkomplexe **15a** und **22a** bereits keine Interaktion mehr mit Tubulin eingingen oder die Organisation der Mikrotubuli in 518A2-Melanomzellen beeinflussten,¹²¹ wurde vermutet, dass auch die deutlich größeren und geladenen Biscarben-Derivate **23** und **24** nicht an Tubulin binden. Exemplarisch wurde dennoch der Goldkomplex **23a** zur Überprüfung dieser Hypothese anhand eines Fluoreszenz-basierten *in vitro* Polymerisationsassays auf die Fähigkeit hin getestet, den Aufbau von Mikrotubuli zu inhibieren. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 zusammen mit den Daten für den analogen Monocarbenkomplex **15a** sowie mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle (Vincristin) dargestellt.¹⁶⁴ Anhand der zur Negativkontrolle ähnlichen Kurvenverläufe ist deutlich zu erkennen, dass Komplex **23a** genauso wie sein Monocarben-Derivat **15a** keine Wechselwirkung mit Tubulin eingeht und daher auch keine Hemmung der Tubulinpolymerisation bewirkt. Lediglich Vincristin, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde, führte zu einer signifikanten Inhibition der Polymerisation, wodurch kaum eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten war. Auch in 518A2-Melanomzellen sowie HUVECs hatten die Biscarbenkomplexe **23** und **24** keinerlei Effekte auf das Tubulinzytoskelett, was exemplarisch für die Komplexe **23a** und **24a** im Anhang unter Abbildung A-2 dargestellt ist. So zeigte sich bei Zellen, die mit den Biscarbenkomplexen behandelt wurden, genau wie bei den Negativkontrollen der beiden Zelltypen eine charakteristische Verteilung der Mikrotubuli, welche ausgehend vom Zentrosom (primäres Mikrotubuli-organisierendes Zentrum) in der Nähe des Zellkerns in die Peripherie der Zelle ragen.

Im Gegensatz dazu führte der antitumorale und antivaskuläre Naturstoff CA-4, welcher gegen beide Zelllinien als Referenzsubstanz eingesetzt wurde, zu einer vollständigen und für destabilisierende Tubulin-Binder charakteristischen Fragmentierung der Mikrotubuli (vgl. auch Abbildung A-2 im Anhang).

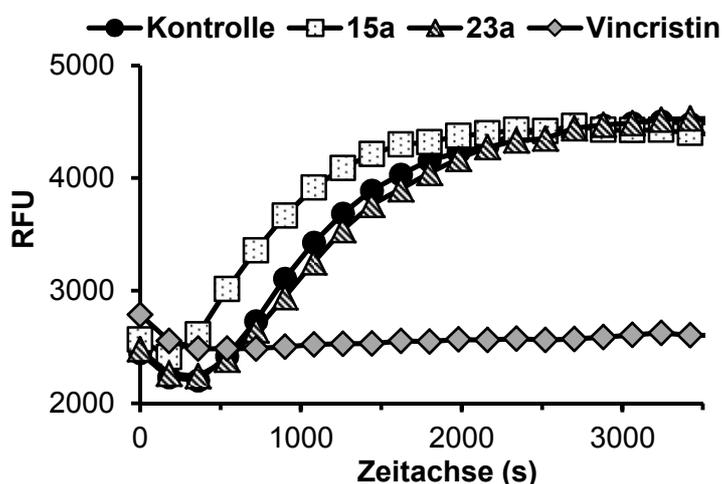


Abbildung 30: Effekte der Gold(I)-NHC-Komplexe **15a** und **23a** sowie von Vincristin (Positivkontrolle) auf die Polymerisation von Tubulin *in vitro*, wobei von jeder Testverbindung 3 μ M eingesetzt wurden. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-basierten Kits von Cytoskeleton und wurde nach Herstellerangaben von Dr. Thomas Müller (Klinik für Innere Medizin IV, Hämatologie und Onkologie, Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg) durchgeführt. RFU - *relative fluorescence units*, relative Fluoreszenzeinheiten.

Während CA-4 einhergehend mit der Zerstörung des Tubulinzytoskeletts die Ausbildung von *stress fibers* in den verwendeten Zelllinien (518A2 und HUVEC) induzierte, führte auch die Behandlung mit den Biscarbenkomplexen in beiden Zelltypen verstärkt zu einer Entstehung von Aktinbündeln, die sich quer durch den Zellkörper ziehen, obwohl für die Komplexe keine Auswirkungen auf die Mikrotubuli beobachtet werden konnten. Die Ausbildung der *stress fibers* war dabei in den vaskulären Endothelzellen insgesamt deutlich intensiver und trat in der Regel schon bei geringeren Konzentrationen der Biscarbenkomplexe im Vergleich zu den untersuchten Tumorzellen ein. In Abbildung 31 sind die Effekte der Biscarbenkomplexe **23a** und **24a** auf das Aktinzytoskelett von 518A2-Melanomzellen und HUVECs bei unterschiedlichen, eingesetzten Konzentrationen beispielhaft zusammengefasst.¹⁶⁴ Zum Teil konnte, wie schon bei den Monocarbenkomplexen **15a** und **22a** (vgl. Abbildung 22), ebenfalls eine Verringerung der interzellulären Kontakte und eine Abrundung sowohl der 518A2-Zellen als auch der humanen, vaskulären Endothelzellen beobachtet werden.

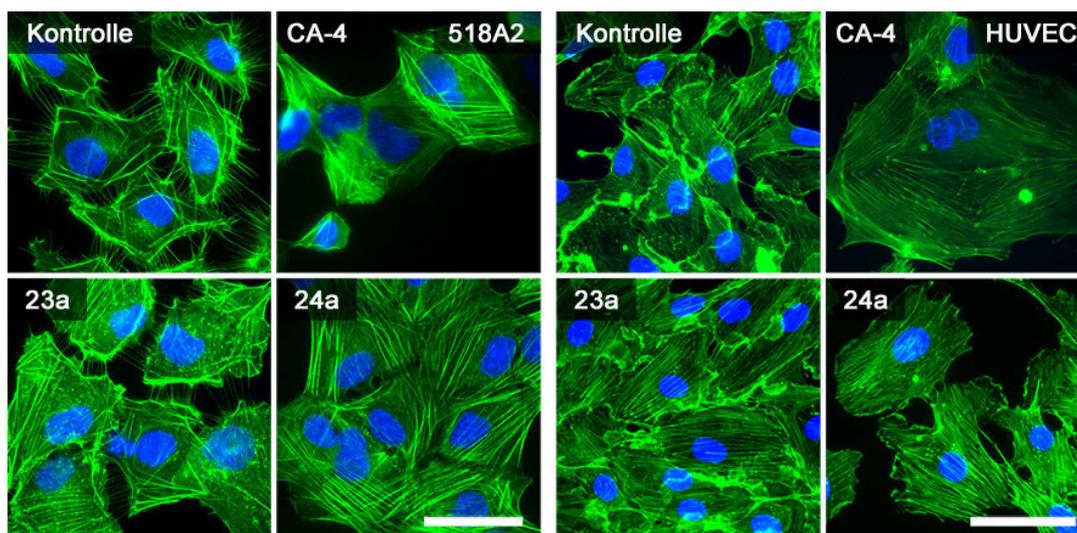


Abbildung 31: Effekte von CA-4 und den hiervon abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23a** und **24a** auf die Organisation von F-Aktin in 518A2-Melanomzellen und vaskulären Endothelzellen (HUVEC). Die Zellen wurden für 24 h mit CA-4 (518A2: 5 nM, HUVEC: 100 nM), **23a** (518A2: 250 nM, HUVEC: 100 nM), **24a** (518A2: 500 nM, HUVEC: 1 μ M) oder DMF (Kontrolle) behandelt, bevor sie fixiert und anschließend das Aktinzytoskelett (grün) mit Alexa Fluor® 488-konjugiertem Phalloidin sowie die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 μ m. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Da die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** eine signifikante Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts bewirkten, sollte weiterhin überprüft werden, ob die *stress fiber*-Induktion wie schon beim *N*-Ethyl-substituierten Monocarbenkomplex **22a** mit einer Arretierung der 518A2-Melanomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus einhergeht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 32 dargestellt. CA-4, welches erneut als Referenz eingesetzt wurde, löste die für Tubulin-Binder typische Arretierung behandelter Krebszellen in der G2/M-Phase aus. In den 518A2-Zellen fällt dieser CA-4-vermittelte Mitose-Arrest jedoch nicht so eindeutig aus wie bei anderen Tumorzellen, da die Melanomzellen relativ sensitiv gegenüber dem Naturstoff sind und daher schnell in die Apoptose übergehen, was auch durch den deutlichen Anstieg des Anteils an Zellen im sub-G1-Bereich deutlich wird. Im Gegensatz hierzu bewirkten alle Goldkomplexe **23** und **24** eine ähnlich starke Akkumulation der 518A2-Zellen in der G1-Phase (~60-70 %), während sich die S- und G2/M-Populationen beträchtlich verringerten. Eine gleichzeitige Veränderung in der Fraktion an apoptotischen Zellen (sub-G1) konnte nicht beobachtet werden. Die durch die Gold(I)-NHC-Komplexe **23** und **24** induzierte Ausbildung von *stress fibers*, welche nicht auf eine Tubulin-Interaktion zurückzuführen ist, korreliert also ebenfalls mit einem signifikanten Arrest der 518A2-Melanomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus.

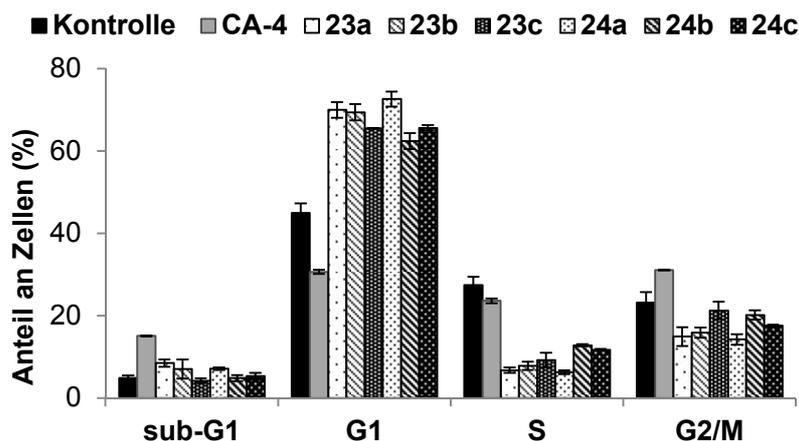


Abbildung 32: Auswirkungen der Gold(I)-NHC-Komplexe **23** und **24** (je 500 nM) im Vergleich zu CA-4 (5 nM) auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmhc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Das antimetastatische Potential der Goldkomplexe **23** und **24** wurde mit Hilfe von *Wound-Healing* Assays und Zymographie-Gelen analysiert, wobei ebenfalls die stark metastasierende 518A2-Melanomzelllinie verwendet wurde. Alle Biscarbenkomplexe beeinträchtigten die Motilität der 518A2-Zellen in den *Wound-Healing* Assays merklich und verhinderten die Schließung der künstlich in die Zellrasen eingeführten Wunden, während die Kontrollzellen eine 100 %-ige „Wundheilung“ nach 48 h Inkubation erreichten (Abbildung 33).¹⁶⁴ Insgesamt waren die *N*-Ethyl-substituierten Goldkomplexe **24** effektivere Inhibitoren der Zellmigration als ihre analogen *N*-Methyl-Derivate **23** und führten zu einer ähnlich starken Hemmung der Wundheilung wie der antitumorale Naturstoff CA-4 (jeweils nur etwa 50 % Wundheilung, vgl. auch Tabelle A-5 im Anhang). Ihre hohe Effektivität beruht dabei vermutlich nur bedingt auf dem induzierten G1-Arrest, der in seiner Intensität vergleichbar zu dem durch den *N*-Ethyl-Monocarbenkomplex **22a** ausgelösten Arrest ist (G1-Anteil jeweils \sim 70 %, vgl. Abbildungen 23 und 32 sowie Tabellen A-2 und A-4 im Anhang). Stattdessen scheint vor allem die im Vergleich zu den Monocarbenkomplexen deutlich stärkere Ausbildung von *stress fibers* für die Hemmung der Wundheilung verantwortlich zu sein,^{236,237} was auf eine tatsächliche antimigratorische bzw. antimetastatische Aktivität der CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** hindeutet. Dies sollte jedoch z.B. anhand des sogenannten *Transwell-Migration* Assays bestätigt werden, der nicht nur eine aktive Bewegung der Zellen, sondern auch den Abbau einer extrazellulären Matrix voraussetzt.^{245–248}

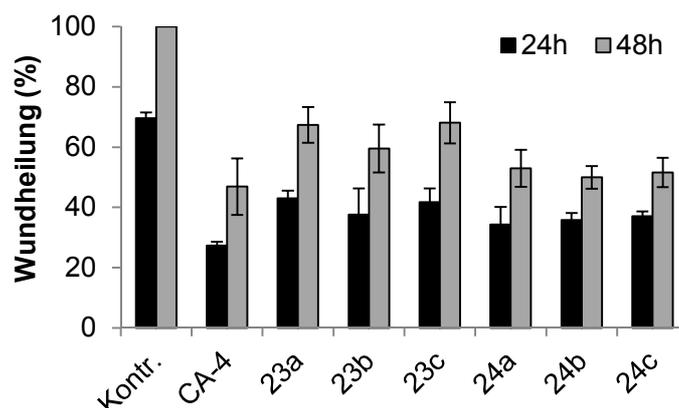


Abbildung 33: Inhibitorische Effekte von CA-4 (5 nM) sowie der Goldkomplexe **23** und **24** (je 500 nM) auf die Motilität von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Die dargestellten prozentualen Anteile der Wundheilung entsprechen Mittelwerten \pm SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Kontr. – Kontrolle. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMed Chem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Wie bereits unter anderem in Abschnitt 3.12 sowie bei den Ergebnissen für die CA-4-abgeleiteten Monocarbenkomplexe **15a** und **22a** beschrieben, werden MMPs von verschiedenen Tumorzellen exprimiert und spielen für diese eine essentielle Rolle bei der Invasion in umliegendes Gewebe sowie beim Eindringen in Lymph- oder Blutgefäße.^{214–218} Durch ihre zentrale Bedeutung für die Metastasierung von Krebszellen stellen diese proteolytischen, Zink-abhängigen Endopeptidasen vielversprechende *targets* neuer anti-metastatischer Wirkstoffe dar. Die Auswirkungen der Behandlung der invasiven 518A2-Melanomzelllinie mit den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23** und **24** auf die extra- sowie intrazellulären Level aktiver MMP-2 und MMP-9 wurden mittels Gelatine-Zymographie untersucht.¹⁶⁴ Bilder repräsentativer Zymographie-Gele sind in der nachfolgenden Abbildung 34 dargestellt. Während keiner der Goldkomplexe **23** und **24** eine Veränderung bezüglich der MMP-9-Konzentration hervorrief, welche erneut ausschließlich im Medium zu detektieren war, induzierten alle Testverbindungen konzentrationsabhängig eine signifikante Abnahme des Anteils an aktiver MMP-2. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Fraktion der intrazellulären MMP-2 jeweils deutlich stärker reduziert wurde als der extrazelluläre Anteil. Dies deutet darauf hin, dass die Biscarbenkomplexe **23** und **24** die Expression der MMP-2 beeinflussen und nicht deren Sekretion inhibieren, wie es bereits für andere (metallbasierte) Verbindungen beobachtet werden konnte.²²¹ Da der Chlor-substituierte *N*-Ethyl-Komplex **24b** bereits bei den geringsten eingesetzten Konzentration von 100 nM und 250 nM zu einer deutlichen Reduktion der MMP-2-Banden (vor allem im

Zellysat) führte und somit die stärksten Effekte auf die MMP-2-Level zeigte, wurde dieser Goldkomplex für eine weiterführende Analyse ausgewählt. Mit Hilfe eines Western-Blots wurde überprüft, ob durch eine Behandlung der 518A2-Zellen mit dem Goldkomplex **24b** wirklich das Proteinlevel und somit die Expression der MMP-2 beeinträchtigt wird (vgl. Abbildung A-3 im Anhang). Das Ergebnis bestätigte, dass **24b** sowohl eine Abnahme des MMP-2-Proteins in den Melanomzellen (Zellysat) als auch im Medium bewirkte. Somit stellen die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** keine direkten Inhibitoren der MMP-2 dar, sondern haben tatsächlich einen Einfluss auf deren Expression.

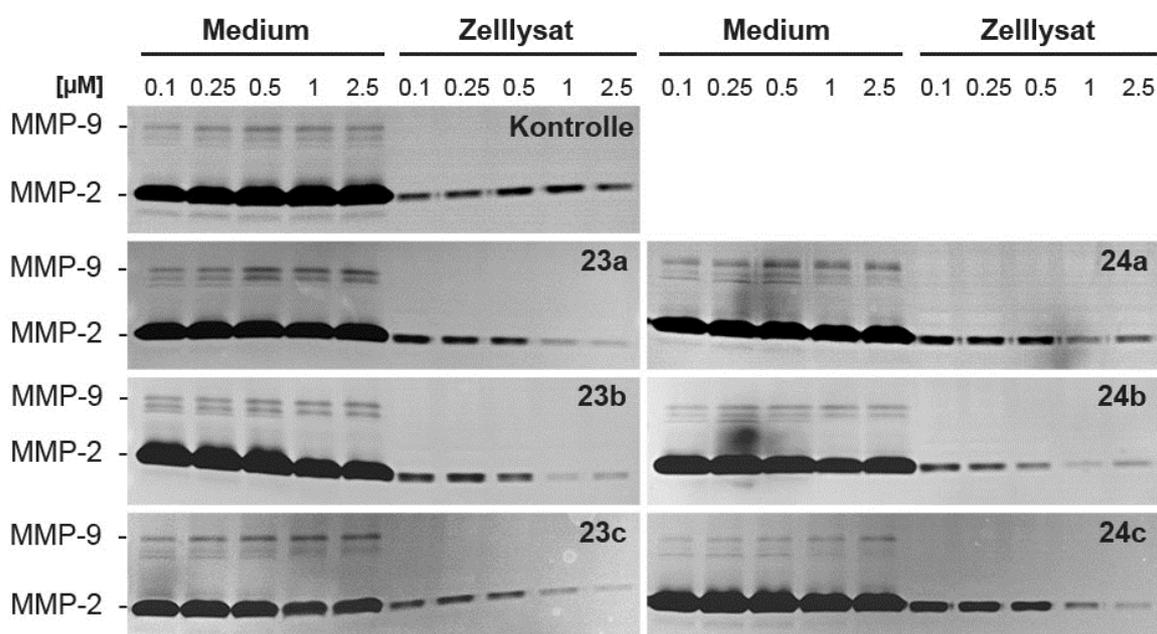


Abbildung 34: Effekte der CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** auf die extra- (Medium) und intrazellulären (Zellysat) Level aktiver MMP-9 und MMP-2 von 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe (0,1-2,5 μM) inkubiert, bevor die Medium- und Zellysatproben aufbereitet und in einem Gelatine-haltigen Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Pro Probe wurden 20 μg Gesamtprotein aufgetragen. Es sind die Negativbilder der gefärbten Zymographie-Gele gezeigt. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Ob die CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24**, trotz ihres scheinbar von CA-4 und dessen analogen Imidazolen abweichenden Wirkmechanismus, eine antivaskuläre Aktivität zeigen, wurde *in vitro* mit Hilfe des *Tube Formation Assays* mit vaskulären Endothelzellen und des CAM-Assays als *in vivo* Modellsystem überprüft. *In vitro* konnte festgestellt werden, dass die beiden Komplexe **23a** und **24a**, welche exemplarisch im Vergleich zu CA-4 untersucht wurden, die Ausbildung von stark verzweigten, tubulären Netzwerken durch HUVECs auf Matrigel signifikant inhibieren (Abbildung 35).¹⁶⁴

So waren nach Behandlung der vaskulären Endothelzellen mit 690 nM von Komplex **23a** und 80 nM von **24a** für 24 h nur noch einzelne sowie zum Teil fragmentierte, röhrenartige Strukturen und wenige Verknüpfungspunkte der *tubes* vorhanden. Dabei erwies sich der *N*-Ethyl-substituierte Goldkomplex **24a** annähernd genauso effektiv wie CA-4. Der natürliche, antivaskuläre Wirkstoff verhinderte den Aufbau der tubulären Strukturen bei einer Konzentration von 80 nM jedoch bereits vollständig. Die unbehandelten Kontrollzellen hatten erwartungsgemäß nach 24 h Inkubation ein hoch geordnetes Netzwerk mit definierten tubulären Strukturen und Knotenpunkten ausgebildet. Durch eine quantitative Auswertung der Aufnahmen in Abbildung 35 mit Hilfe von *ImageJ* (*Angiogenesis Analyzer Plugin*) konnte die starke antiangiogene Wirkung der beiden Biscarbenkomplexe **23a** und **24a** weiterhin bestätigt werden, da eine signifikante Verringerung der die Komplexität der HUVEC-Netzwerke kennzeichnenden Parameter festgestellt werden konnte (vgl. Tabelle A-6 im Anhang).

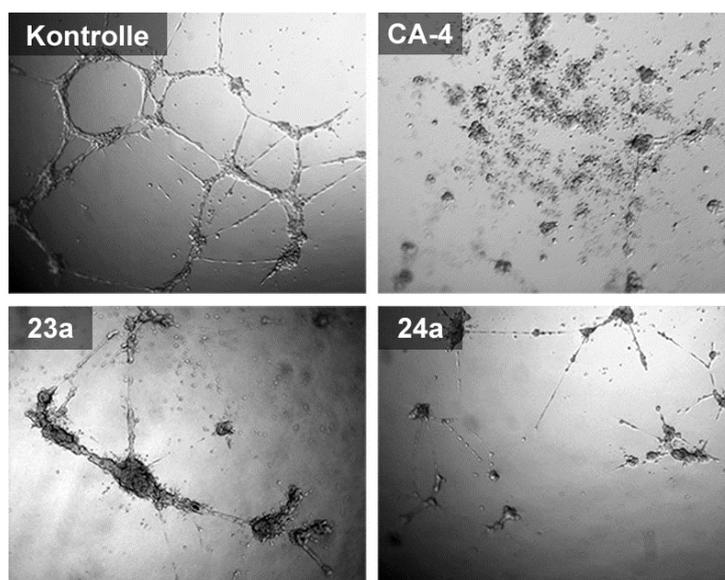


Abbildung 35: Auswirkungen von CA-4 (80 nM) und den hiervon abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23a** (690 nM) und **24a** (80 nM) auf die Fähigkeit von HUVECs tubuläre Netzwerke auf Matrigel auszubilden. Gezeigt sind die Aufnahmen der geringsten effektiven Konzentrationen nach 24 h Inkubation. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Auch *in vivo* wurde die starke antivaskuläre Wirkung von CA-4 eindeutig nachgewiesen (Abbildung 36). So traten im CAM-Assay und bei einer eingesetzten Stoffmenge von 10 nmol des Naturstoffs nach 6 h Inkubation deutliche vaskular-disruptive Effekte sowie starke Ausblutungen in der CAM auf. Nach 24 h hatte CA-4 die kleineren Kapillaren im behandelten Bereich der CAM fast vollständig zerstört, während einzelne größere Blutgefäße noch

intakt waren. Im Gegensatz dazu zeigten die meisten der Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** nach 6 h bereits bei einer eingesetzten Stoffmenge von nur 2,5 nmol eine vollständige Zerstörung der kleineren Blutgefäße. Darüber hinaus schienen auch einige größere Gefäße bereits nach dieser kurzen Inkubationszeit mit den Goldkomplexen angegriffen und vereinzelt konnten auch kleinere Löcher in der CAM detektiert werden. In einigen Fällen zog sich diese nach 24 h Inkubation vermutlich aufgrund der starken Penetration durch die vaskular-disruptiven Goldkomplexe zusammen. Dennoch schienen sich die mit den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23** und **24** behandelten Blutgefäße sowie die umliegende CAM nach 24 h Inkubation zumindest teilweise zu regenerieren und eine Ausbildung neuer Kapillaren konnte im analysierten Bereich beobachtet werden. Ein Effekt, der für CA-4 interessanterweise nicht nachgewiesen werden konnte. Die Auswirkungen der beiden effektivsten Gold(I)-Komplexe **23b** und **24a** auf die Blutgefäße in der CAM von befruchteten Hühnereiern sind in der nachfolgenden Abbildung 36 im Vergleich zur vaskular-disruptiven Aktivität von CA-4 dargestellt.

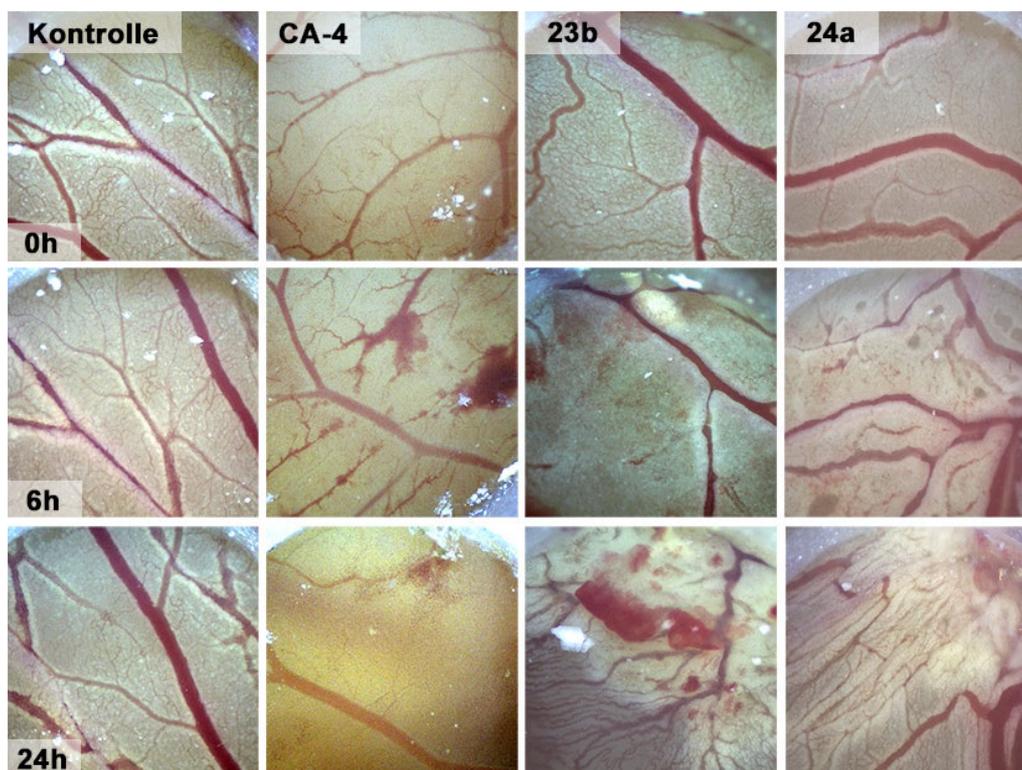


Abbildung 36: Effekte von CA-4 (10 nmol) und den hiervon abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23b** und **24a** (jeweils 2,5 nmol) auf das Blutgefäßsystem in der Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (DMF) nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Dokumentation der antivaskulären Effekte erfolgte mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops (60× Vergrößerung). [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Antivaskuläre Effekte, wie sie durch CA-4 oder die untersuchten Goldkomplexe im CAM-Assay hervorgerufen werden, können mit Hilfe einer Fraktal-Analyse quantifiziert werden. Daher wurde die Fläche der Blutgefäße in den analysierten Bereichen mit dieser Methode vor Zugabe der Testsubstanzen (0 h) sowie nach 6 h Inkubation bestimmt. Die Blutgefäßfläche vor Substanzzugabe wurde gleich 100 % gesetzt und der verringerte Anteil an Blutgefäßen nach 6 h Inkubation auf diesen Ausgangswert bezogen. Die Ergebnisse der Fraktal-Analyse sind in Tabelle 4 aufgeführt. Während die beiden aktivsten Goldkomplexe **23b** und **24a** die Fläche der Blutgefäße nach 6 h Inkubation jeweils auf ~50 % im Vergleich zur Ausgangsfläche (0 h) reduzierten, zeigten die Komplexe **23a** und **24b** mit einer Reduktion der Fläche auf 63 % und 56 % eine etwas schwächere antivaskuläre Wirkung. Die beiden Bromsubstituierten Biscarbenkomplexe **23c** und **24c** konnten die mit Blutgefäßen bedeckte Fläche in der CAM dagegen, wenn überhaupt, nur geringfügig verringern.

Tabelle 4: Effekte der Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** nach 6 h Inkubation auf die von Blutgefäßen bedeckte Fläche in der CAM von befruchteten Hühnereiern. Die Reduktion der Blutgefäßfläche nach 6 h Inkubation wurde relativ zur entsprechenden Fläche vor Substanzzugabe (100 %) berechnet. Die angegebenen prozentualen Werte entsprechen Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Berechnungen der Fraktal-Analyse. Die Fraktal-Analyse wurde von Dr. Ion C. Andronache (*Research Centre for Integrated Analysis and Territorial Management* der Universität Bucharest, Bucharest, Rumänien) durchgeführt.

Fläche mit Blutgefäßen (%)			
23a	63 \pm 4	24a	52 \pm 12
23b	49 \pm 8	24b	56 \pm 8
23c	96 \pm 4	24c	79 \pm 10

Da die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** *in vitro* eine sehr vielversprechende Aktivität gegenüber Tumorzellen gezeigt hatten, sollte ihre antitumorale Wirkung schließlich auch *in vivo* analysiert werden. Hierfür wurden die beiden *N*-Ethyl-substituierten Goldkomplexe **24a** und **24c** exemplarisch in einem Maus-Xenograft-Modell unter Verwendung der stark metastasierenden, murinen Melanomzelllinie B16-F10 untersucht (Abbildung 37).¹⁶⁴ Beide Komplexe führten zu einer deutlichen Reduktion des Tumolvolumens, nachdem sie den Mäusen wiederholt an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen per i.p.-Injektion verabreicht wurden (15 mg/kg Körpergewicht pro Injektion). Neben der Bestimmung des Tumolvolumens wurde auch täglich das Gewicht der Mäuse ermittelt und als Indikator für ihren Allgemeinzustand verwendet.

Beide Testverbindungen **24a** und **24c** induzierten direkt nach Applikation jeweils einen geringfügigen Gewichtsverlust, welcher jedoch reversibel war. Aus diesen vorläufigen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die beiden Gold(I)-Biscarbenkomplexe **24a** und **24c** eine relativ gute Verträglichkeit in den Mäusen sowie ein sehr gutes antitumorales Potential gegenüber dieser Art von Tumoren aufweisen.

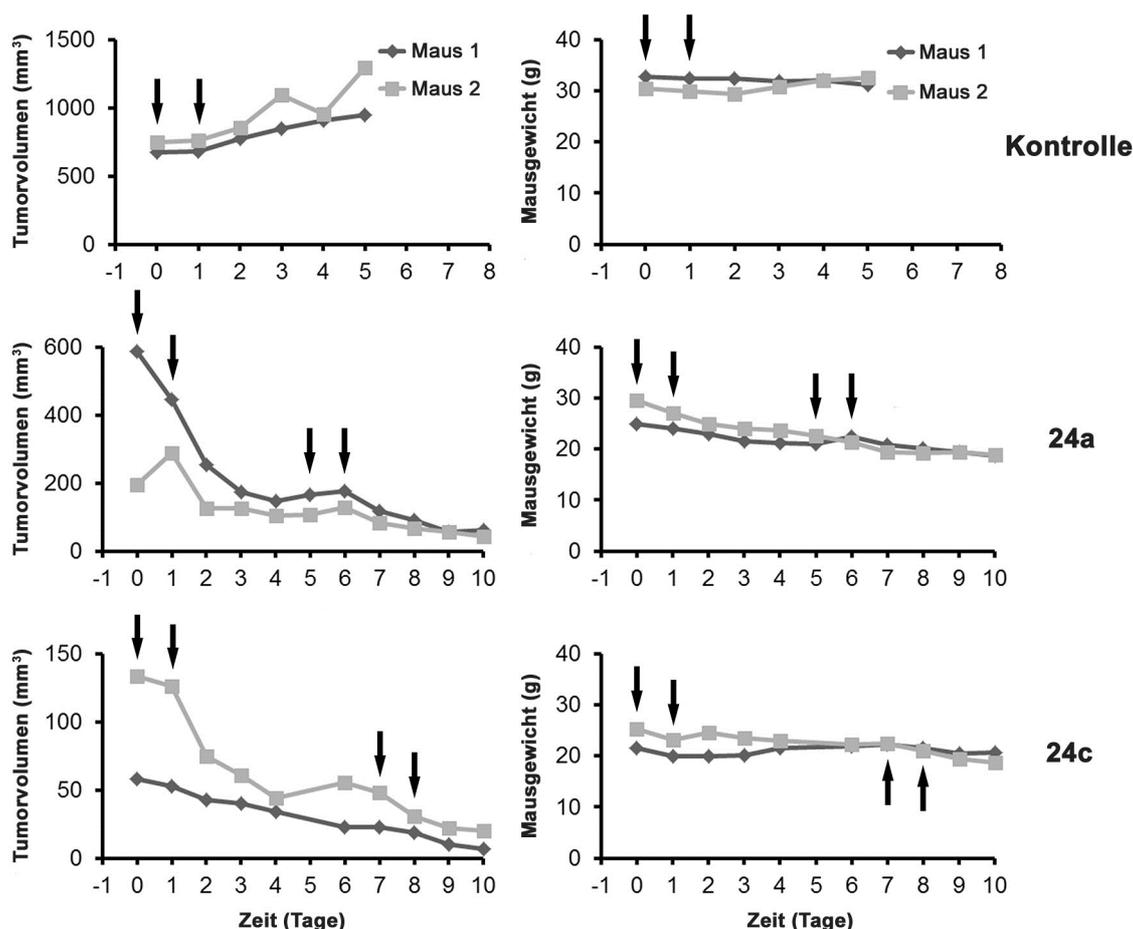


Abbildung 37: Antitumorale Effekte der CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **24a** und **24c** auf Tumore der stark metastasierenden B16-F10-Mausmelanomzellen im Balb/c Maus-Modell. Die Veränderungen des Tumolvolumens und das Gewicht der Mäuse sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Die Behandlung der Balb/c Mäuse mit den Goldkomplexen **24a** und **24c** erfolgte wiederholt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen per i.p.-Injektion, während eine Applikation von DMSO bei den Kontrollmäusen nur an den ersten beiden Tagen des Experiments stattfand. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte der Wirkstoff- bzw. DMSO-Applikation. Die Tierexperimente wurden von Leonard Kaps (M.Sc.) am Institut für Translationale Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Detlef Schuppan durchgeführt. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Zusammenfassende Diskussion

Die Verknüpfung von Metallfragmenten mit Liganden, welche bereits selbst eine antiproliferative Aktivität besitzen, stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Synthese neuartiger, wirkungsvoller Wirkstoffe für die Tumorthherapie dar.^{90,94} Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gold(I)-Carbenkomplexe, die auf dem natürlich auftretenden CA-4 basierende Imidazole als NHC-Liganden aufweisen, auf ihre antitumorale und anti-vaskuläre Wirkung hin untersucht. CA-4 und dessen Imidazol-Derivate, wie z.B. Verbindung **14**, stellen äußerst effektive, antitumorale Substanzen dar, deren Wirkmechanismus auf einer destabilisierenden Interaktion mit Tubulin beruht.^{114–116} Die Depolymerisation der Mikrotubuli führt in den betroffenen Zellen zu einem Mitosearrest und letztendlich zur Initiation der Apoptose. Darüber hinaus weisen CA-4 und analoge Substanzen auch starke Auswirkungen auf die Integrität von Blutgefäßen auf und werden als sogenannte vaskular-disruptive Wirkstoffe bezeichnet. Ihre antivaskuläre Aktivität basiert dabei neben einer starken Umstrukturierung des Zytoskeletts auch auf einer Störung der spezifischen VE-Cadherin/ β -Catenin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte von vaskulären Endothelzellen.¹¹⁸

Die zuerst synthetisierten Gold(I)-Monocarbenkomplexe **15a**, **21** und **22** zeigten keinerlei Interaktion mit Tubulin und wiesen mit ein- bis zweistelligen mikromolaren IC₅₀-Werten im Vergleich zu CA-4 und dessen Imidazol-Derivaten zwar eine deutlich schwächere antiproliferative Wirkung gegenüber Tumorzellen, jedoch auch eine deutliche Selektivität für diese auf. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sowohl eine Halogen-Substitution in der *meta*-Position des A-Rings sowie eine Variation der Reste an den Imidazol-Stickstoffatomen zu einer Wirkungssteigerung führen können. In weiteren Untersuchungen der zellulären Mechanismen dieser Art von Gold(I)-NHC-Komplexen, die exemplarisch mit **15a** und **22a** durchgeführt wurden, konnten deutliche Unterschiede zwischen den *N*-Methyl- und *N*-Ethyl-substituierten Komplexen beobachtet werden. Während **15a** in den zellbasierten *in vitro* Assays keine oder nur eine geringfügige Aktivität aufwies, konnten für **22a** deutliche Effekte auf das Aktinzytoskelett (*stress fibers*), den Zellzyklus (G1-Arrest) sowie die Motilität von 518A2-Melanomzellen nachgewiesen werden. Auch die intra- und extrazellulären Level an aktiver MMP-2, die bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine essentielle Rolle spielt, wurden durch Komplex **22a** in den 518A2-Zellen stark reduziert. Des Weiteren zeigte **22a** auch in *Tube Formation* Assays mit HUVECs eine antivaskuläre Wirkung. Im CAM-Assay konnten schließlich für beide Goldkomplexe **15a** und **22a** signifikante vaskular-disruptive Effekte festgestellt werden.

Die CA-4 abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** besitzen im Vergleich zu ihren analogen Monocarbenkomplexen eine deutlich höhere antiproliferative Aktivität und weisen IC_{50} -Werte auf, die größtenteils im unteren nanomolaren Bereich liegen. Im Gegensatz zu Komplex **15a**, der vorwiegend über Ctr1 und OCT-1/2 in die 518A2-Melanomzellen aufgenommen wird, sind an der zellulären Akkumulation der relativ großen Biscarbenkomplexe **23a** und **24a** vor allem endozytotische Prozesse beteiligt. Die Gold(I)-NHC-Komplexe **23** und **24** induzierten *in vitro* ebenfalls eine signifikante Reorganisation des Aktinzytoskeletts, die in 518A2-Zellen, wie schon bei **22a**, mit einer starken Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus sowie einer Inhibition der Zellmigration einhergeht. Auch die Proteinlevel der prometastatischen MMP-2 wurden durch eine Behandlung der 518A2-Melanomzellen mit **23** und **24** deutlich verringert, was auf eine gute antimetastatische Wirkung der Goldkomplexe hindeutet. Darüber hinaus wurde eine eindeutige antivaskuläre Aktivität der Biscarbenkomplexe nachgewiesen. So inhibierten die Komplexe **23** und **24** die Ausbildung von tubulären Netzwerken durch vaskuläre Endothelzellen auf Matrigel und zeigten im CAM Assay eine starke vaskular-disruptive Wirkung. Schließlich wurde mit Hilfe eines Maus-Xenograft-Modells gezeigt, dass die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **24a** und **24c** auch eine signifikante antitumorale Aktivität sowie eine gute Verträglichkeit *in vivo* aufweisen.

Zusammenfassend stellen die analysierten Goldcarbenkomplexe mit ihren CA-4-abgeleiteten 4,5-Diarylimidazol-Liganden also einen interessanten, neuartigen Typ an Gold(I)-NHC-Komplexen mit signifikanter antitumorale und antivaskulärer Wirkung dar. So wurde durch Variation der Substituenten an den NHC-Liganden zum Teil bereits eine deutliche Wirkungssteigerung erreicht. Derzeit werden jedoch, zusätzlich zu den in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Fluorierungen (Komplexe **28-30**), auch weitere Substitutionsmuster der 4,5-Diarylimidazol-Liganden bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Effektivität und Selektivität dieser Goldkomplexe untersucht.

4.1.2 Beispiel eines fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplexes mit einem Anthracen-substituierten NHC-Liganden

Um die zelluläre Verteilung der äußerst effektiven Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** (Abschnitt 4.1.1) zu untersuchen bzw. zu visualisieren, wurde ein entsprechendes, Anthracen-substituiertes Imidazol-Derivat hergestellt (**25**, Abbildung 38). Hierfür wurde einer der Phenylringe im CA-4-abgeleiteten 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotiv des NHC-Liganden durch einen 9-Anthracenylrest ersetzt. Auf weitere Substituenten an den beiden Arylresten, wie z.B. Methoxygruppen oder Halogene, wurde in diesem Fall verzichtet. Durch die Einführung des Anthracen-Fluorophors weist der Goldkomplex **25** eine starke, blaue Fluoreszenz auf und kann daher für die Visualisierung seiner intrazellulären Verteilung eingesetzt werden.

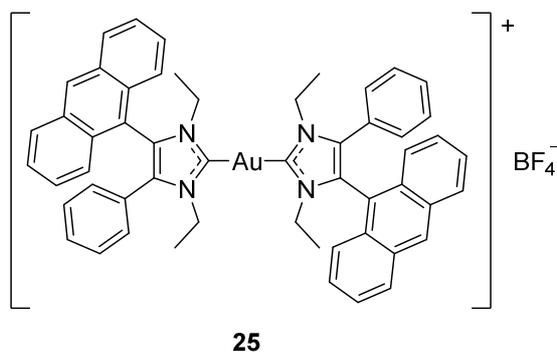


Abbildung 38: Struktur des blau-fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** mit Anthracen-substituiertem NHC-Liganden.

Vor Durchführung der Lokalisierungsexperimente wurde zunächst die antiproliferative Aktivität von **25** gegenüber verschiedenen Krebszelllinien ermittelt (Tabelle 5). Hierbei erwies sich der Anthracen-Goldkomplex **25** mit IC_{50} -Werten im Bereich von $\sim 1\text{-}2\ \mu\text{M}$ gegenüber der mehrfachresistenten KB-V1/Vbl-Zelllinie sowie gegenüber den beiden Kolon-Adenokarzinomzellen HT-29 und DLD-1 im Rahmen der untersuchten Auswahl an Tumorzellen am unwirksamsten. In den eher sensitiven Zelllinien 518A2 und Panc-1 zeigte der Komplex **25** dagegen eine gesteigerte Toxizität im Bereich von etwa 650 nM. Mit einem IC_{50} -Wert von nur 200 nM war der Anthracen-Komplex **25** insgesamt gegenüber den MCF-7/Topo-Brustkrebszellen am effektivsten. Da eine ähnlich starke antiproliferative Wirkung gegenüber den MCF-7/Topo-Zellen bereits für die Biscarbenkomplexe **23** und **24** beobachtet wurde, weist diese Art von Gold(I)-NHC-Komplexen anscheinend generell eine gewisse Selektivität für diese Brustkrebszelllinie auf.

Tabelle 5: IC₅₀-Werte [μM] des Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszelllinien. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen \pm Standardabweichung (SD), die jeweils nach 72 h Inkubation mittels eines MTT-Vitalitätstests bestimmt wurden.

	518A2	Panc-1	MCF-7/Topo	KB-V1/Vbl	HT-29	DLD-1
25	0,64 \pm 0,01	0,66 \pm 0,08	0,20 \pm 0,05	0,96 \pm 0,29	1,6 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, kolorektale HT-29- und DLD-1-Adenokarzinomzellen

Als nächstes wurde überprüft, ob der Anthracen-Komplex **25** auf zellulärer Ebene die gleichen Auswirkungen in 518A2-Melanomzellen zeigt wie die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** (vgl. Abschnitte 4.1.1). Bei vergleichbaren Ergebnissen bezüglich des zellulären Wirkmechanismus sollte nämlich auch eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Lokalisierungsexperimenten gewährleistet sein. Genau wie die Gold(I)-NHC-Komplexe **23** und **24** induzierte auch das fluoreszierende Derivat **25** eine signifikante Ausbildung von *stress fibers* in 518A2-Zellen (Abbildung 39), die mit einer Akkumulation der Melanomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus einherging (Abbildung 40).

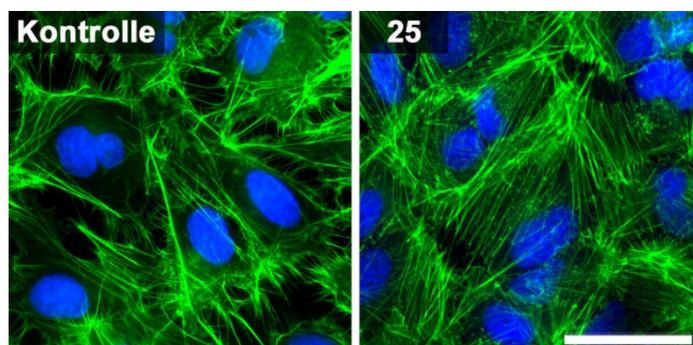


Abbildung 39: Effekte des Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** (2 μM) auf das Aktinzytoskelett von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Das Aktinzytoskelett (grün) wurde mit Hilfe von Alexa Fluor® 488-konjugiertem Phalloidin visualisiert, während die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 μm .

So erhöhte eine Behandlung der 518A2-Melanomzellen mit Komplex **25** den Anteil an Zellen in der G1-Phase von $\sim 45\%$ (Kontrolle) auf $\sim 64\%$ (2 μM) bzw. $\sim 69\%$ (5 μM), während die S- und G2/M-Populationen jeweils beträchtlich verringert wurden. Sowohl die oben beschriebenen Goldkomplexe **23** und **24** als auch der Anthracen-Komplex **25** lösen also die gleiche Art von Zellzyklusarrest aus. Die zytostatische Aktivität von **25** ist dabei jedoch deutlich geringer als die der Komplexe **23** und **24** (vgl. Abbildung 32).

Auch in vaskulären Endothelzellen (HUVECs) führte der Komplex **25** zur Entstehung von *stress fibers*, während die Organisation der Mikrotubuli nicht beeinträchtigt wurde (vgl. Abbildung A-4 im Anhang). Die durch **25** ausgelöste Reorganisation des Aktinzytoskeletts erfolgte also, wie bereits bei den anderen untersuchten Gold(I)-Biscarbenkomplexen, unabhängig von einer direkten Interaktion mit Tubulin bzw. unabhängig von einer Inhibition der Tubulinpolymerisation.

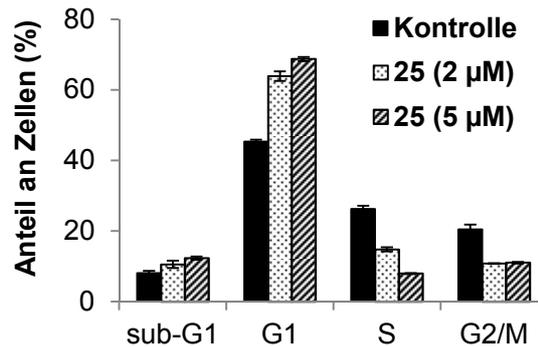


Abbildung 40: Effekte des Anthracen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplex **25** (2 µM und 5 µM) auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich konnte in *Wound-Healing* Assays eine antimigratorische Aktivität des Anthracen-Komplexes **25** festgestellt werden, da dieser ebenfalls die Schließung von in Monolayern aus 518A2-Melanomzellen künstlich eingeführten „Wunden“ verhinderte (Abbildung 41 und Tabelle A-9 im Anhang). Während die Zellen die Wunden in den Kontrollansätzen nach 24 h bereits zum größten Teil (~83 %) und nach 48 h auch wieder vollständig geschlossen hatten, war für 518A2-Zellen, die mit dem Goldkomplex **25** behandelt wurden, nach 24 h Inkubation nur eine Wundheilung von etwa 50 % bzw. nach 48 h von lediglich ~64 % zu beobachten. Somit scheint die inhibitorische Aktivität des Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** im Laufe der Inkubationszeit deutlich zuzunehmen. Dies ist vermutlich aufgrund der signifikanten *stress fiber*-Induktion^{236,237} sowie den damit einhergehenden starken morphologischen Veränderungen der 518A2-Zellen zu erklären, die insbesondere nach 48 h Inkubation mit dem Goldkomplex deutlich zu erkennen sind. Vergrößerungen von Aufnahmen der 518A2-Zellen nach 24 h bzw. 48 h Inkubation mit Komplex **25** im *Wound-Healing* Assay sind in Abbildung 42 einer entsprechenden Aufnahme mit unbehandelten Kontrollzellen (24 h) gegenübergestellt, um die Veränderungen des morphologischen Phänotyps der stark metastasierenden Melanomzelllinie zu verdeutlichen.

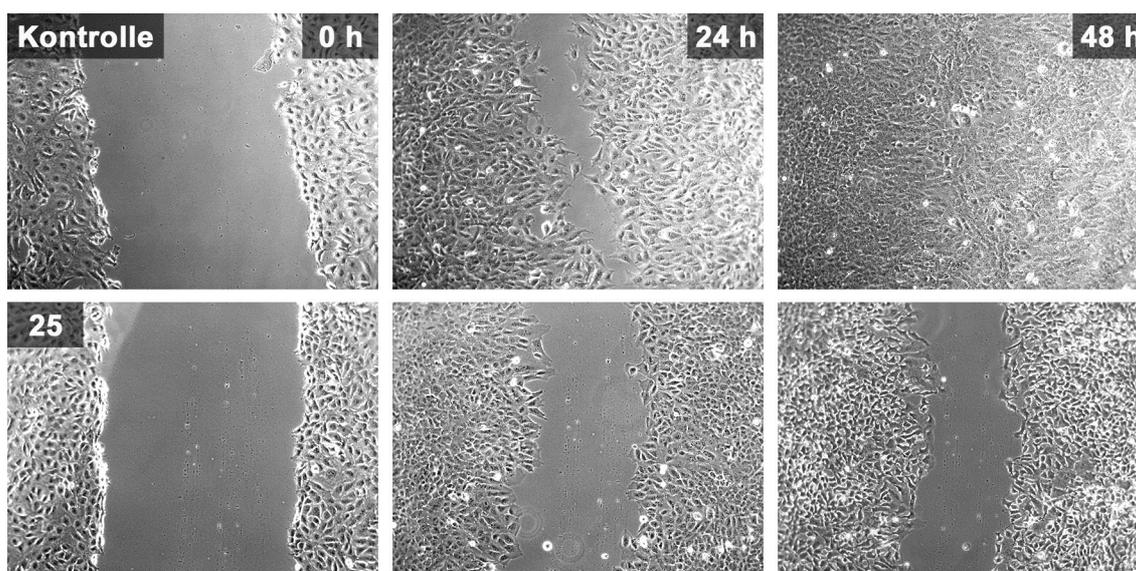


Abbildung 41: Antimigratorische Aktivität des Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** (2 μ M) auf 518A2-Melanomzellen im *Wound-Healing* Assay. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für zwei (Kontrolle) bzw. drei (**25**) unabhängige Experimente.

Die 518A2-Melanomzellen besitzen typischerweise eine epithelartige Zellmorphologie, d.h. bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens zeichnen sich diese durch eine relativ gleichmäßige, polygonale Form aus und sind klar voneinander abgegrenzt.²⁴⁹ Am Rand der Zellschicht können die 518A2-Zellen dagegen eine unregelmäßigere Morphologie aufweisen. So sind die stark metastasierenden Melanomzellen u.a. in der Lage gestreckte Fortsätze, sogenannte Lamellopodien, auszubilden, welche sowohl die Anheftung an ein Substrat ermöglichen (hier den Boden der *wells*) als auch die Zellmigration vermitteln können.²³⁶ Lamellopodienartige Fortsätze der Zellen sind in Abbildung 42 mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Während diese bei den Zellen der Kontrolle (24 h) vermehrt auftreten und auf eine aktive Fortbewegung der Zellen schließen lassen, konnten solche Fortsätze nach einer Behandlung der 518A2-Zellen mit dem Anthracen-Komplex **25** für 24 h nur noch bedingt beobachtet werden. Nach 48-stündiger Behandlung mit dem Goldkomplex **25** haben die 518A2-Zellen ihre charakteristische Morphologie schließlich vollständig verloren und zeigen selbst in den konfluenten Bereichen eine deutlich abgerundete Form. Trotz der starken morphologischen Veränderungen haften die Zellen jedoch noch am Boden der *wells* und bilden darüber hinaus auch viele interzelluläre Kontakte aus. Zusammenfassend kann anhand der gemachten Beobachtungen vermutet werden, dass der Anthracen-Komplex **25** tatsächlich eine echte, antimigratorische Aktivität aufweist und die Wundheilung nicht nur aufgrund der antiproliferativen bzw. zytostatischen Wirkung des Goldkomplexes gehemmt wird.

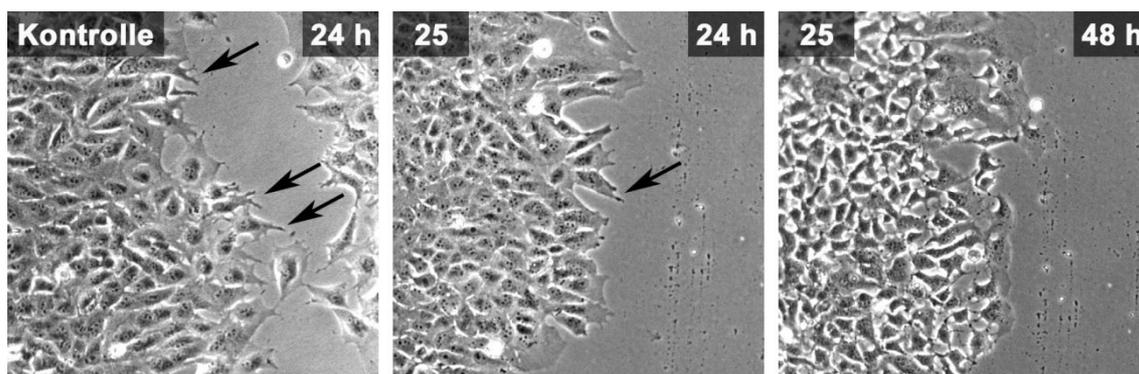


Abbildung 42: Effekte des Anthracen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexes **25** ($2\ \mu\text{M}$) auf die Morphologie von 518A2-Melanomzellen. Es sind Vergrößerungen der bereits in Abbildung 41 dargestellten Aufnahmen des *Wound-Healing* Assays gezeigt.

Neben den für 4,5-Diarylimidazol-Gold(I)-Biscarbenkomplexe (vgl. auch Komplexe **23** und **24** in Abschnitt 4.1.1) charakteristischen Effekten auf 518A2-Melanomzellen wurde für den Anthracen-substituierten Biscarbenkomplex **25** in ersten Experimenten des CAM Assays auch eine antivaskuläre Wirkung nachgewiesen (Aufnahmen nicht gezeigt). Die vaskular-disruptive Aktivität von **25** war bei einer eingesetzten Stoffmenge von $2,5\ \text{nmol}$ jedoch deutlich geringer als die der CA-4 abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe. Der Assay sollte mit höheren Konzentrationen von **25** erneut durchgeführt werden, um seine antivaskuläre Aktivität zu bestätigen. Zusätzlich sollte der Komplex auch *in vitro* an vaskulären Endothelzellen untersucht werden, da antiangiogene Effekte im *Tube Formation* Assay einfacher nachzuweisen sind als im CAM-Modellsystem.

Insgesamt bestätigen die aus den oben beschriebenen Untersuchungen zum Wirkmechanismus von **25** gewonnenen Erkenntnisse, dass dieser Anthracen-Komplex die gleichen Effekte auf 518A2-Melanomzellen bzw. Blutgefäße hat, wie die Biscarbenkomplexe **23** und **24**. Daher sollte eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den (Co-)Lokalisierungsexperimenten mit **25** gegeben sein. Zunächst wurde die intrazelluläre Verteilung von Komplex **25** in den humanen 518A2-Melanomzellen und PtK2-Nierenzellen der Beutelratte untersucht (Abbildung 43). Bereits nach 2 h Inkubation konnte der Goldkomplex anhand seiner blauen, intrinsischen Fluoreszenz in beiden Zellarten eindeutig nachgewiesen werden, wobei er sich am stärksten rings um die Zellkerne herum anreicherte. Vereinzelt konnten jedoch auch punktförmige, fluoreszierende Bereiche in der Zellperipherie beobachtet werden.

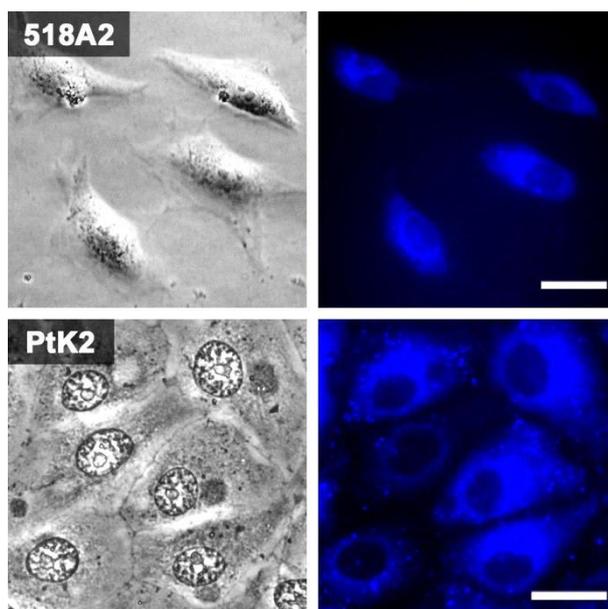


Abbildung 43: Zelluläre Verteilung des Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** ($10\ \mu\text{M}$) nach Behandlung von humanen 518A2-Melanomzellen (oben) und PtK2-Nierenzellen der Beutelratte (unten) für 2 h. Dargestellt sind sowohl die Hellfeld- (links) als auch die Fluoreszenz-aufnahmen (rechts). Maßstabsbalken - $20\ \mu\text{m}$.

Die ausgeprägte Akkumulation des Komplexes um die Zellkerne herum weist darauf hin, dass dieser entweder innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER), welches direkt mit der Hülle des Zellkerns verbunden ist, oder aber im mitochondrialen Netzwerk der eukaryotischen Zellen angereichert wird. Bei den punktförmigen, fluoreszierenden Gebilden im Zytoplasma könnte es sich um Vesikel handeln, in die der Goldkomplex **25**, oder auch dessen Metabolite, verpackt wurden, um aus den Zellen ausgeschleust zu werden. Möglicherweise sind diese Strukturen aber auch einzelne Mitochondrien, die sich von dem großen, zusammenhängenden Netzwerk der Organellen abgespalten haben.

Wie bereits in der Einleitung unter Abschnitt 1.3 beschrieben, akkumulieren Goldkomplexe, bei denen es sich um sogenannte delokalisierte, lipophile Kationen (*delocalised, lipophilic cations* – DLCs) handelt, verstärkt in den Mitochondrien und stören in diesen Organellen essentielle, zelluläre Prozesse.^{37,79,96–98} Da der Anthracen-substituierte Gold(I)-NHC-Komplex **25** ebenfalls einen solchen DLC-Komplex darstellt, sollte bewiesen werden, dass sich dieser tatsächlich in den Mitochondrien und nicht dem ER anreichert. Hierfür wurde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig ein Co-Lokalisierungsexperiment in HeLa-Zellen durchgeführt, bei dem die Zellen zunächst für 2 h mit **25** behandelt und anschließend mit einem spezifischen, roten Fluoreszenzfarbstoff, welcher die Mitochondrien visualisiert (MitoTracker), inkubiert wurden. Aus den repräsentativen Aufnahmen der fluoreszenz-

mikroskopischen Analyse der HeLa-Zellen in Abbildung 44 wird ersichtlich, dass der Anthracen-haltige Gold(I)-Biscarben-komplex **25** wirklich in den Mitochondrien akkumuliert. So korreliert das blaue Fluoreszenz-signal von **25** mit der roten Fluoreszenz des MitoTrackers im mitochondrialen Netzwerk, was durch eine Überlagerung der beiden Signale (*Merge* in Abbildung 44) eindeutig nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Bildanalysesoftware *Volocity 3D Image Analysis Software* (Perkin Elmer) der sogenannte Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt, welcher ein Maß für die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale darstellt und im optimalen Fall, d.h. bei vollständiger Deckung bzw. Co-Lokalisation der Fluoreszenzsignale, einen Wert von +1 annimmt. Bei der Co-Lokalisation des blauen Fluoreszenzsignals des Anthracen-Komplex **25** und der roten Fluoreszenz des MitoTracker-Farbstoffs konnten für einzeln analysierte Zellen Korrelationskoeffizienten im Bereich von $\sim 0,9$ ermittelt werden. Somit decken sich die beiden Fluoreszenzsignale in diesen Fällen fast vollständig.

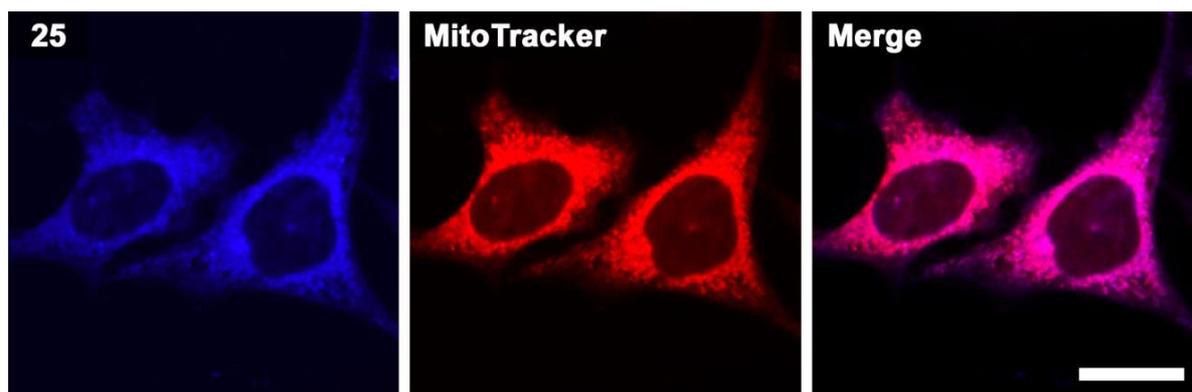


Abbildung 44: Fluoreszenzaufnahmen der mit dem Anthracen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplex **25** durchgeführten Co-Lokalisation in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 2 h mit dem Goldkomplex **25** inkubiert, bevor ihre Mitochondrien mit dem MitoTracker® Deep Red FM-Fluoreszenzfarbstoff visualisiert wurden. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen der intrazellulären Verteilung des Anthracen-Komplex **25** (blau), der mit dem MitoTracker gefärbten Mitochondrien (rot) sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale (Merge). Maßstabsbalken – 20 μm . Die Co-Lokalisation wurde von Sebastian Schrüfer (M.Sc) und Dr. Verena Fetz am HZI in Braunschweig (AG Chemische Biologie) durchgeführt.

Nachdem eine Anreicherung von **25** in den Mitochondrien eindeutig nachgewiesen werden konnte und diese bei Goldkomplexen häufig mit einer signifikanten Inhibition der TrxR einhergeht,^{79,92,106} sollte schließlich überprüft werden, ob es sich bei dem Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplex **25** ebenfalls um einen Inhibitor dieses antioxidativen Enzyms handelt.

Tatsächlich konnte *in vitro* eine signifikante Inhibition der TrxR durch den Gold(I)-Biscarbenkomplex **25** beobachtet werden ($EC_{50} = 0,46 \pm 0,08 \mu\text{M}$, bestimmt von Dr. Julia Schur, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig), die um etwa ein Zehnfaches stärker ist als die Hemmung der TrxR durch den in der Einleitung beschriebenen Benzimidazol-basierten Goldkomplex **13b** ($EC_{50} = 4,89 \pm 1,15 \mu\text{M}$).¹⁰⁹

Zusammenfassende Diskussion

Um die zelluläre Verteilung von 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexen, wie den CA-4 abgeleiteten Gold(I)-NHC-Komplexen **23** und **24**, zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines 4-(Anthracen-9-yl)-5-phenylimidazol-Liganden ein entsprechendes, blau-fluoreszierendes Derivat (**25**) hergestellt. Die exakte intrazelluläre Lokalisierung des Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** sollte weitere Hinweise auf den Wirkmechanismus dieser Art von Goldverbindungen geben.

Zunächst wurde die antiproliferative Aktivität von **25** gegenüber einer Auswahl an Tumorzellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass **25** eine etwas geringere Zytotoxizität gegenüber den getesteten Zelllinien zeigt als die analogen Biscarbenkomplexe **23** und **24**, jedoch ebenfalls weitestgehend submikromolare IC_{50} -Werte erreicht. In 518A2-Melanomzellen induzierte der Goldkomplex **25** genau wie **23** und **24** eine Ausbildung von *stress fibers*, welche mit einer signifikanten Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus korreliert. Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach Behandlung der 518A2-Zellen mit dem Gold(I)-NHC-Komplex **25** ist vermutlich auch für die beobachteten Veränderungen in der Zellmorphologie sowie damit einhergehend für die starke Beeinträchtigung der Zellmotilität im *Wound-Healing* Assay verantwortlich. Insgesamt waren jedoch höhere Konzentrationen von **25** notwendig, um in den 518A2-Melanomzellen ähnlich starke Effekte auszulösen, wie die Biscarbenkomplexe **23** und **24**. Mit Hilfe des CAM Assays konnte in ersten Experimenten bei gleicher eingesetzter Stoffmenge dennoch bereits eine moderate, antivaskuläre Wirkung von **25** nachgewiesen werden.

Da der Anthracen-substituierte Gold(I)-Biscarbenkomplex **25** in den durchgeführten Untersuchungen also die gleichen Effekte wie die CA-4-abgeleiteten Derivate **23** und **24** zeigte, kann bei dieser Art an Goldverbindungen von einem vergleichbaren Wirkmechanismus ausgegangen werden. Aus diesem Grund sollte auch die intrazelluläre Verteilung der Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** ähnlich sein.

In Co-Lokalisationsexperimenten mit dem fluoreszierenden Komplex **25** konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass dieser in den Mitochondrien von HeLa-Zellen akkumuliert. Darüber hinaus zeigte er eine starke inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der TrxR und war dabei weitaus effektiver als andere, literaturbekannte Goldkomplexe dieser Art. Zurzeit werden weiterführende Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Komplex **25**, aber auch die Biscarbenkomplexe **23** und **24** eine Mitochondrien-schädigende Wirkung aufweisen. Des Weiteren wird untersucht, ob es sich bei den CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23** und **24** um ähnlich effektive TrxR-Inhibitoren wie **25** handelt.

Interessanterweise beobachteten Citta *et al.* für einen ähnlichen, Anthracen-substituierten Gold(I)-Monocarbenkomplex (**26**, Abbildung 45) eine starke Akkumulation in den Zellkernen verschiedener Tumorzellen.²⁵⁰ Dennoch konnte zumindest *in vitro* eine signifikante Inhibition der TrxR durch **26** nachgewiesen werden. Aus diesem Grund werden derzeit der zu **25** analoge, ungeladene Monocarbenkomplex **27a** sowie dessen kationisches PPh₃-Analogon **27b** hergestellt (Abbildung 45), um zu überprüfen, ob diese Komplexe eine ähnliche intrazelluläre Verteilung und einen vergleichbaren Wirkmechanismus wie der Biscarbenkomplex **25** aufweisen oder sich in Tumorzellen anders verhalten als dieser. Vermutlich spielen hierbei sowohl die unterschiedliche Lipophilie der Goldkomplexe **25** und **27** als auch ihr kationischer bzw. neutraler Charakter, wie bereits bei vielen anderen Goldverbindungen beobachtet,⁷⁹ eine essentielle Rolle.

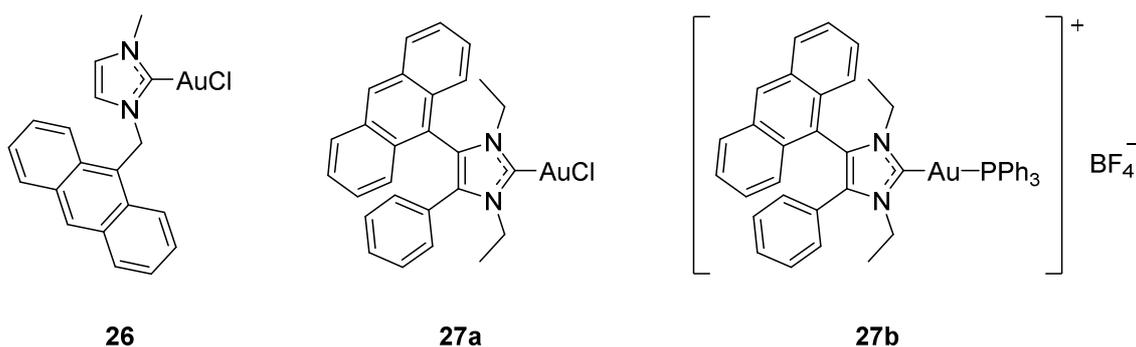


Abbildung 45: Strukturen der Anthracen-substituierten Gold(I)-Monocarbenkomplexe **26**²⁵⁰ und **27**.

4.1.3 Fluor-substituierte Gold(I)-Carbenkomplexe mit 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotiv

Wie bereits in der Einleitung unter Abschnitt 1.3 beschrieben, gibt es verschiedene Möglichkeiten die biologische Aktivität von Goldkomplexen, aber auch von anderen metallbasierten oder rein organischen Wirkstoffkandidaten, zu optimieren. Hierbei ist vor allem die Modulation der physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen entscheidend, da diese für die Verteilung im Organismus, die Aufnahme in Zellen, ihre Interaktion mit dem entsprechenden, zellulären *target* sowie auch die metabolische Stabilität der Verbindungen eine essentielle Rolle spielen.^{37,98}

Aufgrund der im Vergleich zu den anderen Halogenen außergewöhnlichen Eigenschaften des Fluoratoms, wie zum Beispiel seiner geringen Größe, starken Elektronegativität und vergleichsweise hohen Lipophilie, haben Fluor- bzw. Fluor-haltige Substituenten einen wesentlichen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften von organischen Verbindungen.^{251–256} So können Fluor-Substitutionen die Lipophilie oder metabolische Stabilität von Wirkstoffkandidaten erhöhen und somit auch eine gesteigerte biologische Aktivität herbeiführen. Darüber hinaus kann durch die rationale Einführung von Fluor bzw. Fluor-haltigen Substituenten an geeigneten Positionen von Leitstrukturen mit bekannten Wirkmechanismen zum Beispiel eine verbesserte Protein-Ligand-Wechselwirkung erzielt werden, die ebenfalls zu einer Steigerung der Effektivität des entsprechenden Wirkstoffs führen kann.

Aus diesen Gründen, aber auch durch die Entwicklung von weitaus sichereren und selektiveren Fluorierungs-Agenzien seit den 1970er Jahren,^{254,257–259} hat die Herstellung von Fluor-haltigen Substanzen in der medizinischen Chemie in den letzten 40 Jahren deutlich zugenommen. So machen Fluor-substituierte Verbindungen mittlerweile etwa 25 % aller derzeit auf dem Markt befindlichen Pharmazeutika zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen aus, während bis 1957 noch kein einziger fluorierter Wirkstoff zugelassen war.^{252,254,255} Beispiele für solche Fluor-haltigen Medikamente sind die Antidepressiva Fluoxetin (Prozac) und Escitalopram (Lexapro), der Cholesterin-senkende Wirkstoff Atorvastatin (Lipitor) sowie das Antibiotikum Ciprofloxacin (Ciprobay).^{254,256} Auch bei der Synthese neuer Wirkstoffkandidaten für die Tumorthherapie werden mittlerweile vermehrt Fluor-Substitutionen verwendet, um die Pharmakokinetik der Verbindungen sowie die spezifischen Wechselwirkungen mit ihren individuellen, zellulären *targets* zu optimieren.

Zu den in der modernen Krebstherapie erfolgreich eingesetzten Fluor-haltigen Chemotherapeutika gehören neben dem Fluoruracil-*prodrug* Capecitabin, bei dem es sich um einen sogenannten Antimetaboliten handelt, zum Beispiel auch verschiedene (Tyrosin-) Kinaseinhibitoren, wie Gefitinib (Iressa), Sorafenib (Nexavar) oder Sunitinib (Sutent).²⁵⁶

Um zu überprüfen, ob von Fluor-Substituenten bei 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexen, wie den CA-4-abgeleiteten Komplexen in Abschnitt 4.1.1, grundsätzlich auch zu einer Steigerung der biologischen Aktivität führen, wurden die Derivate **28-30** synthetisiert (Abbildung 46).

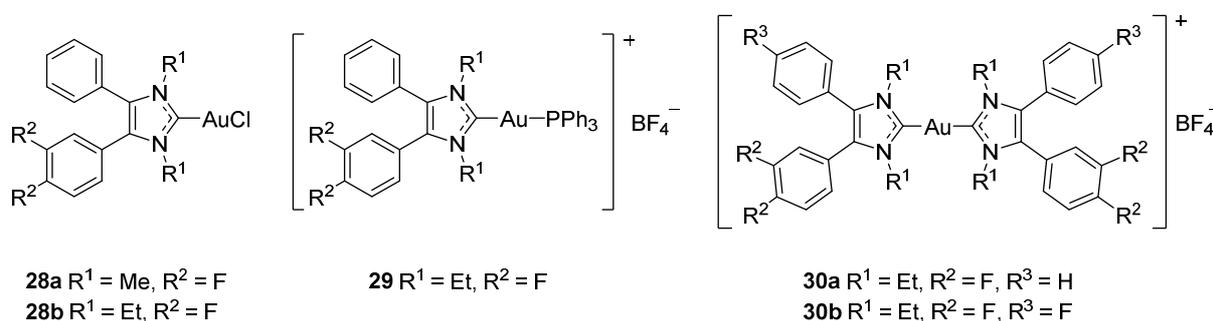


Abbildung 46: Strukturen der Gold(I)-NHC-Komplexe **28-30** mit ihren Fluor-substituierten 4,5-Diarylimidazol-Liganden.

Ihre Effektivität gegenüber einer Auswahl an Krebszelllinien aus vier verschiedenen Entitäten sowie gegenüber vaskulären Endothelzellen (HUVECs) wurde mit Hilfe eines MTT-Proliferationsassays untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 6 zusammengefasst. Bei den in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen CA-4-abgeleiteten Monocarbenkomplexen konnte bereits beobachtet werden, dass die Einführung einer Brom-Substitution zu einer signifikanten Steigerung der Effektivität der Goldkomplexe gegenüber den untersuchten Krebszelllinien führte. So weisen beide Brom-Derivate **21b** und **22c**, mit Ausnahme der Werte für die KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzelllinie, sehr ähnliche IC₅₀-Werte im einstelligen mikromolaren Bereich auf (vgl. Tabelle 1, Abschnitt 4.1.1). Die Reste an den Stickstoffatomen des Imidazolrings (Methyl in **21b** bzw. Ethyl in **22c**) hatten in diesem Fall keinen Einfluss auf die Aktivität der Komplexe. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die beiden Fluor-haltigen Monocarbenkomplexe **28** erhalten. Beide Komplexe zeigen eine gute antiproliferative Aktivität mit IC₅₀-Werten im einstelligen mikromolaren Bereich gegenüber den getesteten Krebszelllinien sowie den HUVECs. Lediglich gegenüber den beiden resistenten Zelllinien KB-V1/Vbl und DLD-1 sind die Komplexe **28** nur im unteren, zweistelligen mikromolaren Bereich wirksam.

So wurde die Effektivität durch die Einführung der *N*-Ethyl-Reste in **28b**, wie schon bei den CA-4-basierten Gold(I)-Monocarbenkomplexen (**21b** und **22c**), nicht weiter erhöht. Da sich die *N*-Ethyl-Substitutionen jedoch in den CA-4-analogen Biscarben-komplexen **24**, insbesondere auch in Bezug auf die Aktivität gegenüber der mehrfach resistenten KB-V1/Vbl-Zelllinie, als äußerst vielversprechend erwiesen hatten, wurden diese beibehalten und zunächst die beiden Derivate **29** und **30a** mit dem neuartigen, fluorierten 4,5-Diarylimidazol-Liganden hergestellt. Während der Komplex **29** neben dem NHC-Liganden einen PPh₃-Rest am Goldzentrum trägt, handelt es sich bei der Verbindung **30a** um den analogen Biscarbenkomplex mit zwei identischen NHC-Liganden.

Tabelle 6: IC₅₀-Werte [μM] der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **28-30** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszelllinien und HUVECs. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± SD, die jeweils nach 72 h Inkubation mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests bestimmt wurden.

	28a	28b	29	30a	30b
518A2	3,5 ± 0,2	2,5 ± 0,6	0,19 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,18 ± 0,07
Panc-1	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,2	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,03
MCF-7/Topo	3,4 ± 0,1	3,9 ± 0,3	0,41 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,20 ± 0,02
KB-V1/Vbl	20,8 ± 1,0	13,9 ± 0,6	2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,0	4,3 ± 0,1
HCT-116	3,2 ± 0,8	4,0 ± 0,3	n.b.	0,30 ± 0,06	0,49 ± 0,13
HT-29	4,0 ± 0,3	6,5 ± 0,7	1,2 ± 0,2	0,39 ± 0,02	0,46 ± 0,04
DLD-1	7,2 ± 0,1	10,1 ± 0,8	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
HUVEC	2,7 ± 0,9	3,2 ± 0,2	0,33 ± 0,04	0,57 ± 0,10	0,22 ± 0,03

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, HCT-116-Kolonkarzinomzellen, kolorektale HT-29- und DLD-1-Adenokarzinomzellen, HUVEC – humane, vaskuläre Endothelzellen; n.b. – nicht bestimmt

Beide Komplexe (**29** und **30a**) weisen gegenüber den untersuchten Tumorzelllinien und vaskulären Endothelzellen sehr ähnliche IC₅₀-Werte auf, die überwiegend im unteren, dreistelligen nanomolaren Bereich liegen. Die Goldkomplexe **29** und **30a** sind somit etwa drei- bis 28-fach aktiver als ihr analoger Monocarbenkomplex **28b**. Auch gegenüber den eher resistenten KB-V1/Vbl- und DLD-1-Zellen sind die beiden Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** im Vergleich zu **28b** deutlich wirksamer (ca. drei- bis siebenfach aktiver).

Insgesamt war der Gold(I)-Biscarbenkomplex **30a** dabei meistens geringfügig aktiver als sein PPh₃-Analogon **29**. Die Einführung einer weiteren Fluor-Substitution am zweiten Phenylring des NHC-Liganden konnte die antiproliferative Aktivität des Biscarbenkomplexes **30b** im Vergleich zu **30a** nicht weiter steigern, sondern verringerte diese sogar geringfügig. Somit wurden die beiden Goldkomplexe **29** und **30a**, welche die aktivsten Verbindungen dieser Serie darstellen und eine ähnlich gute antiproliferative Aktivität wie die CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** aufweisen, für weiterführende Analysen des Wirkmechanismus ausgewählt.

Zunächst wurden die Effekte der Komplexe **29** und **30a** auf die Organisation des Aktinzytoskeletts in 518A2-Melanomzellen und in HUVECs untersucht (Abbildung 47). Hierbei wurde, wie auch schon für die CA-4-abgeleiteten 4,5-Diarylimidazol-Carbenkomplexe **22a**, **23** und **24** (vgl. Abschnitt 4.1.1), eine starke Veränderung in der intrazellulären Verteilung des F-Aktins sowie eine signifikante Ausbildung von *stress fibers* beobachtet. Während die durch den PPh₃-Komplex **29** induzierten *stress fibers* in 518A2-Zellen nicht ganz so deutlich ausgeprägt waren wie für den Biscarbenkomplex **30a**, zeigten beide Goldkomplexe eine vergleichbare Auswirkung auf das Aktinzytoskelett der vaskulären Endothelzellen. Allgemein waren die Effekte beider Gold(I)-NHC-Komplexe (**29** und **30a**) in den HUVECs deutlich stärker als in den Melanomzellen, da die vaskulären Endothelzellen fast vollständig von dicken, parallelen Aktinbündeln durchzogen waren.

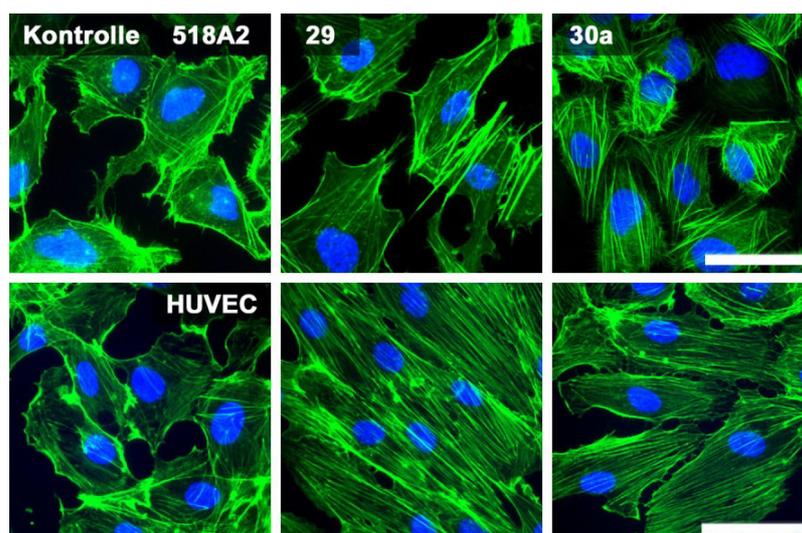


Abbildung 47: Effekte der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** auf das Aktinzytoskelett von 518A2-Melanomzellen und HUVECs. Die Zellen wurden für 24 h mit den Komplexen (jeweils 250 nM) oder einer analogen Menge an reinem DMF (Kontrolle) behandelt, bevor sie fixiert und anschließend das Aktinzytoskelett (grün) mit Alexa Fluor® 488-konjugiertem Phalloidin sowie die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 µm.

Die Induktion von *stress fibers* durch eine Behandlung der 518A2-Melanomzellen mit den CA-4-abgeleiteten Gold(I)-NHC-Komplexen **21a**, **23** und **24** konnte mit einer Arretierung der Krebszellen in der G1-Phase des Zellzyklus assoziiert werden. Darüber hinaus führten beide Effekte, d.h. die Beeinträchtigung der Motilität und der Proliferation von 518A2-Zellen, im Zusammenspiel zu einer signifikanten Hemmung der Fähigkeit eine „Wunde“, die künstlich in einen Zellrasen aus Melanomzellen eingeführt wurde, wieder zu verschließen. Daher wurden auch die Effekte der Fluor-haltigen 4,5-Diarylimidazol-Gold(I)-Carbenkomplexe **29** und **30a** auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen sowie ihr antimigratorisches Potential in *Wound-Healing* Assays analysiert. Die Ergebnisse der beiden Untersuchungen sind in Abbildung 48 aufgeführt.

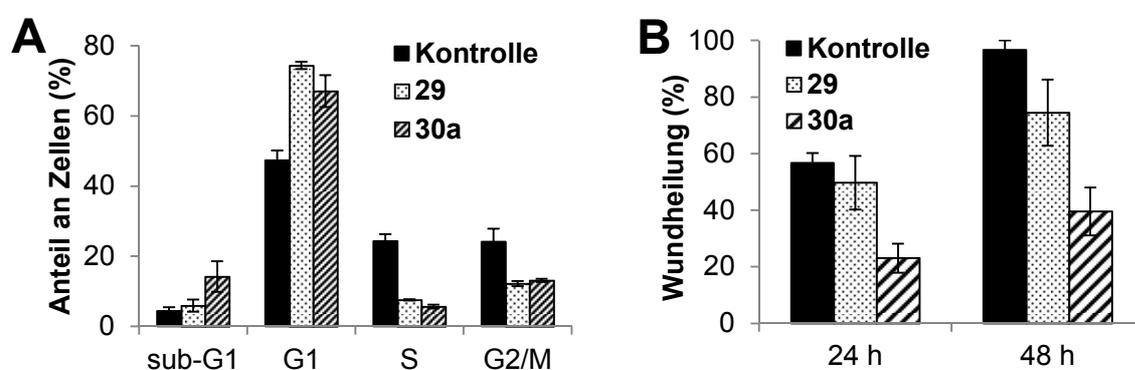


Abbildung 48: (A) Effekte der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** (jeweils 1 μ M) auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). (B) Antimigratorische Aktivität der Komplexe **29** und **30a** (jeweils 500 nM) in *Wound-Healing* Assays mit 518A2-Melanomzellen. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Mittelwerte \pm SD aus drei Experimenten.

Tatsächlich resultierte die Behandlung der 518A2-Zellen mit den Komplexen **29** und **30a** ebenfalls in einem deutlichen Anstieg der G1-Population, während die Anteile an Zellen in der S- und G2/M-Phase stark verringert wurden. So erhöhte sich der G1:G2/M-Quotient, welcher als Maß für einen G1-Arrest herangezogen werden kann, von 2,0 in der Negativkontrolle durch Inkubation der Melanomzellen mit den Testverbindungen auf 6,1 (**29**) bzw. 5,1 (**30a**). Überraschenderweise war die zytostatische Wirkung des PPH₃-Komplexes **29** also im Vergleich zum Biscarbenkomplex **30a** in der eingesetzten Konzentration etwas stärker, obwohl sich Letzterer in Bezug auf die Ausbildung von *stress fibers* in den 518A2-Zellen als deutlich effektivere Verbindung herausgestellt hatte.

Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass der Komplex **30a** bei einer Konzentration von 1 μM in einem kleinen Anteil der behandelten Zellen bereits die Apoptose ausgelöst hatte, was sich auch in einem Anstieg des sub-G1-Anteils widerspiegelt. Im Gegensatz dazu konnte bei einer identischen Konzentration von **29** noch keine Apoptose-induzierende Wirkung festgestellt werden. Auch die Fähigkeit, eine in den Zellrasen der 518A2-Melanomzellen künstlich eingeführte „Wunde“ zu schließen, wurde durch die Behandlung der Zellen mit den beiden Fluor-substituierten Goldkomplexen **29** und **30a** wesentlich beeinträchtigt. Während der PPh_3 -Komplex **29** nach 48 h Inkubation die Wundheilung im Vergleich zur Kontrolle um etwa 26 % reduzierte (74 % Wundheilung), konnte nach Behandlung der 518A2-Zellen mit dem Biscarbenkomplex **30a** für 48 h nur noch eine Wundheilung von etwa 40 % beobachtet werden. Vermutlich basiert die stärkere antimigratorische Wirkung von **30a** im Vergleich zu seinem PPh_3 -Analogon **29** auf seiner deutlich stärkeren Induktion von *stress fibers* in den Melanomzellen (vgl. Abbildung 47).

Das antimetastatische Potential der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** wurde weiterhin, wie bereits bei den Biscarbenkomplexen **23** und **24**, mittels Gelatine-Zymographie untersucht. Die Auswirkungen der Behandlung der hoch invasiven 518A2-Melanomzelllinie mit den Komplexen **29** und **30a** auf die extra- sowie intrazellulären Level aktiver MMP-2 und MMP-9 sind in der nachfolgenden Abbildung 49 dargestellt.

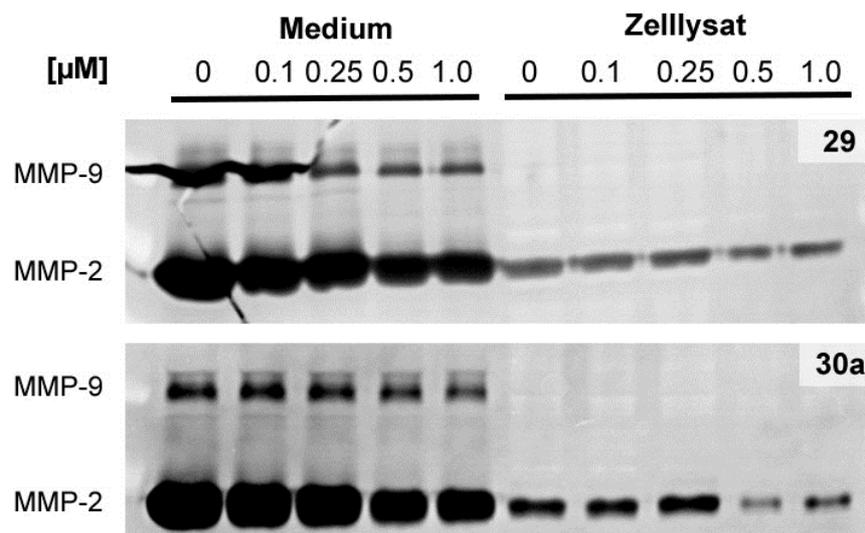


Abbildung 49: Effekte der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** auf die extra- (Medium) und intrazellulären (Zelllysate) Level aktiver MMP-9 und MMP-2 von 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe (0,1-1,0 μM) inkubiert, bevor die Medium- und Zelllysateproben aufbereitet und in einem Gelatine-haltigen Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Pro Probe wurden 15 μg Gesamtprotein aufgetragen. Es sind die Negativbilder der mit Coomassie gefärbten Zymographie-Gele gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit der Erlaubnis von Matthias Rothmund (M.Sc., Universität Bayreuth) verwendet.

Hierbei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass eine Behandlung der 518A2-Zellen mit den beiden Komplexen **29** und **30a** die intra- sowie extrazelluläre Konzentration der MMP-2 deutlich verringert. Die beiden fluorierten Goldkomplexe **29** und **30a** waren dabei genauso effektiv wie die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** und besitzen daher vermutlich auch ein ähnliches antimetastatisches Potential.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass der Anthracen-substituierte Gold(I)-NHC-Komplex **25** ein signifikanter Inhibitor der TrxR ist ($EC_{50} = 0,46 \pm 0,08 \mu\text{M}$, vgl. auch Abschnitt 4.1.2), sollte überprüft werden, ob dieses antioxidative Enzym auch ein molekulares *target* der beiden fluorierten Goldkomplexe **29** und **30a** darstellt. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsassays sind in der nachfolgenden Tabelle 7 zusammengefasst. Während **30a** einen EC_{50} -Wert von $\sim 250 \text{ nM}$ aufweist und damit bereits deutlich effektiver ist als der Anthracen-Biscarbenkomplex **25**, handelt es sich bei dem Fluor-substituierten PPh_3 -Analogon **29** mit einem EC_{50} -Wert von nur $\sim 80 \text{ nM}$ um einen noch potenteren TrxR-Inhibitor. Möglicherweise ist die Interaktion von **29** und **30a** aufgrund der im Vergleich zum Anthracen-Komplex **25** deutlich kleineren Substituenten am NHC-Liganden oder aber auch durch Wechselwirkungen der Fluor-Substituenten mit Aminosäureresten im aktiven Zentrum der TrxR begünstigt, was in einer effektiveren Inhibition des Enzyms durch diese beiden Verbindungen führt. Darüber hinaus konnte eine solche deutliche Überlegenheit eines PPh_3 -Derivats gegenüber seinem Biscarbenkomplex-Analogon auch bereits für die Benzimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe **13b** und **13c** beobachtet werden und beruht auf der unterschiedlichen Stabilität der beiden Komplextypen (vgl. Tabelle 7 und Abschnitt 1.3).¹⁰⁹ Die Biscarbenkomplexe **13b** und **30a** sind mit ihren zwei NHC-Liganden stabiler als ihre Analoga **13c** und **29**. Letztere können aufgrund ihrer PPh_3 -Liganden am Goldzentrum, welche eine relativ gute Abgangsgruppe darstellen, deutlich leichter eine nukleophile Substitution eingehen und daher auch die TrxR stärker inhibieren.

Tabelle 7: Inhibitorische Aktivität der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** gegenüber der TrxR im Vergleich zu den Benzimidazol-basierten Analoga **13b** und **13c** und der Auranofin-abgeleiteten Referenzverbindung **8**. Bei den aufgeführten EC_{50} -Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die EC_{50} -Werte der Komplexe **29** und **30a** wurden von Dr. Julia Schur (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) bestimmt.

	8 ¹⁰⁸	13b ¹⁰⁹	13c ¹⁰⁹	29	30a
EC₅₀ [μM]	0,04 ± 0,01	4,9 ± 1,2	0,66 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,25 ± 0,10

Zwar war die Aktivitätssteigerung durch Einbringen des PPh₃-Liganden bei den Komplexen **13** im relativen Vergleich zu den fluorierten Goldkomplexen deutlich stärker, jedoch handelt es sich bei den Gold(I)-NHC-Komplexen **29** und **30a** mit EC₅₀-Werten im unteren nanomolaren Bereich prinzipiell um die effektiveren TrxR-Inhibitoren. Die inhibitorische Aktivität von **29** gegenüber der TrxR ist dabei annähernd vergleichbar mit der des bereits in der Einleitung vorgestellten, Auranofin-abgeleiteten Phosphinkomplexes **8** (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 10 in Abschnitt 1.3), welcher häufig als Referenzverbindung eingesetzt wird.¹⁰⁸

Die antivaskuläre Aktivität der Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** wurde zunächst *in vitro* mit Hilfe des *Tube Formation Assays* untersucht (Abbildung 50). Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlung von HUVECs mit einer nicht-toxischen Konzentration der beiden Fluor-substituierten Komplexe **29** und **30a** (jeweils 100 nM) zu einer signifikanten Inhibition der Ausbildung von tubulären Strukturen auf Matrigel führt. Während die Kontrollzellen innerhalb von 24 h ein hoch geordnetes Netzwerk ausgebildet hatten, waren in den behandelten Ansätzen hauptsächlich große Ansammlungen von Zellen zu erkennen, die keinerlei definierte Struktur aufwiesen. Lediglich vereinzelt konnten röhrenartige Segmente beobachtet werden, die zum größten Teil jedoch fragmentiert vorlagen.

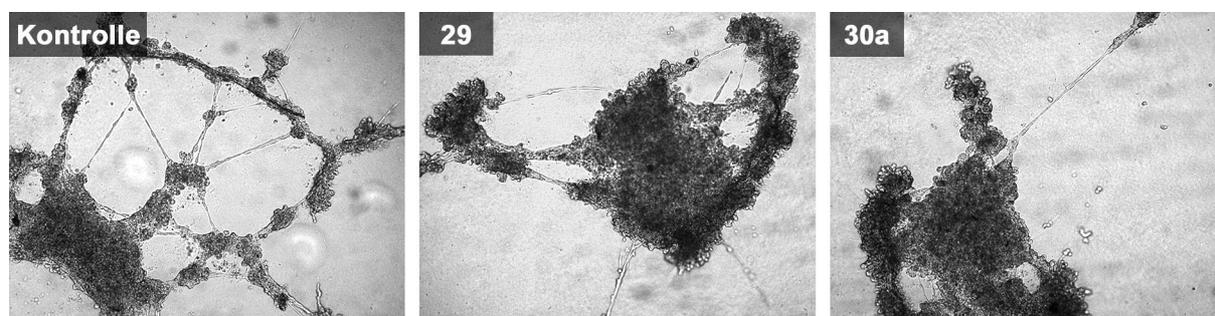


Abbildung 50: Inhibitorische Effekte der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** (jeweils 100 nM) auf die Ausbildung von tubulären Netzwerken durch HUVECs. Die vaskulären Endothelzellen wurden auf Matrigel ausgesät und umgehend mit den Testverbindungen oder einer analogen Menge an DMF (Kontrolle) versetzt. Die lichtmikroskopische Dokumentation erfolgte nach 24 h Inkubation.

Da die Ausbildung der tubulären Netzwerke eine aktive Bewegung der vaskulären Endothelzellen voraussetzt, ist die antiangiogene Wirkung der Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** vermutlich auch eine Folge der signifikanten Ausbildung von *stress fibers*, welche die Motilität der HUVECs stark beeinträchtigen.^{236,237} Eine quantitative Auswertung des *Tube Formation Assays* mit Hilfe von *ImageJ (Angiogenesis Analyzer Plugin)* war in diesem Fall aufgrund der großen, undefinierten Zellansammlungen in den behandelten Proben nicht möglich, da diese das Ergebnis verfälschen würden.

Weiterführend wurde im CAM Assay überprüft, ob die beiden Goldkomplexe **29** und **30a** auch *in vivo* eine antivaskuläre Wirkung zeigen (Abbildung 51). Hierbei konnte beiden fluorierten Gold(I)-NHC-Komplexen **29** und **30a** eindeutig eine vaskular-disruptive Aktivität nachgewiesen werden. Während für die Kontrollen eine normale Entwicklung und Organisation des Blutgefäßsystems in der CAM beobachtet werden konnte, zerstörten beide Komplexe **29** und **30a** schon nach 6 h Inkubation die Kapillaren in der CAM vollständig.

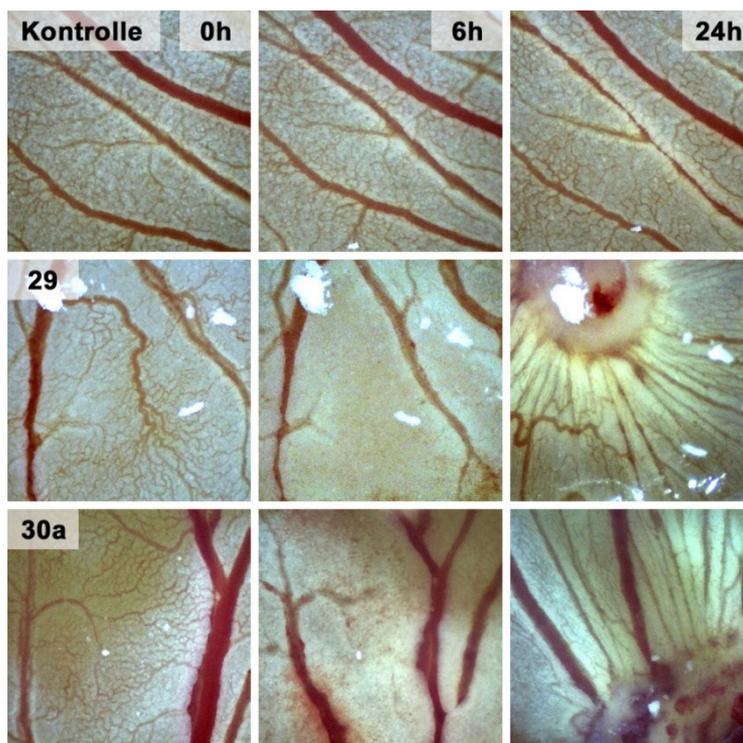


Abbildung 51: Effekte der fluorierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **29** und **30a** (jeweils 2,5 nmol) auf das Blutgefäßsystem in der Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (DMF) nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Dokumentation der antivaskulären Effekte erfolgte mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops (60× Vergrößerung).

Die größeren Blutgefäße schienen nach dieser relativ kurzen Inkubationszeit ebenfalls bereits stark angegriffen zu sein, was vor allem bei der Behandlung mit dem Biscarbenkomplex **30a** anhand von Ausblutungen deutlich zu erkennen war. Nach 24 h Inkubation zeigten beide Fluor-substituierten Goldkomplexe **29** und **30a** darüber hinaus auch signifikante Effekte auf die CAM selbst. So zog sich diese nach der Zerstörung der Blutgefäße in beiden Fällen stark zusammen und bildete eine Art „Narbe“ aus, wodurch neue Blutgefäße in den dokumentierten Bereich der CAM gelangten. Diese nach 24 h Inkubation beobachteten Veränderungen sind vermutlich Teil des Regenerationsprozesses der CAM und konnten zum Teil ebenfalls bei den CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** beobachtet werden (vgl. auch Abschnitt 4.1.1.).

Zusammenfassende Diskussion

Mit Hilfe der Verbindungen **28-30** sollte überprüft werden, ob das Einbringen von Fluor-Substituenten auch bei 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexen prinzipiell zu einer Steigerung der biologischen Aktivität führt.

Anhand von Proliferationsassays wurde für die beiden fluorierten Monocarbenkomplexe **28** eine ähnlich gute antiproliferative Aktivität wie für die Brom-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **21b** und **22c** (vgl. Tabelle 1, Abschnitt 4.1.1) nachgewiesen. So zeigten diese vier Komplexe gegenüber den untersuchten Krebszelllinien im Vergleich zu den Chlor-substituierten (**21a** und **22b**) bzw. rein Methoxy-substituierten (**15a** und **22a**) Monocarbenkomplexen aus Abschnitt 4.1.1 eine deutlich erhöhte Zytotoxizität mit IC₅₀-Werten, die vorwiegend im einstelligen mikromolaren Bereich liegen. Zusätzlich konnte der Austausch des Chlorids am Goldzentrum mit einem PPh₃-Liganden die antiproliferative Aktivität noch einmal deutlich verbessern, sodass der Monocarbenkomplex **29** fast ausschließlich IC₅₀-Werte im submikromolaren Bereich aufweist. Die beiden fluorierten Biscarbenkomplexe **30** waren ebenfalls im unteren submikromolaren Bereich wirksam, dabei jedoch nicht wesentlich aktiver als ihre CA-4-abgeleiteten Analoga **23** und **24**. Eine weitere Steigerung des Fluorierungsgrades (**30b**) führte also ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der Zytotoxizität. Dies lässt darauf schließen, dass die antiproliferative Aktivität dieser Art von Gold(I)-Biscarbenkomplexen vermutlich hauptsächlich auf ihrem Goldzentrum basiert und weniger auf der Beschaffenheit bzw. der Substituenten der 4,5-Diarylimidazol-Liganden.

Die beiden aktivsten Komplexe der Serie (**29** und **30a**) wurden für weiterführende Analysen ihres zellulären Wirkmechanismus und ihrer antivaskulären Wirkung ausgewählt. Genau wie die CA-4-abgeleiteten Gold(I)-NHC-Komplexe **22-24** führten auch die beiden Fluor-substituierten Goldkomplexe **29** und **30a** in 518A2-Melanomzellen und HUVECs durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu einer Ausbildung von *stress fibers*. Dabei erwies sich der Biscarbenkomplex **30a** in den Melanomzellen als wesentlich effektiver. Zusätzlich löste dieser neben einem signifikanten G1-Arrest in einem kleinen Anteil der Zellpopulation auch bereits die Apoptose aus, während für das Derivat **29** bei gleicher Konzentration noch keine Apoptose-induzierende Wirkung in den 518A2-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die im Vergleich zu seinem analogen PPh₃-Komplex **29** überlegene Aktivität des Biscarbenkomplexes **30a** in 518A2-Melanomzellen konnte auch im *Wound-Healing* Assay beobachtet werden, denn der Komplex **30a** hemmte die Schließung von künstlichen „Wunden“ in 518A2-Monolayern deutlich stärker als **29**.

Die beiden Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** verringerten, wie schon die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24**, die Proteinlevel der MMP-2 in 518A2-Zellen signifikant und weisen daher vermutlich ebenfalls ein gutes antimetastatisches Potential auf. Darüber hinaus stellen die beiden Komplexe **29** und **30a** äußerst potente Inhibitoren der TrxR dar, wobei der PPh₃-Komplex **29** sogar eine vergleichbare Aktivität aufweist wie der von Auranofin abgeleitete Phosphinkomplex **8**.

Zusätzlich wurde für beide Komplexe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eindeutig eine antivaskuläre Wirkung nachgewiesen. So inhibierten die fluorierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** nicht nur die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen durch HUVECs auf Matrigel, sondern zeigten auch im CAM Assay eine deutlich ausgeprägte, vaskular-disruptive Aktivität.

Insgesamt zeigten die fluorierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** also sowohl in 518A2-Melanomzellen als auch bei den Untersuchungen zu ihrer antivaskulären Aktivität die gleichen Effekte wie die zuvor beschriebenen 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe **23** und **24** (vgl. Abschnitt 4.1.1) und der analoge Anthracen-Biscarbenkomplex **25** (vgl. Abschnitt 4.1.2). Dies weist erneut auf einen vergleichbaren Wirkmechanismus und somit ein gemeinsames, molekulares *target* dieser Art von Gold(I)-NHC-Komplexen hin. Daher wird, wie auch bereits zuvor erwähnt, derzeit überprüft, ob die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** ebenfalls effektive Inhibitoren der TrxR darstellen sowie ob die in dieser Arbeit bisher untersuchten Gold(I)-NHC-Komplexe (**22-30**) eine die Mitochondrien schädigende Wirkung aufweisen.

4.1.4 Gold(I)-Biscarbenkomplexe mit 1,3-Diarylimidazol-basierten NHC-Liganden

Wie bereits in der Einleitung unter Abschnitt 1.3 beschrieben, wurden neben den CA-4-abgeleiteten Gold(I)-Monocarbenkomplexen **15** mit ihren 4,5-Diarylimidazol-Liganden auch Derivate mit 1,3-Diarylimidazol-Liganden (**16**) hergestellt.^{120,121} Diese waren ebenfalls im unteren mikromolaren Bereich gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien wirksam, wobei sich der Komplex **16b** mit seinem Dibenzylimidazol-Liganden im Vergleich zum mehrfach Methoxy-substituierten Analogon **16a** als etwas effektiver erwies.^{120,121} Darüber hinaus zeigte **16b** eine signifikante antivaskuläre Wirkung und inhibierte nicht nur die Ausbildung von hoch organisierten, tubulären Netzwerken durch vaskuläre Endothelzellen auf Matrigel (*Tube Formation Assay*), sondern zerstörte auch Blutgefäße in der CAM befruchteter Hühnereier.¹²² Da Gold(I)-Biscarbenkomplexe in der Regel deutlich effektiver sind als ihre entsprechenden Monocarbenkomplexe,^{27,28} wurde der zu **16b** analoge Biscarbenkomplex **31a** sowie sein jeweils in *para*-Position der Benzylringe Methoxy-substituiertes Derivat **31b** hergestellt. Darüber hinaus sollte überprüft werden, welche Effekte größere bzw. sterisch anspruchsvollere Aryl-Reste, wie Naphthyl (**32a**) und 4-Benzoylphenyl (**32b**), auf die biologische Aktivität dieser Art von Gold(I)-NHC-Komplexen haben. Die in dieser Arbeit untersuchten 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31** und **32** sind zusammen mit den beiden zuvor beschriebenen Monocarbenkomplexen **16** in Abbildung 52 dargestellt. Zunächst wurde überprüft, ob die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31** und **32** eine ähnlich starke, antiproliferative Aktivität gegenüber einer Auswahl an Krebszellen verschiedener Entitäten aufweisen wie die 4,5-Diarylimidazol-basierten Biscarbenkomplexe **23**, **24** und **27**. Die für die Goldkomplexe **31** und **32** mittels Proliferationsassay bestimmten IC₅₀-Werte gegenüber sechs verschiedenen Tumorzelllinien sind in der nachfolgenden Tabelle 8 zusammengefasst.

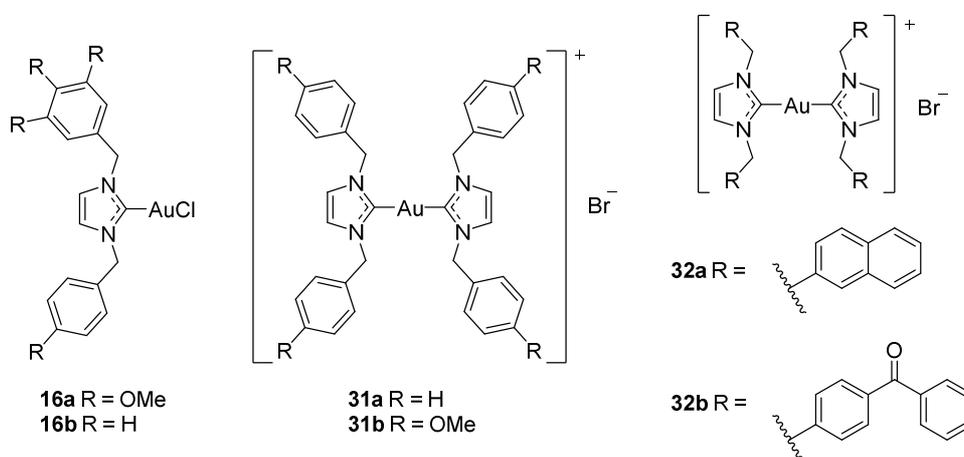


Abbildung 52: Strukturen der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Carbenkomplexe **16**, **31** und **32**.

Während die beiden Komplexe **31b** und **32a** annähernd im gleichen submikromolaren Bereich wie die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23**, **24** und **30** wirksam waren, zeigten die beiden Komplexe **31a** und **32b** eine etwas geringere antiproliferative Aktivität mit IC₅₀-Werten, die überwiegend im Bereich von ~1-2 µM liegen. Somit führten sowohl die Methoxylierungen an den Benzylresten (**31b**) als auch die Einführung des großen, aromatischen Naphthylrestes (**32a**) im Vergleich zum einfachen Dibenzylimidazol-basierten Biscarbenkomplex **31a** zu einer erhöhten Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu konnten die 4-Benzoylphenylreste in **32b** keine Steigerung der antiproliferativen Aktivität bewirken, sondern verringerten diese sogar geringfügig. Allgemein erwiesen sich alle vier Goldkomplexe in den MCF-7/Topo-Zellen am effektivsten, während die KB-V1/Vbl-Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber den Verbindungen **31** und **32** aufwiesen. Eine solche Spezifität für die MCF-7/Topo-Brustkrebszelllinie konnte bereits bei den 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23**, **24** und **30** nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 4.1.1 und Tabelle 6, Abschnitt 4.1.3). Darüber hinaus nahm die Aktivität der Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31** und **32** gegenüber den drei untersuchten Kolonkarzinomzelllinien ausgehend von der eher sensitiven HCT-116-Zelllinie über die HT-29- hin zu den DLD-1-Zellen jeweils deutlich ab. Hierbei handelt es sich um einen Trend, der auch bereits für die fluorierten Gold(I)-NHC-Komplexe **28-30** beobachtet wurde (vgl. Tabelle 6, Abschnitt 4.1.3).

Tabelle 8: IC₅₀-Werte [µM] der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe **31** und **32** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszelllinien. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± SD, die jeweils mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests nach 72 h Inkubation bestimmt wurden.

	31a	31b	32a	32b
518A2	0,89 ± 0,09	0,55 ± 0,08	0,45 ± 0,06	1,0 ± 0,0
Panc-1	0,86 ± 0,03	0,62 ± 0,07	0,60 ± 0,15	2,4 ± 0,3
MCF-7/Topo	0,69 ± 0,08	0,45 ± 0,05	0,19 ± 0,07	1,2 ± 0,2
KB-V1/Vbl	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,6	1,7 ± 0,4	n.b.
HCT-116	0,94 ± 0,03	0,75 ± 0,06	0,25 ± 0,04	1,8 ± 0,0
HT-29	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,5	0,55 ± 0,06	2,3 ± 0,7
DLD-1	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,0	0,92 ± 0,16	n.b.

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, HCT-116-Kolonkarzinomzellen, kolorektale HT-29- und DLD-1-Adenokarzinomzellen; n.b. – nicht bestimmt

Genau wie die zuvor beschriebenen 4,5-Diarylimidazol-basierten Komplexe **23**, **24** und **30a** wurden auch die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31** und **32** auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Veränderungen in der Struktur des Aktinzytoskeletts von 518A2-Melanomzellen auszulösen. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, mit ihrem typischen, kortikalen Netzwerk an Aktinfilamenten und einer Vielzahl an Aktin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten, konnte in Melanomzellen, die mit den Komplexen mit **31** oder **32** behandelt wurden, tatsächlich eine veränderte Organisation bzw. Struktur des Aktinzytoskeletts nachgewiesen werden. So induzierte die Behandlung der 518A2-Zellen mit den Komplexen **31** und **32** ebenfalls die Ausbildung von *stress fibers*, jedoch war dieser Effekt deutlich weniger ausgeprägt als bei Zellen, die mit den 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23**, **24** und **30a** behandelt wurden. Dagegen konnten vermehrt abgerundete Zellen beobachtet werden, in denen das Aktinzytoskelett bereits zum Teil fragmentiert vorlag und die weitaus weniger interzelluläre Kontakte aufwiesen als die Kontrollzellen. Da es sich hierbei um zellmorphologische Veränderungen handelt, die typischerweise während der Apoptose auftreten,¹⁸² könnten diese Beobachtungen darauf hinweisen, dass ein Teil der behandelten 518A2-Zellen bereits den programmierten Zelltod durchläuft. Repräsentative Aufnahmen von 518A2-Melanomzellen, die mit den beiden aktiveren Komplexen **31b** bzw. **32a** behandelt wurden, sind in Abbildung 53 aufgeführt und zeigen stellvertretend die beschriebenen Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Goldkomplexe **31** und **32** auf das Aktinzytoskelett.

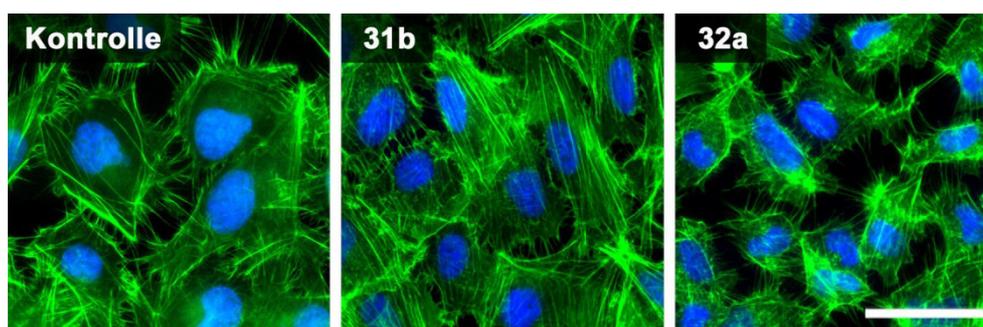


Abbildung 53: Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31b** und **32a** (jeweils 1 μM) auf das Aktinzytoskelett von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Das Aktinzytoskelett (grün) wurde mit Hilfe von Alexa Fluor® 488-konjugiertem Phalloidin visualisiert, während die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 μm .

Die Vermutung, dass eine Behandlung mit den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **31** oder **32** bereits nach 24 h in einem großen Anteil der 518A2-Melanomzellen zur Apoptose und somit zu einer Fragmentierung der chromosomalen DNA führt, konnte anhand einer durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse der Zellen nicht bestätigt werden (Abbildung 54).

Während die beiden Komplexe **31b** und **32a** nach 24 h Inkubation in der eingesetzten Konzentration noch keinerlei Apoptose-induzierende Wirkung zeigten, bewirkten **31a** und **32b** im Vergleich zur Kontrolle einen geringfügigen Anstieg im Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). So wurden die 518A2-Melanomzellen durch Behandlung mit den Goldkomplexen **31** und **32** ebenfalls in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Um einen ähnlich starken G1-Arrest in 518A2-Zellen auszulösen wie die 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23**, **24** und **30a**, waren im Vergleich jedoch etwas höhere Konzentrationen von **31** und **32** notwendig. Es besteht also eine eindeutige Korrelation zwischen der Effektivität, mit der die untersuchten Gold(I)-Biscarbenkomplexe Tumorzellen (hier: 518A2-Melanomzellen) in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren, und ihrer anti-proliferativen Aktivität.

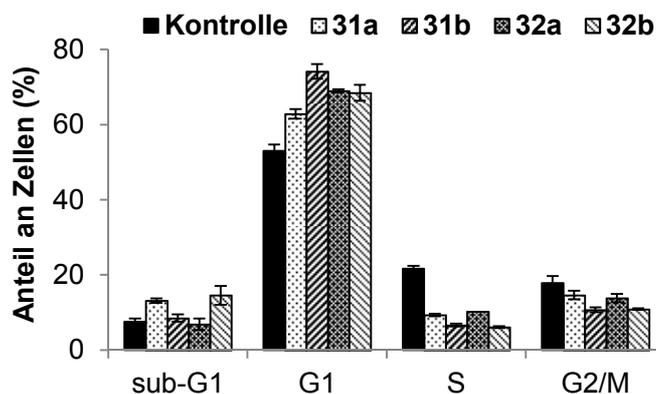


Abbildung 54: Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31** und **32** auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Die Zellen wurden mit jeweils 2 μ M **31a** bzw. **32b** sowie mit jeweils 1 μ M **31b** bzw. **32a** behandelt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei (**31b** und **32a**) bzw. drei (Kontrolle, **31a** und **32b**) Messungen.

Die beiden Komplexe **31b** und **32a** wurden als aktivere Verbindungen dieser Serie von 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexen im *Wound-Healing* Assay untersucht, da die Ausbildung von *stress fibers* und eine Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus durch die bisher analysierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23**, **24** und **30a** mit einer antimigratorischen Aktivität einherging. Trotz der oben beschriebenen Effekte auf das Aktinzytoskelett und dem signifikanten G1-Arrest, den die beiden Goldkomplexe **31b** und **32a** in 518A2-Zellen auslösten, konnte für diese keine inhibitorische Aktivität im *Wound-Healing* Assay beobachtet werden.

So waren mit **31b** oder **32a** behandelte Melanomzellen genauso in der Lage artifizielle „Wunden“, die in ein Monolayer der Zellen eingeführt wurden, vollständig zu schließen wie die Kontrollzellen (vgl. Abbildung 55 und Tabelle A-13 im Anhang). Daher scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass die 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23**, **24** und **30a** (vgl. Abschnitte 4.1.1 und 4.1.3) im Gegensatz zu den 1,3-Diarylimidazol-Derivaten **31** und **32** aufgrund der signifikanten Ausbildung an *stress fibers*, die durch diese Komplexe in 518A2-Melanomzellen ausgelöst wurden, tatsächlich eine antimigratorische Aktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu reichen die vergleichsweise geringen Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31** und **32** auf das Aktinzytoskelett (deutlich verminderte Ausbildung von *stress fibers*) scheinbar nicht aus, um eine Inhibition der Zellmigration auszulösen. Auch die beobachtete, zytostatische Wirkung (G1-Arrest) der Komplexe **31** und **32** bewirkte alleine keine Hemmung der Wundheilung. Somit scheint eine signifikante Ausbildung von *stress fibers* und damit einhergehend eine tatsächliche antimigratorische bzw. antimetastatische Aktivität der Gold(I)-Biscarbenkomplexe für eine Inhibition der Wundheilung notwendig zu sein.

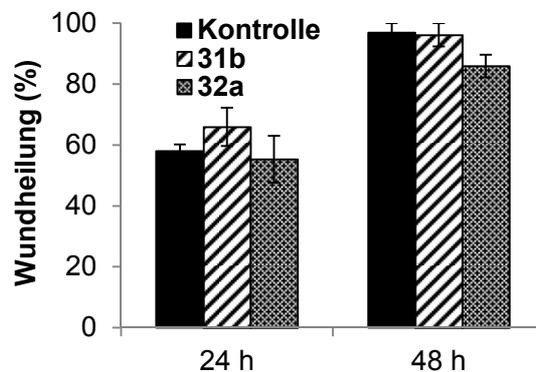


Abbildung 55: Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31b** und **32a** auf die Migration von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing Assays*. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Goldkomplexe **31a** und **31b** wurden zusätzlich im CAM Assay exemplarisch auf eine antivaskuläre Aktivität hin untersucht (Abbildung 56). Dabei konnte festgestellt werden, dass beide Gold(I)-Biscarbenkomplexe eine vaskular-disruptive Wirkung zeigen. Diese war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als die der 4,5-Diarylimidazol-basierten Komplexe **23**, **24** und **30a**, welche in der Regel bereits nach 6 h Inkubation zu einer vollständigen Zerstörung sämtlicher Kapillaren in der CAM sowie zu einer deutlichen Schädigung der größeren Blutgefäße führten. Im Gegensatz dazu waren nach einer Behandlung der CAM mit **31a** und **31b** für 6 h noch viele, intakte Kapillaren vorhanden und die größeren Blutgefäße schienen

ebenfalls weitaus weniger angegriffen als nach einer Behandlung mit **23**, **24** oder **30a**. Auch nach 24 h Inkubation konnte keine weitere Schädigung der Blutgefäße durch die Komplexe **31a** und **31b** nachgewiesen werden. Stattdessen konnten leichte toxische Effekte auf die CAM selbst beobachtet werden, die sich nach 24 h eindeutig verfärbt und teilweise zusammengezogen hatte.

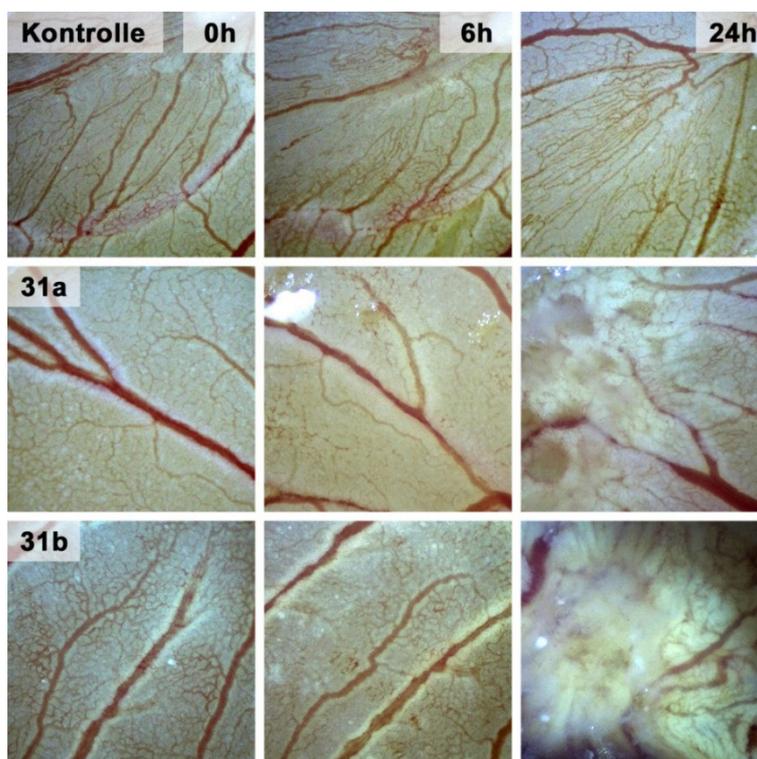


Abbildung 56: Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31a** und **31b** (jeweils 2,5 nmol) auf das Blutgefäßsystem in der Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (DMF) nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Dokumentation der antivaskulären Effekte erfolgte mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops (60× Vergrößerung).

Zusammenfassende Diskussion

Der Gold(I)-NHC-Komplex **16b** hatte sich mit seinem 1,3-Dibenzylimidazol-Strukturmotiv *in vitro* bereits als äußerst effektive antitumorale und antivaskuläre Verbindung herausgestellt.^{120–122} Aus diesem Grund wurden auch sein analoger Biscarbenkomplex **31a** sowie drei weitere 1,3-Diarylimidazol-basierte Biscarbenkomplexe **31b** und **32** hergestellt und auf ihre biologische Aktivität hin getestet. Dabei sollte in dieser Arbeit vor allem überprüft werden, ob diese Art von Gold(I)-Biscarbenkomplexen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen 4,5-Diarylimidazol-Derivaten **23**, **24**, und **30** eine ähnliche Effektivität sowie Wirkungsweise in Tumorzellen aufzeigt oder der NHC-Ligand einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität bzw. den Wirkmechanismus hat.

Mittels MTT-basierter Proliferationsassays konnte festgestellt werden, dass die 1,3-Diaryl-imidazol-basierten Biscarbenkomplexe **31** und **32** insgesamt eine etwas geringere anti-proliferative Aktivität aufweisen als die 4,5-Diarylimidazol-Derivate **23**, **24** und **30**. So zeigten **31** und **32** IC₅₀-Werte, die weitestgehend im oberen nanomolaren, vereinzelt jedoch auch im unteren einstelligen mikromolaren Bereich liegen. Während eine Methoxylierung der Benzylreste in **31b** sowie der Wechsel zu Naphthylsubstituenten in **31a** im Vergleich zum einfachen Dibenzyl-Komplex **31a** zu einer deutlichen Wirkungssteigerung führten, verringerte das Einbringen von 4-Benzoylphenylresten in **32b** die Zytotoxizität dagegen geringfügig.

In 518A2-Melanomzellen induzierten die beiden aktiveren Gold(I)-Biscarbenkomplexe **31b** und **32a** genau wie die 4,5-Diarylimidazol-Komplexe **23**, **24** und **30** einen signifikanten G1-Arrest und führten darüber hinaus ebenfalls zu einer Reorganisation von F-Aktin. Hierbei war die Ausbildung von *stress fibers* jedoch deutlich weniger ausgeprägt als bei einer Behandlung der 518A2-Zellen mit den Biscarbenkomplexen **23**, **24** oder **30**. Stattdessen lag das Aktinzytoskelett in einem Teil der behandelten Melanomzellen bereits fragmentiert vor und die Zellen zeigten eine deutlich abgerundere Morphologie. Eine antimigratorische Aktivität konnte für die 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe **31b** und **32a** nicht nachgewiesen werden, was vermutlich auf der im Vergleich zu den Komplexen **23**, **24** oder **30** deutlich geringeren Beeinträchtigung des Aktinzytoskeletts (deutlich geringere Ausbildung von *stress fibers*) beruht. Neben den oben beschriebenen Effekten auf Tumorzellen wurde für die Goldkomplexe **31a** und **31b** zusätzlich auch eine antivaskuläre Wirkung im CAM Assay beobachtet. Diese war jedoch ebenfalls weniger ausgeprägt als bei den ursprünglich von CA-4 abgeleiteten Biscarbenkomplexen **23**, **24** und **30**. Insgesamt handelt es sich bei den 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC **31** und **32** daher durchaus um eine interessante und vielversprechende Serie von antiproliferativen und antivaskulären Verbindungen, die einen guten Ausgangspunkt für eine weitere Entwicklung und Optimierung bildet.

Einige dinukleare Goldkomplexe, für die eine signifikante antiproliferative bzw. antitumorale Aktivität nachgewiesen wurde, sind in der Abbildung 58 aufgeführt.^{260,267-269} Die beiden Phosphinkomplexe **35** und **36** zeigten neben einer hohen Zytotoxizität *in vitro* auch im Xenograft-Mausmodell eine starke antitumorale Wirkung.²⁶⁰ Weiterhin wurde beobachtet, dass **35** und hiervon abgeleitete Derivate die Autophagie induzieren.²⁶⁷ Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den dinuklearen Goldkomplexen **37** und **38** um effektive Inhibitoren der PARP-1 bzw. der TrxR.^{268,269}

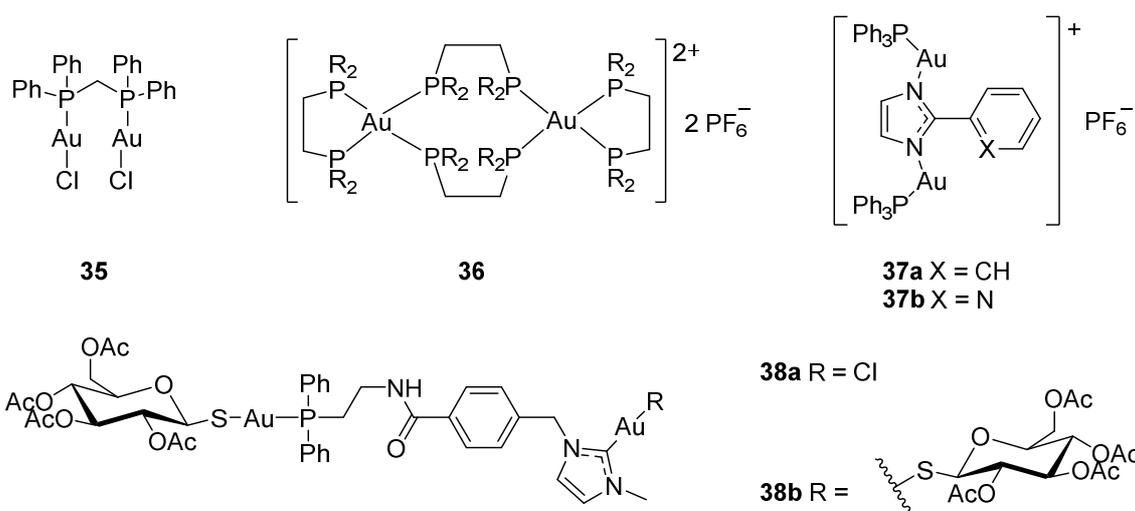


Abbildung 58: Beispiele verschiedener, dinuklearer Gold(I)-Komplexe (**35-38**) mit signifikanter antitumoraler Wirkung *in vitro*.^{260,267-269}

Wie zuvor erwähnt, kann durch die Herstellung von polynuklearen Metallkomplexen nicht nur die Effektivität von Wirkstoffkandidaten gesteigert, sondern es können mit Hilfe dieses Konzepts auch zusätzliche Wirkmechanismen ermöglicht werden. Dies ist insbesondere bei der Kombination von zwei oder mehreren verschiedenen Metallen der Fall, von denen bereits unterschiedliche biologische Wirkungsweisen bekannt sind. So wurden bereits des Öfteren heteronukleare Komplexe hergestellt, die verschiedenste Arten und Kombinationen von Metallzentren, wie zum Beispiel Platin-, Gold-, Ruthenium-, Kupfer- oder auch Eisenzentren, aufweisen.^{194,269,270} Eine interessante und vielversprechende Kombination stellt dabei die Verknüpfung von Goldzentren mit Ferrocen-Einheiten dar.²⁷⁰⁻²⁷² Dies beruht zum einen auf der Tatsache, dass es sich bei Goldkomplexen häufig um effektive Inhibitoren des antioxidativen Enzyms TrxR handelt^{27,28,79,110} und zum anderen darauf, dass der Wirkmechanismus des Ferrocens sowie hiervon abgeleiteter Derivate mit einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert ist.²⁷³⁻²⁷⁸

Durch die Kombination eines TrxR-inhibierenden Goldfragments mit einer ROS-produzierenden Ferrocen-Einheit können daher neue, heteronukleare Metallverbindungen hergestellt werden, die möglicherweise eine synergistische Wirkung zeigen und die intrazelluläre Redoxhomöostase in Form von oxidativem Stress stärker beeinträchtigen als die beiden einzelnen Komponenten alleine. Da viele Arten von Krebszellen prinzipiell ein erhöhtes ROS-Level aufweisen, sind diese gegenüber Verbindungen, bei denen es sich um starke ROS-Produzenten handelt oder die die Redoxhomöostase auf eine andere Weise, wie zum Beispiel durch eine TrxR-Inhibition, stören häufig besonders anfällig.^{279,280} Darüber hinaus erfolgt die Aktivierung von Ferrocen-basierten Verbindungen und die damit einhergehende Ausbildung reaktiver Radikale ebenfalls durch ROS, sodass es sich hierbei um eine Art autokatalytischen Aktivierungsmechanismus handelt, der die Effektivität der Metallkomplexe zusätzlich steigern kann.^{275,281}

Insgesamt sollte es sich daher also bei dieser Art von heterometallischen Verbindungen um gute antitumorale Wirkstoffkandidaten handeln. Einige Beispiele bereits bekannter, heteronuklearer Gold(III)- und Gold(I)-Komplexe mit Ferrocen-Substituenten sind in Abbildung 59 dargestellt. Alle drei Fe/Au-Komplexe **39-41** zeigen *in vitro* eine signifikante antitumorale Wirkung.^{194,272,282} Für den trinuklearen Gold(III)-Komplex **39b** konnte darüber hinaus eine inhibitorische Aktivität gegenüber dem an der DNA-Reparatur beteiligten Enzym PARP-1 nachgewiesen werden.¹⁹⁴

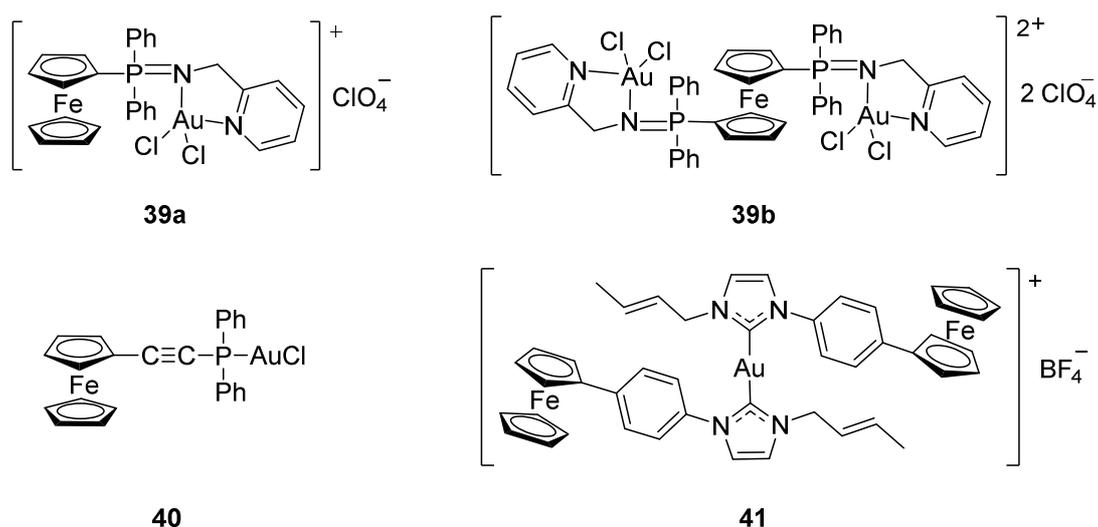


Abbildung 59: Heteronukleare Fe/Au-Komplexe (**39-41**) mit signifikanter antiproliferativer Aktivität *in vitro*.^{194,272,282}

Tabelle 9: IC₅₀-Werte [μM] der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **42-44** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszelllinien und nicht-malignen Zellen. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± SD, die jeweils mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests nach 72 h Inkubation bestimmt wurden.

	42a	42b	43	44
518A2	11,3 ± 0,3	1,3 ± 0,1	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,02
Panc-1	6,7 ± 0,3	0,62 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,00
MCF-7/Topo	7,1 ± 0,1	0,71 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,11 ± 0,00
KB-V1/Vbl	> 50	13,3 ± 0,1	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,1
KB-V1/Vbl + Verap.	2,0 ± 0,6	0,38 ± 0,12	0,40 ± 0,08	0,11 ± 0,01
HCT-116	11,1 ± 0,3	0,21 ± 0,08	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,00
HT-29	10,8 ± 0,4	0,30 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,01
DLD-1	19,5 ± 1,0	4,2 ± 1,4	1,2 ± 0,5	0,30 ± 0,11
HUVEC	12,0 ± 1,5	0,68 ± 0,07	0,77 ± 0,17	0,26 ± 0,04
CCD-18Co	> 50	15,0 ± 0,9	8,9 ± 0,3	2,8 ± 0,1

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen (optional für 24 h mit Verapamil vorbehandelt), HCT-116-Kolonkarzinomzellen, kolorektale HT-29- und DLD-1-Adenokarzinomzellen, HUVEC – humane vaskuläre Endothelzellen, CCD-18Co – kolorektale Myofibroblasten

Interessanterweise sind alle Ferrocen-substituierten Komplexe (**42-44**) auch äußerst effektiv gegenüber resistenten Zelllinien, wie zum Beispiel der MCF-7/Topo-Brustkrebszelllinie oder der kolorektalen HT-29-Adenokarzinomzelllinie.^{134,135,141–143} Eine Ausnahme hiervon bilden die P-gp-überexprimierenden KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen,^{160,161} gegenüber denen sich alle vier Fe/Au-Komplexe **42-44** am unwirksamsten zeigten. Eine solche Resistenz der KB-V1/Vbl-Zellen wurde auch für alle anderen, in dieser Arbeit untersuchten Goldkomplexe (vgl. Abschnitte 4.1.1 - 4.1.4 sowie Abschnitt 4.1.6) beobachtet. Durch eine Vorbehandlung der KB-V1/Vbl-Zellen mit dem P-gp-Inhibitor Verapamil konnte diese jedoch, wie auch im Falle der Biscarbenkomplexe **23** und **24** (vgl. Tabelle 3 in Abschnitt 4.1.1), überwunden bzw. umgangen werden. Neben ihrer signifikanten antiproliferativen Aktivität in Krebszellen zeigen die Fe/Au-Komplexe **42-44** auch starke inhibitorische Effekte auf das Wachstum von vaskulären Endothelzellen. So weisen die Komplexe gegenüber HUVECs ähnliche IC₅₀-Werte auf wie in den untersuchten Krebszelllinien. Dies könnte auf eine starke antivaskuläre Wirkung der Fe/Au-Komplexe **42-44** hinweisen.

Im Gegensatz dazu sind die Ferrocen-substituierten Gold(I)-Carbenkomplexe **42-44** in nicht-malignen CCD-18Co-Fibroblasten weitaus weniger aktiv und zeigen gegenüber diesen deutlich höhere IC_{50} -Werte. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Fe/Au-Komplexe **42-44** eine eindeutige Selektivität für Krebszellen und vaskuläre Endothelzellen aufweisen. Der Phosphinkomplex **43** und sein analoger Biscarbenkomplex **44** wurden aufgrund ihrer hohen antiproliferativen Aktivität gegenüber den untersuchten Tumorzelllinien für weiterführende Experimente ausgewählt und auf ihre zellulären sowie molekularen Wirkmechanismen hin untersucht.

So wurde zunächst beobachtet, dass auch die Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** in 518A2-Melanomzellen sowie HUVECs durch die Ausbildung von *stress fibers* eine markante Änderung in der Organisation des Aktinzytoskeletts induzieren (Abbildung 61). Genau wie bei den Fluor-substituierten Goldkomplexen **29** und **30a** (vgl. Abschnitt 4.1.3) waren die *stress fibers* in den vaskulären Endothelzellen nach Behandlung mit den Goldkomplexen **43** und **44** generell deutlich stärker ausgeprägt als in den Melanomzellen. Darüber hinaus erwies sich der Biscarbenkomplex **44** im Vergleich zu seinem PPh_3 -Analogon **43** in beiden Zelllinien ebenfalls als etwas aktiver.

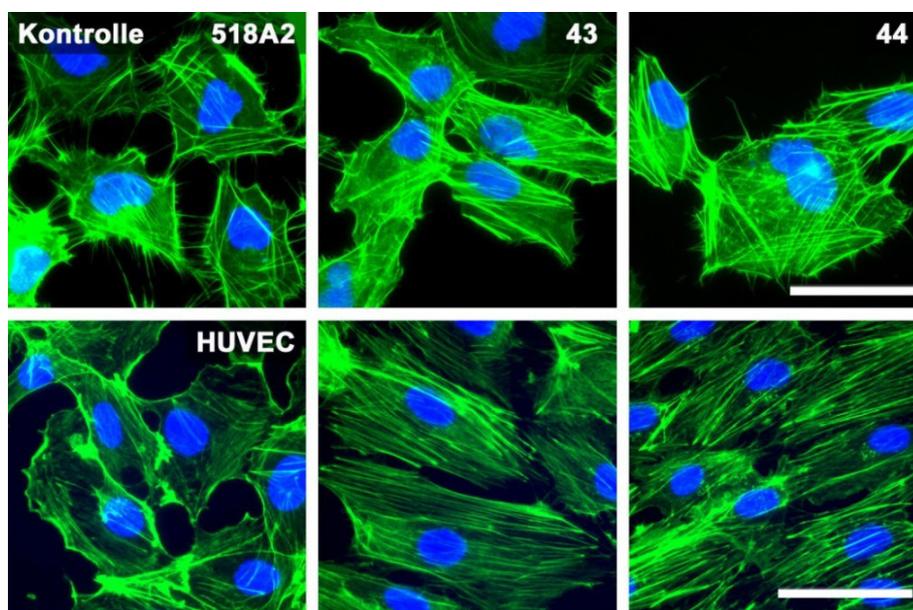


Abbildung 61: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** (500 nM) und **44** (250 nM) auf das Aktinzytoskelett von 518A2-Melanomzellen und HUVECs nach 24 h Inkubation. Das Aktinzytoskelett (grün) wurde mit Hilfe von Alexa Fluor® 488-konjugiertem Phalloidin visualisiert, während die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 μ m.

Da eine solche Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts in 518A2-Zellen nach Behandlung mit ähnlichen Gold(I)-NHC-Komplexen (vgl. Abschnitte 4.1.1-4.1.4) bisher generell mit einer Arretierung der Melanomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus korrelierte, sollte überprüft werden, welchen Effekt die Ferrocen-substituierten Goldkomplexe **43** und **44** auf den Ablauf des Zellzyklus haben. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse mit den Fe/Au-Komplexen **43** und **44** sind in der nachfolgenden Abbildung 62 dargestellt.

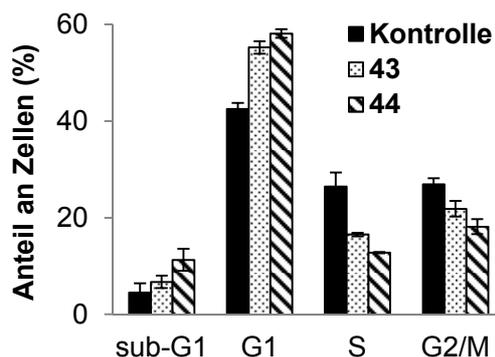


Abbildung 62: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** (500 nM) und **44** (250 nM) auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie bereits vermutet, induzierten die beiden Fe/Au-Komplexe **43** und **44** ebenfalls einen signifikanten G1-Arrest in 518A2-Melanomzellen, der sich jeweils durch einen starken Anstieg an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus sowie damit einhergehend einer deutlichen Abnahme der Anteile an Zellen in der S- und G2/M-Phase auszeichnete. Der Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen war in beiden Fällen nur gering.

Das antimigratorische Potential der Goldkomplexe **43** und **44** wurde mit Hilfe von *Wound-Healing* Assays analysiert, bei denen ebenfalls die stark metastasierende 518A2-Melanomzelllinie verwendet wurde (Abbildung 63). Beide Komplexe **43** und **44** beeinträchtigten die Motilität der 518A2-Zellen erheblich und verhinderten so das Schließen künstlicher „Wunden“ in Monolayern der Zellen. Während die Kontrollzellen eine 100 %-ige „Wundheilung“ nach 48 h Inkubation erreicht hatten, wurde diese durch eine Behandlung der Melanomzellen mit dem Komplex **43** auf etwa 70 % und mit dem Komplex **44** sogar auf etwa 40 % reduziert. Bei dem Biscarbenkomplex **44** handelt es sich also um einen weitaus stärkeren Inhibitor der Zellmigration als bei dem analogen PPh₃-Derivat **43**.

Da ähnliche Ergebnisse bereits für die entsprechenden Fluor-Derivate **29** und **30a** erhalten wurden (vgl. Abschnitt 4.1.3), kann man davon ausgehen, dass es sich bei Gold(I)-Biscarbenkomplexen dieser Art im Vergleich zu ihren analogen Phosphinkomplexen prinzipiell um effektivere antimigratorische Verbindungen handelt. Insgesamt zeigten die beiden Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** also die gleichen Effekte in 518A2-Melanomzellen wie alle anderen bisher in dieser Arbeit untersuchten 4,5-Diaryl-imidazol-basierten Analoga (vgl. Abschnitte 4.1.1 - 4.1.3), was auf einen identischen bzw. weitestgehend vergleichbaren molekularen Wirkmechanismus der Komplexe hinweist.

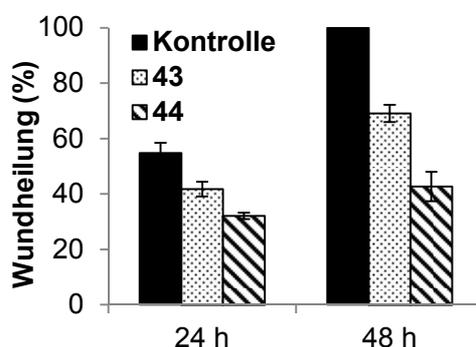


Abbildung 63: Inhibitorische Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** (je 500 nM) auf die Motilität von 518A2-Melanomzellen im *Wound-Healing* Assay. Die dargestellten prozentualen Anteile der Wundheilung entsprechen jeweils Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Um diesen Mechanismus nun näher zu untersuchen, wurde überprüft, ob es sich bei den Goldkomplexen **43** und **44** tatsächlich auch um effektive TrxR-Inhibitoren handelt, die durch Hemmung dieses antioxidativen Enzyms, aber auch aufgrund der vorhandenen Ferrocen-Einheiten zu einer erhöhten intrazellulären ROS-Konzentration und damit einhergehend zu einer Schädigung der Mitochondrien führen. Da Lease *et al.* für den zuvor beschriebenen Fe/Au-Komplex **39b** eine starke inhibitorische Aktivität gegenüber PARP-1 nachweisen konnten,¹⁹⁴ sollten die Komplexe **43** und **44** zusätzlich auf ihr Potential, dieses an der DNA-Reparatur beteiligte Enzym zu hemmen, untersucht werden. Die Ergebnisse der TrxR- und PARP-1-Enzymaktivitätsassays sind in der nachfolgenden Tabelle 10 zusammengefasst. Beide untersuchten Fe/Au-Komplexe waren *in vitro* in der Lage die TrxR zu inhibieren, wobei sich das PPh₃-Derivat **43** mit einem EC₅₀-Wert von ~600 nM im Vergleich zum Biscarbenkomplex **44** mit einem EC₅₀-Wert von ~1,5 μ M als weitaus effektiverer Inhibitor herausstellte. Eine solche Überlegenheit des Phosphinkomplexes gegenüber seinem analogen Biscarbenkomplex wurde in Bezug auf eine TrxR-inhibierende Aktivität auch bei den Fluor-substituierten Goldkomplexen **29** und **30a** festgestellt sowie von Rubbiani *et al.* für die

Benzimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe **13b** und **13c** beschrieben (vgl. auch Tabelle 7 in Abschnitt 4.1.3 und Abschnitt 1.3).^{109,110} Die Ursache für die höhere Aktivität der Phosphinkomplexe liegt dabei, wie bereits zuvor beschrieben, in der unterschiedlichen Stabilität der Gold(I)-NHC-Komplexe.^{109,110} Während die Biscarbenkomplexe **13b**, **30a** und **44** mit ihren zwei NHC-Liganden weitaus weniger anfällig für Angriffe von (Bio-)Nukleophilen sind, weisen die Derivate **13c**, **29** und **43** mit ihren PPh₃-Liganden am Goldzentrum eine deutlich bessere Abgangsgruppe auf und gehen somit leichter nukleophile Substitutionen ein.

Aus diesem Grund können die Goldzentren in **13c**, **29** und **43** also auch besser mit dem Selenocystein im aktiven Zentrum der TrxR interagieren als die in den Biscarbenkomplexen **13b**, **30a** und **44**, was zu der stärkeren inhibitorischen Aktivität von **13c**, **29** und **43** gegenüber diesem antioxidativen Enzym führt.¹¹⁰ Überraschenderweise wurde die Aktivität von PARP-1 dagegen durch den Biscarbenkomplex **44** stärker beeinträchtigt als durch das PPh₃-Derivat **43**. Allgemein handelt es sich bei beiden Komplexen um relativ potente Inhibitoren von PARP-1, die mit EC₅₀-Werten von ~1-2 μM im gleichen Aktivitätsbereich wie der Fe/Au-Komplex **39b** (EC₅₀ = 1,0 ± 0,5 μM)¹⁹⁴ liegen.

Tabelle 10: Inhibitorisches Potential der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** gegenüber der Enzymaktivität von TrxR und PARP-1. Bei den aufgeführten EC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte ± SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die für die Inhibition von PARP-1 ermittelten EC₅₀-Werte wurden von Prof. Dr. Angela Casini (*Chair of Medicinal and Bioinorganic Chemistry*, Cardiff University, Cardiff, Wales) bestimmt.

EC ₅₀ [μM]	TrxR	PARP-1
43	0,63 ± 0,07	2,0 ± 0,3
44	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,4

Mit Hilfe eines NBT-basierten Assays zum Nachweis von ROS wurde weiterhin untersucht, ob die Fe/Au-Komplexe **43** und **44** die ROS-Konzentration in 518A2-Melanomzellen erhöhen (Abbildung 64). Die Komplexe **43** und **44** wurden dabei in einem Konzentrationsbereich eingesetzt, in dem sie nach 24 h Inkubation noch keine oder nur eine äußerst geringe toxische Wirkung auf die Melanomzellen haben, aber dennoch bereits zu einer signifikanten Inhibition der TrxR führen (0,25 – 1,0 μM). Während der Phosphinkomplex **43** in den beiden geringeren Konzentrationen (250 nM und 500 nM) noch keinen Effekt auf die 518A2-Zellen zeigte, führte der Biscarbenkomplex **44** zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären ROS-Levels.

So war die ROS-Konzentration in Melanomzellen, die mit 500 nM des Goldkomplexes **44** behandelt wurden, etwa 1,6-fach höher als in Zellen, die mit einer analogen Konzentration von **43** oder einer analogen Menge an reinem DMF (Kontrolle) behandelt wurden. Überraschenderweise steigerten die beiden Fe/Au-Komplexe **43** und **44** in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 μ M die ROS-Produktion dagegen gleichermaßen (jeweils \sim 1,8-fach im Vergleich zur Kontrolle). Dies lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Anzahl an Ferrocen-Einheiten in den beiden Komplexen sowie ihr unterschiedlich stark ausgeprägtes Potential, die TrxR zu inhibieren, erklären. So scheint der Biscarbenkomplex **44** vor allem aufgrund seiner zwei Ferrocen-Reste mehr ROS zu produzieren und dem PPh₃-Komplex **43** zumindest bei geringen Konzentrationen deutlich überlegen zu sein.

Wahrscheinlich ist dies bei Betrachtung der reinen ROS-Produktion an sich sogar noch bei 1 μ M der Fall, jedoch stellt der Gold(I)-Phosphinkomplex **43** im Vergleich zu seinem Analogon **44** bei dieser Konzentration den weitaus effektiveren TrxR-Inhibitor dar (vgl. EC₅₀-Werte in Tabelle 10). Dies führt vermutlich zu einer Kompensierung der geringeren ROS-Produktion durch **43** und somit zu einem ähnlichen intrazellulären ROS-Level in 518A2-Melanomzellen wie bei Behandlung mit dem Biscarbenkomplex **44**. Allgemein lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass sowohl die Ferrocen-Reste als auch das Goldzentrum der Komplexe **43** und **44** maßgeblich an der Erhöhung des intrazellulären ROS-Levels in 518A2-Zellen beteiligt sind und beide Metalle eine zentrale Rolle im Wirkmechanismus dieser beiden heteronuklearen Metallverbindungen spielen.

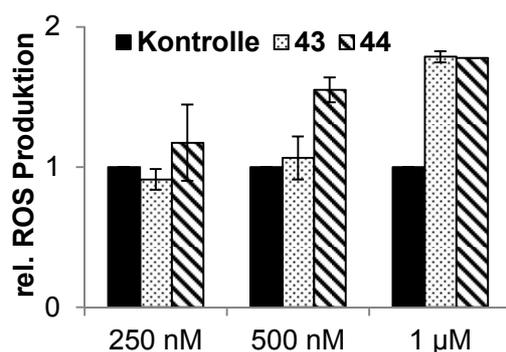


Abbildung 64: Relative ROS-Level in 518A2-Melanomzellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (250 nM, 500 nM und 1 μ M) der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** für 24 h. Die Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt und das in den Kontrollansätzen ermittelte ROS-Level jeweils gleich 1 gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Inhibition der TrxR durch Goldkomplexe sowie das Auftreten von oxidativem Stress sind in der Regel mit starken Schädigungen der Mitochondrien assoziiert, die wiederum zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ führen können.^{171,176,283–285} Auch ist bekannt, dass sogenannte DLCs (delokalisierte, lipophile Kationen), zu denen auch die beiden Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** zählen, vermehrt in den Mitochondrien akkumulieren und in diesen essentielle, zelluläre Prozesse stören. So führen DLCs durch eine Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran ebenfalls zu einem Verlust von $\Delta\psi_m$ und leiten letztendlich die Apoptose in den betroffenen Zellen ein.^{79,97,98} Aus diesen Gründen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 die Effekte der Fe/Au-Komplexe **43** und **44** auf das Mitochondrienmembranpotential von 518A2-Melanomzellen untersucht. Die Ergebnisse des JC-1 Assays sind in der nachfolgenden Abbildung 65 graphisch dargestellt.

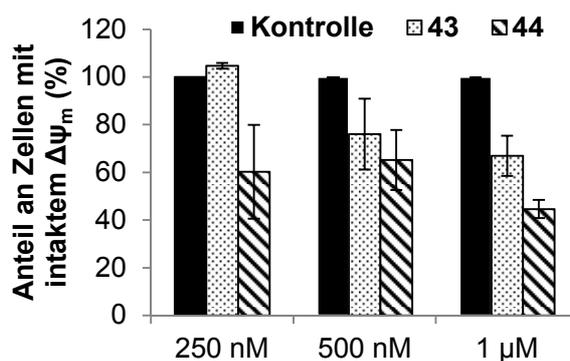


Abbildung 65: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** (0,25 - 1 μ M) auf das Mitochondrienmembranpotential $\Delta\psi_m$ in 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt. Der Anteil an Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ wurde für die Kontrollen gleich 100 % gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur ROS-Produktion (NBT-Test, vgl. Abbildung 64) konnte nach Behandlung der 518A2-Zellen mit den gleichen Konzentrationen der Komplexe **43** und **44** im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen auch jeweils eine konzentrationsabhängige Reduktion des Anteils an Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ beobachtet werden (Anstieg ROS \rightarrow Verlust $\Delta\psi_m$). Dabei erwies sich der Biscarbenkomplex **44** generell als effektiver und schädigte die Mitochondrien der Melanomzellen deutlich stärker als sein PPh₃-Analogon **43**. Neben einer höheren ROS-Produktion könnte auch eine stärkere Akkumulation von **44** in den Mitochondrien eine Erklärung für die effektivere antimitochondriale Aktivität des Fe/Au-Biscarbenkomplexes darstellen.

Ob sich der Biscarbenkomplex **44** tatsächlich stärker in den Mitochondrien anreichert als sein PPh₃-Analogon **43**, könnte zum Beispiel mit Hilfe von FAAS und einer Bestimmung des Goldgehalts in Mitochondrien, die aus entsprechend behandelten Melanomzellen isoliert wurden, überprüft werden.

Da die Komplexe **43** und **44** nicht nur in Tumorzellen sehr effektiv waren, sondern auch gegenüber vaskulären Endothelzellen eine signifikante antiproliferative Aktivität gezeigt hatten (vgl. Tabelle 9), wurde ihre antivaskuläre Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Die Auswirkungen der Fe/Au-Komplexe **43** und **44** auf die Expression und/oder Sekretion von proangiogenen MMPs in HUVECs wurden, wie bereits bei den CA-4-abgeleiteten Goldkomplexen **22a**, **23** und **24** (hier wurden allerdings 518A2-Melanomzellen verwendet; prometastatische MMPs), mit Hilfe einer Gelatine-Zymographie untersucht. Aus den in Abbildung 66 dargestellten Aufnahmen der Zymographie-Gele wird deutlich, dass beide Komplexe **43** und **44** zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des intra- sowie extrazellulären Anteils an aktiver MMP-2 führen. Dabei war das MMP-2-Level in den vaskulären Endothelzellen (Zelllysate) jeweils deutlich stärker betroffen als der von den HUVECs sezernierte Anteil (Medium). Dies deutet darauf hin, dass die Ferrocen-substituierten Goldkomplexe **43** und **44**, genau wie die Gold(I)-Biscarbenkomplexe **23** und **24** (vgl. Abschnitt 4.1.1), die Expression der MMP-2 beeinflussen und nicht einfach nur deren Sekretion inhibieren.

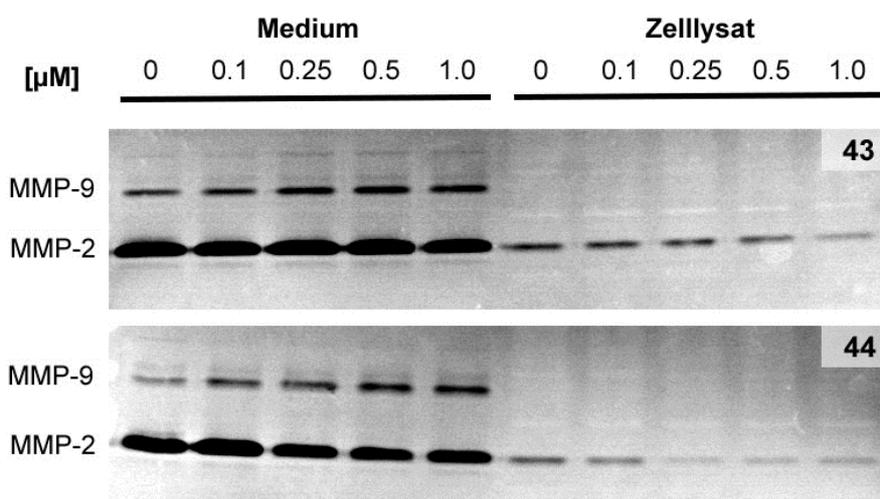


Abbildung 66: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** auf die extra- (Medium) und intrazellulären (Zelllysate) Anteile aktiver MMP-9 und MMP-2 von HUVECs. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe (0,1 - 1 µM) inkubiert, bevor die Medium- und Zelllysateproben aufbereitet und anschließend elektrophoretisch in einem Gelatine-haltigen Gel aufgetrennt wurden. Pro Probe wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Es sind die Negativbilder der Coomassie-gefärbten Gele gezeigt.

Insgesamt war der Biscarbenkomplex **44** deutlich effektiver als sein PPh_3 -Analogon **43**, da er die MMP-2-Anteile bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 100 nM signifikant reduzierte. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung der HUVECs mit dem Komplex **43** erst ab einer Konzentration von etwa 250-500 nM zu einer deutlichen Verringerung der MMP-2-Level. Die MMP-9 konnte, wie schon bei den 518A2-Melanomzellen (vgl. Abschnitt 4.1.1), auch bei den HUVECs lediglich im Medium nachgewiesen werden und schien im Gegensatz zur MMP-2 bei Behandlung der Zellen mit den Fe/Au-Komplexen **43** und **44** sogar verstärkt exprimiert bzw. sezerniert zu werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Reaktion der vaskulären Endothelzellen, durch die die Reduktion der MMP-2 ausgeglichen werden soll.

In *Tube Formation* Assays wurde ersichtlich, dass eine Behandlung der HUVECs mit nicht-toxischen Konzentrationen der beiden Ferrocen-substituierten Komplexe **43** und **44** (jeweils 100 nM) zu einer deutlichen Inhibition der Ausbildung von tubulären Netzwerken auf Matrigel führt (Abbildung 67).

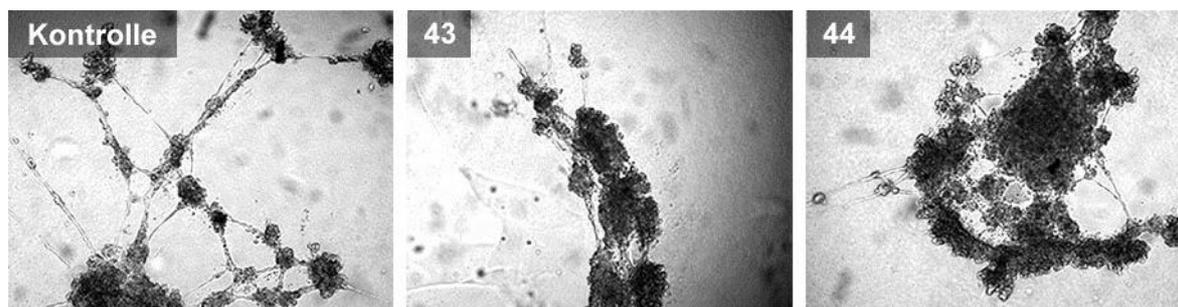


Abbildung 67: Inhibitorische Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** (jeweils 100 nM) auf die Ausbildung von tubulären Netzwerken durch HUVECs. Die vaskulären Endothelzellen wurden auf Matrigel ausgesät und umgehend mit den Testverbindungen oder einer analogen Menge an DMF (Kontrolle) versetzt. Die lichtmikroskopische Dokumentation erfolgte nach 24 h Inkubation.

Auch *in vivo* zeigten die Komplexe **43** und **44** eine signifikante antivaskuläre Wirkung und zerstörten die Blutgefäße in der CAM von befruchteten Hühnereiern. Repräsentative Aufnahmen, welche diese starke vaskular-disruptive Wirkung im CAM Assay dokumentieren, sind in Abbildung 68 dargestellt. Bereits nach 6 h Inkubation mit den Komplexen **43** und **44** waren annähernd alle Kapillaren in den behandelten Bereichen der CAM verschwunden. Auch die größeren Gefäße wiesen nach dieser kurzen Inkubationszeit deutliche Schäden auf und zeigten zum Teil starke Ausblutungen.

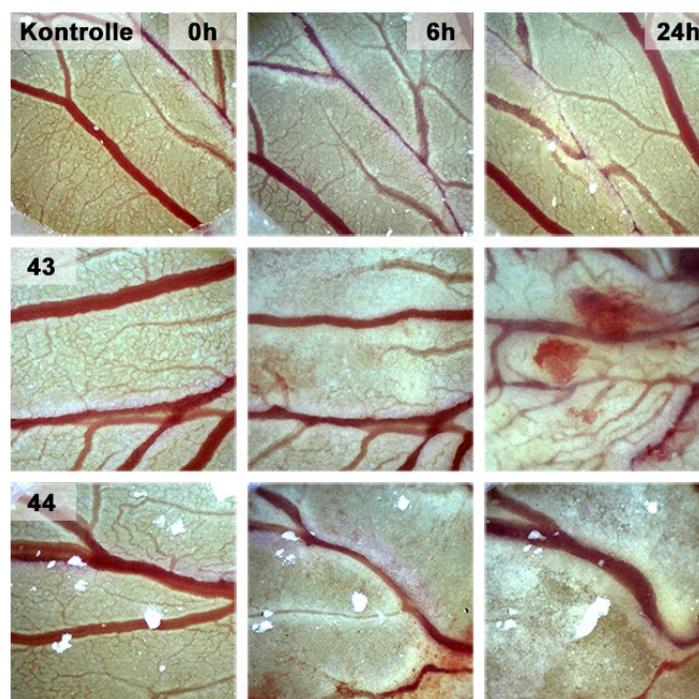


Abbildung 68: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** (jeweils 2,5 nmol) auf das Blutgefäßsystem in der Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (DMF) nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Dokumentation der antivaskulären Effekte erfolgte mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops (60× Vergrößerung).

Erst nach 24 h wurde deutlich, dass es sich bei dem Biscarbenkomplex **44** um die weitaus effektivere vaskular-disruptive Verbindung handelt. So blieben nach Behandlung der CAM mit **44** lediglich vereinzelt große Blutgefäße intakt, während alle anderen Kapillaren durch den Goldkomplex vollständig zerstört wurden. Im Gegensatz dazu waren in der CAM, die für 24 h mit dem PPh₃-Komplex **43** inkubiert wurde, zwar ebenfalls noch signifikante Blutungen zu beobachten, jedoch lagen im Vergleich zu **44** noch deutlich mehr intakte Blutgefäße vor. Darüber hinaus schien sich die CAM mit den darin liegenden Gefäßen nach dieser Inkubationszeit bereits wieder von der Behandlung mit dem Fe/Au-Komplex **43** zu erholen.

Da sich der Biscarbenkomplex **44** insgesamt als aktivste Verbindung dieser Serie von Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexen herausgestellt und *in vitro* bereits eine eindeutige Selektivität für Tumorzellen gezeigt hatte, sollte dieser schließlich auch *in vivo* mit Hilfe eines Xenograft-Mausmodells auf seine antitumorale Aktivität hin untersucht werden. Die Ergebnisse zur antitumoralen Wirkung von **44** in Balb/c-Mäusen, die in ihren Flanken jeweils einen Tumor der stark metastasierenden B16-F10-Mausmelanomzelllinie tragen, sind in Abbildung 69 dargestellt. Nachdem der Komplex **44** den Mäusen wiederholt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen per i.p.-Injektion (Tage: 1 & 2 sowie 7 & 8) verabreicht wurde,

konnte an Tag 12 nach Beginn des Experiments eine deutliche Reduktion des Tumorumens im Vergleich zur Ausgangsgröße an Tag 1 (Tumorumen = 100 %) beobachtet werden. So zeigten die Tumore in Mäusen, die mit dem Fe/Au-Komplex **44** behandelt wurden, nach zwölf Tagen nur noch eine Größe von etwa 18-48 % des ursprünglichen Tumorumens (Tag 1). Im Gegensatz dazu vergrößerten sich die Tumore der unbehandelten Kontrollmäuse bei diesem *in vivo*-Experiment um das ~1,6-1,9-fache. Das Gewicht der Mäuse wurde zu Beginn (Tag 1) und nach Ende des Experiments (Tag 12) als Indikator für den Allgemeinzustand der Tiere und somit für die Verträglichkeit des Komplexes **44** ermittelt. Da dieses nahezu konstant geblieben war, kann man davon ausgehen, dass der Ferrocen-haltige Gold(I)-NHC-Komplex **44** gut verträglich ist.

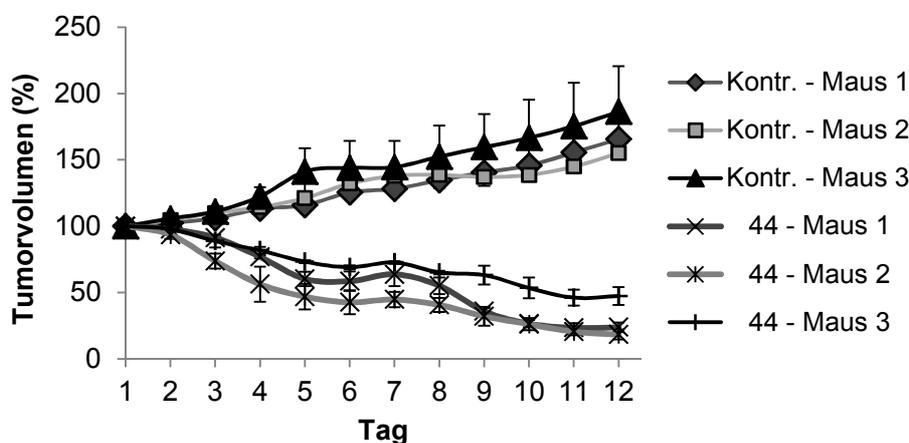


Abbildung 69: Antitumoraler Effekt des Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexes **44** auf Tumore der stark metastasierenden B16-F10-Mausmelanomzellen im Balb/c Maus-Modell. Die prozentualen Veränderungen des Tumorumens (Tag 1 = 100 %) sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Die Behandlung der Balb/c Mäuse mit dem Goldkomplex **44** oder einer entsprechenden Menge an DMSO (Kontrolle) erfolgte wiederholt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen per i.p.-Injektion (Tage: 1&2 sowie 7&8). Bei den Daten handelt es sich jeweils um Mittelwerte \pm SD der Tumore in den beiden Flanken jeder Maus. Die Tierexperimente wurden von Leonard Kaps (M.Sc.) am Institut für Translationale Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Detlef Schuppan durchgeführt.

Zusammenfassende Diskussion

Multinukleare Metallkomplexe sind ein vielversprechender Weg zur Erhöhung der biologischen Aktivität von Metallverbindungen und/oder zur Modulation von Wirkmechanismen in bereits bekannte Leitstrukturen.^{194,260–262,269} So führte auch die Kombination von Goldfragmenten mit Ferrocen-Einheiten im Fall der 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe zu einer Serie von Verbindungen mit guten antitumoralen und antivaskulären Eigenschaften.

In vitro konnte für die bi- und trinuklearen Fe/Au-Komplexe **42-44** eine sehr gute anti-proliferative Aktivität sowie Selektivität gegenüber einer Auswahl an Tumorzelllinien festgestellt werden. Dabei zeigten die beiden Komplexe **43** und **44** IC₅₀-Werte im unteren nanomolaren Bereich und wurden aufgrund ihrer hohen antitumoralen Aktivität auch für alle weiteren Untersuchungen der Wirkmechanismen dieser Art von Ferrocen-substituierten Goldkomplexen herangezogen. Dabei zeigte sich, dass die beiden Fe/Au-Komplexe **43** und **44** auf zellulärer Ebene identische Effekte auslösen wie die anderen, in dieser Arbeit untersuchten 4,5-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe. So induzierten sie sowohl in HUVECs als auch 518A2-Melanomzellen die Ausbildung von *stress fibers*, welche im Falle der Krebszellen mit einer deutlichen Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus einherging. Darüber hinaus konnte für die Komplexe **43** und **44** in *Wound-Healing* Assays ebenfalls eine eindeutige antimigratorische Aktivität nachgewiesen werden. Auch in Bezug auf ihre antivaskuläre Wirkung waren die für die Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** erhaltenen Ergebnisse vergleichbar mit denen der zuvor analysierten Serien an Goldkomplexen (vgl. Abschnitte 4.1.1 - 4.1.4). So führten die Fe/Au-Komplexe **43** und **44** nicht nur zu einer Reduktion des Proteinlevels der prometastatischen MMP-2 in vaskulären Endothelzellen, sondern inhibierten darüber hinaus auch die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen der HUVECs auf Matrigel und zeigten eine eindeutige vaskular-disruptive Wirkung *in vivo*.

Des Weiteren wurde überprüft, ob es sich bei den Fe/Au-Komplexen **43** und **44**, wie erwartet, um effektive Inhibitoren der TrxR handelt, die zu einer Steigerung der ROS-Level in 518A2-Melanomzellen sowie zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ führen. Tatsächlich konnte eine signifikante Inhibition der TrxR durch die Komplexe **43** und **44** beobachtet werden, wobei sich der Goldkomplex **43**, genau wie andere in der Literatur beschriebene PPh₃-Komplexe dieser Art,^{109,110} im Vergleich zu seinem Biscarbenkomplex-Analogon **44** als effektiverer TrxR-Inhibitor herausstellte.

In 518A2-Melanomzellen induzierten beide Komplexe **43** und **44** einen signifikanten Anstieg der ROS-Konzentration und damit einhergehend den Verlust des $\Delta\psi_m$. Es zeigte sich, dass bei geringeren Konzentrationen die ROS-produzierenden Eigenschaften des Ferrocens anscheinend dominierend sind und der Biscarbenkomplex **44** mit seinen zwei Ferrocen-Einheiten aus diesem Grund zunächst deutlich aktiver ist als das PPh_3 -Derivat **43**. Bei höheren Konzentrationen scheint die stärkere TrxR-inhibierende Wirkung von Komplex **43** dagegen die geringere ROS-produzierende Aktivität auszugleichen, sodass beide Komplexe das ROS-Level in 518A2-Zellen in gleichem Maße erhöhen und daher auch eine ähnlich starke Mitochondrien-schädigende Wirkung zeigen. Zurzeit wird überprüft, ob die Goldkomplexe **43** und **44** aufgrund der vorhandenen Ferrocen-Einheiten in Bezug auf ihre ROS-produzierenden sowie antimitochondrialen Eigenschaften den entsprechenden, vollständig unsubstituierten 4,5-Diphenylimidazol-Komplexen **45** und **46** (Abbildung 70) tatsächlich überlegen sind.

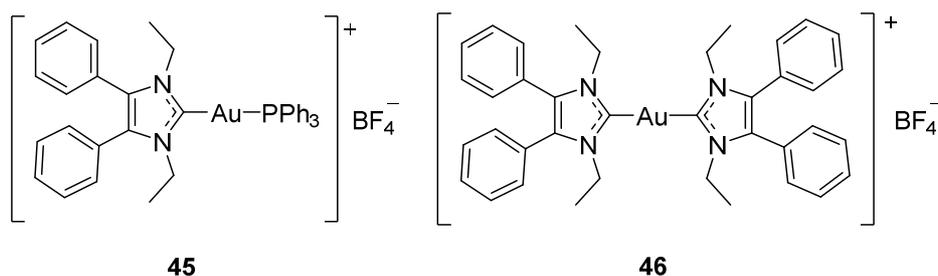


Abbildung 70: Strukturen der 4,5-Diphenylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexe **45** und **46**.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass es sich bei den Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexen **42-44** um einen vielversprechenden Typ von multinuklearen Komplexen handelt, der eine signifikante antitumorale Aktivität, gute Selektivität gegenüber Krebszellen sowie starke antivaskuläre Wirkung aufweist. Vor allem die beiden Komplexe **43** und **44** bilden eine gute Grundlage für die Weiterentwicklung und Optimierung dieser Art von heteronuklearen Verbindungen.

4.1.6 Ferrocen-verbrückte, trinukleare Gold(I)-NHC-Komplexe

Neben den Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexen **42-44** (Abschnitt 4.1.5) wurden in der vorliegenden Arbeit auch die in Abbildung 71 dargestellten, Ferrocen-verbrückten Goldkomplexe **47** untersucht, in denen zwei Gold(I)-NHC-Einheiten über ein Ferrocen-Zentrum miteinander verbunden sind. Als NHC-Liganden wurden dabei das ursprünglich von CA-4 abgeleitete, *N*-Ethyl-substituierte 4,5-Diarylimidazol in tetramethoxylierter (**47a**) sowie vollständig unsubstituiertes (**47b**) Form und das ebenfalls bereits bekannte 1,3-Dibenzylimidazol (**47c**) verwendet, da sich diese bereits in anderen Gold(I)-NHC-Komplexen (vgl. Abschnitte 1.3, 4.1.1 und 4.1.4), aber auch zum Teil in den im Nachfolgenden beschriebenen Platinverbindungen (vgl. Abschnitt 4.2), als vielversprechend erwiesen hatten.

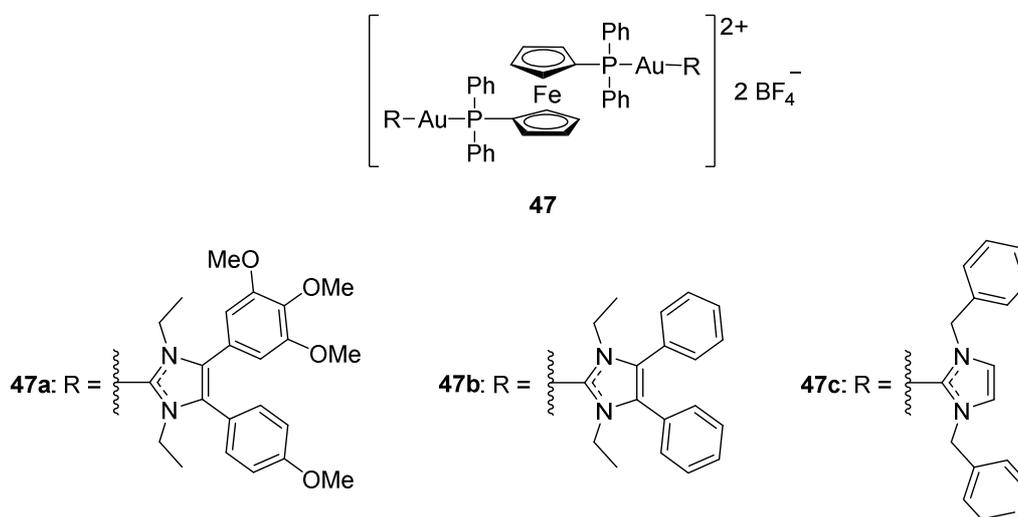


Abbildung 71: Strukturen der Ferrocen-verbrückten, trinuklearen Gold(I)-NHC-Komplexe **47**.

Zunächst wurde in MTT-basierten Proliferationsassays die Zytotoxizität der Ferrocen-verbrückten Goldkomplexe **47** gegenüber einer Auswahl an Krebszelllinien aus fünf verschiedenen Entitäten sowie an nicht-malignen Fibroblasten ermittelt. Die Ergebnisse der Proliferationsassays sind in der nachfolgenden Tabelle 11 zusammengefasst. Trotz ihrer drei Metallzentren weisen die Komplexe **47** im Vergleich zu den zuvor in dieser Arbeit beschriebenen Phosphinkomplexen **29** und **43** oder auch den Biscarbenkomplexen **23**, **24**, **25**, **30-32** und **44** keine gesteigerte antiproliferative Aktivität auf (vgl. Abschnitte 4.1.1 – 4.1.5), sondern sind in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wirksam. So zeigen die Komplexe **47** gegenüber den verschiedenen Tumorzellen ebenfalls IC₅₀-Werte, die weitestgehend im unteren nanomolaren Bereich liegen.

Insgesamt erwies sich der Komplex **47b** mit seinem unsubstituierten 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotiv dabei gegenüber allen getesteten Krebszelllinien als effektivste Verbindung. Lediglich die mehrfach-resistenten KB-V1/Vbl-Zellen zeigten sich erneut weniger anfällig für die Goldkomplexe, sodass auch hier für die Fe/Au-Komplexe **47** nur IC₅₀-Werte im unteren, einstelligen mikromolaren Bereich beobachtet werden konnten. Zusätzlich zeigen die Komplexe **47** auch eine starke inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von vaskulären Endothelzellen und weisen gegenüber den EaHy.926-Zellen ähnliche IC₅₀-Werte auf wie in den untersuchten Krebszelllinien. Dies könnte, wie bereits bei den Ferrocen-substituierten Goldkomplexen **42-44**, auf eine signifikante antivaskuläre Wirkung der Fe/Au-Komplexe **47** hinweisen. In nicht-malignen CCD-18Co-Fibroblasten sind die Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** dagegen weitaus weniger aktiv. Zusammenfassend wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass die Fe/Au-Komplexe **47**, genau wie die Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **42-44**, eine eindeutige Selektivität für Krebszellen und vaskuläre Endothelzellen aufweisen.

Tabelle 11: IC₅₀-Werte [µM] der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszelllinien und der Endothelhybridzelllinie EaHy.926. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± SD, die jeweils mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests nach 72 h Inkubation bestimmt wurden.

	47a	47b	47c
518A2	0,65 ± 0,13	0,11 ± 0,01	0,85 ± 0,03
Panc-1	0,26 ± 0,02	n.b.	0,48 ± 0,03
MCF-7/Topo	0,45 ± 0,09	0,18 ± 0,03	0,61 ± 0,06
KB-V1/Vbl	2,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,3
HCT-116	0,15 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,24 ± 0,06
HT-29	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,18	0,19 ± 0,03
EaHy.926	0,32 ± 0,05	0,05 ± 0,01	2,1 ± 0,3
CCD-18Co	5,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2	5,4 ± 0,1

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, HCT-116-Kolonkarzinomzellen, kolorektale HT-29-Adenokarzinomzellen, endotheliale EaHy.926-Hybridzellen, CCD-18Co – kolorektale Myofibroblasten

Die Effekte der Komplexe **47** auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen sind in der nachfolgenden Abbildung 72 dargestellt. Wie auch alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Goldkomplexe (vgl. Abschnitte 4.1.1 - 4.1.5) induzierten sie einen signifikanten G1-Arrest in den Melanomzellen. Für **47b** und **47c** konnte neben ihrer zytostatischen Wirkung bei der eingesetzten Konzentration von 1 μM auch bereits eine Apoptose-induzierende Aktivität nachgewiesen werden, da sich der Anteil an Zellen im sub-G1-Bereich nach Behandlung der 518A2-Zellen mit diesen beiden Derivaten signifikant erhöht hatte. Im Gegensatz dazu zeigte der Komplex **47a** bei gleicher Konzentration noch keine apoptotische Wirkung.

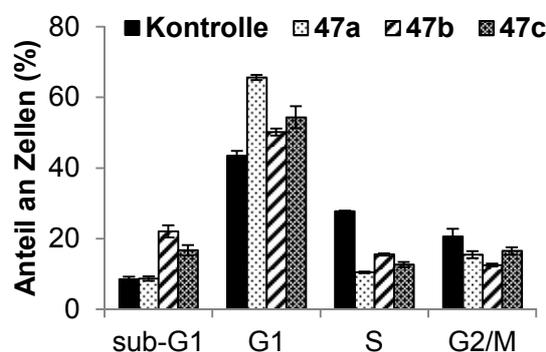


Abbildung 72: Effekte der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** (1 μM) auf den Zellzyklus von 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Neben der zytostatischen Wirkung auf 518A2-Melanomzellen wurde für die trinuklearen Fe/Au-Komplexe **47** auch eine eindeutige antimigratorische Wirkung in *Wound-Healing* Assays festgestellt. So inhibierten sie die Schließung von künstlichen „Wunden“ in Zellrasen der 518A2-Zellen signifikant, was die in Abbildung 73 dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen gut zeigen. Auch wird im *Wound-Healing* Assay die schon bei der Zellzyklusanalyse beobachtete Apoptose-induzierende Wirkung der Derivate **47b** und **47c** bei einer Konzentration von 1 μM deutlich. Während die mit **47a** behandelten Melanomzellen eine annähernd normale Morphologie aufweisen, konnten bei Behandlung der 518A2-Zellen mit den beiden Derivaten **47b** und **47c** nämlich für die Apoptose eindeutig charakteristische zellmorphologische Veränderungen beobachtet werden. So lagen hier im Vergleich zu den Kontrollansätzen und der mit **47a** versehenen Ansätze vermehrt abgerundete Zellen mit weitaus weniger Lamellopodien-artigen Fortsätzen vor, die sich zum Teil auch bereits vom Boden der *wells* ablösten.

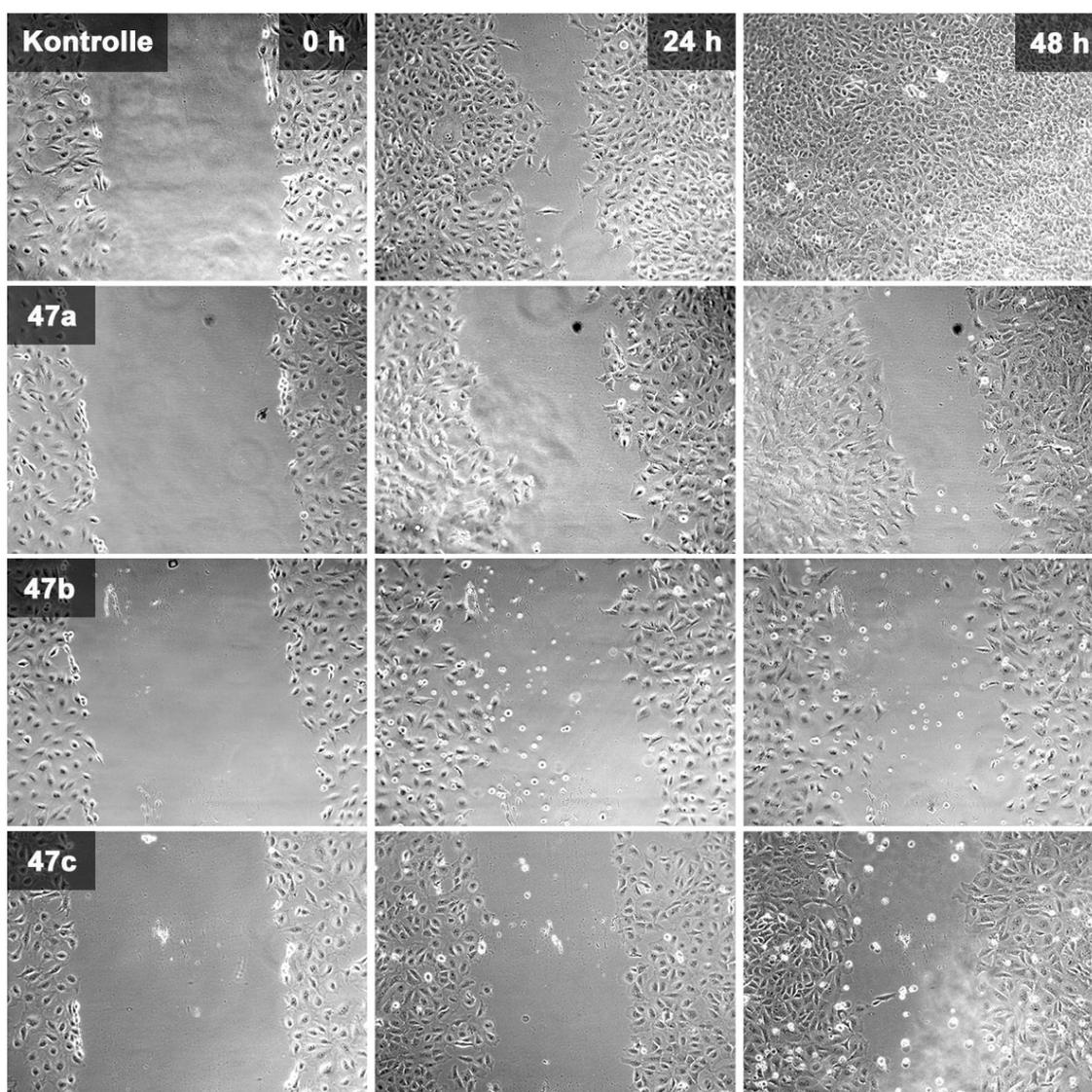


Abbildung 73: Antimigratorische Aktivität der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** (1 μM) auf 518A2-Melanomzellen im *Wound-Healing* Assay. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Das inhibitorische Potential der Fe/Au-Komplexe **47** im *Wound-Healing* Assay wurde nicht nur rein qualitativ bewertet, sondern wie bereits auch für die anderen in dieser Arbeit untersuchten Goldkomplexe quantifiziert. Die hierbei erhaltenen Daten zur Wundheilung sind in Abbildung 74 graphisch aufgetragen. Hierbei wird ersichtlich, dass **47b** die mit Abstand aktivste Verbindung in Bezug auf eine antimigratorische Wirkung ist. So führte die Behandlung der 518A2-Melanomzellen mit diesem Komplex zu einer deutlich reduzierten Wundheilung von nur $\sim 17\%$ nach 24 h und $\sim 25\%$ nach 48 h. Im Gegensatz dazu war die Inhibition durch die Fe/Au-Komplexe **47a** und **47c** etwas geringer, sodass die Wundheilung nach 48 h immerhin bei $\sim 43\%$ (**47a**) bzw. $\sim 51\%$ (**47c**) lag.

Somit handelt es sich bei dem Derivat **47b** innerhalb dieser Serie von Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexen nicht nur um die Verbindung mit der stärksten antiproliferativen Wirkung, sondern auch mit der bedeutendsten antimigratorischen Aktivität. Weiterhin ist der Fe/Au-Komplex **47b** auch im Vergleich zu allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Goldkomplexen bezüglich seiner inhibitorischen Aktivität im *Wound-Healing* Assay die effektivste Metallverbindung (vgl. auch Abschnitte 4.1.1 - 4.1.5).

Allgemein ist die Inhibition der Schließung der künstlichen Wunden in den 518A2-Monolayern durch die Ferrocen-verbrückten Goldkomplexe **47** dabei vermutlich ebenfalls auf eine signifikante Reorganisation des Aktinzytoskeletts in den Melanomzellen zurückzuführen, da in ersten Fluoreszenzfärbungen des F-Aktins nach Behandlung der Zellen mit den Fe/Au-Derivaten **47** eine Ausbildung von *stress fibers* beobachtet werden konnte (nicht gezeigt). Da die Qualität dieser vorläufigen Aktinfärbungen jedoch nicht einwandfrei war, werden die Experimente zurzeit wiederholt, um das erhaltene Ergebnis eindeutig zu bestätigen.

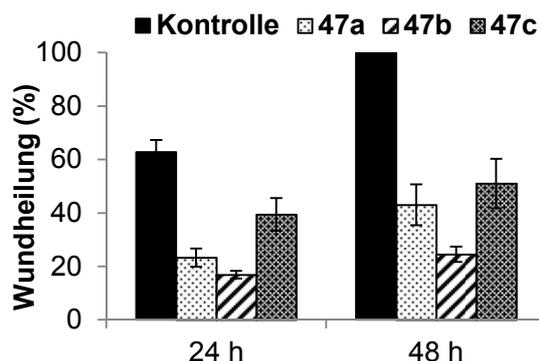


Abbildung 74: Inhibitorische Effekte der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** ($1 \mu\text{M}$) auf die Motilität von 518A2-Melanomzellen im *Wound-Healing* Assay. Die dargestellten prozentualen Anteile der Wundheilung entsprechen Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Da für die Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** eine signifikante Inhibition der TrxR nachgewiesen werden konnte, sollte anhand von Enzymaktivitätsassays überprüft werden, ob es sich bei den trinuklearen Fe/Au-Komplexen **47** ebenfalls um effektive Inhibitoren dieses antioxidativen Enzyms handelt. Die ermittelten EC_{50} -Werte der Komplexe **47** sind in Tabelle 12 aufgeführt und liegen alle im Bereich von $\sim 1 \mu\text{M}$. Somit handelt es sich bei den drei verschiedenen Ferrocen-verbrückten Goldkomplexen **47** *in vitro* zwar um relativ gute TrxR-Inhibitoren, die jedoch trotz ihrer zwei Goldzentren, die potentiell mit dem Enzym interagieren können, genau wie die Fe/Au-Komplexe **43** und **44** nicht an die Aktivität der deutlich effektiveren Fluor-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** herankommen (vgl. Abschnitt 4.1.3).

Möglicherweise ist die geringere inhibitorische Aktivität der Komplexe **47** auf eine sterische Hinderung zurückzuführen, da es sich bei diesen vergleichsweise um sehr große Moleküle handelt und eine Interaktion der Goldzentren mit dem Selenocystein im aktiven Zentrum der TrxR daher alleine aufgrund der Größe der Komplexe erschwert sein könnte.

Tabelle 12: Inhibitorisches Potential der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** gegenüber der Enzymaktivität von TrxR. Bei den aufgeführten EC_{50} -Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Der EC_{50} -Wert von **47c** wurde durch Dr. JingJing Zhang (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) bestimmt.

	47a	47b	47c
EC_{50} [μ M]	0,90 \pm 0,23	0,87 \pm 0,33	1,1 \pm 0,3

Die Inhibition der TrxR durch Komplexe **47** korrelierte, wie schon bei den Fe/Au-Komplexen **43** und **44**, mit einer starken Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration (Abbildung 75 A) sowie einer signifikanten antimitochondrialen Aktivität (Abbildung 75 B) in den untersuchten 518A2-Melanomzellen. Auch hierbei war die Überlegenheit des Komplexes **47b** gegenüber seinen Analoga **47a** und **47c** eindeutig zu erkennen. Zwar steigerten die Fe/Au-Komplexe **47a** und **47c** das ROS-Level in 518A2-Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen ebenfalls signifikant (\sim 2-fach in den beiden höheren eingesetzten Konzentrationen), jedoch war der Komplex **47b** ein weitaus stärkerer ROS-Produzent und erhöhte das ROS-Level im Vergleich zu den Kontrollen sogar um etwa das 3,5- bis 3,7-fache.

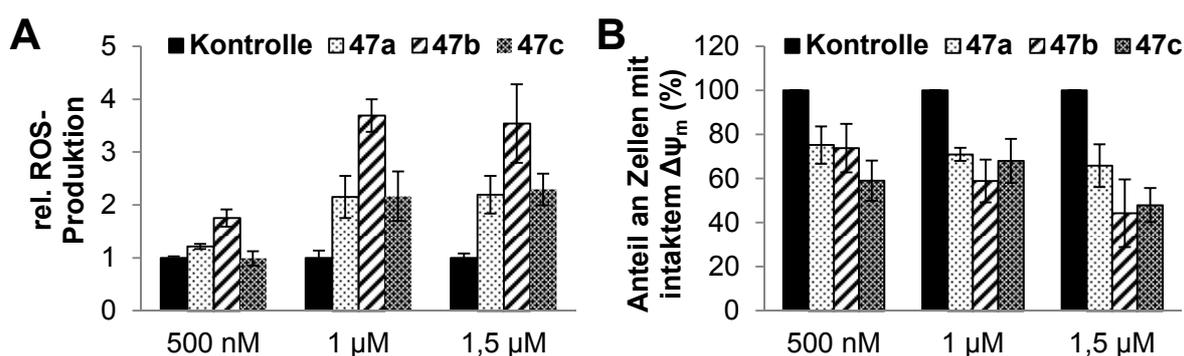


Abbildung 75: Relative ROS-Level (**A**) und Effekte auf das Mitochondrienmembranpotential $\Delta\psi_m$ (**B**) in 518A2-Melanomzellen nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (500 nM, 1 μ M und 1,5 μ M) der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** für 24 h. Die Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt. Das in den Kontrollansätzen ermittelte ROS-Level wurde gleich 1 bzw. der Anteil an Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ für die Kontrollen gleich 100 % gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei Experimenten.

Im JC-1 Assay war die Überlegenheit von **47b** dagegen nicht ganz so deutlich zu erkennen, dennoch reduzierte dieser Fe/Au-Komplex im Vergleich zu seinen Analoga **47a** und **47c** auch den Anteil an Zellen mit intaktem Mitochondrienmembranpotential $\Delta\psi_m$ am stärksten. Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die deutlich höhere antiproliferative Aktivität des Komplexes **47b** im Vergleich zu den anderen beiden Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexen **47a** und **47c** vor allem auf seiner signifikanten ROS-produzierenden Eigenschaft beruht.

Ob die Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** eine antivaskuläre Aktivität aufweisen, wurde zunächst *in vitro* anhand von *Tube Formation Assays* mit der vaskulären Endothelhybridzelllinie EaHy.926 überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Komplexe die Ausbildung von verzweigten, tubulären Netzwerken durch EaHy.926-Zellen auf Matrigel signifikant inhibieren (Abbildung 76). Erneut erwies sich der Fe/Au-Komplex **47b** als aktivste Verbindung und zeigte bereits bei einer Konzentration von nur 25 nM eine starke antiangiogene Wirkung. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Derivate **47a** und **47c** erst bei der doppelten Konzentration vergleichbare inhibitorische Effekte auf die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen durch die EaHy.926-Zellen.

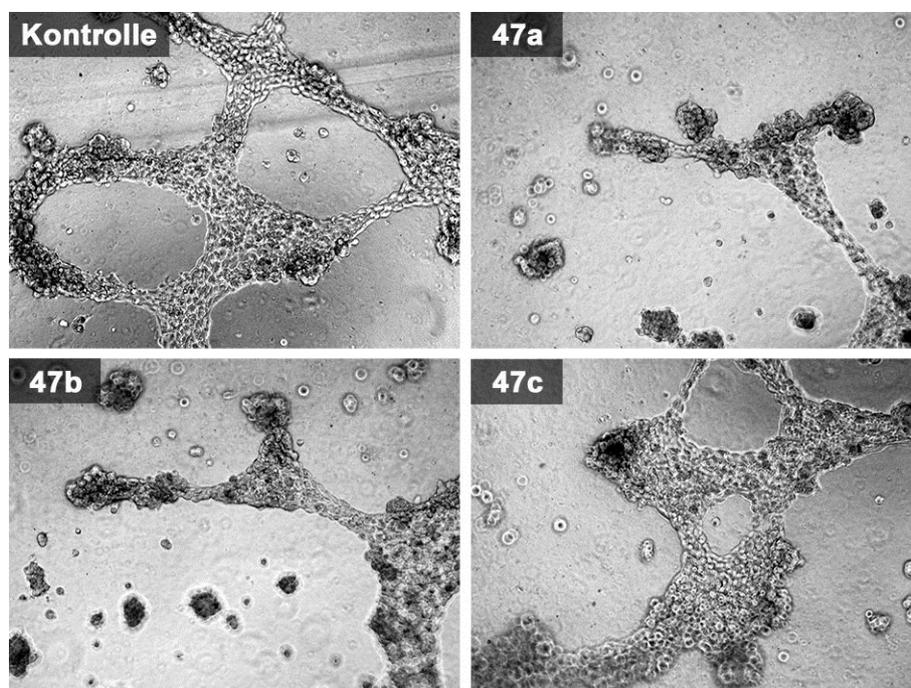


Abbildung 76: Inhibitorische Effekte der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** (**47a** und **47c**: 50 nM, **47b**: 25 nM) auf die Ausbildung von tubulären Netzwerken durch EaHy.926-Endothelhybridzellen. Die EaHy.926-Zellen wurden auf Matrigel ausgesät und umgehend mit den Testverbindungen oder einer analogen Menge an DMF (Kontrolle) versetzt. Die lichtmikroskopische Dokumentation erfolgte nach 24 h Inkubation.

Auch *in vivo* konnte eine signifikante antivaskuläre Wirkung der Fe/Au-Komplexe **47** nachgewiesen werden (Abbildung 77). So traten nach 6 h Inkubation im CAM-Assay und bei einer eingesetzten Stoffmenge von 2,5 nmol der Komplexe deutliche vaskular-disruptive Effekte auf, sodass alle Kapillaren im behandelten Bereich der CAM bereits nach dieser kurzen Inkubationszeit zerstört waren. Auch die größeren Blutgefäße wurden nach 6 h durch die Komplexe **47** angegriffen und wiesen zum Teil starke Ausblutungen auf. Nach 24 h hatte sich die CAM aufgrund der Penetration durch die vaskular-disruptiven Goldkomplexe deutlich zusammengezogen, sodass neue Blutgefäße in den dokumentierten Bereich der Membran gezogen wurden. Dennoch schien sich ein Teil der mit den Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexen **47** behandelten Blutgefäße und auch die umliegende CAM nach 24 h Inkubation zumindest teilweise zu regenerieren. Vereinzelt konnte darüber hinaus die Ausbildung neuer Kapillaren im analysierten Bereich beobachtet werden.

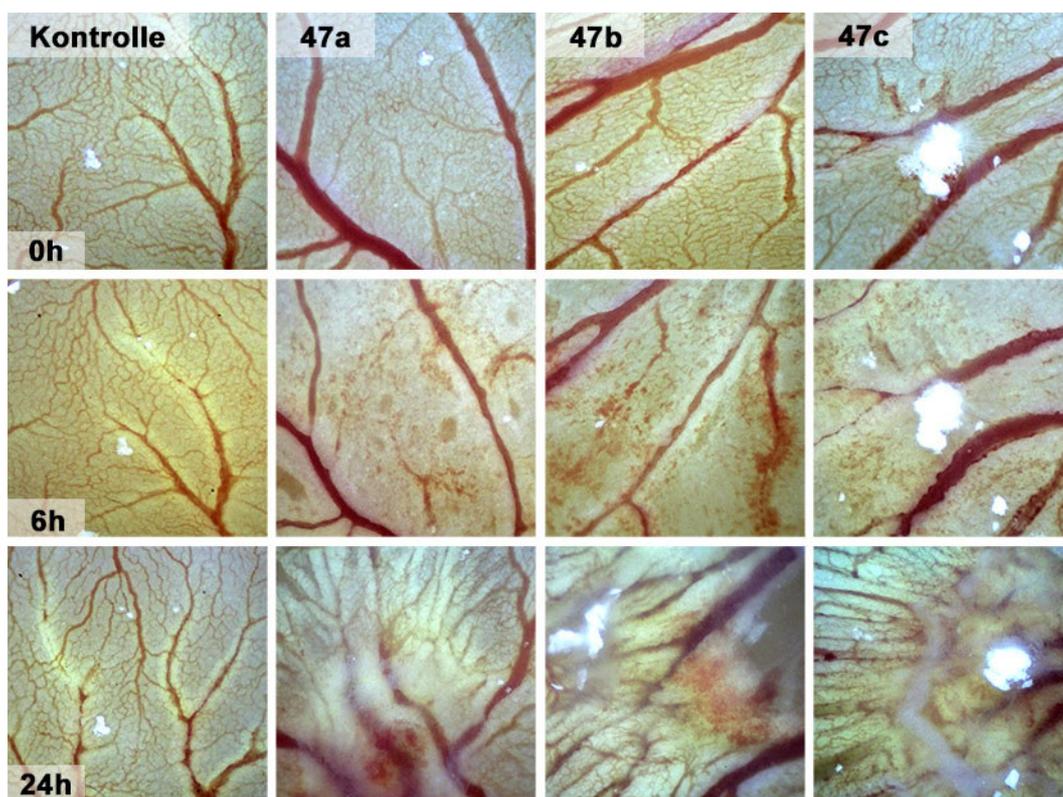


Abbildung 77: Effekte der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** (jeweils 2,5 nmol) auf das Blutgefäßsystem in der Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (DMF) nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Dokumentation der antivaskulären Effekte erfolgte mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops (60× Vergrößerung).

Zusammenfassende Diskussion

Bei den Ferrocen-verbrückten Gold(I)-bis-NHC-Komplexen **47** handelt es sich genau wie bei den in Abschnitt 4.1.5 beschriebenen Komplexe **42-44** um heteronukleare Metallverbindungen mit einer signifikanten antiproliferativen Aktivität sowie Selektivität gegenüber Tumorzellen. Das Derivat **47b** mit seinem unsubstituierten 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotiv erwies sich allgemein als aktivster Komplex dieser Serie an trinuklearen Fe/Au-Komplexen. Seine überlegene Zytotoxizität ist dabei wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich bei diesem Komplex um einen deutlich stärkeren ROS-Produzenten handelt als bei den beiden anderen Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexen **47a** und **47c**. Auch im Vergleich zu den Ferrocen-substituierten Goldkomplexen **43** und **44**, die in 518A2-Melanomzellen ebenfalls auf eine das intrazelluläre ROS-Level steigernde Aktivität hin getestet wurden, war dieser trinukleare Komplex deutlich effektiver. Die TrxR-inhibierenden Eigenschaften waren dagegen für alle drei Fe/Au-Komplexe dieser Serie mit EC₅₀-Werten um 1 µM herum sehr ähnlich. Einhergehend mit der Erhöhung des ROS-Levels in 518A2-Zellen führten die Fe/Au-Komplexe **47**, wie auch schon die Verbindungen **43** und **44**, in einem großen Teil der Zellpopulation zu einem Verlust des Mitochondrienmembranpotentials. Darüber hinaus induzierten sie eine starke Akkumulation der Melanomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus und zeigten eine antimigratorische Aktivität in *Wound-Healing* Assays. Dabei waren die Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** in etwa genauso effektiv wie die meisten anderen in dieser Arbeit untersuchten Goldverbindungen. Auch ihre antivaskuläre Wirkung war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vergleichbar mit der Aktivität der zuvor beschriebenen Goldkomplexe.

Insgesamt handelt es sich bei den Komplexen **47**, vor allem auch aufgrund ihrer hohen Selektivität gegenüber Tumorzellen, um vielversprechende antitumorale und antivaskuläre Metallverbindungen. Da die Art des NHC-Liganden eine entscheidende Rolle für ihre Effektivität spielt, erscheint eine Weiterentwicklung bzw. Optimierung der Liganden für diesen Typ von Fe/Au-Komplexen erfolgsversprechend.

4.2 Neuartige Platin(II)-NHC-Komplexe als potentielle Antitumorwirkstoffe

4.2.1 Auswirkungen der Zweitliganden auf den Wirkmechanismus von 1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden-Platin(II)-Komplexen

Da sich das 1,3-Dibenzylimidazol bereits bei den Gold(I)-Carbenkomplexen (vgl. Abschnitt 4.1.4) als ein vielversprechender NHC-Ligand herausgestellt hatte, wurden hiermit auch fünf verschiedene Platin(II)-NHC-Komplexe hergestellt (**48** und **49** in Abbildung 78).¹⁶² Diese weisen neben dem NHC-Liganden unterschiedliche Zweitliganden (**48a**: weiteres 1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden, **48b**: 2-Picolin, **49a**: DMSO und **49b/c**: PPh₃) sowie damit einhergehend verschiedene Abgangsgruppen *trans* zum primären 1,3-Dibenzylimidazol-2-yl-Rest auf. Die unterschiedlichen Zweitliganden können die Reaktivität der Platinverbindungen gegenüber Bionukleophilen wesentlich beeinflussen und somit auch eine entscheidende Rolle für den Wirkmechanismus der Pt(II)-NHC-Komplexe **48** und **49** spielen.

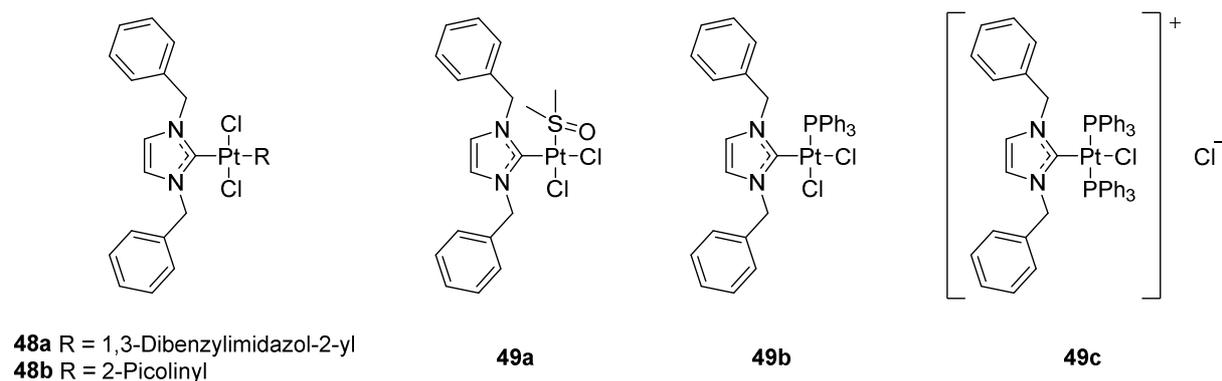


Abbildung 78: Strukturen neuer 1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden-Platin(II)-Komplexe **48** und **49**.¹⁶²

Um die Effektivität und Selektivität der neuartigen Platin(II)-Komplexe **48** und **49** gegenüber Krebszellen zu bestimmen, wurde ihre antiproliferative Aktivität an verschiedenen malignen Zelllinien sowie kolorektalen Fibroblasten mit Hilfe eines MTT-basierten Proliferationsassays untersucht. Die Ergebnisse sind zusammen mit den entsprechenden Daten für Cisplatin, welches als Referenzsubstanz eingesetzt wurde, in der nachfolgenden Tabelle 13 zusammengefasst.¹⁶² Insgesamt zeigte sich, dass die Platin(II)-NHC-Komplexe **48** und **49** in nicht-malignen CCD-18Co-Zellen eine deutlich geringere antiproliferative Aktivität aufweisen als in den Krebszelllinien und sie daher eine gewisse Selektivität für Tumorzellen besitzen. Dagegen konnte eine Spezifität der Platinkomplexe für eine bestimmten Tumorzelllinie anhand der ermittelten Toxizitäten nicht nachgewiesen werden.

Der Biscarbenkomplex **48a** sowie der Komplex **48b** mit *trans*-ständigem 2-Picolin-Liganden zeigten gegenüber den getesteten Krebszelllinien IC₅₀-Werte, die vorwiegend im einstelligen sowie unteren zweistelligen mikromolaren Bereich liegen. Während **48b** die geringste Wirkung gegen die Cisplatin-resistente HT-29-Kolonkarzinomzelllinie^{141,143} und die DLD-1-Zellen zeigte, besitzt der Pt(II)-Komplex **48a** eine relativ gute antiproliferative Aktivität gegenüber diesen beiden Zelllinien. Von den Pt(II)-NHC-Komplexen mit *cis*-ständigen Zweitliganden hat sich **49a** mit seinem DMSO-Liganden als inaktivste Verbindung erwiesen. Im Gegensatz dazu war der *cis*-Dichloro-PPh₃-Komplex **49b** mit seinen durchgehend einstellig-mikromolaren IC₅₀-Werten gegenüber den Cisplatin-sensitiven Zelllinien nicht nur genauso aktiv wie die Referenzverbindung selbst, sondern zeigte sich darüber hinaus auch äußerst effektiv gegenüber den Cisplatin-resistenten Zelllinien (KB-V1/Vbl und HT-29). Interessanterweise ist der *bis*-PPh₃-Komplex **49c** bis auf eine Ausnahme sogar im submikromolaren Bereich gegen die untersuchten Krebszellen verschiedener Entitäten wirksam und damit die deutlich aktivste Verbindung dieser Serie von neuen Pt(II)-NHC-Komplexen.

Tabelle 13: IC₅₀-Werte (µM) der 1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden basierten Pt(II)-NHC-Komplexe **48** und **49** sowie Cisplatin gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszellen. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± SD, die jeweils nach 72 h Inkubation mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests bestimmt wurden.¹⁶²

	48a	48b	49a	49b	49c	Cisplatin
518A2	12,0 ± 0,3	11,4 ± 0,5	27,7 ± 1,2	7,5 ± 0,4	0,32 ± 0,02	5,3 ± 0,4
Panc-1	20,4 ± 1,3	5,1 ± 0,3	20,6 ± 0,3	7,7 ± 0,5	0,32 ± 0,01	4,8 ± 0,7
MCF-7/Topo	7,7 ± 0,7	5,1 ± 0,2	31,2 ± 1,2	3,9 ± 0,3	0,15 ± 0,01	10,6 ± 0,7
KB-V1/Vbl	> 50	8,6 ± 1,4	> 50	4,5 ± 0,5	2,1 ± 0,2	> 100
HCT-116	11,3 ± 0,7	5,9 ± 1,1	18,0 ± 1,4	6,7 ± 0,4	0,28 ± 0,06	5,0 ± 0,6
HT-29	8,4 ± 0,3	42,2 ± 4,8	22,7 ± 0,7	9,6 ± 0,4	0,85 ± 0,05	> 100
DLD-1	14,7 ± 3,4	32,3 ± 3,4	27,0 ± 1,6	2,5 ± 0,4	0,92 ± 0,09	32,6 ± 2,4
CCD18-Co	35,8 ± 11,4	> 50	> 50	14,5 ± 2,1	2,8 ± 0,1	> 100

518A2-Melanomzellen, Panc-1-Pankreas-Adenokarzinomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, HCT-116-Kolonkarzinomzellen, kolorektale HT-29- und DLD-1- Adenokarzinomzellen, CCD-18Co – kolorektale Myofibroblasten

Zunächst wurde vermutet, dass diese hohe Wirksamkeit des Komplexes **49c** vor allem auf seinem kationischen Charakter beruht, der es ihm ermöglicht, über die von malignen Zellen häufig überexprimierten (organischen) Kationentransporter^{163,286–289} vermehrt in Krebszellen aufgenommen zu werden. Tatsächlich konnte durch eine Bestimmung des intrazellulären Platingehalt mittels FAAS festgestellt werden, dass die Zytotoxizität der Platinkomplexe **49** in HCT-116-Kolonkarzinomzellen mit der Menge an aufgenommenem Platin korreliert (vgl. Tabelle 14). Einhergehend mit der Akkumulation und Wirksamkeit der Testverbindungen steigt jedoch auch die Lipophilie der Komplexe ausgehend von **49a** mit dem kleinsten, positiven log P-Wert (log P = 0,71) über Komplex **49b** (log P = 3,3) hin zum lipophilsten Platinkomplex **49c** (log P = 3,9) deutlich an. Somit scheint auch die Lipophilie eine entscheidende Rolle für die zelluläre Aufnahme der Komplexe zu spielen und daher ebenfalls maßgeblich für die Aktivität der Platinverbindungen in Krebszellen verantwortlich zu sein.

Tabelle 14: IC₅₀-Werte (72h) und zelluläre Aufnahme (Platingehalt) in HCT-116-Zellen sowie Lipophilie (log P) der 1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden-basierten Pt(II)-Komplexe **49**. Die Werte stellen Mittelwerte ± SD aus jeweils vier (IC₅₀-Werte) bzw. drei (Platingehalt und log P) unabhängigen Experimenten dar.¹⁶² Der Platingehalt in HCT-116-Zellen und die log p-Werte wurden durch Prof. Dr. Jana Kašpárková und Prof. Dr. Viktor Brabec (*Department of Biophysics, Palacky University in Olmütz, Tschechien* und *Institute of Biophysics, Academy of Science in Brunn, Tschechien*) bestimmt.

Komplex	IC ₅₀ [µM]	ng Pt / 10 ⁶ Zellen	log P
49a	18,0 ± 1,4	5 ± 1	0,71 ± 0,05
49b	6,7 ± 0,4	51 ± 4	3,3 ± 0,2
49c	0,28 ± 0,06	448 ± 11	3,9 ± 0,2

So führte die Kombination großer, lipophiler Substituenten (PPh₃) mit einer positiven Gesamtladung des Moleküls zum aktivsten Platinkomplex **49c**. Diese Strategie der Synthese von geladenen, lipophilen Verbindungen (sogenannten DLCs) wurde bereits bei der Entwicklung neuer, effektiver Goldkomplexe für die Tumorthherapie verfolgt. Wie bereits zuvor beschrieben, weisen DLCs die Fähigkeit auf, Lipiddoppelschichten einfach zu überwinden und werden aufgrund ihres kationischen Charakters sowie der negativen Ladung an der Innenseite der Plasmamembranen in Zellen verstärkt angereichert.^{37,79,97,98} Zur Klasse der DLCs zählt auch der *bis*-PPh₃-Platinkomplex **49c**, wodurch sich seine überlegene Wirksamkeit im Vergleich zu den weniger lipophilen, ungeladenen Komplexen **49a** und **49b** nachvollziehbar erklären lässt. Die Toxizität der Komplexe **49** in HCT-116-Zellen ist dem

jeweiligen intrazellulären Platingehalt sowie den entsprechenden log P-Werten der Platinkomplexe in der oben stehenden Tabelle 14 vergleichend gegenübergestellt.¹⁶²

Obwohl für verschiedene Platinverbindungen auch bereits eine Vielzahl an DNA-unabhängigen Wirkmechanismen identifiziert werden konnte,^{27,28,65} stellt die DNA vor allem für Pt(II)-Komplexe noch immer ein wesentliches zelluläres *target* dar. Aus diesem Grund wurde zunächst mit Hilfe eines einfachen *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) überprüft, ob die Komplexe **48** und **49** eine Interaktion mit zirkulärer Plasmid-DNA eingehen (Abbildung 79).¹⁶² Der Assay basiert darauf, dass das verwendete pBR322-Plasmid in zwei verschiedenen topologischen Formen, nämlich der *open circular* (oc, entspannt zirkulär) oder *covalently closed circular* (ccc, negativ superspiralisiert) Form, vorliegen kann und diese jeweils eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität besitzen. Unbehandelt liegt das Plasmid überwiegend in der kompakteren ccc-Form vor, die bei einer elektrophoretischen Auftrennung eine weitere Strecke im Gel zurücklegt als die sperrigere oc-Form mit geringerer elektrophoretischer Mobilität. Sowohl durch eine Interkalation von Testsubstanzen in die Plasmid-DNA als auch durch eine kovalente Bindung an diese kann sich das negativ überspiralisierte Plasmid entwinden und geht von der ccc-Form in die relaxierte oc-Form über. Im EMSA äußert sich dies durch eine charakteristische Bandenretardation (*band shift*), über die eine Interaktion mit der pBR322-Plasmid-DNA nachgewiesen werden kann. Beide Platinkomplexe **48**, deren Zweitliganden (NHC oder 2-Picolin) in *trans*-Position zum primären NHC-Liganden stehen, zeigten im EMSA keinerlei Wechselwirkung mit der pBR322-DNA (vgl. Abbildung A-5 im Anhang).

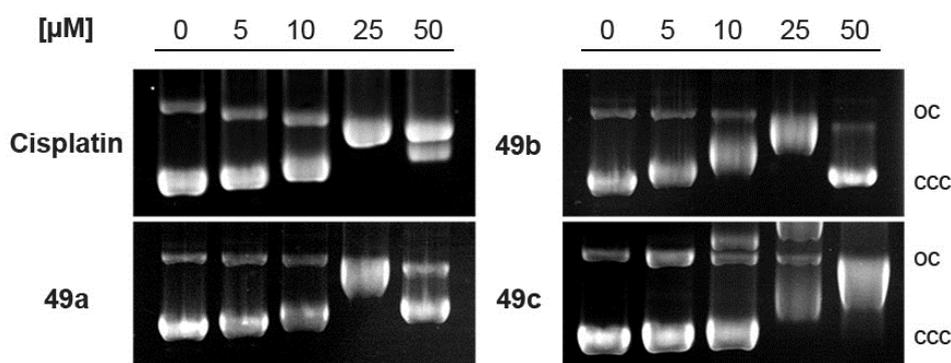


Abbildung 79: Interaktion von Cisplatin und den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** mit zirkulärer pBR322-Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Platinverbindungen behandelt und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelbilder sind für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente repräsentativ. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Hieraus lässt sich schließen, dass die DNA für diese *trans*-Pt(II)-Komplexe vermutlich kein direktes *target* darstellt und daher ein anderer Wirkmechanismus für ihre vergleichsweise gute Zytotoxizität ursächlich sein muss. Im Gegensatz dazu konnte für alle *cis*-Pt(II)-Komplexe **49**, welche als gute Abgangsgruppe ein zum NHC-Liganden *trans*-ständiges Chlorid aufweisen, ein konzentrationsabhängiger *band shift* beobachtet und somit eine Interaktion mit der Plasmid-DNA nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 79). Bei den höheren eingesetzten Konzentrationen der Platinverbindungen (25 μ M und 50 μ M) trat dabei zum Teil auch eine erneute Überspiralisierung der pBR322-DNA auf, was zu einer der ccc-Form ähnlichen elektrophoretischen Mobilität der DNA führte. Darüber hinaus wurde für den aktivsten Komplex **49c** festgestellt, dass ab einer Konzentration von 10 μ M zusätzliche DNA-Banden oberhalb der oc-Form auftreten sowie ab 25 μ M ein Großteil der DNA-Proben in den Ladetaschen des Agarosegels verbleibt. Ein vollständiges Bild des Agarosegels der mit **49c** behandelten Plasmid-DNA-Proben ist im Anhang aufgeführt (Abbildung A-6). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Behandlung des Plasmids mit **49c** größere DNA-Addukte entstanden sind, die eine deutlich geringere elektrophoretische Mobilität als die relaxierte oc-Form besitzen bzw. gar nicht mehr in der Lage sind durch die Poren des Agarosegels zu gelangen. Wie erwartet, induzierte Cisplatin nicht nur eine Bandenretardation, sondern aufgrund seiner bifunktionalen Bindung an die DNA, die zu einer Verkürzung bzw. Kondensation der DNA-Doppelhelix führt,^{290,291} konzentrationsabhängig auch eine deutlich erhöhte Mobilität der oc-Form. Ein solcher Effekt konnte bei Behandlung der Plasmid-DNA mit den Platinkomplexen **49** nur bedingt festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Pt(II)-NHC-Komplexe **49** im Vergleich zur Referenzverbindung Cisplatin vermutlich eine andere Wechselwirkung mit DNA-Molekülen eingehen.

Neben dem zirkulären pBR322-Plasmid wurde, aufgrund der besseren Vergleichbarkeit zur natürlich vorliegenden, chromosomalen DNA, auch linearisierte Plasmid-DNA im EMSA eingesetzt. Die Effekte von Cisplatin sowie der Platinkomplexe **49** auf die elektrophoretische Mobilität dieses linearen DNA-Moleküls sind in Abbildung 80-A dargestellt. Während Cisplatin zumindest geringfügig zu einer konzentrationsabhängigen Retardation der DNA-Banden führte, war nach Behandlung der linearen pBR322-DNA mit den Komplexen **49** für 24 h kein *band shift* zu beobachten. Jedoch konnte mit steigender Konzentration der Platinkomplexe **49** eine Reduktion der DNA-Bandenintensitäten beobachtet werden. Komplex **49c** hatte dabei den stärksten Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der mit EtBr gefärbten DNA und führte in der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 μ M sogar zu einem

vollständigen Verlust einer detektierbaren DNA-Bande. Die Referenzverbindung Cisplatin bewirkte dagegen keine Verringerung der Bandenintensitäten. In Abbildung 80-B sind die prozentualen Anteile der Bandenintensitäten, welche mittels Densitometrie in *ImageJ* bestimmt wurden, nach Behandlung der linearen pBR322-DNA mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. der Pt(II)-Komplexe **49** relativ zur Fluoreszenzintensität der Banden mit unbehandelter DNA (100 %) aufgetragen. Aus dem Graphen wird ersichtlich, dass sowohl **49a** und **49b** die Bandenintensität nur minimal verringern, sodass selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (50 μM) noch eine Fluoreszenz von etwa 75-80 % im Vergleich zur Kontrolle vorliegt.

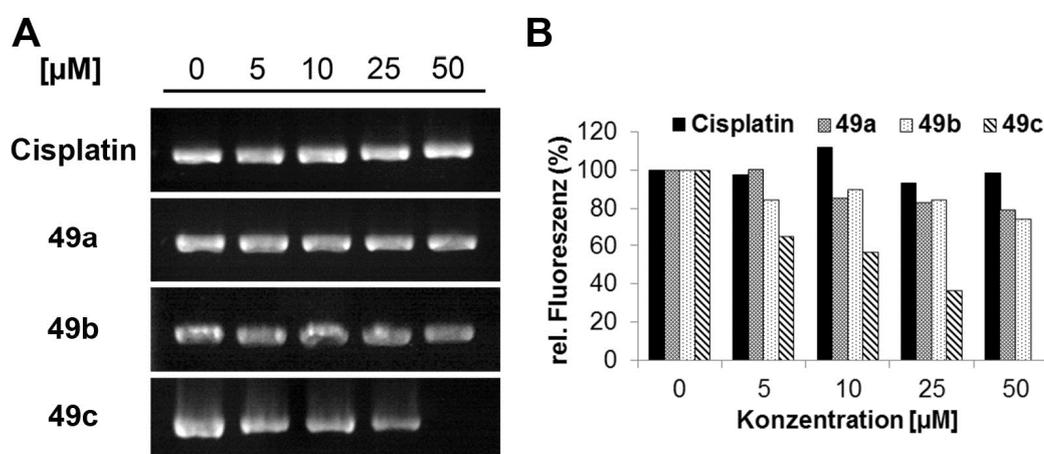


Abbildung 80: Interaktion von Cisplatin und den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** mit linearisierter pBR322-Plasmid-DNA. **(A)** Die Plasmid-DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Platinverbindungen behandelt und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelbilder sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. **(B)** Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität der EtBr-gefärbten Plasmid-DNA-Banden gegen die eingesetzten Konzentrationen der Testverbindungen.

Im Gegensatz dazu reduzierte **49c** die Fluoreszenzintensität der pBR322-Bande bereits bei einer Konzentration von nur 5 μM auf 65 %. Konzentrationsabhängig wurde die Fluoreszenz durch den *bis*-PPh₃-Komplex **49c** weiter verringert bis bei der höchsten eingesetzten Konzentration schließlich keine EtBr-gefärbte DNA-Bande mehr nachzuweisen war. Diese Reduktion der Bandenintensität weist darauf hin, dass die Behandlung des linearisierten Plasmids mit den Platinkomplexen **49** zu einer starken Strukturänderung der linearen DNA und somit zu einer Blockierung der Interkalationsstellen für EtBr führt. In einem weiteren *in vitro* Assay wurde untersucht, ob die Pt(II)-NHC-Komplexe **49** auch mit linearer Lachsspermien-DNA interagieren und wie bereits bei der linearisierten pBR322-Plasmid-DNA die Ausbildung von EtBr-DNA-Addukten verhindern.

Hierfür wurde die Lachsspermien-DNA zunächst mit verschiedenen Konzentrationen der Platinkomplexe **49** inkubiert, anschließend mit EtBr-Lösung versetzt und die Fluoreszenz der gebildeten EtBr-DNA-Addukte gemessen (Abbildung 81).¹⁶² Hierbei zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Untersuchung der Wechselwirkung der Komplexe **49** mit linearisierter Plasmid-DNA. Während Cisplatin nur einen geringfügigen, konzentrations-abhängigen Effekt auf die EtBr-Fluoreszenz und somit auf die Ausbildung von EtBr-DNA-Addukten zeigte, verursachten die Platinkomplexe **49** eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität.

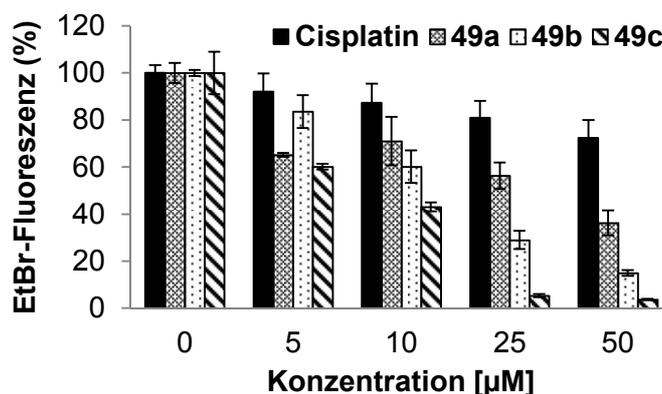


Abbildung 81: Relative Fluoreszenzintensität der EtBr-DNA-Addukte nach Inkubation von Lachsspermien-DNA mit verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 µM) an Cisplatin oder der Pt(II)-NHC-Komplexen **49** für 2 h. Die Fluoreszenz der mit DMF behandelten DNA wurde gleich 100 % gesetzt. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Erneut erwies sich der *bis*-PPh₃-Komplex **49c** als aktivste Testverbindung und verringerte die EtBr-Fluoreszenz bereits bei der geringsten, eingesetzten Konzentration von 5 µM auf 60 % im Vergleich zu unbehandelter Lachsspermien-DNA. Durch Erhöhung der Konzentration von **49c** wurde die Fluoreszenzintensität weiter vermindert, bis bei einer Konzentration von 50 µM nur noch eine Restfluoreszenz von ~4 % zu detektieren war. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Lachsspermien-DNA mit dem DMSO-Komplex **49a** und dem *mono*-PPh₃-Komplex **49b** in der höchsten eingesetzten Konzentration nur zu einer Reduktion der Fluoreszenz auf 36 % bzw. 15 %. Durch die Einführung bzw. die Erhöhung der Anzahl von PPh₃-Liganden wird die Wechselwirkung der Komplexe mit der DNA und damit die Inhibition der EtBr-Interkalation also scheinbar verstärkt. Diese erneuten Unterschiede bei den für Cisplatin und die Komplexe **49** erhaltenen Ergebnissen weisen darauf hin, dass die neuartigen Pt(II)-NHC-Komplexe **49** im Vergleich zur Referenzverbindung tatsächlich eine intensivere und/oder veränderte Interaktion mit der DNA eingehen.

Um nun herauszufinden, ob die im EMSA und dem EtBr-Fluoreszenz-Assay beobachteten Effekte der Platinkomplexe **49** lediglich auf einer erhöhten, kovalenten Bindung von Platin an die DNA beruhen, oder auf einem im Vergleich zu Cisplatin veränderten Interaktionsmechanismus mit der DNA, wurden weitere Experimente durchgeführt.¹⁶²

So wurde zunächst der kovalent und irreversibel an CT-DNA gebundene Pt-Gehalt nach Inkubation der DNA mit Cisplatin und den Komplexen **49** bei einem molaren Verhältnis von $r_1 = 0,05$ (Verhältnis an freiem Platinkomplex zu Nukleotid-Phosphatresten der DNA zu Beginn des Experiments) und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mittels FAAS bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 82 A zusammengefasst.¹⁶² Es zeigte sich, dass der DMSO-Komplex **49a** am schnellsten an die CT-DNA bindet, da bereits nach etwa einer halben Stunde 50 % des maximalen Anteils an Platin an die DNA gebunden waren. Im Gegensatz dazu liegt die halbmaximale Bindungszeit für den *mono*-PPh₃-Komplex **49b** bei 5,2 h und der *bis*-PPh₃-Komplex **49c** bindet sogar noch langsamer an die CT-DNA, sodass hier selbst nach 24 h Inkubation der größte Teil des Platins immer noch ungebunden bzw. zumindest nicht-kovalent an die CT-DNA gebunden vorlag. In Abbildung 82 B sind die prozentualen Anteile an kovalent gebundenem Platin nach 24 h Inkubation der CT-DNA mit Cisplatin oder den Komplexen **49** aufgetragen.

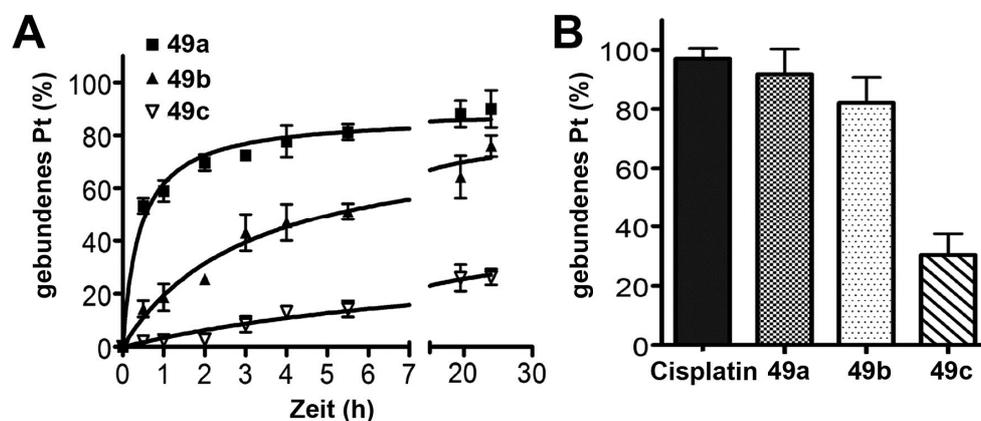


Abbildung 82: Kovalente Bindung der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** an CT-DNA. **(A)** Kinetik der Reaktionen der Platinkomplexe **49** mit CT-DNA bei einem molaren Verhältnis von $r_1 = 0,05$ in NaClO₄ (10 mM) bei 37 °C. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Relativer Anteil des kovalent an die CT-DNA gebundenen Platins nach 24 h Inkubation mit Cisplatin oder den Komplexen **49** bei 37 °C. Die Daten repräsentieren ebenfalls Mittelwerte \pm SD. Die Experimente wurden von Prof. Dr. Jana Kašpárková und Prof. Dr. Viktor Brabec (*Department of Biophysics, Palacky University in Olmütz, Tschechien* und *Institute of Biophysics, Academy of Science in Brunn, Tschechien*) durchgeführt (s. auch Abschnitt 3.11.3). [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Während Cisplatin und der DMSO-substituierte Komplex **49a** nach dieser Zeit fast vollständig an die DNA gebunden hatten (Cisplatin: ~97 %, **49a**: ~92 %), lag der Anteil an gebundenem Platin für den *mono*-PPh₃-Komplex **49b** nur bei ~82 %. Der *bis*-PPh₃-Komplex **49c** zeigte mit nur etwa 30 % an gebundenem Platin die geringste kovalente Wechselwirkung mit der CT-DNA. Aus diesen Ergebnissen zur DNA-Interaktion wird ersichtlich, dass Komplex **49c** im Gegen-satz zu den beiden ungeladenen Platinverbindungen **49a** und **49b** vorrangig über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit DNA interagiert, wobei diese Interaktion möglicherweise vor allem durch seine positive Ladung vermittelt wird.

Da für einige Verbindungen, die in der Lage sind DNA zu kondensieren bzw. zu aggregieren, bereits ein ähnliches Verhalten beobachtet wurde,^{292–294} sollte nun untersucht werden, ob eine Behandlung von CT-DNA mit den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** ebenfalls zu einer Kondensation oder Aggregation der DNA führt. Hierfür wurde die Lichtstreuung der CT-DNA nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testverbindungen im 90°-Winkel zum einstrahlenden Licht nach einer von Vijayanathan *et al.* beschriebenen Methode bestimmt (Abbildung 83 A).^{162,201}

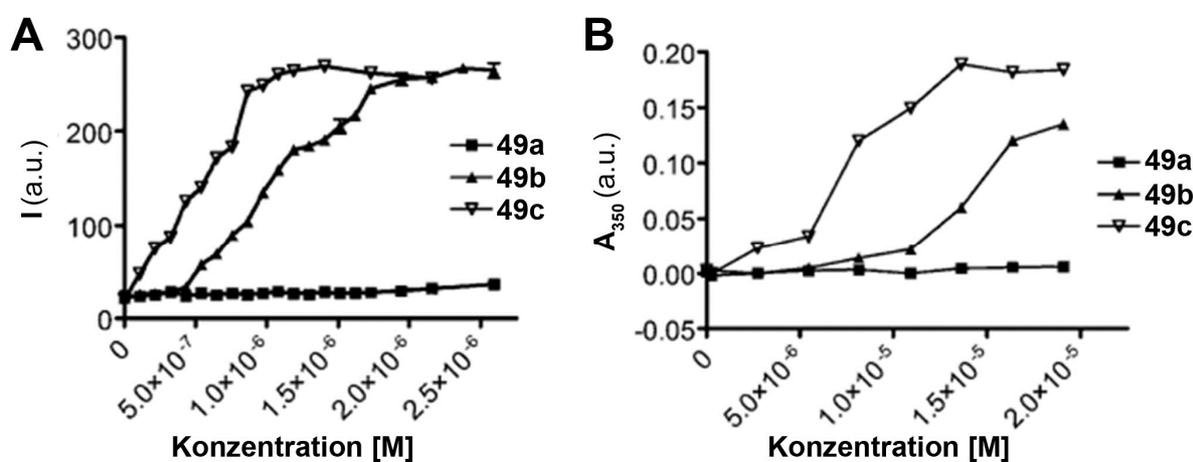


Abbildung 83: Potential der Platinkomplexe **49** eine Aggregation von CT-DNA auszulösen. (A) Intensität des Streulichts einer mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe **49** (0,5 bis 2,5 μ M) versetzten CT-DNA-Lösung (1,5 μ M in 10 mM Kakodylat-Puffer, pH 7,2) bei 25 °C. (B) Absorption einer mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe **49** (5 bis 20 μ M) versetzten CT-DNA-Lösung (100 μ M in 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) bei 25 °C. Die Experimente wurden von Prof. Dr. Jana Kašpárková und Prof. Dr. Viktor Brabec (*Department of Biophysics, Palacky University in Olmütz, Tschechien* und *Institute of Biophysics, Academy of Science in Brünn, Tschechien*) durchgeführt (s. auch Abschnitt 3.11.4). [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Da die Intensität (I) des Streulichts ein direktes Maß für die Aggregation von DNA darstellt und mit zunehmender DNA-Kondensation ansteigt, kann über diese einfach ermittelt werden, ob es sich bei einer Substanz um eine DNA-kondensierende Verbindung handelt. Durch Auftragung der Streulicht-Intensität (I) gegen die eingesetzte Substanzkonzentration kann die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), bei der 50 % der gesamten DNA in der Probe aggregiert vorliegt, berechnet werden. Während der DMSO-Platinkomplex **49a** keine DNA-Kondensation initiierte, konnte für das *mono*-PPh₃-Derivat **49b** ein EC_{50} -Wert von $1,00 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Übereinstimmend mit der durch die Ergebnisse des EMSAs aufgestellten Hypothese, dass bei der Behandlung der pBR322-Plasmid-DNA mit **49c** sehr große DNA-Addukte entstanden sein müssen, welche die Poren des Agarosegels nicht mehr passieren können, induzierte der *bis*-PPh₃-Komplex mit einem EC_{50} -Wert von $0,51 \pm 0,04 \mu\text{M}$ die stärkste CT-DNA-Aggregation. Auch die Absorption der CT-DNA-Proben bei 350 nm kann als Indikator für eine DNA-Kondensation verwendet werden, da eine verstärkte Aggregation zu einer deutlichen Trübung der DNA-Lösung und somit zu einer erhöhten Absorption führt.²⁰² Auch in diesem Assay konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass lediglich die beiden PPh₃-substituierten Platinkomplexe **49b** und **49c** eine DNA-Aggregation auslösen, wobei sich das *bis*-PPh₃-Derivat **49c** erneut als die deutlich effektivere Verbindung herausstellte.¹⁶²

Zusammenfassend kann also darauf geschlossen werden, dass die durch die beiden PPh₃-Komplexe **49b** und **49c** verursachte Reduktion der EtBr-Fluoreszenz im EMSA (mit dem linearisiertem pBR322-Plasmid, vgl. Abbildung 80) sowie im EtBr-Fluoreszenz-Assay (vgl. Abbildung 81) nicht die Folge einer koordinativen Interaktion mit der DNA, sondern einer Aggregation ist, durch die die Interkalationsstellen für den Fluoreszenzfarbstoff in der DNA unzugänglich werden. Des Weiteren korreliert die Fähigkeit der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** DNA zu aggregieren bzw. zu kondensieren mit ihrer Zytotoxizität: je stärker die DNA-Aggregation durch die Platinverbindungen ist, desto größer ist auch ihr antiproliferativer Effekt.

In weiteren Experimenten, in denen die Effekte von Cisplatin und der Komplexe **49** auf das Wachstum bzw. die Morphologie von *E. coli*-Zellen untersucht wurden (Abbildung 84), wurde bestätigt, dass die PPh₃-haltigen Platinkomplexe **49b** und **49c** einen von der Referenzverbindung veränderten Wirkmechanismus aufweisen.¹⁶² Während eine Behandlung der Bakterien mit Cisplatin das typische und durch Rosenberg *et al.* bereits in den 1960er Jahren beobachtete, filamentöse Wachstum der *E. coli*-Zellen induzierte,²⁹⁻³¹ wiesen die mit

den Pt(II)-NHC-Komplexen **49b** und **49c** behandelten Bakterienzellen eine normale Morphologie auf. Lediglich der DMSO-Komplex **49a**, welcher im Gegensatz zu den beiden PPh₃-Komplexen **49b** und **49c** auch in den zuvor beschriebenen Experimenten bereits ähnliche Effekte wie die Referenzverbindung gezeigt hatte, führte ebenfalls zu einem gestreckten Wachstum einiger Bakterienzellen. Der Effekt auf die *E. coli*-Zellen war jedoch wesentlich geringer als bei einer Behandlung mit Cisplatin.

Schließlich wurde mit Hilfe eines abschließenden Experiments zur DNA-Interaktion festgestellt, dass die Platinkomplexe **49** im Gegensatz zu Cisplatin²⁰⁴ keine Lyse von mit λ -Phagen infizierten *E. coli*-Bakterien auslösten (nicht gezeigt).¹⁶² Die Zelllyse und die damit einhergehende Freisetzung von λ -Phagen tritt als Folge der für Bakterien typischen SOS-Antwort auf, die durch Cisplatin induziert wird und bei der es sich um einen speziellen DNA-Reparaturprozess handelt. Die neuartigen Pt(II)-NHC-Komplexe **49** lösen diesen charakteristischen Reparaturmechanismus jedoch nicht aus. Dies beweist, dass die Komplexe **49** Veränderungen an der DNA herbeiführen, die von den durch Cisplatin hervorgerufenen Schädigungen grundlegend verschieden sein müssen.

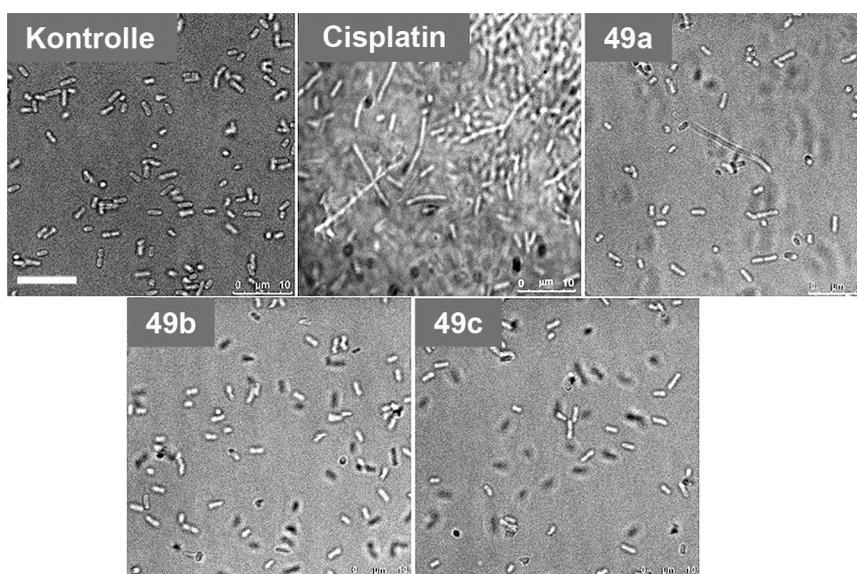


Abbildung 84: Effekte von Cisplatin und den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** (jeweils 30 μ M) auf die Morphologie von *E. coli*-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Bakterien (Kontrolle) nach 5 h Inkubation bei 37 °C. Maßstabsbalken – 10 μ m. Das Experiment wurde von Prof. Dr. Jana Kašpárková und Prof. Dr. Viktor Brabec (*Department of Biophysics*, Palacky University in Olmütz, Tschechien und *Institute of Biophysics, Academy of Science* in Brunn, Tschechien) durchgeführt (s. auch Abschnitt 3.11.5). [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* *J. Med. Chem.* 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Um weitere Informationen über den zellulären Wirkmechanismus der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** in Krebszellen zu erhalten, wurden ihre Effekte auf die Organisation des Zytoskeletts, den Ablauf des Zellzyklus sowie auf die Motilität der stark metastasierenden 518A2-Melanomzellen untersucht. Von dem Komplex **48a**, dem CA-4-abgeleiteten Pt(II)-Biscarbenkomplex **50a** (s. Abschnitt 4.2.2.) sowie einigen anderen, nicht in dieser Arbeit behandelten Pt(II)-NHC-Komplexen (eigene unveröffentlichte Daten) war bereits bekannt, dass diese genau wie die Goldkomplexe mit analogen NHC-Liganden (vgl. Abschnitte 4.1.1-4.1.6) keinerlei Auswirkungen auf die Organisation der Mikrotubuli haben. Beispielfhaft ist dies für die Komplexe **48a** und **50a** in Abbildung A-7 des Anhangs gezeigt. Aus diesem Grund wurde auch lediglich analysiert, welche Auswirkungen eine Behandlung der 518A2-Zellen mit den Platin-komplexen **49** auf das Aktinzytoskelett hat (Abbildung 85).

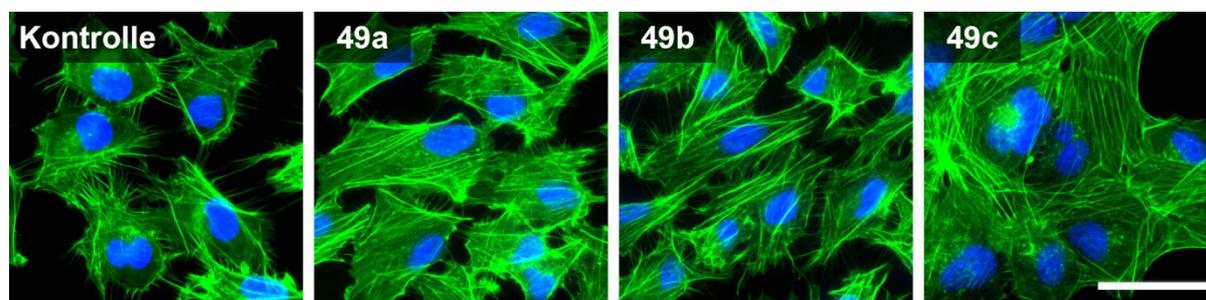


Abbildung 85: Effekte der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** auf die Organisation von F-Aktin in 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den 20 μM von **49a**, 2,5 μM von **49b**, 500 nM von **49c** oder DMF (Kontrolle) behandelt, bevor sie fixiert und das Aktinzytoskelett (grün) mit Alexa Fluor®-488-konjugiertem Phalloidin sowie die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 μm .

Alle drei Platinkomplexe **49** lösten in den 518A2-Melanomzellen eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts aus und induzierten die Ausbildung von *stress fibers*. Deren Ausprägung war jedoch nicht so intensiv wie bei einer Behandlung der Tumorzellen mit analogen Gold(I)-NHC-Komplexen (vgl. Abschnitte 4.1.1 - 4.1.6). Beim Vergleich der Pt(II)-NHC-Komplexe untereinander konnte festgestellt werden, dass die beiden PPh₃-haltigen Komplexe **49b** und **49c** im Vergleich zum DMSO-Komplex **49a** eine (etwas) stärkere Auswirkung auf das Aktinzytoskelett hatten und somit auch zu einer stärkeren Formierung von Aktinbündeln führten, die sich quer durch die Zellkörper ziehen. Die Ausbildung von *stress fibers* korrelierte bei den Gold(I)-NHC-Komplexen in der Regel mit einem signifikanten Arrest der 518A2-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Im Gegensatz dazu induziert Cisplatin bekannterweise in verschiedensten Zelltypen einen G2/M-Arrest,^{11,35,295,296} welcher charakteristisch für den Wirkmechanismus dieses metallbasierten Wirkstoffs ist.

Mittels Propidiumiodidfärbung wurde daher durchflusszytometrisch untersucht, welche Effekte die Pt(II)-NHC-Komplexe **49** auf den Zellzyklus der 518A2-Melanomzellen haben. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 86 zusammengefasst.¹⁶² Eine Behandlung der 518A2-Zellen mit Cisplatin führte zu einer moderaten Arretierung der Tumorzellen in der S- und G2/M-Phase des Zellzyklus. Gleichzeitig war bei der eingesetzten Konzentration von 50 μM auch ein leichter Anstieg an apoptotischen Zellen (sub-G1) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten. Der DMSO-Komplex **49a**, welcher bereits bezüglich seiner DNA-Interaktion ähnliche Effekte wie Cisplatin gezeigt hatte, induzierte ebenfalls einen G2/M-Arrest, welcher im Vergleich zu Cisplatin sogar etwas stärker ausgeprägt war.

Während der *mono*-PPh₃-Komplex **49b** keinen Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus zeigte, sondern direkt den programmierten Zelltod auslöste (starker Anstieg des sub-G1-Anteils), resultierte eine Behandlung der 518A2-Melanomzellen mit dem *bis*-PPh₃-Komplex **49c** in einem signifikanten G1-Arrest. Die drei neuartigen Pt(II)-NHC-Komplexe **49** zeigen also komplett unterschiedliche Auswirkungen auf den Zellzyklus, wobei sich die beiden PPh₃-Komplexe **49b** und **49c** erneut als die effektiveren Verbindungen im Vergleich zum DMSO-Komplexe **49a** und der Referenzverbindung Cisplatin herausstellten.

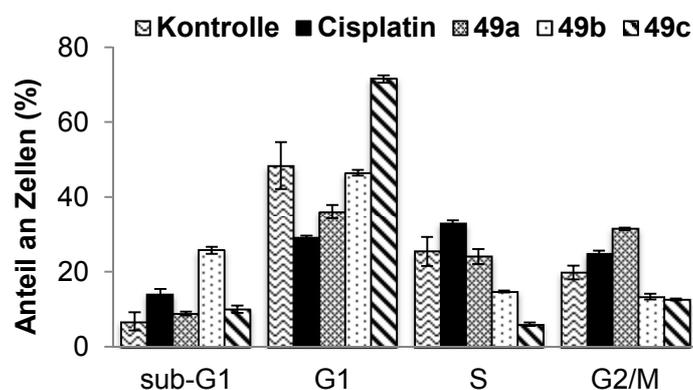


Abbildung 86: Effekte von Cisplatin und der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** auf den Zellzyklus von 518A2-Zellen nach Inkubation mit 50 μM von Cisplatin, 30 μM von **49a**, 5 μM von **49b**, 500 nM von **49c** oder einer analogen Menge an DMF (Kontrolle) für 24 h. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und der G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1) als Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Signifikante Unterschiede traten auch bei den mit den Platinverbindungen **49** durchgeführten *Wound-Healing* Assays auf (Abbildung 87). Dabei wurde lediglich für die beiden Komplexe **49a** und **49c**, die in den 518A2-Melanomzellen einen Zellzyklusarrest auslösen, eine Inhibition der Wundheilung beobachtet. Hierbei war die Überlegenheit des PPh₃-substituierten Platinkomplexes **49c** gegenüber seinem DMSO-Analogen **49a** ebenfalls eindeutig nachzuweisen. Nach 24 h Inkubation ist die Wundheilung mit 33 % (**49a**) bzw. 25 % (**49c**) im Vergleich zur Kontrolle (62 %) durch beide Komplexe noch ähnlich stark gehemmt, erst nach 48 h wird die unterschiedlich starke, inhibitorische Aktivität der Platinverbindungen **49a** und **49c** deutlich. So zeigte **49a** lediglich eine Inhibition der Wundheilung von etwa 19 %, während der *bis*-PPh₃-Komplex **49c** mit einer 57 %-igen Inhibition dreimal so aktiv war.

Für die Effektivität im *Wound-Healing* Assay scheinen also, wie schon bei den Gold(I)-NHC-Komplexen, sowohl eine Inhibition der Zellmotilität durch die Ausbildung von *stress fibers* als auch die Arretierung der 518A2-Zellen im Zellzyklus eine zentrale Rolle zu spielen. Im Gegensatz zum DMSO- und dem *bis*-PPh₃-Komplex (**49a** bzw. **49c**) war eine Beeinträchtigung der Wundheilung bei Behandlung der 518A2-Zellen mit dem *mono*-PPh₃-Komplex **49b** nicht nachzuweisen. So führte dieser Komplex bereits in relativ niedrigen Konzentrationen (2,5 µM und 5 µM) zu deutlichen, morphologischen Veränderungen (Abrundung der Zellen) und damit einhergehend zu einer vermehrten Ablösung der Zellen vom Boden der *wells*. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass der Komplex in den 518A2-Melanomzellen keinen Zellzyklusarrest induziert, sondern scheinbar direkt die Apoptose einleitet. So handelt es sich bei einer solchen starken Kondensierung bzw. Abrundung, wie sie bei den 518A2-Zellen nach Behandlung mit **49b** detektiert werden konnte, um eine charakteristische, morphologische Eigenschaft von apoptotischen Zellen. Darüber hinaus konnte auch eine Ausbildung der typischen apoptotischen Vesikel beobachtet werden (vgl. auch Abbildung A-8 im Anhang).

Um eine Apoptose-induzierende Wirkung von **49b** sowie der analogen Platinkomplexe **49a** und **49c** in höheren Konzentrationen eindeutig nachzuweisen, sollten jedoch weitere Assays durchgeführt werden, mit denen andere Charakteristika des programmierten Zelltods, wie z.B. eine DNA-Fragmentierung oder die Aktivität verschiedener Caspasen, analysiert bzw. detektiert werden können.

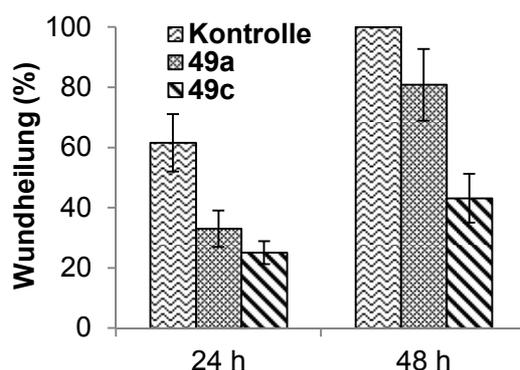


Abbildung 87: Inhibitorische Effekte der Platinkomplexe **49a** (20 μ M) und **49c** (500 nM) auf die Motilität von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Die dargestellten prozentualen Anteile der Wundheilung entsprechen Mittelwerten \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Um nun herauszufinden, ob die Pt(II)-NHC-Komplexe **49** genau wie die in dieser Arbeit untersuchten Gold(I)-NHC-Komplexe^{122,164} (vgl. Abschnitte 4.1.1-4.1.6) auch eine anti-vaskuläre Wirkung aufweisen, wurden ihre Auswirkungen im Vergleich zu denen von Cisplatin auf die sich entwickelnden Blutgefäße in der CAM von befruchteten Hühnereiern analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 88 gezeigt.¹⁶²

Während der *mono*-PPh₃-Komplex **49b** erst nach 24 h Inkubation eine moderate Wirkung auf die Blutgefäße der CAM zeigte, konnte für den DMSO-Komplex **49a** und den *bis*-PPh₃-Komplex **49c** schon nach 6 h eine signifikante vaskular-disruptive Aktivität festgestellt werden. Beide Platinkomplexe hatten nach dieser kurzen Inkubationszeit bereits sämtliche kleineren Kapillaren zerstört und zeigten darüber hinaus auch starke Effekte auf größere Blutgefäße, sodass eindeutige Ausblutungen (**49a**) bzw. eine Fragmentierung der Blutgefäße (**49c**) zu erkennen waren. Komplex **49c** erwies sich als die effektivste, vaskular-disruptive Verbindung und führte nach 24 h Inkubation zu einer vollständigen Zerstörung der Blutgefäße. Im Vergleich zu den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** zeigte Cisplatin nur einen geringfügigen Effekt auf das Blutgefäßsystem, schien jedoch starke Auswirkungen auf die CAM selbst zu haben, da eine starke Verfärbung der Membran beobachtet werden konnte. Möglicherweise ist dies auf die relativ geringe Selektivität zurückzuführen, die Cisplatin in der Regel vor allem *in vivo* aufweist.^{11,13,39,40}

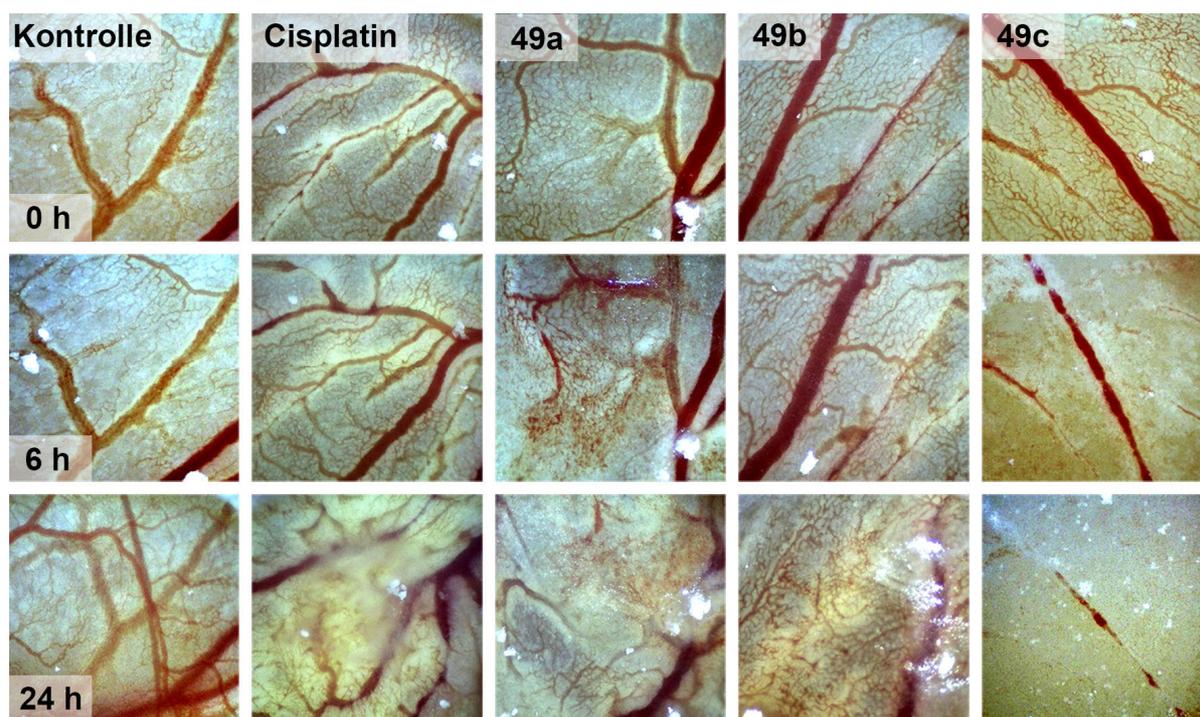


Abbildung 88: Effekte von Cisplatin und den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** (jeweils 10 nmol) auf das Blutgefäßsystem der Chorioallantoismembran in befruchteten Hühnereiern im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (DMF) nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Dokumentation der antivaskulären Effekte erfolgte mit Hilfe eines Traveler USB-Mikroskops (60× Vergrößerung). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Die Nephrotoxizität der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** wurde mit Hilfe von *precision-cut kidney slices* (PCKS), welche ein bedeutendes *ex vivo*-Modell zur Abschätzung der Organtoxizität von Wirkstoffen darstellen,^{231,232} im Vergleich zum bekanntermaßen stark nephrotoxischen Cisplatin untersucht.¹⁶² Verschiedene Konzentrationen an Cisplatin oder der Platinkomplexe **49** (jeweils 1-25 μM) wurden zu den PCKS gegeben und diese 24 h mit den Testverbindungen inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Vitalität der Gewebeschnitte über ihren ATP-Gehalt ermittelt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 89 graphisch dargestellt.

Die für Cisplatin bekannte, starke Nephrotoxizität^{39,233} konnte auch in dieser Arbeit unter Verwendung der *ex vivo* kultivierten PCKS eindeutig nachgewiesen werden. So reduzierte die Referenzverbindung die Vitalität der Gewebeschnitte in einem Bereich von ca. 10 – 15 μM auf 50 %. Eine Behandlung der PCKS mit dem *bis*-PPH₃-Komplex **49c**, welcher sich *in vitro* als äußerst vielversprechende Verbindung herausgestellt hatte und gegenüber den untersuchten Tumorzellen zumindest eine gewisse Selektivität aufwies (vgl. Tabelle 13),

fürte dagegen bereits bei einer Konzentration von 5 μM zu einer Verringerung der Vitalität auf $\sim 30\%$. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Pt(II)-NHC-Komplex **49c** in den durchgeführten MTT-Tests auch etwa 15-mal aktiver gegenüber den Krebszelllinien war als der in der Chemotherapie eingesetzte Wirkstoff Cisplatin. Daher könnte der Komplex *in vivo* möglicherweise in einer deutlich geringeren Konzentration eingesetzt werden und dennoch eine signifikante antitumorale Wirkung vermitteln.

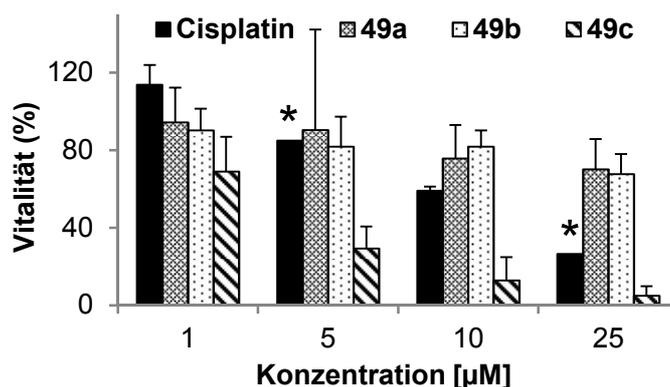


Abbildung 89: Vitalität der mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cisplatin bzw. der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** behandelten *precision-cut kidney slices* (PCKS) nach 24 h Inkubation. Die ATP-Level wurden anhand der Proteinkonzentration der PCKS normiert und die Vitalität un behandelter Gewebeschnitte gleich 100 % gesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden. Die mit Sternen (*) markierten Daten sind Werte, die lediglich aus einem Einzelexperiment (drei Gewebeschnitte) erhalten wurden. Die Experimente wurden von Pawida Worawutputtapong (B.Sc.) und Dr. Inge A. M. de Graaf (*Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting, University of Groningen, Groningen, The Netherlands*) durchgeführt. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* *J. Med. Chem.* 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Im Gegensatz zu ihrem *bis*-PPh₃-Analogon **49c** hatten die beiden Komplexe **49a** und **49b** nur eine geringe Auswirkung auf die Vitalität der Nierenschnitte und reduzierten diese selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 25 μM lediglich auf etwa 70 %. Diese beiden Platinverbindungen weisen also eine vergleichsweise geringe Nephrotoxizität auf.

Die Effekte der beiden sich in ihrem Wirkmechanismus scheinbar grundlegend voneinander unterscheidenden Pt(II)-NHC-Komplexe **49a** und **49c** auf die PCKS wurden schließlich auch histomorphologisch charakterisiert.¹⁶² Hierbei konnten die aus den Vitalitätsbestimmungen erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. In Abbildung 90 sind repräsentative Aufnahmen der PCKS nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des DMSO-Komplexes **49a** dargestellt.

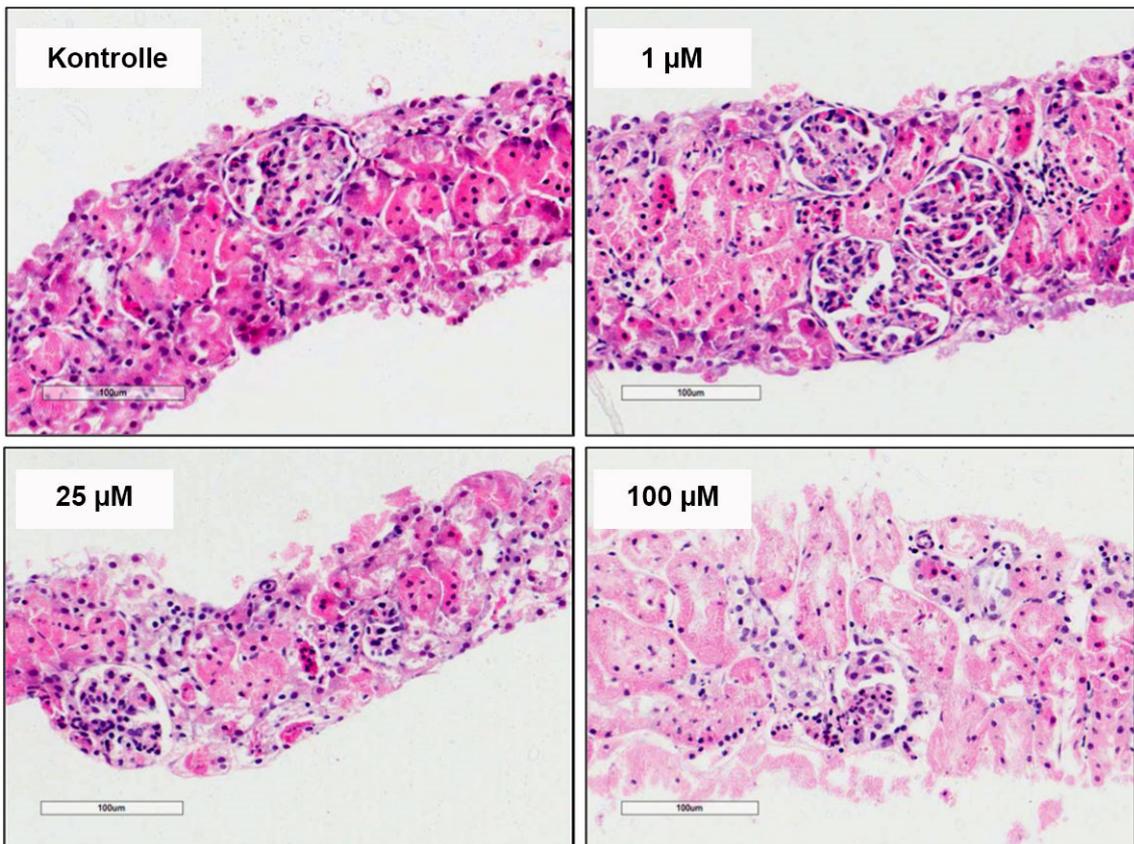


Abbildung 90: Histomorphologie der PCKS nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 μM , 25 μM und 100 μM) des DMSO-substituierten Pt(II)-Komplexes **49a** im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten (DMSO-Kontrolle). Maßstabsbalken – 100 μm . Die Experimente wurden von Pawida Worawuttputtpong (B.Sc.) und Dr. Inge A. M. de Graaf (*Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting, University of Groningen, Groningen, The Netherlands*) durchgeführt. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* *J. Med. Chem.* 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Aus diesen wird deutlich, dass **49a** bei einer Konzentration von 1 μM kaum Auswirkungen auf die Gewebeschnitte hatte, auch wenn geringfügige, toxische Effekte auf die Zellen der Nierentubuli beobachtet werden konnten. Bei einer Behandlung mit 25 μM sind die durch den DMSO-Komplex hervorgerufenen, morphologischen Veränderungen dagegen sehr viel ausgeprägter. Schließlich führten 100 μM von **49a** zu einer deutlichen Nekrose in den Nierenschnitten, welche aufgrund des starken Verlusts an Zellkernen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Eine Nekrose-induzierende und somit stark nephrotoxische Wirkung konnte für den *bis*-PPh₃-Komplex **49c** histomorphologisch bereits bei einer Konzentration von nur 1 μM beobachtet werden (vgl. Abbildung A-9 im Anhang).

Zusammenfassende Diskussion

Bei den in der Chemotherapie eingesetzten, klassischen Pt(II)-Komplexen, wie Cisplatin und seinen Analoga (vgl. Abschnitt 1.2), handelt es sich um Zytostatika, deren primäres *target* die DNA darstellt.^{11–13,33,35} Durch eine kovalente Bindung an die Nukleobasen führen diese Platinverbindungen zu signifikanten Konformationsänderungen der DNA-Doppelhelix, die wiederum eine Inhibition der Replikation und Transkription der DNA zur Folge haben. Schließlich wird bei erfolgloser Reparatur der so entstandenen DNA-Schäden im Zuge eines Zellzyklusarrests die Apoptose eingeleitet.

Im Gegensatz dazu ist die DNA für Pt(II)-NHC-Komplexe nicht zwangsläufig ein molekulares *target*.^{27,28,65} Während einige Vertreter dieser Art von Platinverbindungen zwar noch eine kovalente Interaktion mit der DNA eingehen, interkalieren andere lediglich in diese oder weisen sogar vollständig DNA-unabhängige Wirkmechanismen auf. Von den in dieser Arbeit untersuchten 1,3-Dibenzylimidazol-basierten Pt(II)-NHC-Komplexen **48** und **49** zeigten lediglich diejenigen Komplexe eine Interaktion mit DNA im ESMA, die auch eine gute Abgangsgruppe (in diesem Fall Chlorid) *trans* zum primären NHC-Liganden besitzen. Trotz fehlender DNA-Bindung zeigten auch der Biscarbenkomplex **48a** und sein 2-Picolin-Derivat **48b** eine gute antiproliferative Wirkung gegenüber den untersuchten Tumorzelllinien. Eine Interaktion mit DNA stellt für diese Art von Platinverbindungen also ebenfalls keine Notwendigkeit für eine biologische Aktivität dar.

Bei den DNA-bindenden *trans*-Chlorido-Komplexen **49** war jedoch ein eindeutiger Trend bezüglich der Zytotoxizität zu erkennen. So erhöhte sich die antiproliferative Aktivität ausgehend vom DMSO-Komplex **49a** mit IC₅₀-Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich über den *mono*-PPh₃-Komplex **49b** (einstellige, mikromolare IC₅₀-Werte) hin zum *bis*-PPh₃-Analogon **49c** mit Werten weitestgehend im submikromolaren Bereich signifikant. Diese Steigerung der antiproliferativen Aktivität korreliert dabei genau entgegengesetzt mit der Fähigkeit der Platinkomplexe **49** kovalent an CT-DNA zu binden, welche sich wiederum vermutlich aufgrund der unterschiedlich starken Abschirmung des Platinzentrums in den Komplexen **49** erklären lässt. Während das Platinatom in Komplex **49a** mit seinen DMSO- und Chlorido-Hilfsliganden noch relativ gut zugänglich ist, führen die PPh₃-Liganden in der Verbindung **49b** und vor allem in **49c** zu einer verstärkten, sterischen Abschirmung und verhindern so eine kovalente Bindung des Metallzentrums an die DNA.

Da der DMSO-Komplex **49a** nicht nur in Bezug auf seine DNA-bindenden Eigenschaften, sondern auch auf zellulärer Ebene ähnliche Ergebnisse wie die Referenzverbindung Cisplatin zeigte (G2/M-Arrest in 518A2-Melanomzellen und Induktion eines filamentösen Wachstums von *E. coli*-Bakterien), kann vermutet werden, dass der Wirkmechanismus dieser Platinverbindung ebenfalls auf einer kovalenten Interaktion mit DNA beruht. Der *mono*-PPh₃-Komplex **49b** löste im EMSA zwar einen ähnlichen *band shift* wie **49a** aus, zeigte jedoch in allen anderen die DNA-Interaktion betreffenden sowie zellbasierten Assays Effekte, die weder mit den Effekten des DMSO- (**49a**) noch des *bis*-PPh₃-Derivats (**49c**) vollständig vergleichbar sind. So konnte im Vergleich zu **49a** eine verringerte kovalente Bindung an CT-DNA, während gleichzeitig eine moderate Induktion der DNA-Aggregation beobachtet werden konnte. In 518A2-Zellen resultierte eine Behandlung mit **49b** in keinem Zellzyklusarrest, sondern führte direkt zur Apoptose. Darüber hinaus induzierte der *mono*-PPh₃-Komplex **49b** auch kein filamentöses Wachstum oder eine SOS-Antwort in *E. coli*.

Das *bis*-PPh₃-Analogon **49c** scheint dagegen eindeutig durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit DNA zu interagieren und verstärkt deren Aggregation auszulösen, weshalb eine Behandlung von *E. coli*-Zellen mit diesem Komplex auch nicht zu den für Cisplatin charakteristischen morphologischen Veränderungen oder einer typischen SOS-Antwort der Bakterien führte. In den 518A2-Melanomzellen induzierte der Platinkomplex **49c** weiterhin einen signifikanten G1-Arrest, der vermutlich auch seine äußerst starke, antiproliferative Aktivität gegenüber Krebszellen erklärt. Des Weiteren führten alle drei Pt(II)-NHC-Komplexe **49** zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts in 518A2-Zellen und einer Ausbildung von *stress fibers*. In *Wound-Healing* Assays konnte jedoch nur für die beiden Komplexe **49a** und **49c**, die auch einen Zellzyklusarrest in den Melanomzellen auslösten, eine Inhibition der Wundheilung festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Beeinträchtigung der Motilität, sondern auch die zytostatische Wirkung der Platinverbindungen hierbei eine zentrale Rolle spielt.

Auch eine antivaskuläre Wirkung konnte für die Pt(II)-Komplexe **49** beobachtet werden, wobei sich das *bis*-PPh₃-Derivat (**49c**) mit Abstand als die effektivste vaskular-disruptive Verbindung herausstellte. Während die beiden Komplexe **49a** und **49b** eine im Vergleich zu Cisplatin deutlich verringerte Nephrotoxizität aufweisen, zeigte **49c** starke toxische Effekte auf *ex vivo* kultivierte Nierengewebeschnitte. Dieser Pt(II)-NHC-Komplex (**49c**) war jedoch *in vitro* auch um ein Vielfaches aktiver gegenüber Tumorzellen als die Referenzverbindung und kann daher *in vivo* wahrscheinlich in einer deutlich geringeren Dosis eingesetzt werden.

4.2.2 Effekte verschiedener NHC- und Zweitliganden auf die biologischen Eigenschaften von Platin(II)-Komplexen

Nachdem sich die 1,3-Dibenzylimidazol-basierten Pt(II)-NHC-Komplexe **48** und **49** als äußerst effektive antiproliferative sowie antivaskuläre Metallverbindungen herausgestellt hatten (vgl. Abschnitt 4.2.1), sollte nun überprüft werden, welchen Einfluss verschiedene NHC-Liganden auf die Aktivität bzw. Wirkungsweise dieser Art an Platinverbindungen haben. Daher wurden unter Verwendung des Methoxy-substituierten und ursprünglich von CA-4-abgeleiteten 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotivs sowie der bereits von den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **31** und **32** bekannten *para*-Methoxybenzyl-, Naphthyl- bzw. 4-Benzoylphenyl-substituierten 1,3-Diarylimidazol-Liganden (vgl. auch Abschnitt 4.1.4) die in der nachfolgenden Abbildung 91 dargestellten, neuen Pt(II)-NHC-Komplexe **50-53** synthetisiert. Dabei sind die Strukturen der beiden Komplexe **50c** und **53d** der Vollständigkeit halber mit aufgeführt, obwohl es nicht möglich war diese tatsächlich herzustellen.

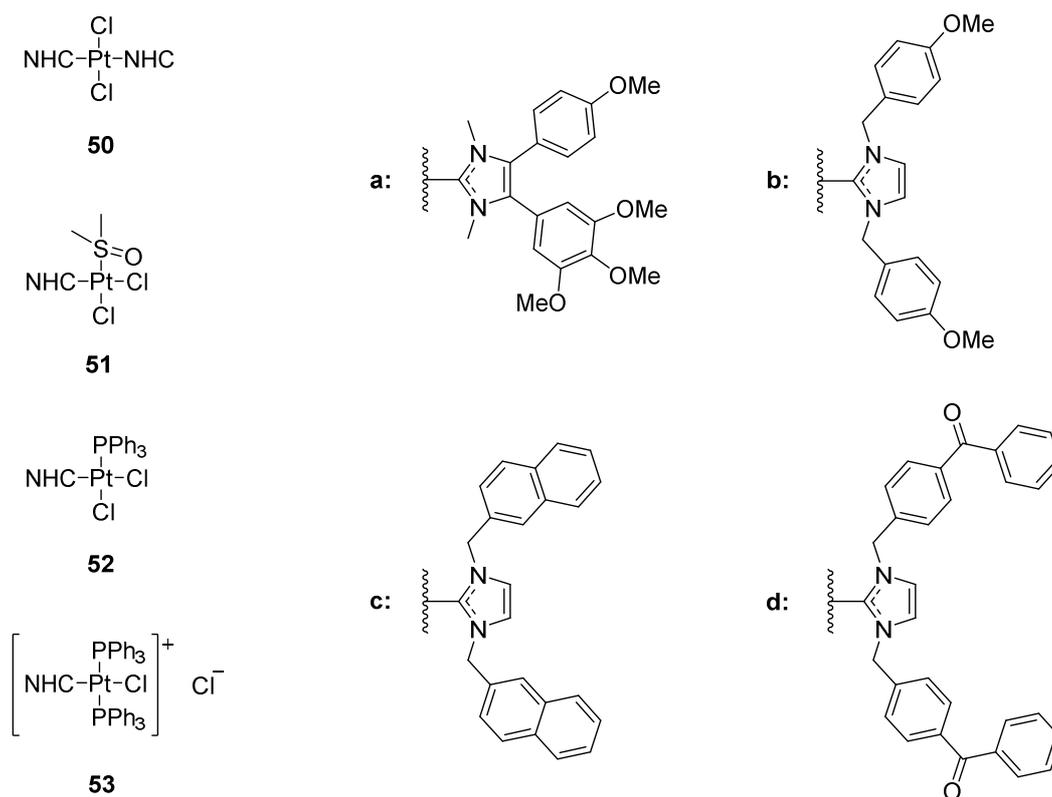


Abbildung 91: Strukturen der 4,5- und 1,3-Diarylimidazol-basierten Pt(II)-NHC-Komplexe **50-53** mit ihren unterschiedlichen NHC- und Zweitliganden.

Zunächst wurde überprüft, ob die neuen Pt(II)-NHC-Derivate **50-53** eine ähnlich gute antiproliferative Aktivität gegenüber Tumorzellen zeigen und welche Rolle die unterschiedlichen NHC-Liganden hierbei spielen. Die für die Komplexe **50-53** mit Hilfe eines MTT-basierten Proliferationsassays ermittelten IC₅₀-Werte gegenüber einer kleinen Auswahl an Krebszellen verschiedener Entitäten sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Aus diesen wird ersichtlich, dass die Platinverbindungen **50-53** ein ähnliches Aktivitätsprofil gegenüber den untersuchten Krebszelllinien zeigen wie die analogen Komplexe **48** und **49**. So zeigten die Biscarbenkomplexe **50** mit IC₅₀-Werten im einstelligen bis zweistelligen mikromolaren Bereich eine ähnlich gute antiproliferative Wirkung wie die analogen *trans*-Platinkomplexe **48**. Auch die DMSO-substituierten Platinkomplexe **51** waren in diesem Konzentrationsbereich wirksam, wobei sie sich insgesamt als etwas effektiver herausstellten als das zuvor beschriebene Analogon **49a**.

Tabelle 15: IC₅₀-Werte (µM) der 4,5- und 1,3-Diarylimidazol-basierten Pt(II)-NHC-Komplexe **50-53** gegenüber einer Auswahl an humanen Krebszellen. Bei den IC₅₀-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vier Messreihen ± SD, die jeweils mittels eines MTT-basierten Vitalitätstests nach 72 h Inkubation bestimmt wurden.

	518A2	MCF-7/Topo	KB-V1/Vbl	HCT-116	HT-29
50a	3,6 ± 0,7	5,0 ± 0,1	n.b.	4,7 ± 0,7	4,5 ± 1,2
50b	1,1 ± 0,3	20,0 ± 1,4	> 50	18,3 ± 1,9	n.b.
50d	1,7 ± 0,1	> 50	> 50	> 50	> 50
51a	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
51b	15,0 ± 0,1	34,2 ± 1,7	n.b.	12,1 ± 0,2	21,5 ± 2,2
51c	2,9 ± 0,5	22,8 ± 7,0	n.b.	1,7 ± 0,1	11,4 ± 0,8
51d	32,7 ± 1,7	22,0 ± 2,3	> 50	n.b.	n.b.
52a	17,6 ± 1,6	8,4 ± 0,9	> 50	13,2 ± 0,2	17,4 ± 1,3
52b	3,8 ± 0,4	6,5 ± 0,7	n.b.	3,1 ± 1,0	9,8 ± 1,8
52c	10,0 ± 1,1	n.b.	n.b.	8,1 ± 2,5	> 50
52d	13,1 ± 2,1	n.b.	> 50	11,7 ± 3,4	> 50
53a	1,0 ± 0,4	0,2 ± 0,05	2,9 ± 0,4	n.b.	0,7 ± 0,3
53b	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	2,9 ± 0,2	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,02
53c	1,1 ± 0,1	0,13 ± 0,07	31,5 ± 4,2	0,82 ± 0,09	1,9 ± 0,2

518A2-Melanomzellen, MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen, KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen, HCT-116-Kolonkarzinomzellen, kolorektale HT-29- und DLD-1- Adenokarzinomzellen

Eine Ausnahme hiervon bildet der Komplex **51a** mit seinem Methoxy-substituierten 4,5-Diarylimidazol-Liganden, der keinerlei Toxizität gegenüber der untersuchten Auswahl an Tumorzellen aufweist. Zusätzlich ist hier anzumerken, dass auch alle anderen Komplextypen mit diesem Liganden (**50a**, **52a** und **53a**) im Vergleich zu den jeweiligen 1,3-Diarylimidazol-basierten Derivaten (**50b-d**, **51b-d** und **53b-d**) eine deutlich geringere antiproliferative Aktivität zeigen.

Der Austausch des DMSO-Liganden zu einem PPh₃-Rest resultierte, wie schon bei dem Komplex **49b**, auch bei den Pt(II)-NHC-Komplexen **52** in einer signifikanten Wirkungssteigerung. Die effektivsten Platinkomplexe der Serie stellen erneut die bis-PPh₃-Derivate **53** dar, die weitestgehend IC₅₀-Werte im submikromolaren bis unteren einstelligen mikromolaren Bereich aufzeigen. Dabei erwies sich dieser Komplex typ gegenüber den MCF-7/Topo-Mammakarzinomzellen sowie den beiden untersuchten Kolonkarzinomzellen als besonders aktiv und war darüber hinaus sogar in den mehrfach-resistenten KB-V1/Vbl-Zervixkarzinomzellen stark wirksam. Im Gegensatz dazu zeigten alle anderen Platinkomplexe entweder keine oder nur eine vergleichsweise geringe Aktivität gegenüber den KB-V1/Vbl-Zellen.

Als nächstes wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Assays (EMSA und EtBr-Fluoreszenz-Assay) untersucht, ob die neuartigen Pt(II)-NHC-Komplexe **50-53** mit zirkulärer Plasmid- bzw. linearer Lachsspermien-DNA interagieren. Erneut zeigten auch hier die Biscarbenkomplexe **50** keinerlei Wechselwirkungen mit den beiden verschiedenen DNA-Formen (Abbildung A-10 im Anhang). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von pBR322-Plasmid-DNA mit allen anderen Platinkomplexen **51-53**, die ein zum NHC-Liganden *trans*-ständiges Chlorid aufweisen, zu einer konzentrationsabhängigen Bandenretardation im EMSA. Die Effekte der beiden Reihen **51b/52b/53b** und **51c/52c/53c** auf die Plasmid-DNA sind in der nachfolgenden Abbildung 92 exemplarisch dargestellt, da in diesen alle drei Komplex typen (DMSO-, *mono*-PPh₃ und *bis*-PPh₃-Komplex) beinhaltet sind und diese sich darüber hinaus auch bei den Zytotoxizitätsbestimmungen als die effektiveren beiden Reihen an Platinverbindungen herausgestellt hatten. Den deutlichsten *band shift* lösten die *mono*-PPh₃-Komplexe **52b** und **52c** aus, wobei das Methoxy-substituierte 1,3-Dibenzylimidazol-Derivat **52b** geringfügig aktiver war als sein Naphthyl-Analogon **52c**. Im Gegensatz dazu induzierten die beiden *bis*-PPh₃-Komplexe **53b** und **53c** zwar die geringste Bandenretardation, jedoch waren ab einer Konzentration von 10 μM eindeutig Banden von größeren DNA-Addukten oberhalb der *oc*-Form des Plasmids zu beobachten.

Des Weiteren verblieben auch große Anteile der Plasmid-DNA nach Behandlung mit **53b** und **53c** in den Taschen der Agarosegele, was, wie bereits bei dem analogen Platinkomplex **49c** (vgl. Abbildung 79 in Abschnitt 4.2.1 und Abbildung A-6 im Anhang), auf eine signifikante Aggregation der DNA hindeutet. Zu einem weitaus geringeren Maß war dieser Effekt auf die DNA auch bei den beiden *mono*-PPh₃-Komplexen **52b** und **52c** zu beobachten (nicht gezeigt).

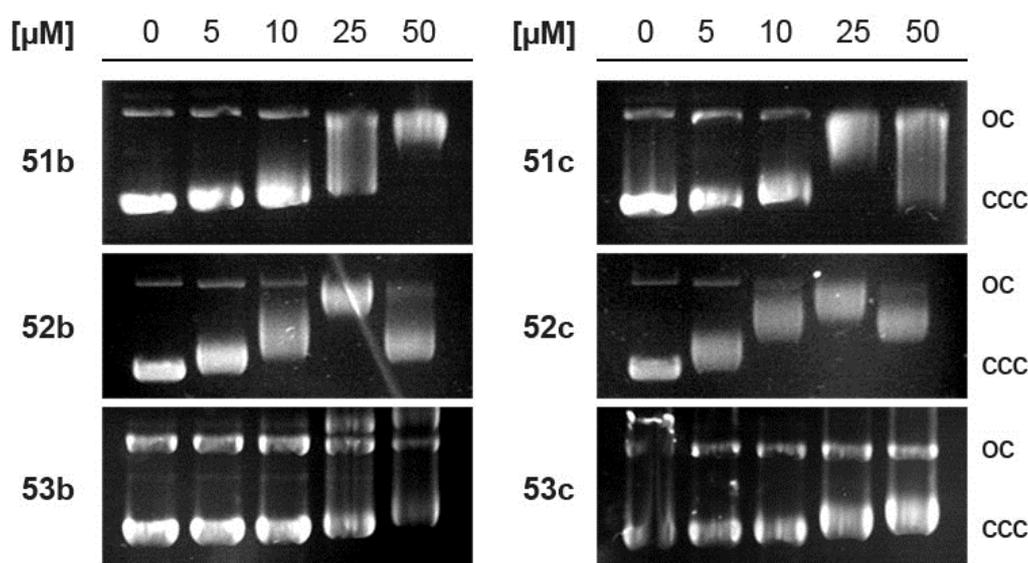


Abbildung 92: Interaktion der Pt(II)-NHC-Komplexe **51b/52b/53b** und **51c/52c/53c** mit zirkulärer pBR322-Plasmid-DNA. Die DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Platinverbindungen behandelt und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelbilder sind für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente repräsentativ.

Da eine erhebliche Reduktion der Fluoreszenz von EtBr-DNA-Addukten nach Behandlung von Lachsspermien-DNA mit den PPh₃-Komplexen **49b** und **49c** bereits eindeutig mit einer DNA-aggregierenden Aktivität dieser Platinverbindungen korreliert werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.1), wurden auch die beiden Reihen **51b/52b/53b** und **51c/52c/53c** im EtBr-Fluoreszenzassay untersucht (Abbildung 93). Genau wie der analoge DMSO-Komplex **49a** und die Referenzverbindung Cisplatin induzierten auch die Verbindungen **51b** und **51c** lediglich eine minimale Verringerung der EtBr-Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung der Lachsspermien-DNA mit den *mono*-PPh₃-Komplexen **52b** und **52c** zu einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenz. Die stärkste Verringerung der EtBr-Fluoreszenz lösten jedoch wie schon bei den zuvor beschriebenen Platinkomplexen **49** die beiden *bis*-PPh₃-Komplexe **53b** und **53c**. Der Komplex **53b** war dabei in etwa genauso effektiv wie sein unsubstituiertes 1,3-Dibenzylimidazol-Analogon **49c**, während die Aktivität des Derivats **53** im Vergleich zu den anderen beiden *bis*-PPh₃-Komplexen deutlich geringer ausfiel.

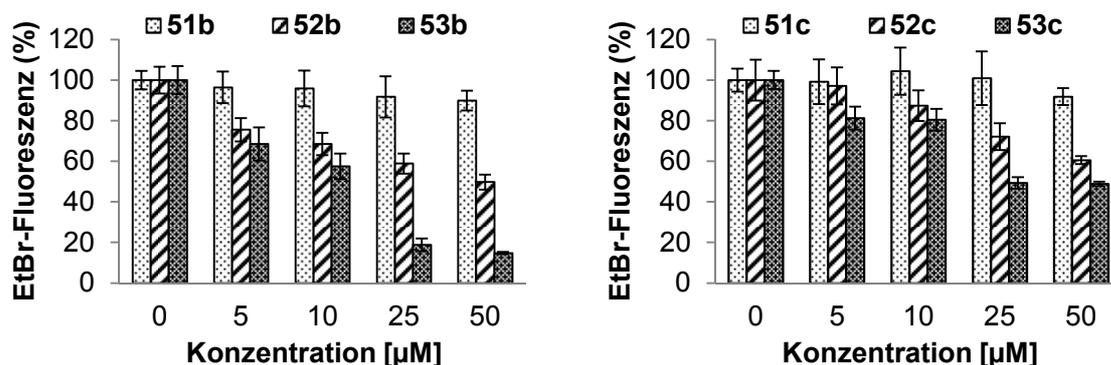


Abbildung 93: Relative Fluoreszenzintensität der EtBr-DNA-Addukte nach Inkubation von Lachspermien-DNA mit verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 µM) der *para*-Methoxy-substituierten Pt(II)-NHC-Komplexe **51b**, **52b** und **53b** (A) bzw. der Naphthyl-substituierten Pt(II)-NHC-Komplexe **51c**, **52c** und **53c** (B) für 2 h. Die Fluoreszenz der mit DMF behandelten DNA-Kontrollansätze wurde jeweils gleich 100 % gesetzt.

Die *bis*-PPh₃-Komplexe **53a-c** wurden als aktivste Komplexe dieser Serie an Pt(II)-NHC-Komplexen für weiterführende Experimente ausgewählt und in 518A2-Melanomzellen auf ihren zellulären Wirkmechanismus untersucht. So konnte zunächst gezeigt werden, dass alle drei Platinkomplexe massive Veränderungen im Aktinzytoskelett der 518A2-Zellen auslösen (Abbildung 94).

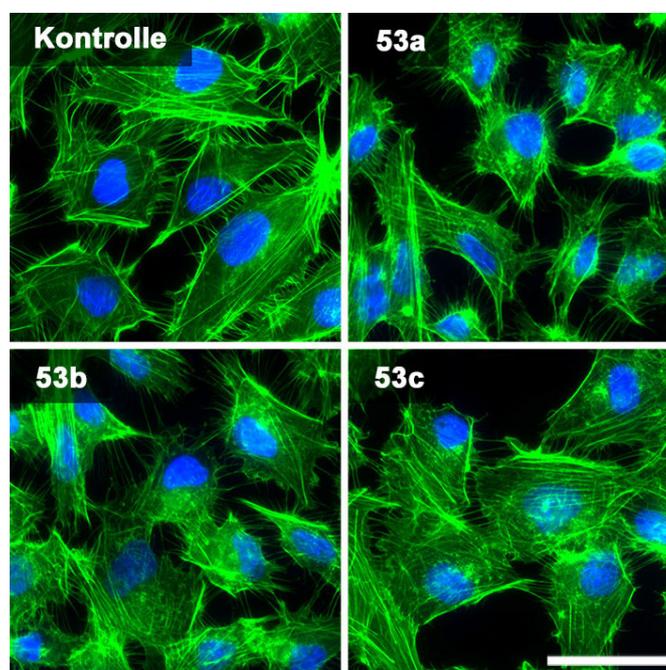


Abbildung 94: Effekte der Pt(II)-NHC-Komplexe **53a-c** auf die Organisation von F-Aktin in 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den 750 nM von **53a**, 300 nM von **53b**, 2 µM von **53c** oder DMF (Kontrolle) behandelt, bevor sie fixiert und das Aktinzytoskelett (grün) mit Alexa Fluor®-488-konjugiertem Phalloidin sowie die Zellkerne (blau) mit DAPI gefärbt wurden. Maßstabsbalken – 50 µm.

Während zwar vereinzelt noch *stress fibers* in den 518A2-Melanomzellen beobachtet werden konnten, lag das Aktinzytoskelett nach Behandlung mit den Platinkomplexen **53a-c** zum Teil auch bereits fragmentiert vor. Darüber hinaus wiesen die Zellen eine stark abgerundete Morphologie sowie im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich verringerte Anzahl an Aktin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten auf. Da es sich hierbei um für die Apoptose charakteristische zellmorphologische Eigenschaften handelt, könnte man vermuten, dass die Platinkomplexe **53a-c** in den eingesetzten Konzentrationen bereits eine signifikante Apoptose-induzierende Wirkung aufweisen. In durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (vgl. Abbildung 95). Stattdessen korrelierte die deutliche Beeinträchtigung des Aktinzytoskeletts genau wie bei dem analogen *bis*-PPh₃-Komplex **49c** mit einer Arretierung der 518A2-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abbildung 95) sowie einer signifikanten antimigratorischen Aktivität der Pt(II)-NHC-Komplexe **53a-c** im *Wound-Healing* Assay (Abbildung 96).

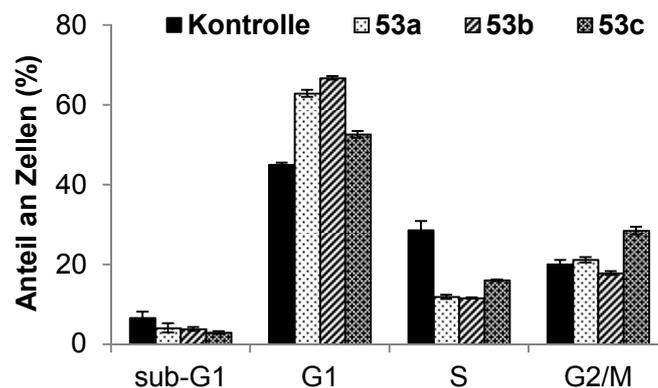


Abbildung 95: Effekte der Pt(II)-NHC-Komplexe **53a-c** auf den Zellzyklus von 518A2-Zellen nach Inkubation mit 1 μ M von **53a**, 450 nM von **53b**, 3 μ M von **53c** oder einer analogen Menge an DMF (Kontrolle) für 24 h. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in der G1-, S- und der G2/M-Phase sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1) als Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine Behandlung der 518A2-Melanomzellen mit den beiden Derivaten **53a** und **53b** führte zu einem deutlichen Anstieg der G1-Zellpopulation und damit einhergehend zu einer starken Verringerung des Anteils an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Im Gegensatz dazu wurden Zellen, die mit dem Platinkomplex **53c** behandelt wurden, nicht ganz so stark in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Es zeigte sich jedoch ein zusätzlicher Anstieg des Anteils an Zellen in der G2/M-Phase. Möglicherweise ist die gleichzeitige Arretierung der 518A2-Zellen in der G1- und der G2/M-Phase durch den Platinkomplex **53c** die Folge eines bimodalen Wirkmechanismus. So könnte dieser Platinkomplex nicht nur die Aggregation von DNA aufgrund

seines *bis*-PPh₃-Strukturmotivs auslösen, sondern möglicherweise zu einem gewissen Maß auch über die Naphthyl-substituenten der NHC-Liganden in diese interkalieren. Während die DNA-Aggregation, wie für den zuvor beschriebenen Komplex **49c** bereits eindeutig nachgewiesen (vgl. Abschnitt 4.2.1), mit einer Akkumulation der 518A2-Zellen in der G1-Phase einhergeht, induzieren interkalierende Verbindungen, wie zum Beispiel Doxorubicin, häufig einen G2/M-Arrest.^{297,298} Die über seine Naphthylreste vermittelte DNA-Interkalation des Komplexes **53c** könnte also durchaus eine plausible Erklärung für den zweifachen Zellzyklusarrest darstellen. Da im *Wound-Healing* Assay keine wesentlichen Unterschiede bei den Effekten der Komplexe **53a-c** festgestellt werden konnten, ist in der nachfolgenden Abbildung 96 stellvertretend für alle drei Platinkomplexe lediglich die Beeinträchtigung der Migrationsfähigkeit von 518A2-Melanomzellen durch **53a** dargestellt.

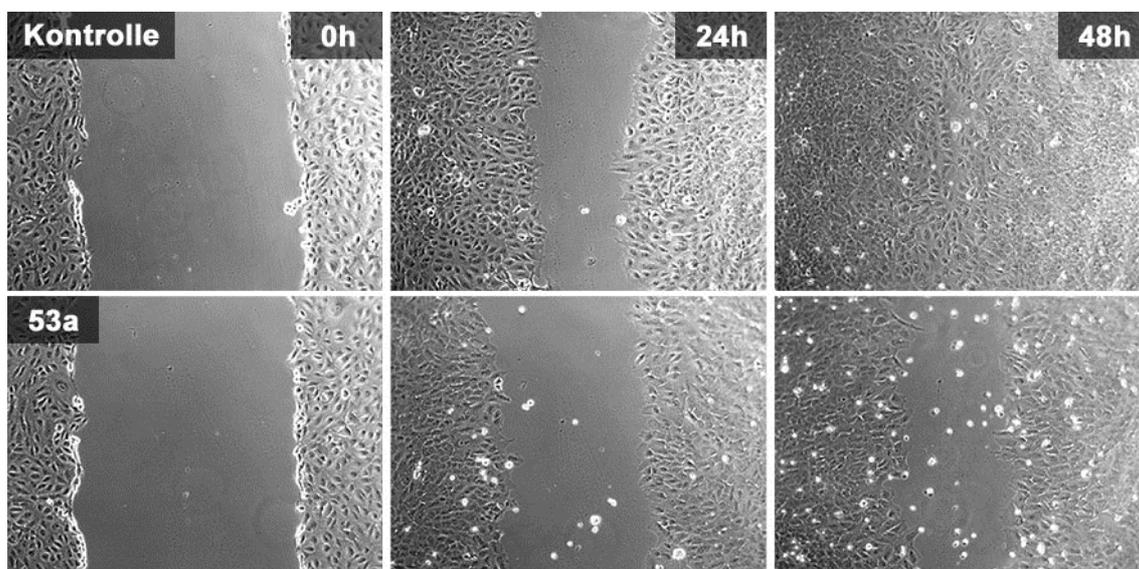


Abbildung 96: Inhibitorischer Effekt des Pt(II)-NHC-Komplexes **53a** (1 μ M) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen sind für mindestens drei unabhängige Experimente repräsentativ.

Zusammenfassende Diskussion

Genau wie die Verbindungen **48** und **49** sind die Pt(II)-NHC-Komplexe **50-53** vielversprechende Wirkstoffkandidaten mit einer signifikanten antiproliferativen Wirkung. So konnte mit Hilfe von MTT-basierten Proliferationsassays gezeigt werden, dass die Biscarbenkomplexe **50** trotz einer fehlenden DNA-Bindung IC_{50} -Werte im unteren einstelligen bis zweistelligen mikromolaren Bereich aufweisen und somit eine vergleichbare Aktivität zeigen wie der zuvor beschriebene Biscarbenkomplex **48a** und sein 2-Picolin-Derivat **48b**. Ausgehend von den DMSO-Komplexen **51**, die in etwa im gleichen Bereich wirksam sind wie die Biscarbenkomplexe **50**, steigerte sich die antiproliferative Aktivität der Platinkomplexe über die *mono*-PPh₃-Komplexe **52** hin zu den *bis*-PPh₃-Komplexen **53** um etwa das zeh- bis zwanzigfache. Dieser Trend konnte auch bereits bei den analogen Komplexen **49a-c** beobachtet werden und korrelierte hier mit der Fähigkeit der Verbindungen DNA zu aggregieren. Da die Komplexe **50-53** in den die DNA-Interaktion untersuchenden Assays vergleichbare Ergebnisse zeigten wie ihre entsprechenden Analoga **49a-c**, kann vermutet werden, dass die Phosphinkomplexe **52** und **53** ebenfalls eine DNA-aggregierende Aktivität aufweisen, während die DMSO-Komplexe **51** eine kovalente Interaktion mit der DNA eingehen. Diese Hypothese könnte leicht mit Hilfe der bereits bei den Komplexen **49** eingesetzten Methoden zur Interaktion der Platinkomplexe leicht überprüft werden. Derzeit wird analysiert, ob die Platinkomplexe in den Zellkern von Tumorzellen gelangen und ihre antiproliferative Aktivität somit tatsächlich auf einer Wechselwirkung mit der DNA beruht.

In zellbiologischen Experimenten, in denen der zelluläre Wirkmechanismus der drei aktivsten Verbindungen dieser Serie an Pt(II)-NHC-Komplexen beleuchtet werden sollte, konnte gezeigt werden, dass die PPh₃-Komplexe **53** in 518A2-Melanomzellen eine signifikante Reorganisation des Aktinzytoskeletts induzierten. Diese ging wie schon bei dem zuvor beschriebenen Analogon **49c** mit einer deutlichen Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus einher. Darüber hinaus wurde für die Komplexe **53** in *Wound-Healing* Assays ebenfalls eine eindeutige antimigratorische Aktivität nachgewiesen.

Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die zellulären und molekularen Wirkmechanismen der untersuchten Pt(II)-NHC-Komplexe **50-53**, aber auch **48** und **49**, weitgehend von den unterschiedlichen Platinzentren der Komplexe abhängig sind und weniger von der Art der NHC-Liganden bestimmt werden.

5 Zusammenfassung

Cisplatin und einige von dieser Leitstruktur abgeleitete Platinanaloga stellen bis heute die einzigen metallbasierten Wirkstoffe dar, die für die Krebstherapie zugelassen sind. Trotz ihres erfolgreichen Einsatzes bei der Behandlung verschiedener solider Tumore, ist die klinische Anwendung dieser Platinverbindungen aufgrund von ausgeprägten Nebenwirkungen, die durch eine unspezifische Toxizität der Metallkomplexe entstehen, sowie aufgrund der Entwicklung von Resistenzen dennoch häufig limitiert. Daher handelt es sich bei der Erhöhung der Selektivität gegenüber Tumorzellen zur Reduzierung von Nebenwirkungen und der Überwindung von Resistenzmechanismen zur Steigerung der Wirksamkeit von neuen Wirkstoffkandidaten um zwei essentielle Ziele der medizinischen Chemie. Dabei wird nicht nur weiterhin mit Hochdruck an der Optimierung unterschiedlicher Cisplatin-Derivate gearbeitet, sondern auch an der Entwicklung neuartiger antitumoraler Metallkomplexe.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gold(I)- und Platin(II)-NHC-Komplexe (NHC - *N*-heterozyklisches Carben) mit unterschiedlichen Imidazol-Liganden auf ihre antitumorale Aktivität untersucht. Die präklinische Evaluierung umfasste dabei neben der Bestimmung der Effektivität und Selektivität der Metallverbindungen gegenüber einer Auswahl an etablierten Krebszelllinien auch unterschiedliche zellbiologische und biochemische Methoden zur Aufklärung ihrer zellulären und molekularen Wirkmechanismen. Weiterhin wurden auch die antivaskulären Eigenschaften der Gold- und Platinverbindungen analysiert, da das tumorale Blutgefäßsystem sowie die Angiogenese aufgrund ihrer essentiellen Bedeutung für das Wachstum, die Progression sowie die Metastasierung von Tumoren vielversprechende *targets* für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika darstellen.

Für alle untersuchten mononuklearen Gold- sowie multinuklearen Fe/Au-Komplexe, deren allgemeine Strukturen in Abbildung 97 aufgeführt sind, konnte *in vitro* eine signifikante antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden. So zeigten Monocarbenkomplexe, die als Zweitliganden lediglich ein Chlorid am Goldzentrum tragen (**54**), IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren Bereich. Eine deutliche Wirkungssteigerung konnte sowohl durch einen Austausch des Chlorids gegen einen PPh₃-Liganden (**55**) sowie durch die Herstellung der entsprechenden Biscarbenkomplexe (**56**) erreicht werden, sodass diese beiden Komplextypen mit IC₅₀-Werten im submikromolaren Bereich eine deutlich erhöhte Aktivität gegenüber den verwendeten Tumorzelllinien aufwiesen. Auch die Ferrocen-verbrückten, trimetallischen Goldkomplexe (**57**) waren in diesem Konzentrationsbereich wirksam.

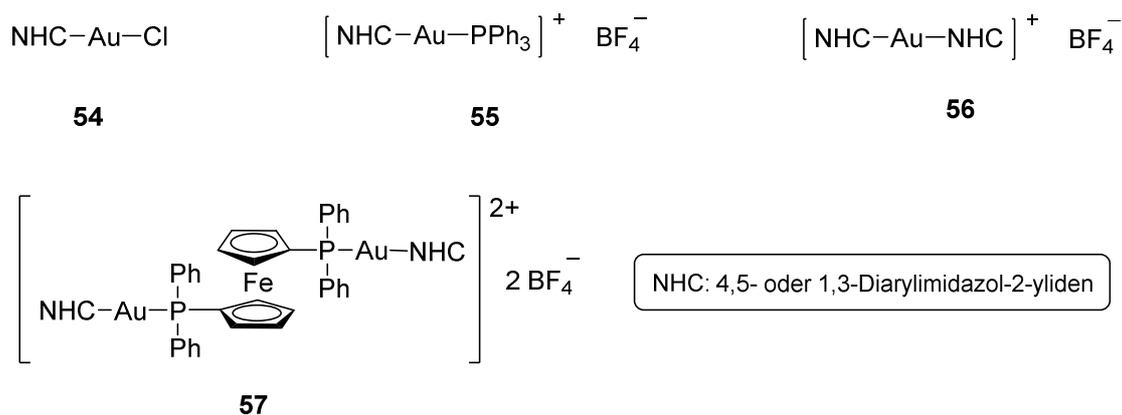


Abbildung 97: Allgemeine Strukturen (**54-57**) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten an Gold(I)-NHC-Komplexe mit 4,5- und 1,3-Diarylimidazol-Liganden.

Des Weiteren wiesen die jeweils aktivsten Vertreter der analysierten Serien an Goldkomplexen vergleichbare zelluläre und molekulare Wirkmechanismen auf. So induzierten sie in Tumorzellen neben einem signifikanten G1-Zellzyklusarrest auch eine starke Ausbildung von sogenannten *stress fibers* im Aktinzytoskelett. Die Beeinträchtigung der Aktinzytoskelettdynamik korrelierte dabei eindeutig mit einer antimigratorischen Wirkung der Gold(I)-NHC-Komplexe. Zusätzlich verringerten einige ausgewählte Phosphin- (**55**) und Biscarbenkomplexe (**56**) das Proteinlevel der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) in stark metastasierenden 518A2-Melanomzellen, was ebenfalls auf ein gutes antimetastatisches Potential dieser Verbindungen hindeutet.

Darüber hinaus waren einige der in dieser Arbeit untersuchten Gold(I)-NHC-Komplexe (**55**, **56** und **57**) in der Lage die enzymatische Aktivität der Thioredoxinreduktase zu hemmen. Die direkte Inhibition dieses antioxidativen Enzyms ging dabei im Falle der heteronuklearen Fe/Au-Komplexe, zu denen sowohl die Ferrocen-substituierten Phosphin- und Biscarbenkomplexe **55** und **56** als auch die trimetallischen, Ferrocen-verbrückten Komplexe **57** zählen, mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Levels an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials einher.

Weiterhin konnte für alle getesteten Goldkomplexe sowohl *in vitro* anhand von *Tube Formation* Assays mit vaskulären Endothelzellen als auch *in vivo* im Chorioallantoismembran Assay (CAM Assay) eine starke antivaskuläre Wirkung festgestellt werden. Einige der aktivsten Gold(I)-Biscarbenkomplexe **56** zeigten auch im *in vivo*-Mausmodell eine erhebliche antitumorale Aktivität sowie eine gute Verträglichkeit und sind somit sehr vielversprechende Wirkstoffkandidaten, deren Optimierung und Weiterentwicklung erfolgsversprechend erscheint.

Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Platin(II)-NHC-Komplexe bilden einen guten Ausgangspunkt für die Herstellung weiterer, effektiver Metallverbindungen, da ihnen *in vitro* ebenfalls eine starke antiproliferative Wirkung sowie Selektivität für Tumorzellen nachgewiesen werden konnte. Die allgemeinen Strukturen der verschiedenen analysierten Typen von Platinkomplexen (**58-60**) sind in der nachfolgenden Abbildung 98 dargestellt.

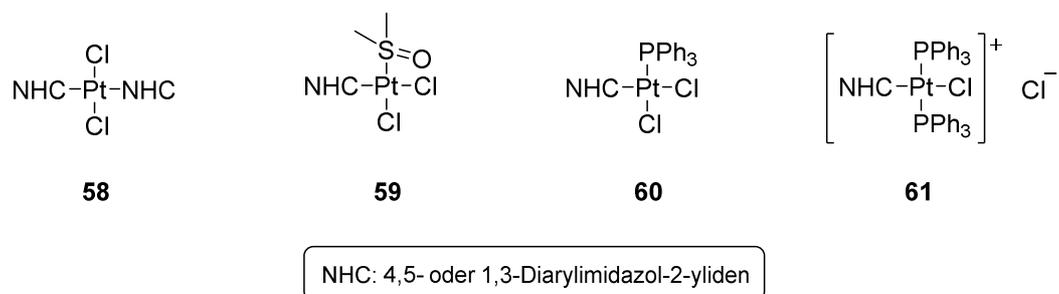


Abbildung 98: Allgemeine Strukturen (**58-61**) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten von Platin(II)-NHC-Komplexe mit 4,5- und 1,3-Diarylimidazol-Liganden.

Ein Großteil dieser Platinverbindungen scheint einen im Vergleich zu dem etablierten Chemotherapeutikum Cisplatin veränderten Wirkmechanismus aufzuweisen, was womöglich auch *in vivo* zu einer Überwindung der häufig auftretenden Cisplatin-Resistenzen beitragen kann. Für alle Platinverbindungen, die in *trans*-Position zum NHC-Liganden ein Chlorid aufweisen (**59-61**), konnte *in vitro* zwar eine signifikante Wechselwirkung mit DNA beobachtet werden. Im Falle der *bis*-PPh₃-substituierten Platinkomplexe **61** war diese jedoch im Gegensatz zur Bindung von Cisplatin nicht koordinativ. Stattdessen lösten diese Platinverbindungen eine starke Aggregation der DNA aus. Die *mono*-PPh₃-Komplexe **60** zeigten dagegen eine bimodale Interaktion mit DNA. So sind sie zum einen ebenfalls in der Lage eine DNA-Kondensation auszulösen, zum anderen besitzen sie aber auch die Fähigkeit koordinativ an DNA zu binden. Lediglich die DMSO-substituierten Platin(II)-NHC-Komplexe **59** zeigten eine rein koordinative Bindung an DNA sowie einen zu Cisplatin vergleichbaren zellulären Wirkmechanismus. Darüber hinaus bleibt anzumerken, dass die DNA anscheinend kein direktes *target* für die untersuchten Biscarbenkomplexe **58** darstellt, es sich bei diesen Komplexen aber dennoch um sehr effektive antiproliferative Verbindungen handelt.

In Tumorzellen wurde die antiproliferative Wirkung der *bis*-PPh₃-Komplexe **61**, wie bereits bei den getesteten Gold(I)-NHC-Komplexen, unter anderem durch einen starken Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus vermittelt. Durch die Auslösung der Aktinzytoskelett-Stressantwort (Ausbildung von *stress fibers*) und der damit einhergehenden Beeinträchtigung

der Zytoskelettdynamik weisen die Platin(II)-NHC-Komplexe **61** ebenfalls eine deutliche antimigratorische Aktivität auf. Zusätzlich konnte für diese Art von Platinkomplexen auch eine signifikante vaskular-disruptive Wirkung *in vivo* nachgewiesen werden, da sie die Blutgefäße in der CAM von befruchteten Hühnereiern zerstörten.

Eine ausgewählte Reihe der neuartigen Platinverbindungen, die den gleichen NHC-Liganden, aber unterschiedliche Zweitliganden tragen (DMSO, *mono*-PPh₃ oder *bis*-PPh₃), wurde beispielhaft anhand von *ex vivo* kultivierten Nierengewebeschnitten auf ihre Nephrotoxizität untersucht. Während der DMSO- und der *mono*-PPh₃-substituierte Komplex in den Gewebeschnitten kaum eine Toxizität zeigten, war die Schädigung des Gewebes durch den *bis*-PPh₃-Komplex im Vergleich zu dem für seine Nephrotoxizität bekannten Wirkstoff Cisplatin sogar deutlich stärker. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Komplex gegenüber Tumorzellen wesentlich effektiver ist als Cisplatin und daher *in vivo* vermutlich auch in einer weitaus geringeren Konzentration eingesetzt werden könnte, was zu einer verringerten und damit handhabbaren Toxizität des Komplexes führen sollte. Neben ihrer hohen Effektivität gegenüber Krebszellen und dem im Vergleich zu Cisplatin abweichenden Wirkmechanismus trägt also auch die relativ geringe generelle Toxizität der Platin(II)-NHC-Komplexe **60-61** dazu bei, dass es sich bei dieser Art von Metallverbindungen ebenfalls um interessante neue Wirkstoffkandidaten für die Chemotherapie handelt. Die weitere Variation der NHC-Liganden und ihrer Substituenten eröffnet dabei eine Vielzahl an Möglichkeiten zur weiteren Optimierung der pharmakokinetischen sowie pharmakodynamischen Eigenschaften dieser vielversprechenden Platinkomplexe.

6 Summary

Until today, Cisplatin and a few platinum analogs derived from this lead structure are the only metal-based drugs that have been approved for the treatment of cancer. While these platinum complexes are very effective against a variety of different solid tumors, their clinical application is often limited due to severe side effects, which are the result of the non-specific toxicity of these metallodrugs, and the occurrence of resistances. For these reasons, increasing the selectivity for cancer cells to reduce undesirable side effects and overcoming resistance mechanisms to improve the effectivity of new anticancer drug candidates represent two major goals in medicinal chemistry. Within this frame, researchers are not only working on the optimization of cisplatin analogs, but also the development of completely novel metal complexes for cancer treatment.

In this present study the antitumoral activity of a variety of new gold(I) and platinum(II) *N*-heterocyclic carbene (NHC) complexes with imidazole ligands was investigated. The preclinical evaluation included, but was not limited to the assessment of the antiproliferative activity and selectivity of these metal compounds towards a selection of established human cancer cell lines. Different cell-based and biochemical assays were applied to elucidate the cellular and molecular mechanisms of action of the gold and platinum complexes. Additionally, the antivascular effects of the complexes were examined since the vasculature of solid tumors as well as the process of angiogenesis play an essential role for tumor growth, progression and metastasis and thus represent promising targets for the development of new chemotherapeutic agents.

All mononuclear gold and multinuclear Fe/Au complexes, which were investigated in this study and whose general structures are depicted in Figure 99, showed strong antiproliferative effects *in vitro*. Monocarbene complexes bearing a simple chloride as their ancillary ligand (**54**) were active in the lower micromolar IC₅₀ range. Both the replacement of the chloride with a PPh₃-residue (**55**) as well as the synthesis of the respective biscarbene complexes **56** were associated with a significant increase in the compounds' cytotoxicity, so that both of these types of gold complexes showed IC₅₀ values in the submicromolar range. The trimetallic complexes **57**, in which two gold(I) NHC fragments are connected through a diphosphino ferrocene moiety, were active in that same range.

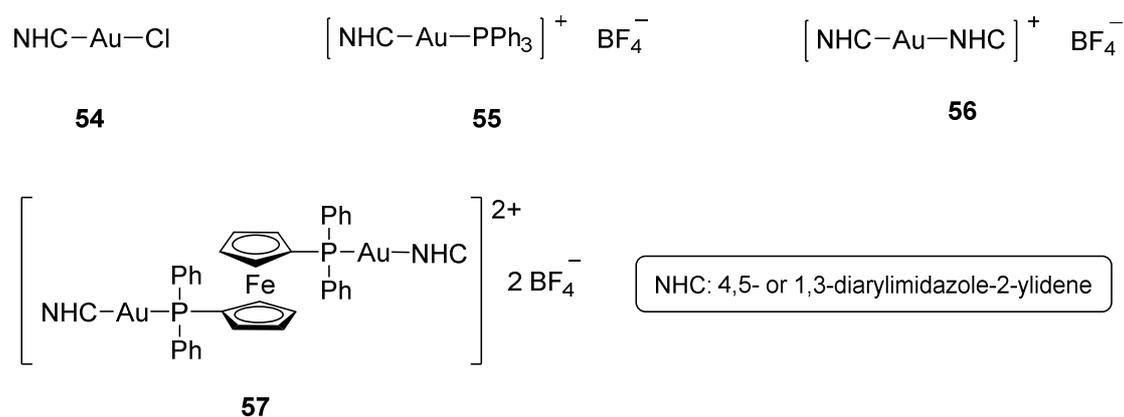


Figure 99: General structures (**54-57**) of the different types of gold(I) NHC complexes with 4,5- and 1,3-diarylimidazole ligands that were investigated in this study.

It could be shown that the most active derivatives of the different analyzed series of gold complexes act through comparable cellular and molecular mechanisms of action. The arrest of tumor cells in the G1 phase of the cell cycle and the strong formation of stress fibers induced by the gold complexes were generally linked to a distinct antimigratory activity in wound-healing assays. Additionally, a few selected phosphine (**55**) and biscarbene (**56**) complexes significantly attenuated the protein level of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in highly metastatic 518A2 melanoma cells, hinting towards a promising antimetastatic potential of these derivatives.

The antioxidative enzyme thioredoxinreductase (TrxR) represents the most common target of gold-based compounds and was strongly inhibited by several gold complexes of this study (**55**, **56** and **57**). In case of the heteronuclear Fe/Au complexes, which include both the ferrocenyl-substituted phosphine (**55**) and biscarbene (**56**) complexes as well as the ferrocene-coupled gold complexes **57**, this inhibition was associated with a distinct intracellular increase of reactive oxygen species (ROS) and the loss of the mitochondrial membrane potential. Moreover, all gold complexes were found to be strongly antivascular as observed by tube formation assays with vascular endothelial cells *in vitro* and in the chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized chicken eggs. Some of the most active gold(I) biscarbene complexes **56** also showed a distinct antitumoral activity and respectable tolerance *in vivo* as assessed by mouse xenograft models. In summary, it can be stated that the gold(I) NHC complexes **55-57** represent interesting new drug candidates for the treatment of cancer, whose optimization and further development seem promising.

Similarly, the different platinum(II) NHC complexes **58-61** investigated in this study (Figure 100) also provide a good basis for the development of further optimized derivatives as they were highly efficacious against the tested panel of tumor cell lines, while affecting non-malignant cells to a much lower extent (selectivity).

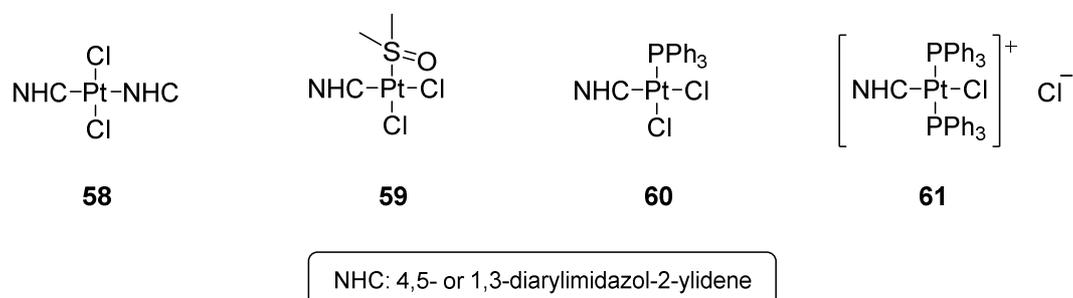


Figure 100: General structures (**58-61**) of the different types of platinum(II) NHC complexes with 4,5- and 1,3-diarylimidazole ligands that were investigated in this study.

The majority of these platinum complexes appears to exhibit a molecular mechanism of action that differs from the one of the established anticancer drug cisplatin. All complexes bearing a chloride *trans* to their primary NHC ligand were found to still interact with DNA. However, in case of the *bis*-PPh₃ complexes **61** this interaction was non-coordinative and induced a remarkable aggregation of DNA. In contrast, the *mono*-PPh₃ complexes **60** displayed a bimodal mechanism of DNA interaction. While also inducing a distinct condensation of DNA, this type of complex was additionally found to bind to DNA in a coordinative manner. The DMSO-substituted platinum complexes **59** showed an entirely coordinative binding to DNA as well as a cellular mechanism of action comparable to that of cisplatin. The only platinum complexes that seem to act through a DNA-independent mechanism of action are the biscarbene complexes **58**, which nevertheless represent very effective antiproliferative agents.

As already observed for the gold(I) NHC complexes described above, the antiproliferative activity of the *bis*-PPh₃ complexes **61** in tumor cells was also associated with a pronounced accumulation of the cells in the G1 phase of the cell cycle. Furthermore, these platinum complexes induced a similar actin cytoskeleton remodeling (stress response, stress fiber formation) as the gold complexes, which seems to mediate their distinct antimigratory activity. Additionally, the complexes **61** represent strong vascular-disruptive agents since they destroyed the blood vessels in the CAM of fertilized chicken eggs.

A selected series of the new platinum complexes bearing the same type of NHC but different ancillary ligands (DMSO, *mono*-PPh₃ and *bis*-PPh₃) was exemplarily investigated for nephrotoxic effects in precision-cut kidney slices that were cultured *ex vivo*. The DMSO- (**59**) and *mono*-PPh₃-substituted (**60**) complexes hardly affected the viability of the kidney slices. In contrast, the corresponding *bis*-PPh₃ complex **61** was even more nephrotoxic than cisplatin. However, it should be noted that this complex also displayed a far higher antiproliferative activity in tumor cells than cisplatin and thus, it can most likely be administered at a much lower concentrations *in vivo*, which should result in a manageable renal toxicity.

Taken altogether, their strong antiproliferative effects in cancer cells, their relatively low general toxicity as well as their specific mechanisms of DNA interaction render the novel platinum(II) NHC complexes **60-61** very interesting anticancer-active drug candidates with many possibilities to further optimize their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

7 Literaturverzeichnis

1. International Agency for Research on Cancer. *World Cancer Report 2014*. (WHO Press, 2014).
2. International Agency for Research on Cancer. *Cancer Fact Sheet N°297*. (WHO, 2015). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
3. Robert Koch-Institut (Hrsg) & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. (2013).
4. Wagener, C. & Müller, O. *Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. (Georg Thieme Verlag, 2010).
5. Statistisches Bundesamt. *Statistisches Bundesamt 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung*. (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2015).
6. Croce, C. M. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–511 (2008).
7. Weinstein, I. B., Joe, A. & Felsher, D. Oncogene Addiction. *Cancer Res.* **68**, 3077–3080 (2008).
8. Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobaleda, C. & Sánchez-García, I. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBO J.* **32**, 1502–1513 (2013).
9. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *cell* **100**, 57–70 (2000).
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
11. Wang, D. & Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307–320 (2005).
12. Ott, I. & Gust, R. Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. *Pharm. Unserer Zeit* **35**, 124–133 (2006).
13. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014).

14. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, Taylor & Francis Group, 2007).
15. Lindahl, A. in *Tissue Engineering* 73–87 (Academic Press, 2008).
16. Schaap-Nutt, A., Thyssen, D. A., Drell, D. W. & Entschladen, F. Anti-metastatics: an overview of drug candidates in current pipelines. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 6522–6528 (2014).
17. Taraboletti, G. & Margosio, B. Antiangiogenic and antivascular therapy for cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 378–384 (2001).
18. Cook, K. M. & Figg, W. D. Angiogenesis Inhibitors: Current Strategies and Future Prospects. *CA. Cancer J. Clin.* **60**, 222–243 (2010).
19. Tozer, G. M., Kanthou, C. & Baguley, B. C. Disrupting tumour blood vessels. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 423–435 (2005).
20. Tozer, G. M. *et al.* Tumour vascular disrupting agents: combating treatment resistance. *Br. J. Radiol.* **81**, S12–S20 (2008).
21. Siemann, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* **37**, 63–74 (2011).
22. Stephen J. Lippard. in *Bioinorganic Chemistry* (University Science Books, 1994).
23. Allardyce, C. & Dyson, P. in *Bioorganometallic Chemistry* (ed. Simonneaux, G.) **17**, 177–210 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
24. Mjos, K. D. & Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **114**, 4540–4563 (2014).
25. Komeda, S. & Casini, A. Next-generation anticancer metallodrugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 219–235 (2012).

26. Bergamo, A. & Sava, G. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chem Soc Rev* (2015). doi:10.1039/C5CS00134J
27. Liu, W. & Gust, R. Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chem Soc Rev* **42**, 755–773 (2013).
28. Oehninger, L., Rubbiani, R. & Ott, I. N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Trans* **42**, 3269–3284 (2013).
29. Rosenberg, B., Vancamp, L. & Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698–699 (1965).
30. Rosenberg, B., Renshaw, E., Vancamp, L., Hartwick, J. & Drobnik, J. Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**, 716–721 (1967).
31. Rosenberg, B., Van Camp, L., Grimley, E. B. & Thomson, A. J. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J. Biol. Chem.* **242**, 1347–1352 (1967).
32. Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **222**, 385–386 (1969).
33. Rosenberg, B. Some biological effects of platinum compounds. *Platin. Met. Rev* **15**, 42–51 (1971).
34. Galanski, M. & Keppler, B. K. Tumorhemmende Metallverbindungen: Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven. *Pharm. Unserer Zeit* **35**, 118–123 (2006).
35. Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem. Rev.* **99**, 2467–2498 (1999).
36. Alderden, R. A., Hall, M. D. & Hambley, T. W. The discovery and development of cisplatin. *J. Chem. Educ.* **83**, 728 (2006).
37. Ott, I. in *Comprehensive Inorganic Chemistry II* 933–949 (Elsevier, 2013).

38. Hall, M. D., Okabe, M., Shen, D.-W., Liang, X.-J. & Gottesman, M. M. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, (2008).
39. Oh, G.-S. *et al.* Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolytes Blood Press.* **12**, 55 (2014).
40. Saller, R. in *Metoclopramid als Standardantiemetikum in der Behandlung zytostatikainduzierten Erbrechens* 19–21 (Springer Berlin Heidelberg, 1992).
41. Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **478**, 23–43 (2001).
42. Brabec, V. & Kasparikova, J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist. Updat.* **5**, 147–161 (2002).
43. Brabec, V. & Kasparikova, J. Modifications of DNA by platinum complexes. *Drug Resist. Updat.* **8**, 131–146 (2005).
44. Apps, M., Choi, E. & Wheate, N. The state-of-play and future of platin drugs. *Endocr. Relat. Cancer* **22**, R219–233 (2015).
45. Lokich, J. & Anderson, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **9**, (1998).
46. Schmitt, A. *et al.* Factors for Hematopoietic Toxicity of Carboplatin: Refining the Targeting of Carboplatin Systemic Exposure. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4568–4574 (2010).
47. Gore, M. E. *et al.* Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **60**, 767 (1989).
48. Eckstein, N. Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* **30**, 91 (2011).
49. Bleiberg, H. Oxaliplatin (L-OHP): a new reality in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **77**, 1 (1998).

50. Simpson, D., Dunn, C., Curran, M. & Goa, K. L. Oxaliplatin: a review of its use in combination therapy for advanced metastatic colorectal cancer. *Drugs* **63**, 2127–2156 (2003).
51. Voigt, W., Dietrich, A. & Schmoll, H.-J. Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. *Pharm. Unserer Zeit* **35**, 134–143 (2006).
52. Kameyama, Y. *et al.* Nephrotoxicity of a new platinum compound, 254-S, evaluated with rat kidney cortical slices. *Toxicol. Lett.* **52**, (1990).
53. Ito, K. *et al.* A dose-finding study of nedaplatin and cyclophosphamide for patients with gynecological malignancies. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **29**, 299–302 (1999).
54. Shimada, M., Kigawa, J. & Itamochi. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Manag. Res.* 67–76 (2013).
55. McKeage, M. J. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **10**, 119–128 (2001).
56. Lobaplatin: D 19466. *Drugs RD* **4**, 369–372 (2003).
57. Choi, C.-H. *et al.* Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: less involvement of metallothionein. *Cancer Cell Int.* **4**, 6 (2004).
58. Lee, K. H. *et al.* Randomized, Multicenter, Phase III Trial of Heptaplatin 1-hour Infusion and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy Comparing with Cisplatin and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cancer Res. Treat.* **41**, 12 (2009).
59. Zhang, H.-Y. *et al.* Condensations of single DNA molecules induced by heptaplatin and its chiral isomer. *AIP Adv.* **4**, 087128 (2014).

-
60. Skander, M. *et al.* N-Heterocyclic Carbene-Amine Pt(II) Complexes, a New Chemical Space for the Development of Platinum-Based Anticancer Drugs. *J. Med. Chem.* **53**, 2146–2154 (2010).
61. Chtchigrovsky, M. *et al.* Antitumor trans-N-Heterocyclic Carbene–Amine–Pt(II) Complexes: Synthesis of Dinuclear Species and Exploratory Investigations of DNA Binding and Cytotoxicity Mechanisms. *J. Med. Chem.* **56**, 2074–2086 (2013).
62. Zhang, J.-J., Che, C.-M. & Ott, I. Caffeine derived platinum(II) N-heterocyclic carbene complexes with multiple anti-cancer activities. *J. Organomet. Chem.* **782**, 37–41 (2015).
63. Herrmann, W. A. N-Heterocyclic Carbenes: A New Concept in Organometallic Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1290–1309 (2002).
64. Glorius, F. *N-Heterocyclic Carbenes in Transition Metal Catalysis*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007).
65. Wai-Yin Sun, R. *et al.* Luminescent cyclometalated platinum(ii) complexes containing N-heterocyclic carbene ligands with potent in vitro and in vivo anti-cancer properties accumulate in cytoplasmic structures of cancer cells. *Chem Sci* **2**, 728–736 (2011).
66. Higby, G. J. Gold in medicine. *Gold Bull.* **15**, 130–140 (1982).
67. Kean, W. F., Hart, L. & Buchanan, W. W. Auranofin. *Rheumatology* **36**, 560–572 (1997).
68. Pricker, S. P. Medical uses of gold compounds: past, present and future. *Gold Bull.* **29**, 53–60 (1996).
69. Hunt, L. B. The Figuiers of Montpellier. *Ambix* **26**, 221–223 (1979).
70. Koch, R. Über bacteriologische Forschung. *Dtsch Med Wochenschr* **16**, 756 (1890).
71. Berners-Price, S. J. in *Bioinorganic Medicinal Chemistry* 197–222 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011). at <<http://dx.doi.org/10.1002/9783527633104.ch7>>

72. Forestier, J. L'aurothérapie dans les rhumatismes chroniques. *Bull Mém Soc Méd Hôp Paris* **53**, 323–7 (1929).
73. Forestier, J. Rheumatoid arthritis and its treatment by gold salts. *The Lancet* **224**, 646–648 (1934).
74. Simon, T. M., Kunishima, D. H., Vibert, G. J. & Lorber, A. Cellular antiproliferative action exerted by auranofin. *J. Rheumatol. Suppl.* **5**, 91–97 (1979).
75. Simon, T. M., Kunishima, D. H., Vibert, G. J. & Lorber, A. Inhibitory effects of a new oral gold compound on HeLa cells. *Cancer* **44**, (1979).
76. Mirabelli, C. K. *et al.* Evaluation of the in vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. *Cancer Res.* **45**, 32–39 (1985).
77. Mirabelli, C. K. *et al.* Correlation of the in vitro cytotoxic and in vivo antitumor activities of gold(I) coordination complexes. *J. Med. Chem.* **29**, 218–223 (1986).
78. Marzano, C. *et al.* Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 872–881 (2007).
79. Ott, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1670–1681 (2009).
80. Gromer, S., Arscott, L. D., Williams, C. H., Schirmer, R. H. & Becker, K. Human placenta thioredoxin reductase isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.* **273**, 20096–20101 (1998).
81. Fan, C. *et al.* Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **5**, e1191 (2014).

82. Roder, C. & Thomson, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs RD* **15**, 13–20 (2015).
83. Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. & Schneider, G. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9533–9538 (2001).
84. Nordberg, J. & Arner, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287–1312 (2001).
85. Biaglow, J. E. & Miller, R. A. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 13–20 (2005).
86. Fiskus, W. *et al.* Auranofin Induces Lethal Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress and Exerts Potent Preclinical Activity against Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* **74**, 2520–2532 (2014).
87. Engman, L. *et al.* Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold(III) compounds. *Anticancer. Drugs* **17**, 539–544 (2006).
88. Liu, W. *et al.* Synthesis, Characterization, and in Vitro Studies of Bis[1,3-diethyl-4,5-diarylimidazol-2-ylidene]gold(I/III) Complexes. *J. Med. Chem.* **55**, 3713–3724 (2012).
89. Bertrand, B. & Casini, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans* **43**, 4209–4219 (2014).
90. Ott, I. *et al.* A Gold(I) Phosphine Complex Containing a Naphthalimide Ligand Functions as a TrxR Inhibiting Antiproliferative Agent and Angiogenesis Inhibitor. *J. Med. Chem.* **52**, 763–770 (2009).
91. Brana, M. F. & Ramos, A. Naphthalimides as anti-cancer agents: synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **1**, 237–255 (2001).

92. Rackham, O., Nichols, S. J., Leedman, P. J., Berners-Price, S. J. & Filipovska, A. A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **74**, (2007).
93. Humphreys, A. S. *et al.* Gold(I) chloride adducts of 1,3-bis(di-2-pyridylphosphino)propane: synthesis, structural studies and antitumour activity. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 4943–4950 (2007).
94. Meyer, A. *et al.* Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes with Naphthalimide Ligands as Combined Thioredoxin Reductase Inhibitors and DNA Intercalators. *ChemMedChem* 1794–1800 (2014).
95. Berners-Price, S. J. *et al.* In vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of bis[1,2-bis(diphenylphosphino)ethane]gold(I) chloride. *Cancer Res.* **46**, 5486–5493 (1986).
96. Hoke, G. D. *et al.* Mechanism of alterations in isolated rat liver mitochondrial function induced by gold complexes of bidentate phosphines. *J. Biol. Chem.* **263**, 11203–11210 (1988).
97. Modica-Napolitano, J. S. & Aprile, J. R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 63 – 70 (2001).
98. Spreckelmeyer, S., Orvig, C. & Casini, A. Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metallodrugs: An Overview beyond Cisplatin. *Molecules* **19**, 15584–15610 (2014).
99. Rush, G., Alberts, D., Meunier, P., Leffler, K. & Smith, P. In vivo and in vitro hepatotoxicity of a novel antineoplastic agents SKF101772 in male beagle dogs. *Toxicologist* **7**, 1–584 (1987).
100. Hoke, G. D. *et al.* In vivo and in vitro cardiotoxicity of a gold-containing antineoplastic drug candidate in the rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **100**, (1989).

101. Mirabelli, C. K. *et al.* Antitumor activity of bis(diphenylphosphino)alkanes, their gold(I) coordination complexes, and related compounds. *J. Med. Chem.* **30**, 2181–2190 (1987).
102. McKeage, M. J. *et al.* Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, 343–350 (2000).
103. Trapp, S. & Horobin, R. W. A predictive model for the selective accumulation of chemicals in tumor cells. *Eur. Biophys. J. EBJ* **34**, 959–966 (2005).
104. Teyssot, M.-L. *et al.* Metal-NHC complexes: a survey of anti-cancer properties. *Dalton Trans.* 6894 (2009). doi:10.1039/b906308k
105. Baker, M. V. *et al.* Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure and anti-mitochondrial activity. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 3708–3715 (2006).
106. Hickey, J. L. *et al.* Mitochondria-Targeted Chemotherapeutics: The Rational Design of Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells and Target Protein Selenols in Preference to Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12570–12571 (2008).
107. Jellicoe, M. M. *et al.* Bioenergetic differences selectively sensitize tumorigenic liver progenitor cells to a new gold(I) compound. *Carcinogenesis* **29**, 1124–1133 (2008).
108. Rubbiani, R. *et al.* Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties. *J. Med. Chem.* **53**, 8608–8618 (2010).
109. Rubbiani, R. *et al.* Comparative in Vitro Evaluation of N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Complexes of the Benzimidazolylidene Type. *J. Med. Chem.* **54**, 8646–8657 (2011).

110. Rubbiani, R. *et al.* TrxR inhibition and antiproliferative activities of structurally diverse gold N-heterocyclic carbene complexes. *Med Chem Commun* **4**, 942–948 (2013).
111. Pettit, G. R. *et al.* Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia* **45**, 209–211 (1989).
112. Wang, L. *et al.* Potent, Orally Active Heterocycle-Based Combretastatin A-4 Analogues: Synthesis, Structure–Activity Relationship, Pharmacokinetics, and In Vivo Antitumor Activity Evaluation. *J. Med. Chem.* **45**, 1697–1711 (2002).
113. Bonezzi, K. *et al.* Vascular Disrupting Activity of Tubulin-Binding 1,5-Diaryl-1H-imidazoles†. *J. Med. Chem.* **52**, 7906–7910 (2009).
114. Schobert, R. *et al.* 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxyphenyl)-5-aryloxazoles 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 (2010).
115. Biersack, B., Muthukumar, Y., Schobert, R. & Sasse, F. Cytotoxic and antivasular 1-methyl-4-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-5-(halophenyl)-imidazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 6270–6273 (2011).
116. Mahal, K., Biersack, B., Caysa, H., Schobert, R. & Mueller, T. Combretastatin A-4 derived imidazoles show cytotoxic, antivasular, and antimetastatic effects based on cytoskeletal reorganisation. *Invest. New Drugs* **33**, 541–554 (2015).
117. Kanthou, C. & Tozer, G. M. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood* **99**, 2060–2069 (2002).
118. Vincent, L. *et al.* Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *J. Clin. Invest.* **115**, (2005).

119. Grosios, K., Holwell, S. E., McGown, A. T., Pettit, G. R. & Bibby, M. C. In vivo and in vitro evaluation of combretastatin A-4 and its sodium phosphate prodrug. *Br. J. Cancer* **81**, 1318–1327 (1999).
120. Patil, S. *et al.* Novel Benzyl- or 4-Cyanobenzyl-Substituted N-Heterocyclic (Bromo)(carbene)silver(I) and (Carbene)(chloro)gold(I) Complexes: Synthesis and Preliminary Cytotoxicity Studies. *Helv. Chim. Acta* **94**, 1551–1562 (2011).
121. Kaps, L. *et al.* Gold(I)–NHC complexes of antitumoral diarylimidazoles: Structures, cellular uptake routes and anticancer activities. *J. Inorg. Biochem.* **106**, 52–58 (2012).
122. Munzner, J. *et al.* Synergistic ‘gold effects’ of anti-vascular 4,5-diarylimidazol-2-ylidene gold(I) carbene complexes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **51**, 44–46 (2013).
123. Selzer, E. *et al.* Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 935–940 (2000).
124. Versteeg, R., Noordermeer, I. A., Krüse-Wolters, M., Ruiters, D. J. & Schrier, P. I. c-myc down-regulates class I HLA expression in human melanomas. *EMBO J.* **7**, 1023 (1988).
125. Jansen, B. *et al.* Activated N-ras contributes to the chemoresistance of human melanoma in severe combined immunodeficiency (SCID) mice by blocking apoptosis. *Cancer Res.* **57**, 362–365 (1997).
126. Benimetskaya, L. *et al.* Relative Bcl-2 independence of drug-induced cytotoxicity and resistance in 518A2 melanoma cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8371–8379 (2004).
127. Benimetskaya, L. Bcl-2 Protein in 518A2 Melanoma Cells In vivo and In vitro. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4940–4948 (2006).
128. Zerp, S. F., Van Elsas, A., Peltenburg, L. T. C. & Schrier, P. I. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br. J. Cancer* **79**, 921 (1999).

129. Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M. & Todaro, G. Establishment of a continuous tumor? cell line (PANC? 1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* **15**, 741–747 (1975).
130. Ruggeri, B. *et al.* Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the p53 and Rb-1 tumor-suppressor genes. *Oncogene* **7**, 1503–1511 (1992).
131. Deer, E. L. *et al.* Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines: *Pancreas* **39**, 425–435 (2010).
132. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409–1416 (1973).
133. Brooks, S. C., Locke, E. R. & Soule, H. D. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* **248**, 6251–6253 (1973).
134. Kühnle, M. *et al.* Potent and Selective Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Derived from the p-Glycoprotein (ABCB1) Modulator Tariquidar. *J. Med. Chem.* **52**, 1190–1197 (2009).
135. Doyle, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15665–15670 (1998).
136. Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**, 695–710 (1953).
137. Shen, D.-W. *et al.* Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins. *J. Biol. Chem.* **261**, 7762–7770 (1986).

138. Cornwell, M. M., Safa, A. R., Felsted, R. L., Gottesman, M. M. & Pastan, I. Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150-to 170-kDa protein detected by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 3847–3850 (1986).
139. Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. & Brattain, D. E. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* **41**, 1751–1756 (1981).
140. Fogh, J. & Trempe, G. in *Human Tumor Cells in Vitro* (ed. Fogh, J.) 115–159 (Springer US, 1975).
141. Alvarez, M. *et al.* Using the national cancer institute anticancer drug screen to assess the effect of MRP expression on drug sensitivity profiles. *Mol. Pharmacol.* **54**, 802–814 (1998).
142. Cummings, J. *et al.* Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 31–39 (2004).
143. Roundhill, E. A. & Burchill, S. A. Detection and characterisation of multi-drug resistance protein 1 (MRP-1) in human mitochondria. *Br. J. Cancer* **106**, 1224–1233 (2012).
144. Rodrigues, N. R. *et al.* p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 7555–7559 (1990).
145. Dexter, D. L., Barbosa, J. A. & Calabresi, P. N. N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **39**, 1020–1025 (1979).
146. Macville, M. *et al.* Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* **59**, 141–150 (1999).

147. Adey, A. *et al.* The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* **500**, 207–211 (2013).
148. Wolny, D. & Dzierżewicz, Z. Effects of 300 mT static magnetic field on IL-6 secretion in normal human colon myofibroblasts. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **6**, 1320–1324
149. Cheung, A. L. in *Current Protocols in Microbiology* (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
150. Edgell, C. J., McDonald, C. C. & Graham, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 3734–3737 (1983).
151. Bauer, J. *et al.* In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J. Cell. Physiol.* **153**, 437–449 (1992).
152. Ahn, K., Pan, S., Beningo, K. & Hupe, D. A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* **56**, 2331–2341 (1995).
153. Walen, K. H. Spatial relationships in the replication of chromosomal DNA. *Genetics* **51**, 915 (1965).
154. Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2002).
155. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, (1983).
156. Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., Wang, R. & others. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* **4**, 14–19 (1996).
157. Vtorushin, S. V. *et al.* The phenomenon of multi-drug resistance in the treatment of malignant tumors. *Exp. Oncol.* **36**, 144–156 (2014).

158. Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K. & Ricciardelli, C. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **96**, 220–256 (2015).
159. Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. & Greenberger, L. M. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**, 47–50 (2000).
160. Fojo, A., Akiyama, S., Gottesman, M. M. & Pastan, I. Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **45**, 3002–3007 (1985).
161. Willingham, M. C., Cornwell, M. M., Cardarelli, C. O., Gottesman, M. M. & Pastan, I. Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and-sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res.* **46**, 5941–5946 (1986).
162. Muenzner, J. K. *et al.* Adjusting the DNA Interaction and Anticancer Activity of Pt(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes by Steric Shielding of the Trans Leaving Group. *J. Med. Chem.* **58**, 6283–6292 (2015).
163. Zoldakova, M. *et al.* Effects of a combretastatin A4 analogous chalcone and its Pt-complex on cancer cells: A comparative study of uptake, cell cycle and damage to cellular compartments. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1487–1496 (2010).
164. Muenzner, J. K. *et al.* Gold(I) Biscarbene Complexes Derived from Vascular-Disrupting Combretastatin A-4 Address Different Targets and Show Antimetastatic Potential. *ChemMedChem* **9**, 1195–1204 (2014).
165. Giganti, A. & Friederich, E. The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Prog. Cell Cycle Res.* **5**, 511–525 (2003).
166. Kavallaris, M. *Cytoskeleton and Human Disease*. (Humana Press, 2012).

167. Woods, J. A., Hadfield, J. A., Pettit, G. R., Fox, B. W. & McGown, A. T. The interaction with tubulin of a series of stilbenes based on combretastatin A-4. *Br. J. Cancer* **71**, 705 (1995).
168. Schafer, K. A. The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* **35**, 461–478 (1998).
169. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
170. Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H. & Heller, H. C. *Biologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2006).
171. Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 749–762 (2010).
172. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, 981–990 (2012).
173. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, (2007).
174. Wang, J. & Yi, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1875–1884 (2008).
175. Storz, P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **10**, 1881–1896 (2005).
176. Rigobello, M. P. *et al.* Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1634–1641 (2004).
177. Ott, I. *et al.* A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. *J. Med. Chem.* **52**, 763–770 (2009).
178. Jackson-Rosario, S. E. & Self, W. T. Targeting selenium metabolism and selenoproteins: Novel avenues for drug discovery. *Metallomics* **2**, 112–116 (2010).

179. Rook, G. A. W., Steele, J., Umar, S. & Dockrell, H. M. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by γ -interferon. *J. Immunol. Methods* **82**, 161–167 (1985).
180. Sim Choi, H., Woo Kim, J., Cha, Y. & Kim, C. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *J. Immunoassay Immunochem.* **27**, 31–44 (2006).
181. Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309–1312 (1998).
182. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
183. Desagher, S. *et al.* Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* **144**, 891–901 (1999).
184. ANTONSSON, B., MONTESSUIT, S., LAUPER, S., ESKESS, R. & Martinou, J. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **345**, 271–278 (2000).
185. Szabo, I. & Zoratti, M. Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More. *Physiol. Rev.* **94**, 519–608 (2014).
186. Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. & Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* **411**, (1997).
187. Reers, M., Smith, T. W. & Chen, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry (Mosc.)* **30**, 4480–4486 (1991).

188. Reers, M. *et al.* Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* **260**, 406–417 (1995).
189. Sakamuru, S. *et al.* Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. *Physiol. Genomics* **44**, 495–503 (2012).
190. Bertrand, B. & Casini, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans.* **43**, 4209 (2014).
191. Bertrand, B. *et al.* New Gold(I) Organometallic Compounds with Biological Activity in Cancer Cells: Gold(I) Organometallic Compounds with Biological Activity. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 4532–4536 (2014).
192. Mendes, F. *et al.* Metal-Based Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase – The Guardian Angel of DNA. *J. Med. Chem.* **54**, 2196–2206 (2011).
193. Serratrice, M. *et al.* Cytotoxic gold compounds: synthesis, biological characterization and investigation of their inhibition properties of the zinc finger protein PARP-1. *Dalton Trans.* **41**, 3287 (2012).
194. Lease, N. *et al.* Potential Anticancer Heterometallic Fe–Au and Fe–Pd Agents: Initial Mechanistic Insights. *J. Med. Chem.* **56**, 5806–5818 (2013).
195. Smith, A. D., Morris, V. C. & Levander, O. A. Rapid determination of glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities using a 96-well microplate format: comparison to standard cuvette-based assays. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* **71**, (2001).
196. Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Brandes, A. A., Rossi, E. & Monfardini, S. The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **60**, 59–75 (2006).
197. Fried, M. G. Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *ELECTROPHORESIS* **10**, 366–376 (1989).

198. Hellman, L. M. & Fried, M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc.* **2**, 1849–1861 (2007).
199. Olmsted, J. & Kearns, D. R. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry (Mosc.)* **16**, 3647–3654 (1977).
200. Spoerlein-Guettler, C., Mahal, K., Schobert, R. & Biersack, B. Ferrocene and (arene)ruthenium(II) complexes of the natural anticancer naphthoquinone plumbagin with enhanced efficacy against resistant cancer cells and a genuine mode of action. *J. Inorg. Biochem.* **138**, 64–72 (2014).
201. Vijayanathan, V., Thomas, T., Shirahata, A. & Thomas, T. J. DNA Condensation by Polyamines: A Laser Light Scattering Study of Structural Effects. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 13644–13651 (2001).
202. Kankia, B. I., Buckin, V. & Bloomfield, V. A. Hexaminecobalt(III)-induced condensation of calf thymus DNA: circular dichroism and hydration measurements. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2795–2801 (2001).
203. Johnstone, T. C., Alexander, S. M., Lin, W. & Lippard, S. J. Effects of Monofunctional Platinum Agents on Bacterial Growth: A Retrospective Study. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 116–118 (2014).
204. Reslova, S. The induction of lysogenic strains of *Escherichia coli* by cis-dichloro-diammineplatinum (II). *Chem. Biol. Interact.* **4**, 66–70 (1971).
205. Papetti, M. & Herman, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *AJP Cell Physiol.* **282**, C947–C970 (2002).
206. van Hinsbergh, V. W. M. & Koolwijk, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc. Res.* **78**, 203–212 (2008).

207. Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting: MMPs as potential targets in malignancy. *FEBS J.* **278**, 16–27 (2011).
208. Yadav, L. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, XE01–XE05 (2015).
209. Hoeben, A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **56**, 549–580 (2004).
210. Featherstone, J. & Griffiths, S. Drugs that target angiogenesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 413–414 (2002).
211. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 273–286 (2007).
212. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (1971).
213. Ribatti, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis* **11**, 3–10 (2008).
214. Li, X. & Tai, H.-H. Increased expression of matrix metalloproteinases mediates thromboxane A₂-induced invasion in lung cancer cells. *Curr. Cancer Drug Targets* **12**, 703–715 (2012).
215. Bachmeier, B. E., Nerlich, A. G., Lichtinghagen, R. & Sommerhoff, C. P. Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res.* **21**, 3821–3828 (2001).
216. Said, A., Raufman, J.-P. & Xie, G. The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers* **6**, 366–375 (2014).
217. Hofmann, U. B., Westphal, J. R., van Muijen, G. N. & Ruiter, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 337–344 (2000).

218. Hofmann, U. B., Houben, R., Bröcker, E.-B. & Becker, J. C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* **87**, 307–314 (2005).
219. Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **160**, 673–680 (2002).
220. Kiran, M. S., Viji, R. I., Kumar, S. V., Prabhakaran, A. A. & Sudhakaran, P. R. Changes in expression of VE-cadherin and MMPs in endothelial cells: Implications for angiogenesis. *Vasc Cell* **3**, 6 (2011).
221. Spoerlein, C., Mahal, K., Schmidt, H. & Schobert, R. Effects of chrysin, apigenin, genistein and their homoleptic copper(II) complexes on the growth and metastatic potential of cancer cells. *J. Inorg. Biochem.* **127**, 107–115 (2013).
222. Snoek, P. A. & Von den Hoff, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* **38**, 73–83 (2005).
223. Rodriguez-Nieto, S. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *FASEB J.* **16**, 261–263 (2001).
224. Bradford, M. M. 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 (1976).
225. Auerbach, R. in *Angiogenesis* (eds. Figg, W. & Folkman, J.) 299–312 (Springer US, 2008).
226. Ponce, Ml. in *Angiogenesis Protocols* (eds. Murray, C. & Martin, S.) **467**, 183–188 (Humana Press, 2009).
227. Ribatti, D. *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat. Rec.* **264**, 317–324 (2001).
228. Norrby, K. In vivo models of angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, (2006).

229. Ribatti, D. in *International Review of Cell and Molecular Biology* **270**, 181–224 (Elsevier, 2008).
230. Nowak-Sliwinska, P., Segura, T. & Iruela-Arispe, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* **17**, 779–804 (2014).
231. Parrish, A. R., Gandolfi, A. J. & Brendel, K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci.* **57**, 1887–1901 (1995).
232. de Graaf, I. A. M. *et al.* Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat. Protoc.* **5**, 1540–1551 (2010).
233. Vickers, A. *et al.* Kidney Slices of Human and Rat to Characterize Cisplatin-Induced Injury on Cellular Pathways and Morphology. *Toxicol. Pathol.* **32**, 577–590 (2004).
234. Bertrand, B. *et al.* Caffeine-Based Gold(I) N-Heterocyclic Carbenes as Possible Anticancer Agents: Synthesis and Biological Properties. *Inorg. Chem.* **53**, 2296–2303 (2014).
235. Daum, S. *et al.* Improved synthesis of N-benzylaminoferrocene-based prodrugs and evaluation of their toxicity and antileukemic activity. *J. Med. Chem.* **58**, 2015–2024 (2015).
236. Papakonstanti, E. A. & Stournaras, C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* **582**, 2120–2127 (2008).
237. Pellegrin, S. & Mellor, H. Actin stress fibres. *J. Cell Sci.* **120**, 3491–3499 (2007).
238. Heng, Y.-W. & Koh, C.-G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1622–1633 (2010).
239. Beaty, B. T. & Condeelis, J. Digging a little deeper: The stages of invadopodium formation and maturation. *Eur. J. Cell Biol.* **93**, 438–444 (2014).

240. Lohmer, L. L., Kelley, L. C., Hagedorn, E. J. & Sherwood, D. R. Invadopodia and basement membrane invasion in vivo. *Cell Adhes. Migr.* **8**, 246–255 (2014).
241. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 123–130 (1998).
242. Bonello, T., Coombes, J., Schevzov, G., Gunning, P. & Stehn, J. in *Cytoskeleton and Human Disease* (ed. Kavallaris, M.) 181–200 (Humana Press, 2012).
243. Martin, S. K., Kamelgarn, M. & Kyprianou, N. Cytoskeleton targeting value in prostate cancer treatment. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* **2**, 15 (2014).
244. Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct ‘side population’ of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14228–14233 (2004).
245. Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **115**, 453–466 (1962).
246. Albini, A. *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* **47**, 3239–3245 (1987).
247. Entschladen, F. *et al.* Analysis methods of human cell migration. *Exp. Cell Res.* **307**, 418–426 (2005).
248. Kramer, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **752**, 10–24 (2013).
249. Freshney, R. I., Goan, S. R., Schütt, M., Schunck, H. & Wählte, H. *Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch.* (De Gruyter, 1990).
250. Citta, A. *et al.* Fluorescent silver(i) and gold(i)–N-heterocyclic carbene complexes with cytotoxic properties: mechanistic insights. *Metallomics* **5**, 1006 (2013).
251. Smart, B. E. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem.* **109**, 3–11 (2001).

252. Böhm, H.-J. *et al.* Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **5**, 637–643 (2004).
253. Shah, P. & Westwell, A. D. The role of fluorine in medicinal chemistry: Review Article. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **22**, 527–540 (2007).
254. Muller, K., Faeh, C. & Diederich, F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition. *Science* **317**, 1881–1886 (2007).
255. Yang, X. & Guan, A. Application of fluorine-containing non-steroidal anti-androgen compounds in treating prostate cancer. *J. Fluor. Chem.* **161**, 1 – 10 (2014).
256. Wang, J. *et al.* Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chem. Rev.* **114**, 2432–2506 (2014).
257. Jr, W. R. D. Fluorine chemistry at the millennium. *J. Fluor. Chem.* **126**, 157–163 (2005).
258. Schlosser, M. CF(3)-bearing aromatic and heterocyclic building blocks. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **45**, 5432–5446 (2006).
259. Kirsch, P. *Modern Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, Reactivity, Applications.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013).
260. Hartinger, C. G., Phillips, A. D. & Nazarov, A. A. Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2688–2702 (2011).
261. Farrell, N. P., Almeida, S. G. D. & Skov, K. A. Bis(platinum) complexes containing two platinum cis-diammine units. Synthesis and initial DNA-binding studies. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5018–5019 (1988).

-
262. Harris, A. L. Biological Consequences of Trinuclear Platinum Complexes: Comparison of [2 -(trans-Pt(NH₃)₂(H₂N(CH₂)₆-NH₂)₂)]⁴⁺ (BBR 3464) with Its Noncovalent Congeners. *Mol. Pharmacol.* **69**, 666–672 (2005).
263. Muchova, T., Quintal, S., Farrell, N., Brabec, V. & Kasparikova, J. Antitumor bifunctional dinuclear PtII complex BBR3535 forms interduplex DNA cross-links under molecular crowding conditions. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 239–245 (2012).
264. Wang, K. & Gao, E. Recent advances in multinuclear complexes as potential anticancer and DNA binding agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **14**, 147–169 (2014).
265. Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E. & Oun, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans* **39**, 8113–8127 (2010).
266. Bergamo, A. *et al.* Reduction of in vivo lung metastases by dinuclear ruthenium complexes is coupled to inhibition of in vitro tumour invasion. *Int. J. Oncol.* **24**, 373–379 (2004).
267. Tian, S., Siu, F.-M., Kui, S. C. F., Lok, C.-N. & Che, C.-M. Anticancer gold(i)–phosphine complexes as potent autophagy-inducing agents. *Chem. Commun.* **47**, 9318 (2011).
268. Serratrice, M. *et al.* Cytotoxic gold compounds: synthesis, biological characterization and investigation of their inhibition properties of the zinc finger protein PARP-1. *Dalton Trans.* **41**, 3287 (2012).
269. Bertrand, B. *et al.* Gold(I) NHC-based homo- and heterobimetallic complexes: synthesis, characterization and evaluation as potential anticancer agents. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 1005–1020 (2015).
270. Ornelas, C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New J. Chem.* **35**, 1973 (2011).

271. Gimeno, M. C. *et al.* Conjugates of ferrocene with biological compounds. Coordination to gold complexes and antitumoral properties. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 1373–1382 (2011).
272. Fourie, E. *et al.* Cytotoxicity of ferrocenyl-ethynyl phosphine metal complexes of gold and platinum. *Anticancer Res.* **31**, 825–829 (2011).
273. Tabbi, G. *et al.* Water Stability and Cytotoxic Activity Relationship of a Series of Ferrocenium Derivatives. ESR Insights on the Radical Production during the Degradation Process†. *J. Med. Chem.* **45**, 5786–5796 (2002).
274. Kovjazin, R. *et al.* Ferrocene-induced lymphocyte activation and anti-tumor activity is mediated by redox-sensitive signaling. *FASEB J.* **17**, 467–469 (2003).
275. Hillard, E., Vessières, A., Thouin, L., Jaouen, G. & Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 285–290 (2006).
276. Hamels, D. *et al.* Ferrocenyl Quinone Methides as Strong Antiproliferative Agents: Formation by Metabolic and Chemical Oxidation of Ferrocenyl Phenols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 9124–9126 (2009).
277. Pérez, W. I., Soto, Y., Ortíz, C., Matta, J. & Meléndez, E. Ferrocenes as potential chemotherapeutic drugs: Synthesis, cytotoxic activity, reactive oxygen species production and micronucleus assay. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 471–479 (2015).
278. Morantes, C. Y. A.-. Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines. *J. Cancer Sci. Ther.* **04**, (2012).
279. Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* **7**, 97–110 (2004).

280. Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579–591 (2009).
281. Hagen, H. *et al.* Aminoferrocene-Based Prodrugs Activated by Reactive Oxygen Species. *J. Med. Chem.* **55**, 924–934 (2012).
282. Horvath, U. E. I. *et al.* A cytotoxic bis(carbene)gold(i) complex of ferrocenyl complexes: synthesis and structural characterisation. *New J Chem* **32**, 533–539 (2008).
283. Rigobello, M. P., Scutari, G., Folda, A. & Bindoli, A. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 689–696 (2004).
284. Bragadin, M., Scutari, G., Folda, A., Bindoli, A. & Rigobello, M. P. Effect of Metal Complexes on Thioredoxin Reductase and the Regulation of Mitochondrial Permeability Conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1030**, 348–354 (2004).
285. Barnard, P. J. & Berners-Price, S. J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *37th Int. Conf. Coord. Chem. Cape Town South Afr.* **251**, 1889–1902 (2007).
286. Koepsell, H., Lips, K. & Volk, C. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm. Res.* **24**, 1227–1251 (2007).
287. Howell, S. B., Safaei, R., Larson, C. A. & Sailor, M. J. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Mol. Pharmacol.* **77**, 887–894 (2010).
288. Gupta, S. *et al.* Human Organic Cation Transporter 1 Is Expressed in Lymphoma Cells and Increases Susceptibility to Irinotecan and Paclitaxel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 16–23 (2012).

289. Jong, N. N. & McKeage, M. J. Emerging roles of metal solute carriers in cancer mechanisms and treatment: metal solute carriers in cancer. *Biopharm. Drug Dispos.* **35**, 450–462 (2014).
290. Cohen, G. L., Bauer, W. R., Barton, J. K. & Lippard, S. J. Binding of cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA: evidence for unwinding and shortening of the double helix. *Science* **203**, 1014–1016 (1979).
291. Scovell, W. M. & Collart, F. Unwinding of supercoiled DNA by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II): influence of the torsional strain on DNA unwinding. *Nucleic Acids Res.* **13**, 2881–2895 (1985).
292. Sun, S. *et al.* A thermoresponsive chitosan-NIPAAm/vinyl laurate copolymer vector for gene transfection. *Bioconjug. Chem.* **16**, 972–980 (2005).
293. Dong, X. *et al.* Reversible DNA condensation induced by a tetranuclear nickel(II) complex. *Chemistry* **16**, 14181–14189 (2010).
294. Malina, J., Farrell, N. P. & Brabec, V. DNA condensing effects and sequence selectivity of DNA binding of antitumor noncovalent polynuclear platinum complexes. *Inorg. Chem.* **53**, 1662–1671 (2014).
295. Sorenson, C. M. & Eastman, A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* **48**, 4484–4488 (1988).
296. Sorenson, C. M. & Eastman, A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **48**, 6703–6707 (1988).
297. Ling, Y. H., el-Naggar, A. K., Priebe, W. & Perez-Soler, R. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Mol. Pharmacol.* **49**, 832–841 (1996).

298. Deng, L.-J. *et al.* Arenobufagin intercalates with DNA leading to G2 cell cycle arrest via ATM/ATR pathway. *Oncotarget* **6**, 34258–34275 (2015).

8 Anhang

8.1 Zusätzliche Informationen, Daten und Abbildungen

Antiproliferative und antivaskuläre Eigenschaften Gold(I)-basierter *N*-heterozyklischer Carbenkomplexe

Beispielauswertung zur Untersuchung der an der Aufnahme in 518A2-Melanomzellen beteiligten zellulären Transportwege

Die Aufnahme der Goldkomplexe wurde durch den Vergleich ihrer Zytotoxizitäten in An- und Abwesenheit spezifischer Inhibitoren der einzelnen Aufnahmewege mit Hilfe des MTT-Tests untersucht. Hierfür wurde, wie beim MTT-Test, für die Auswertung zunächst für jeden einzelnen Transportweg die Absorptionsdifferenz zwischen den bei 570 nm und 630 nm erhaltenen Absorptionswerten gebildet, welche ein direktes Maß für die Vitalität der Zellen darstellt (vgl. Abschnitte 3.3 und 3.4.3). Die für die unbehandelten Zellen (Zugabe von reinem DMF/DMSO und dem jeweiligen Inhibitor) erhaltene Absorptionsdifferenz wurde gleich 100 % gesetzt (= 100 % vitale Zellen) und dient somit als Referenz für die Werte, welche für die mit den Metallkomplexen behandelten Zellen gemessen wurden (Zellvitalität). Die so erhaltenen Anteile an vitalen Zellen nach Inhibition der einzelnen Transportwege wurden um den Anteil an vitalen Zellen, der nach alleiniger Behandlung mit dem jeweiligen Komplex (kein Inhibitor) vorliegt, korrigiert. Der so berechnete Mehranteil an vitalen Zellen (korrigierte Vitalität) durch Inhibition eines bestimmten Transportwegs kann nun in den prozentualen Anteil an der zellulären Gesamtaufnahme des jeweiligen Komplexes umgerechnet werden. Hierfür wurden die korrigierten Vitalitäts-Werte der einzelnen Transportwege summiert, die Summe gleich 100 % gesetzt und schließlich die einzelnen prozentualen Anteile der verschiedenen Aufnahmewege berechnet (Aufnahme). Aus der so ermittelten, prozentualen Beteiligung der verschiedenen Transportwege wurden Mittelwerte \pm SD berechnet. Die Standardabweichung SD wurde dabei noch um den Fehler der Negativkontrolle nach der Gleichung $SD_{\text{kor}} = SD / (1 - E_R)$ korrigiert. Eine Beispielrechnung für die prozentualen Anteile der an der Aufnahme von Goldkomplex **23a** beteiligten zellulären Transportwege ist in nachfolgender Tabelle A-1 aufgeführt.¹²¹

Tabelle A-1. Beispielrechnung zur Bestimmung der prozentualen Anteile der an der Aufnahme von Komplex **23a** in 518A2-Melanomzellen beteiligten zellulären Transportwege. Alle Daten stellen prozentuale Werte dar.¹²¹

Inhibition von	Ctr1	OCT1/2	Makrop. (Na/H)	Makrop. (PI3K)	Endozyt. (Clathrin)	Endozyt. (Na/K)
Zellvitalität ^a	63	47	52	44	58	55
	58	50	52	44	60	51
	50	57	52	45	53	55
Vitalität _{korrr} ^b	25,9	9,9	14,9	6,9	20,9	17,9
	20,9	12,9	14,9	6,9	22,9	13,9
	12,9	19,9	14,9	7,9	15,9	17,9
Aufnahme ^c	26,8	10,3	15,5	7,2	21,7	18,6
	22,6	14,0	16,1	7,5	24,8	15,0
	14,4	22,2	16,7	8,9	17,8	20,0
Mittelwert Aufnahme	21,3	15,5	16,1	7,8	21,4	17,9
SD	5,2	5,0	0,5	0,7	2,9	2,1
SD_{korrr}^d	5,8	5,7	0,6	0,8	3,2	2,4
Mittelwert Aufnahme ± SD_{korrr}	21,3 ± 5,8	15,5 ± 5,7	16,1 ± 0,6	7,8 ± 0,8	21,4 ± 3,2	17,9 ± 2,4

^a Die Zellvitalität wurde durch Messung des vitalen Anteils an 518A2-Zellen nach Behandlung mit 50 µM des Komplexes **23a** für 3 h im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (DMF + jeweiliger Inhibitor, 100 % Zellvitalität) mit Hilfe des MTT-Tests ermittelt.

^b Der Mittelwert des Anteils an vitalen Zellen nach Inkubation mit Komplex **23a** für 3 h und in Abwesenheit der Inhibitoren beträgt 37,1 %. Um diesen Wert wurde die Zellvitalität jeweils korrigiert.

^c Um den jeweiligen Anteil an der zellulären Gesamtaufnahme für die verschiedenen Transportwege zu berechnen, wurden die einzelnen korrigierten Werte der Vitalität (Mehranteile an vitalen Zellen) addiert und die Summe 100 % Aufnahme gesetzt. Über diesen Referenzwert wurden dann schließlich die prozentualen Anteile der sechs verschiedenen, zellulären Transportwege an der Aufnahme ermittelt.

^d Die korrigierte Standardabweichung SD_{korrr} wurde mit Hilfe der Gleichung $SD_{korrr} = SD / (1 - E_R)$ bestimmt. Dabei betrug der relative Fehler der Negativkontrolle $E_R = 0,12$.

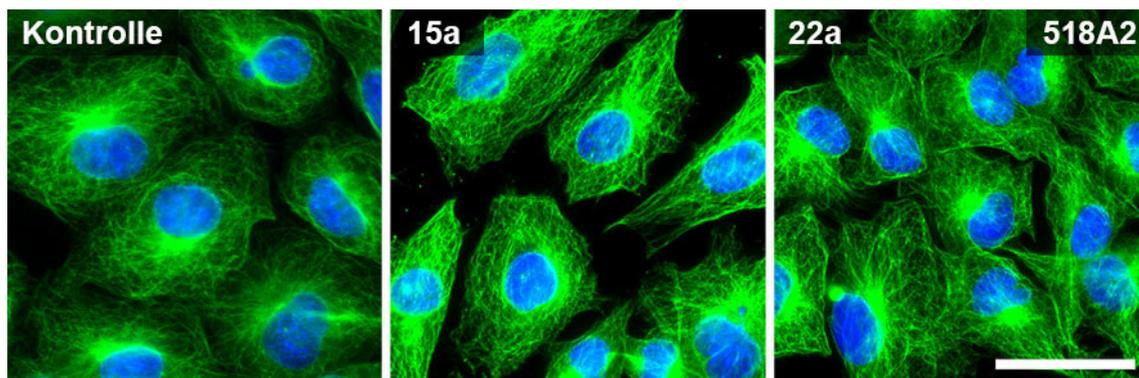


Abbildung A-1: Effekte der CA-4-basierten Goldkomplexe **15a** (10 μM) und **22a** (2,5 μM) auf die Organisation der Mikrotubuli in 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testverbindungen oder DMF (Kontrolle) behandelt und anschließend fixiert. Die Fluoreszenzfärbung des Tubulinzytoskeletts (grün) erfolgte über Immunofluoreszenz mit Hilfe eines monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörpers und einem entsprechenden an Alexa Fluor® 488 gekoppelten, sekundären Antikörper. Die Zellkerne der Tumorzellen (blau) sind mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken – 50 μm .

Tabelle A-2: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit den Goldkomplexen **15a** und **22a** für 24 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Aufgeführt ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	4,5 \pm 0,8	45,7 \pm 2,5	27,1 \pm 1,9	23,1 \pm 2,3
15a	8,2 \pm 4,0	44,8 \pm 3,2	24,9 \pm 2,5	22,6 \pm 2,5
22a	6,5 \pm 0,7	70,0 \pm 2,3	9,7 \pm 0,7	13,9 \pm 1,5

Tabelle A-3: Zelluläre Aufnahme der Gold(I)-NHC-Komplexe **15a**, **23a** und **24a** in 518A2-Melanomzellen. Aufgeführt sind die prozentualen Anteile der einzelnen Transportwege an der Gesamtaufnahme (100 %) der Komplexe. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Messungen.

Aufnahme (%)	Ctrl	OCT1/2	Makropinoz. (Na/H)	Makropinoz. (PI3K)	Endozytose (Clathrin)	Endozytose (Na/K)
15a	19,0 \pm 1,8	35,2 \pm 1,9	17,5 \pm 1,1	10,3 \pm 1,5	14,0 \pm 1,6	3,9 \pm 1,0
23a	21,3 \pm 5,8	15,5 \pm 5,7	16,1 \pm 0,6	7,8 \pm 0,8	21,4 \pm 3,2	17,9 \pm 2,4
24a	13,9 \pm 3,2	18,8 \pm 2,5	19,7 \pm 1,7	8,5 \pm 2,5	28,8 \pm 3,5	10,3 \pm 7,0

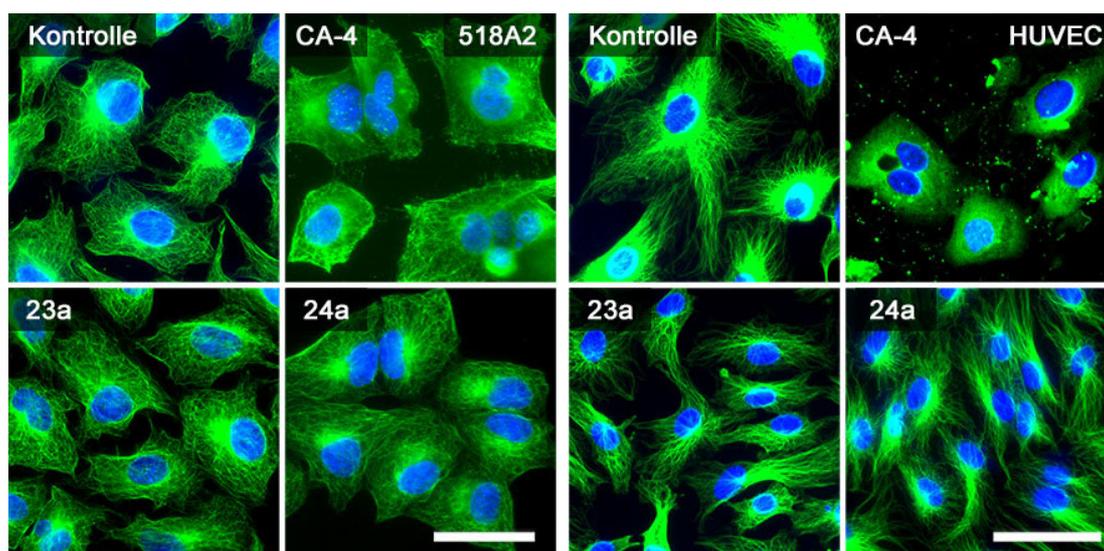


Abbildung A-2: Effekte von CA-4 und den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23a** und **24a** auf die Mikrotubuliorganisation in 518A2-Melanomzellen und vaskulären Endothelzellen (HUVEC). Die Zellen wurden für 24 h mit CA-4 (518A2: 5 nM, HUVEC: 100 nM), **23a** (518A2: 250 nM, HUVEC: 100 nM), **24a** (518A2: 500 nM, HUVEC: 1 μ M) oder DMF (Kontrolle) behandelt, bevor sie fixiert und anschließend das Tubulin (grün) über Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe eines monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörpers sowie einem entsprechenden an Alexa Fluor® 488 gekoppelten, sekundären Antikörper visualisiert wurde. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken – 50 μ m. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmcd.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Tabelle A-4: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit CA-4 (5 nM) sowie den Goldkomplexen **23a-c** und **24a-c** (jeweils 500 nM) für 24 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Aufgeführt ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	4,8 \pm 0,7	44,8 \pm 2,3	27,3 \pm 2,0	23,1 \pm 2,6
CA-4	15,0 \pm 0,1	30,5 \pm 0,5	23,5 \pm 0,6	31,0 \pm 0,1
23a	8,5 \pm 0,9	69,9 \pm 1,9	6,7 \pm 0,7	14,9 \pm 2,3
23b	7,0 \pm 2,3	69,3 \pm 2,0	7,8 \pm 1,0	15,8 \pm 1,3
23c	4,2 \pm 0,6	65,4 \pm 0,1	9,2 \pm 1,8	21,2 \pm 2,2
24a	7,1 \pm 0,3	72,5 \pm 1,8	6,2 \pm 0,4	14,2 \pm 1,3
24b	4,8 \pm 0,7	62,3 \pm 1,9	12,8 \pm 0,3	20,1 \pm 1,1
24c	5,3 \pm 0,8	65,5 \pm 0,7	11,7 \pm 0,2	17,5 \pm 0,3

Tabelle A-5: Inhibitorische Effekte von CA-4 (5 nM) und den Gold(I)-Biscarbenkomplexen **23a-c** und **24a-c** (jeweils 500 nM) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen. Kontrollzellen wurden mit der höchsten eingesetzten Konzentration an reinem DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	69,6 \pm 1,9	100,0 \pm 0,0
CA-4	27,4 \pm 1,2	46,9 \pm 9,4
23a	43,0 \pm 2,6	67,4 \pm 5,9
23b	37,6 \pm 8,7	59,5 \pm 8,0
23c	41,7 \pm 4,5	68,1 \pm 6,9
24a	34,4 \pm 5,8	53,0 \pm 6,2
24b	35,9 \pm 2,3	50,0 \pm 3,7
24c	37,1 \pm 1,5	51,6 \pm 4,9

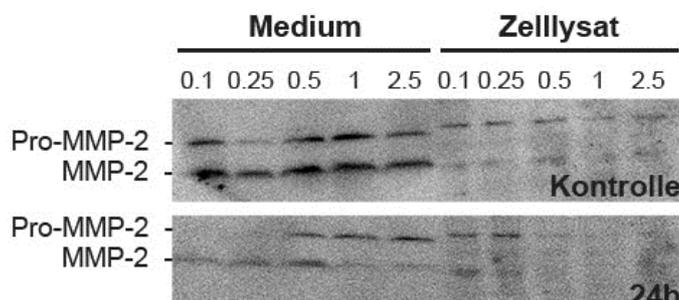


Abbildung A-3: Effekte des Chlorid-substituierten *N*-Ethyl-Goldkomplexes **24b** auf die Proteinlevel der MMP-2 in 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von **24b** (0,1-2,5 μ M) inkubiert, bevor die Medium- und Zelllysateproben aufbereitet und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die MMP-2 wurde mittels eines Antikörpers (*anti-MMP-2 rabbit pAb*, Cell Signaling Technology) in einem Western Blot detektiert. Pro Probe wurden 60 μ g Gesamtprotein aufgetragen. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* ChemMedChem 2014, 9 (6), 1195-1204, doi: 10.1002/cmdc.201400049. Copyright 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.]

Tabelle A-6: Ergebnisse der quantitativen Analyse der inhibitorischen Effekte von **23a** und **24a** auf die Ausbildung von hoch organisierten, tubulären Netzwerken durch HUVECs auf Matrigel nach 24 h Inkubation. Angegeben sind die mit Hilfe von *ImageJ* und dem *Angiogenesis Analyzer Plugin* erhaltenen Werte für die Anzahl an Maschen bzw. Segmenten sowie die Gesamtlänge der Segmente in den durch die HUVECs aufgebauten Netzwerken. Analysiert wurden die in Abbildung 35 gezeigten Aufnahmen des *Tube Formation Assays*.

	Kontrolle	23a	24a
Anzahl der Maschen	10	3	3
Anzahl der Segmente	58	39	18
Gesamtlänge der Segmente (Pixel)	4784	2132	587

Tabelle A-7: Antitumorale Wirkung der Gold(I)-NHC-Komplexe **24a** und **24c** auf Tumore der stark metastasierenden B16-F10-Mausmelanomzellen im Balb/c Maus-Modell. Aufgeführt sind das Tumolvolumen und das Gewicht der Mäuse in Abhängigkeit der Zeit. TV – Tumolvolumen; n.b. – nicht bestimmt.

Tag	24a (Maus 1)		24a (Maus 2)		24c (Maus 1)		24c (Maus 2)	
	TV (mm ³)	Gewicht (g)						
0	588,1	25,0	196,0	29,5	58,1	21,6	133,3	25,3
1	445,5	24,0	288,0	27,0	52,9	20,0	126,0	23,2
2	253,1	22,9	126,0	25,0	42,9	20,0	75,0	24,5
3	174,1	21,5	126,0	24,0	40,0	20,2	60,7	23,5
4	146,2	21,2	103,9	23,7	34,2	21,5	44,1	22,9
5	165,3	21,1	106,4	22,7	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
6	176,6	22,5	128,3	21,4	22,9	21,9	55,2	22,3
7	116,6	20,9	83,8	19,5	22,9	22,3	48,1	22,5
8	90,0	20,1	66,3	19,2	18,5	21,5	30,6	21,1
9	56,4	19,5	55,7	19,5	10,4	20,5	22,0	19,5
10	62,8	18,7	44,1	18,8	6,8	20,7	20,0	18,7

Beispiel eines fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplexes mit einem Anthracen-substituierten NHC-Liganden

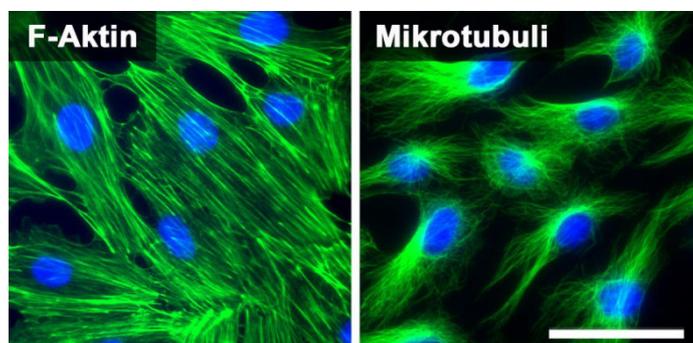


Abbildung A-4: Effekte des Anthracen-substituierten Gold(I)-Biscarbenkomplexes **25** (500 nM) auf das Zytoskelett von HUVECs nach 24 h Inkubation. Das Aktinzytoskelett (grün, links) wurde mit Alexa Fluor®-488-konjugiertem Phalloidin gefärbt, während die Mikrotubuli (grün, rechts) über Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe eines monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörpers sowie einem entsprechenden an Alexa Fluor® 488 gekoppelten, sekundären Antikörper visualisiert wurden. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken – 50 μ m.

Tabelle A-8: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit dem fluoreszierenden Gold(I)-Biscarbenkomplex **25** für 24 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Aufgeführt sind die prozentualen Verteilungen der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	8,0 \pm 0,7	45,3 \pm 0,6	26,3 \pm 0,9	20,4 \pm 1,4
25 (2 μM)	10,5 \pm 1,1	63,9 \pm 1,4	14,8 \pm 0,6	10,8 \pm 0,1
25 (5 μM)	12,3 \pm 0,5	68,7 \pm 0,6	7,9 \pm 0,1	11,0 \pm 0,2

Tabelle A-9: Inhibitorische Effekte des Gold(I)-NHC-Komplexes **25** (2 μ M) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen. Kontrollzellen wurden mit einer analogen Menge an DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei (Kontrolle) bzw. drei (**25**)unabhängigen Experimenten.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	83,3 \pm 0,4	100,0 \pm 0,0
25	50,4 \pm 8,9	64,3 \pm 9,6

Fluor-substituierte Gold(I)-Carbenkomplexe mit 4,5-Diarylimidazol-Strukturmotiv

Tabelle A-10: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit den Goldkomplexen **29** und **30a** (jeweils 1 μ M) für 24 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Aufgeführt sind die prozentualen Verteilungen der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	4,4 \pm 1,0	47,3 \pm 2,8	24,3 \pm 2,1	24,1 \pm 3,8
29	5,9 \pm 1,7	74,4 \pm 1,0	7,5 \pm 0,2	12,2 \pm 0,7
30a	14,2 \pm 4,4	67,1 \pm 4,5	5,6 \pm 0,5	13,1 \pm 0,4

Tabelle A-11: Inhibitorische Effekte der Gold(I)-NHC-Komplexe **29** und **30a** (jeweils 500 nM) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen. Kontrollzellen wurden mit einer analogen Menge an DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	56,8 \pm 3,5	96,7 \pm 3,4
29	49,7 \pm 9,5	74,4 \pm 11,7
30a	23,1 \pm 5,1	39,5 \pm 8,5

Gold(I)-Biscarbenkomplexe mit 1,3-Diarylimidazol-basierten NHC-Liganden

Tabelle A-12: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit den 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-Biscarbenkomplexen **31** und **32**. Die Zellen wurden für 24 h mit 1 μM von **31b** bzw. **32a** oder mit 2 μM von **31a** bzw. **32b** behandelt. Aufgeführt sind die prozentualen Verteilungen der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei (**31b** und **32a**) bzw. drei (Kontrolle, **31a** und **32b**) Messungen.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	7,5 \pm 0,8	53,0 \pm 1,7	21,7 \pm 0,8	17,8 \pm 1,9
31a	13,2 \pm 0,6	62,8 \pm 1,3	9,4 \pm 0,3	14,6 \pm 1,2
31b	8,5 \pm 1,0	74,2 \pm 2,0	6,6 \pm 0,4	10,7 \pm 0,6
32a	6,9 \pm 1,5	69,0 \pm 0,4	10,3 \pm 0,0	13,9 \pm 1,1
32b	14,6 \pm 2,5	68,4 \pm 2,1	6,1 \pm 0,2	10,9 \pm 0,2

Tabelle A-13: Effekte der 1,3-Diarylimidazol-basierten Gold(I)-NHC-Komplexes **31b** und **32a** (jeweils 1 μM) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Kontrollzellen wurden mit einer analogen Menge an DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	58,0 \pm 2,2	96,9 \pm 3,1
31b	65,9 \pm 6,3	96,2 \pm 3,8
32a	55,3 \pm 7,7	85,9 \pm 3,7

Ferrocen-substituierte Gold(I)-NHC-Komplexe

Tabelle A-14: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation von 518A2-Melanomzellen mit den Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexen **43** (500 nM) und **44** (250 nM) für 24 h. Aufgeführt sind die prozentualen Verteilungen der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei Messungen.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	4,5 \pm 1,9	42,5 \pm 1,3	26,5 \pm 2,9	26,9 \pm 1,3
43	6,7 \pm 1,3	55,2 \pm 1,3	16,5 \pm 0,3	21,9 \pm 1,6
44	11,3 \pm 2,3	58,1 \pm 0,9	12,8 \pm 0,1	18,1 \pm 1,5

Tabelle A-15: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** (jeweils 500 nM) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Kontrollzellen wurden mit einer analogen Menge an DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	54,8 \pm 3,7	100,0 \pm 0,0
43	41,8 \pm 2,6	69,1 \pm 3,1
44	32,1 \pm 1,1	42,7 \pm 5,3

Tabelle A-16: Relative ROS-Level in 518A2-Melanomzellen nach Behandlung mit den Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexen **43** und **44** für 24 h. Die Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt und das in den Kontrollansätzen ermittelte ROS-Level jeweils gleich 1 gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

relative ROS-Produktion	250 nM	500 nM	1 μ M
43	0,91 \pm 0,07	1,07 \pm 0,15	1,79 \pm 0,04
44	1,17 \pm 0,27	1,55 \pm 0,09	1,78 \pm 0,00

Tabelle A-17: Effekte der Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **43** und **44** (0,25 - 1 μM) auf das Mitochondrienmembranpotential $\Delta\Psi_m$ in 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt. Der Anteil an Zellen mit intaktem $\Delta\Psi_m$ wurde für die Kontrollen gleich 100 % gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zellen mit intaktem $\Delta\Psi_m$ (%)	250 nM	500 nM	1 μM
43	104,7 \pm 1,2	76,1 \pm 14,9	66,9 \pm 8,5
44	60,2 \pm 19,7	65,2 \pm 12,6	44,6 \pm 3,8

Tabelle A-18: Antitumorale Wirkung des Ferrocen-substituierten Gold(I)-NHC-Komplexe **44** auf Tumore der stark metastasierenden B16-F10-Mausmelanomzellen im Balb/c Maus-Modell. Aufgeführt ist das prozentuale Tumolvolumen der Mäuse in Abhängigkeit der Zeit. Das Ausgangsvolumen der Tumore an Tag 1 wurde gleich 100 % gesetzt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte der Tumore

Tag	Tumolvolumen (mm^3)					
	Kontrolle Maus 1	Kontrolle Maus 2	Kontrolle Maus 3	44 Maus 1	44 Maus 2	44 Maus 3
1	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2	102,3 \pm 2,3	104,5 \pm 2,1	105,7 \pm 2,7	97,7 \pm 2,3	93,5 \pm 3,0	97,7 \pm 1,4
3	105,9 \pm 0,2	109,9 \pm 0,3	111,0 \pm 0,4	91,3 \pm 0,8	73,6 \pm 5,7	88,7 \pm 4,8
4	113,2 \pm 1,2	114,3 \pm 0,3	122,3 \pm 6,9	76,8 \pm 1,1	56,2 \pm 13,3	81,7 \pm 2,7
5	115,7 \pm 0,2	121,1 \pm 2,0	141,2 \pm 17,5	60,2 \pm 5,5	46,8 \pm 9,7	73,2 \pm 1,2
6	125,4 \pm 1,2	132,1 \pm 5,5	144,0 \pm 20,3	58,5 \pm 7,4	42,6 \pm 9,1	69,0 \pm 1,4
7	128,1 \pm 3,9	137,8 \pm 6,4	144,5 \pm 19,8	63,7 \pm 8,9	44,7 \pm 5,7	72,6 \pm 1,0
8	134,7 \pm 5,9	138,6 \pm 7,2	152,4 \pm 23,4	55,1 \pm 6,3	40,6 \pm 5,3	65,0 \pm 1,3
9	140,4 \pm 1,6	137,0 \pm 6,6	159,5 \pm 25,0	35,8 \pm 2,3	32,0 \pm 7,1	63,1 \pm 7,0
10	145,7 \pm 0,7	138,5 \pm 1,1	166,5 \pm 28,7	26,4 \pm 2,8	26,0 \pm 4,6	53,4 \pm 7,8
11	155,6 \pm 0,4	144,9 \pm 3,5	175,3 \pm 32,8	23,3 \pm 3,5	20,4 \pm 2,6	46,0 \pm 6,0
12	165,7 \pm 0,0	155,0 \pm 4,2	186,2 \pm 34,3	23,8 \pm 3,6	18,3 \pm 3,7	47,3 \pm 6,8

Ferrocen-verbrückte, trinukleare Gold(I)-NHC-Komplexe

Tabelle A-19: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation von 518A2-Melanomzellen mit den Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexen **47** (1 μM) für 24 h. Aufgeführt sind die prozentualen Verteilungen der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Messungen.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	8,5 \pm 0,7	43,5 \pm 1,4	27,8 \pm 0,1	20,7 \pm 2,1
47a	8,7 \pm 0,6	65,6 \pm 0,7	10,5 \pm 0,2	15,4 \pm 1,0
47b	22,0 \pm 1,7	50,2 \pm 1,0	15,5 \pm 0,3	12,5 \pm 0,4
47c	16,7 \pm 1,5	54,4 \pm 3,1	12,6 \pm 0,8	16,5 \pm 1,0

Tabelle A-20: Effekte der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** (jeweils 1 μM) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen in *Wound-Healing* Assays. Kontrollzellen wurden mit einer analogen Menge an DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	62,7 \pm 4,6	100,0 \pm 0,0
47a	23,3 \pm 3,4	43,1 \pm 7,6
47b	16,9 \pm 1,5	24,5 \pm 2,9
47c	39,4 \pm 6,1	51,0 \pm 9,2

Tabelle A-21: Relative ROS-Level in 518A2-Melanomzellen nach Behandlung mit den Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexen **47** für 24 h. Die Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt und das in den Kontrollansätzen ermittelte ROS-Level jeweils gleich 1 gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

relative ROS-Produktion	500 nM	1 μM	1,5 μM
47a	1,22 \pm 0,05	2,15 \pm 0,40	2,19 \pm 0,36
47b	1,75 \pm 0,16	3,69 \pm 0,31	3,54 \pm 0,32
47c	0,99 \pm 0,14	2,17 \pm 0,47	2,3 \pm 0,30

Tabelle A-22: Effekte der Ferrocen-verbrückten Gold(I)-NHC-Komplexe **47** (0,5 - 1,5 μM) auf das Mitochondrienmembranpotential $\Delta\Psi_m$ in 518A2-Melanomzellen nach 24 h Inkubation. Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt. Der Anteil an Zellen mit intaktem $\Delta\Psi_m$ wurde für die Kontrollen gleich 100 % gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zellen mit intaktem $\Delta\Psi_m$ (%)	500 nM	1 μM	1,5 μM
47a	75,2 \pm 8,5	70,9 \pm 3,0	65,8 \pm 9,7
47b	73,8 \pm 11,0	58,9 \pm 9,7	44,3 \pm 15,4
47c	59,0 \pm 9,1	68,0 \pm 10,0	47,9 \pm 7,8

1,3-Dibenzylimidazol-2-yliden-Pt(II)-Komplexen

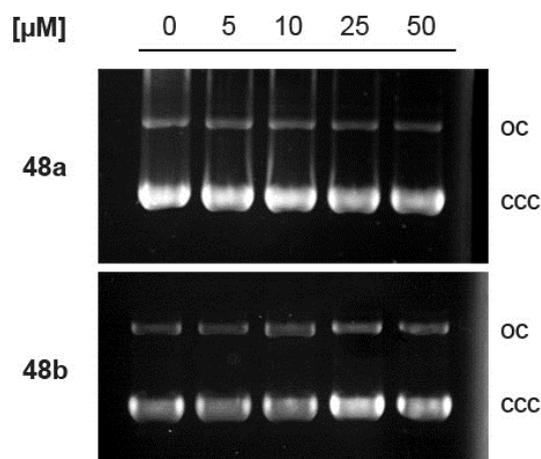


Abbildung A-5: Die Pt(II)-NHC-Komplex 48 zeigen im EMSA keine Interaktion mit der pBR322-Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe **48** behandelt und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bilder sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

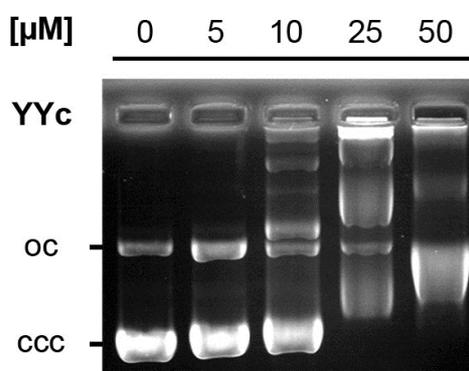


Abbildung A-6: Interaktion des *bis*-PPh₃-substituierten Pt(II)-NHC-Komplex **49c** mit pBR322-Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von **49c** behandelt und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Bild des Agarosegels ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

Tabelle A-23: Relative Fluoreszenzintensität der mit EtBr gefärbten Banden linearisierter pBR322-Plasmid-DNA im EMSA nach Behandlung mit Cisplatin und den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** für 24 h. Die Intensität der Banden wurde mittels der ImageJ 1.49h Software bestimmt und relativ zur entsprechenden unbehandelten DNA-Probe (100 % Fluoreszenz) angegeben.

Konz. [μM]	Relative Fluoreszenz (%)				
	0	5	10	25	50
Cisplatin	100	97	112	94	99
49a	100	101	86	83	80
49b	100	85	90	85	75
49c	100	65	57	37	0

Tabelle A-24: Relative Fluoreszenzintensität der EtBr-DNA-Addukte nach Inkubation von Lachs-spermien-DNA mit verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 μM) an Cisplatin oder der Pt(II)-NHC-Komplexen **49** für 2 h. Die Fluoreszenz der mit DMF behandelten DNA-Kontrollansätze wurde gleich 100 % gesetzt.

Konz. [μM]	Relative Fluoreszenz (%)				
	0	5	10	25	50
Cisplatin	100,0 \pm 3,3	92,1 \pm 7,7	87,3 \pm 8,1	81,0 \pm 7,2	72,3 \pm 7,6
49a	100,0 \pm 4,3	65,2 \pm 0,8	71,0 \pm 10,4	56,3 \pm 5,6	36,3 \pm 5,3
49b	100,0 \pm 1,3	83,6 \pm 7,0	60,2 \pm 6,9	29,0 \pm 3,9	14,9 \pm 1,3
49c	100,0 \pm 9,0	60,1 \pm 1,3	43,1 \pm 1,9	5,4 \pm 0,7	3,7 \pm 0,3

Tabelle A-25: Kinetik der kovalenten Bindung der Pt(II)-NHC-Komplexe **49** an CT-DNA bei einem molaren Verhältnis von $r_1 = 0,05$ in NaClO_4 (10 mM) und einer Inkubation bei 37 °C. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Zeit (h)	kovalent gebundenes Platin (%)		
	49a	49b	49c
0	0	0	0
0,5	53 \pm 3	14 \pm 3	2 \pm 1
1	59 \pm 4	19 \pm 5	3 \pm 1
2	70 \pm 3	26 \pm 2	3 \pm 1
3	72 \pm 2	43 \pm 7	9 \pm 3
4	78 \pm 6	47 \pm 7	13 \pm 2
5,5	81 \pm 3	51 \pm 3	14 \pm 3
19,5	88 \pm 5	64 \pm 8	26 \pm 5
24	90 \pm 7	76 \pm 4	26 \pm 3

Tabelle A-26: Relativer Anteil kovalent gebundenem Platin nach Inkubation von CT-DNA mit Cisplatin und den Pt(II)-NHC-Komplexe **49** bei einem molaren Verhältnis von $r_1 = 0,05$ in NaClO_4 (10 mM) und einer Inkubation bei 37 °C. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Cisplatin	kovalent gebundenes Platin (%)		
	49a	49b	49c
97 \pm 4	88 \pm 16	85 \pm 12	30 \pm 6

Tabelle A-27: Intensität des Streulichts nach Inkubation von CT-DNA mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe **49** (0,5 - 2,5 μM ; CT-DNA: 1,5 μM in 10 mM Kakodylat-Puffer, pH 7,2) bei 25 °C. n.b. – nicht bestimmt.

Intensität des Streulichts (a.u.)			
Konzentration [μM]	49a	49b	49c
0	24	22	21
0,1	24	26	48
0,2	25	27	75
0,3	29	28	87
0,4	24	34	126
0,5	27	58	141
0,7	25	69	172
0,8	27	89	184
0,9	25	104	243
1	27	135	249
1,1	29	159	261
1,2	27	181	265
1,3	26	185	242
1,4	28	191	269
1,7	27	206	262
2,2	27	217	256
2,4	28	245	n.b.
2,6	30	255	n.b.

Tabelle A-28: Absorption (350 nm) einer mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe **49** (5 bis 20 μM) versetzten CT-DNA-Lösung (100 μM in 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) bei 25 °C.

Konzentration [μM]	A_{350} (a.u.)		
	49a	49b	49c
0	0,0013	0,0020	0,0025
0,3	0,0001	0,0000	0,0230
0,6	0,0023	0,0050	0,0337
0,8	0,0032	0,0140	0,1200
1,1	0,0001	0,0220	0,1494
1,4	0,0045	0,0600	0,1890
1,6	0,0056	0,1203	0,1818
1,9	0,0060	0,1352	0,1840

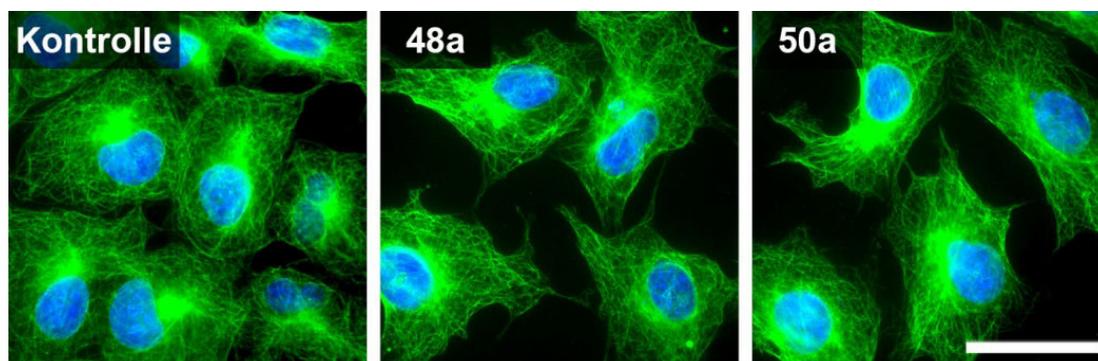


Abbildung A-7: Effekte der Platinkomplexe **48a** (5 μM) und **50a** (10 μM) auf die Organisation von Mikrotubuli in 518A2-Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testverbindungen oder DMF (Kontrolle) behandelt und anschließend fixiert. Die Fluoreszenzfärbung des Tubulinzytoskeletts (grün) erfolgte über Immunfluoreszenz mit Hilfe eines monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörpers und einem entsprechenden Alexa Fluor® 488-konjugierten, sekundären Antikörper. Die Zellkerne der Tumorzellen (blau) sind mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken – 50 μm .

Tabelle A-29: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit Cisplatin (50 μM) sowie den Platinkomplexen **49** (**49a**: 30 μM , **49b**: 5 μM und **49c**: 500 nM) für 24 h. Kontrollzellen wurden mit der höchsten eingesetzten Konzentration an DMF behandelt. Aufgeführt ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	6,8 \pm 2,4	48,4 \pm 6,3	25,4 \pm 3,9	19,8 \pm 1,8
Cisplatin	14,0 \pm 1,4	29,0 \pm 0,7	32,8 \pm 1,0	24,7 \pm 0,9
49a	8,8 \pm 0,5	36,1 \pm 1,7	24,1 \pm 2,0	31,5 \pm 0,36
49b	25,7 \pm 0,9	46,5 \pm 0,7	14,8 \pm 0,3	13,4 \pm 0,7
49c	10,0 \pm 0,9	71,5 \pm 1,0	6,0 \pm 0,5	12,6 \pm 0,3

Tabelle A-30: Inhibitorische Effekte der Pt(II)-NHC-Komplexe **49a** und **49c** (500 nM) auf die Migration von 518A2-Melanomzellen. Kontrollzellen wurden mit einer analogen Menge an DMF behandelt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, die mit Hilfe des *Wound-Healing* Assays ermittelt wurden.

Wundheilung (%)	24 h	48 h
Kontrolle	61,5 \pm 9,5	100 \pm 0,0
49a	33,0 \pm 6,0	80,8 \pm 11,9
49c	25,1 \pm 3,8	43,1 \pm 8,1

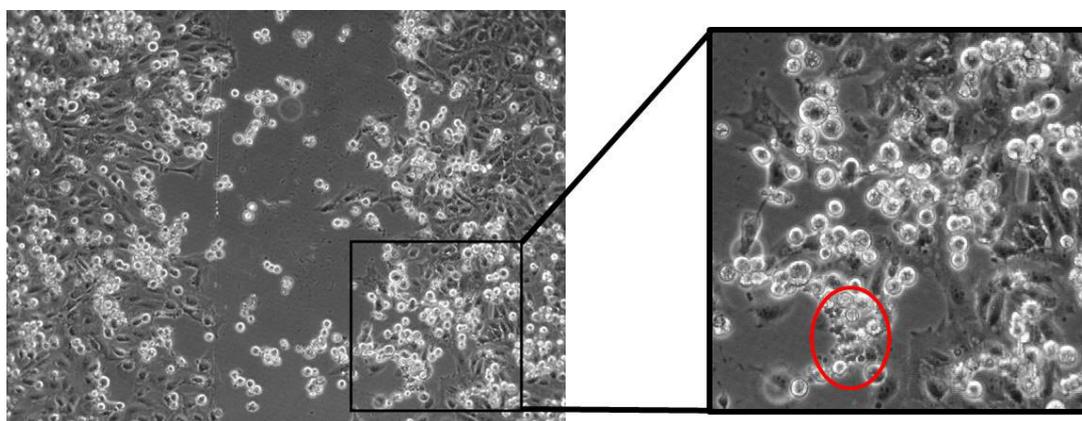


Abbildung A-8: Morphologische Veränderungen der 518A2-Melanomzellen nach Behandlung mit 2,5 μM von Platin(II)-NHC-Komplex **49b** für 24 h. In der Vergrößerung (rechts) sind eindeutig eine starke Abrundung der Zellen sowie die Entstehung sogenannter apoptotischer Vesikel (rote Ellipse) zu erkennen. Hierbei handelt es sich um für den programmierten Zelltod typische Charakteristika.

Tabelle A-31: Vitalität der PCKS nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cisplatin oder den Pt(II)-NHC-Komplexen **49** für 24 h. Die Vitalität wurde anhand des ATP-Gehalts der Gewebeschnitte bestimmt und relativ zu unbehandelten Kontrollen (100 % Vitalität) angegeben. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, bei denen pro Konzentration drei PCKS eingesetzt wurden. Mit Sternen (*) markierte Werte stammen lediglich aus einem Einzelexperiment mit jeweils drei Gewebeschnitten pro Konzentration.

Konz. [μ M]	Vitalität (%)			
	1	5	10	25
Cisplatin	113,9 \pm 10,2	85,0*	59,1 \pm 2,1	26,4*
49a	94,3 \pm 17,9	90,4 \pm 51,9	75,8 \pm 17,3	70,2 \pm 15,7
49b	90,3 \pm 11,1	81,9 \pm 15,5	81,8 \pm 8,5	67,7 \pm 10,4
49c	69,0 \pm 18,0	29,2 \pm 11,5	12,9 \pm 12,0	5,0 \pm 4,9

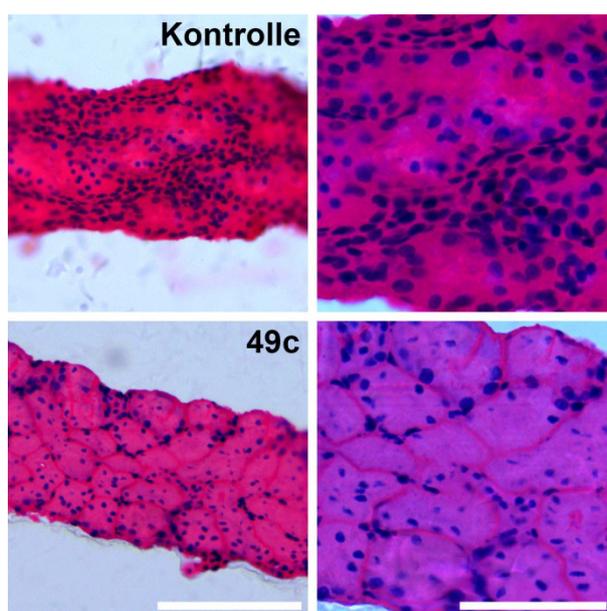


Abbildung A-9: Histomorphologie von unbehandelten PCKS (Kontrolle, oben) und mit **49c** (1 μ M) behandelten Nierengewebeschnitten (unten) nach 24 h Inkubation. Maßstabsbalken – links 50 μ m, rechts: 100 μ m. [Adapted with permission from Muenzner, J. K., *et al.* J. Med. Chem. 2015, 58 (15), 6283-6292, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00896. Copyright 2015, American Chemical Society.]

1,3-Diarylimidazol-2-yliden-Pt(II)-Komplexen mit unterschiedlichen NHC-Liganden

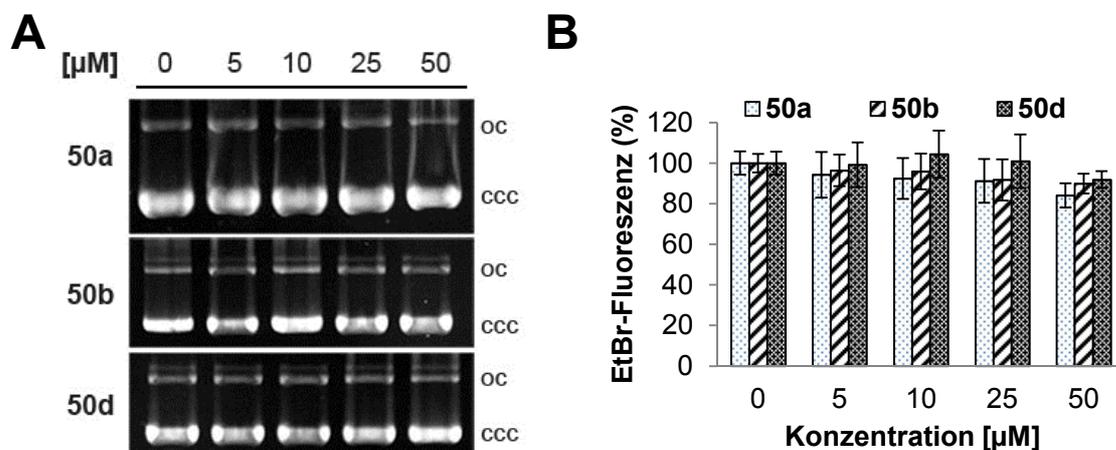


Abbildung A-10: Ergebnisse der Untersuchungen zur Wechselwirkung der Platin(II)-Biscarbenkomplexe **50a**, **50b** und **50d** mit DNA. **(A)** EMSA: zirkuläre pBR322-Plasmid-DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Platinverbindungen inkubiert und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelbilder sind für mindestens zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente repräsentativ. **(B)** EtBr-Fluoreszenz-Assay: Relative Fluoreszenzintensität der EtBr-DNA-Addukte nach Inkubation von Lachsspermien-DNA mit verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 µM) der Pt(II)-NHC-Komplexen **50a**, **50b** und **50d** für 2 h. Die Fluoreszenz der mit DMF behandelten DNA-Kontrollansätze wurde jeweils gleich 100 % gesetzt.

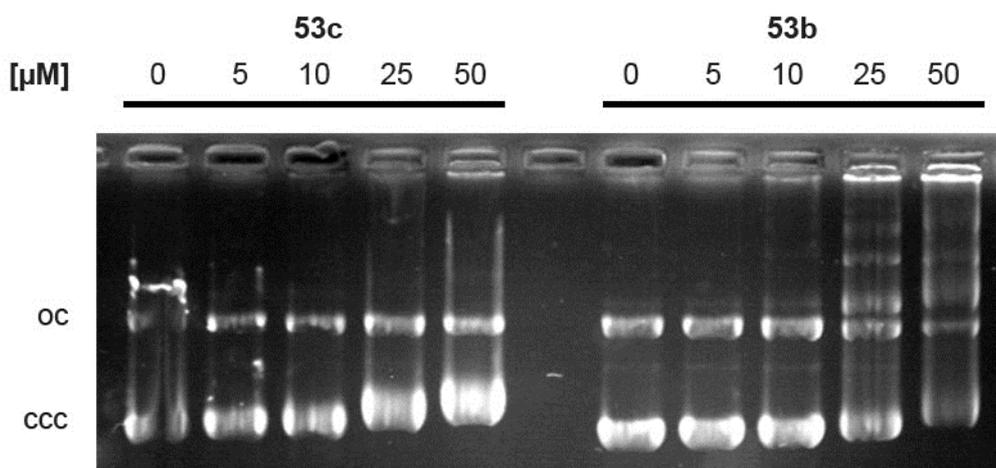


Abbildung A-11: Interaktion der *bis*-PPh₃-substituierten Pt(II)-NHC-Komplex **53c** und **53b** mit pBR322-Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von der Komplexe behandelt und die DNA-Proben anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Bild des Agarosegels ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Tabelle A-32: Relative Fluoreszenzintensität der EtBr-DNA-Addukte nach Inkubation von Lachs-spermien-DNA mit verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 μM) der Platin(II)-NHC-Komplexe **51b/c**, **52b/c** und **53b/c** für 2 h. Die Fluoreszenz der mit DMF behandelten DNA-Kontrollansätze wurde gleich 100 % gesetzt.

Konz. [μM]	Relative Fluoreszenz (%)				
	0	5	10	25	50
51b	100,0 \pm 4,6	96,4 \pm 7,8	95,9 \pm 8,8	91,7 \pm 10,1	89,9 \pm 4,9
52b	100,0 \pm 6,6	75,6 \pm 5,7	68,5 \pm 5,5	58,9 \pm 5,0	49,7 \pm 3,7
53b	100,0 \pm 6,9	68,5 \pm 8,2	57,5 \pm 6,3	18,7 \pm 3,1	14,8 \pm 0,6
51c	100,0 \pm 5,6	99,2 \pm 11,1	104,3 \pm 11,6	101,0 \pm 13,2	91,9 \pm 4,1
52c	100,0 \pm 10,1	97,2 \pm 9,2	87,4 \pm 7,6	72,1 \pm 6,6	60,6 \pm 2,0
53c	100,0 \pm 4,5	81,2 \pm 5,7	80,4 \pm 5,3	49,3 \pm 2,8	48,8 \pm 1,1

Tabelle A-33: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nach Inkubation der 518A2-Melanomzellen mit den Platinkomplexen **53** (**53a**: 1 μM , **53b**: 450 nM und **53c**: 3 μM) für 24 h. Kontrollzellen wurden mit analogen Mengen an reinem DMF behandelt. Aufgeführt ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, und G2/M-Phase) sowie der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Anteil (%)	sub-G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	6,6 \pm 1,6	45,1 \pm 0,6	28,6 \pm 2,4	20,1 \pm 1,1
53a	4,1 \pm 1,2	63,0 \pm 0,9	11,9 \pm 0,5	21,2 \pm 0,7
53b	3,8 \pm 0,5	66,9 \pm 0,4	11,6 \pm 0,2	17,9 \pm 0,5
53c	2,9 \pm 0,3	52,7 \pm 0,8	16,1 \pm 0,2	28,5 \pm 1,0

8.2 Genehmigungen/Lizenzen von Journalen

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 19, 2015

This Agreement between Julienne Muenzner ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3752701081542
License date	Nov 19, 2015
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	ChemMedChem
Licensed Content Title	Gold(I) Biscarbene Complexes Derived from Vascular-Disrupting Combretastatin A-4 Address Different Targets and Show Antimetastatic Potential
Licensed Content Author	Julienne K. Muenzner, Bernhard Biersack, Hussein Kalie, Ion C. Andronache, Leonard Kaps, Detlef Schuppan, Florenz Sasse, Rainer Schobert
Licensed Content Date	Mar 19, 2014
Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	German English (Summary)
Title of your thesis / dissertation	Biological evaluation of the mechanism of action of NHC metal complexes with antitumoral and antivascular activity
Expected completion date	Dec 2015
Expected size (number of pages)	200



RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.**Title:**

Adjusting the DNA Interaction and Anticancer Activity of Pt(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes by Steric Shielding of the Trans Leaving Group

Logged in as:

Julienne Muenzner

Account #:

3000960691

Author:

Julienne K. Muenzner, Tobias Rehm, Bernhard Biersack, et al

[LOGOUT](#)**Publication:**

Journal of Medicinal Chemistry

Publisher:

American Chemical Society

Date:

Aug 1, 2015

Copyright © 2015, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Schobert für die interessante Themenstellung sowie die stete Unterstützung und wissenschaftliche Förderung während meiner Promotion.

Bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Lehrstuhls möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an meine beiden Laborkollegen Dr. Katharina Mahal und Florian Schmitt für die tolle Zeit im „Biologen-Labor“, ihre Unterstützung sowie stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Ein spezieller Dank geht auch an die Chemiker Dr. Bernhard Biersack, Tobias Rehm und Hussein Kalie für die Synthese sämtlicher in dieser Arbeit untersuchten Komplexe, die wissenschaftlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen meinen Praktikanten sowie Bachelor- und Masterarbeitskandidaten, insbesondere bei Matthias Rothmund, Alexander Albrecht und Sebastian Schrüfer bedanken, deren wissenschaftliche Arbeit mich während meiner Promotion wesentlich unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt den folgenden Kooperationspartnern: Prof. Dr. Angela Casini (*Chair of Medicinal and Bioinorganic Chemistry, Cardiff University, UK*), Dr. Inge A. M. de Graaf und Pawida Worawutputtapong (*Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting, University of Groningen, Niederlande*), Prof. Dr. Ingo Ott, Dr. JingJing Zhang und Dr. Julia Schur (*Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig*), Prof. Dr. Victor Brabec, Prof. Dr. Jana Kašpárková und Olga Stuchlíková (*Department of Biophysics, Palacky University in Olmütz, Tschechien und Institute of Biophysics, Academy of Science in Brunn, Tschechien*), Prof. Dr. Detlef Schuppan und Leonard Kaps (*Institut für Translationale Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz*), Dr. Florenz Sasse, Bettina Hinkelmann, Prof. Dr. Mark Brönstrup und Dr. Verena Fetz (*Chemische Biologie, HZI Braunschweig*), Dr. Ion C. Andronache (*Research Centre for Integrated Analysis and Territorial Management, University of Bucharest, Rumänien*) und Dr. Thomas Müller (*Klinik für Innere Medizin IV - Hämatologie und Onkologie-, Universitätsklinikum Halle (Saale)*).

Auch bei Prof. Dr. Stemmann und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Genetik, insbesondere bei Markus Herrmann, sowie bei Prof. Dr. Carlo Unverzagt und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Bioorganische Chemie, besonders bei den Kollegen aus dem „S1-Labor“, und Prof. Dr. Matthias Weiss und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Experimentalphysik I, insbesondere bei Kathrin Weidner-Hertrampf, möchte ich mich für die Möglichkeit zur Mitbenutzung verschiedener Geräte sowie die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei der COST Action CM1105 *Functional metal complexes that bind to biomolecules* für den interessanten wissenschaftlichen Austausch auf verschiedenen Tagungen, die entstandenen Kooperationen und insbesondere für die Möglichkeit zu einem Auslandsaufenthalt am *Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting* der Universität Groningen. An dieser Stelle noch einmal ein besonderer Dank an Prof. Dr. Angela Casini und ihre Mitarbeiter für die herzliche Aufnahme, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und eine schöne Zeit in Groningen.

Last, but not least geht ein herzlicher Dank an meine Eltern und meinen Freund Florian, die mich in allen Lebenslagen unterstützen und immer für mich da sind.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNGEN UND ERKLÄRUNGEN

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....
Ort, Datum

Unterschrift (Julienne K. Münzner)