



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Imaging of alkyne-functionalized ruthenium complexes for photoactivated chemotherapy**

Busemann, A.

### **Citation**

Busemann, A. (2019, October 1). *Imaging of alkyne-functionalized ruthenium complexes for photoactivated chemotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/78473>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/78473>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:  
<http://hdl.handle.net/1887/78473>

**Author:** Busemann, A.

**Title:** Imaging of alkyne-functionalized ruthenium complexes for photoactivated chemotherapy

**Issue Date:** 2019-10-01

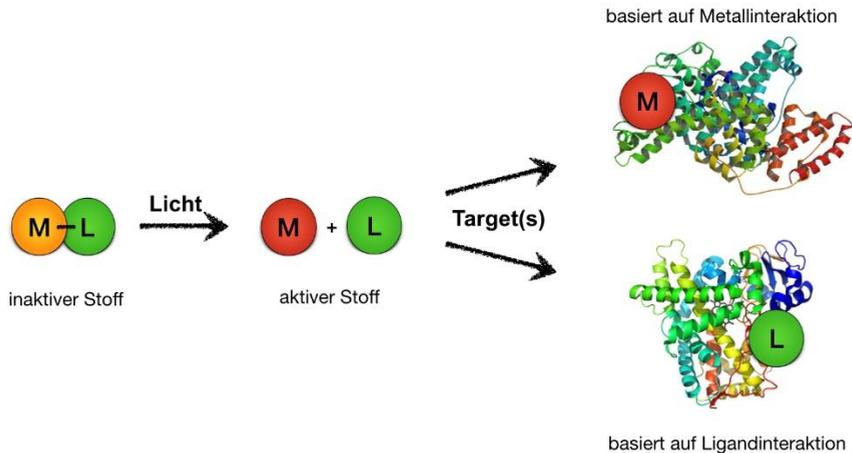
# ZUSAMMENFASSUNG

---

## **PACT als selektive Krebsbehandlung**

Krebs wird mit drei verschiedenen Methoden behandelt: der operative Entfernung des Tumorgewebes, der Strahlungstherapie und einer Chemokur. Die traditionelle Chemokur beinhaltet giftige chemische Substanzen, die die Zellteilung der Zellen angreift und dadurch zu deren Tod führt. Dabei wird kein Unterschied zwischen gesunden Zellen und Krebszellen gemacht, wodurch Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Haarausfall, auftreten. Um die Krebsbehandlung für den Patienten erträglicher zu machen, muss daher ein Medikament entwickelt werden, das hauptsächlich Krebszellen angreift und keine Wirkung auf gesunde Zellen hat. Diese Selektivität kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden: entweder ist der wirksame Stoff auf einen Bestandteil in den Zellen gerichtet, der nur in Krebszellen vorkommt (biologische Selektivität) oder das Medikament wird nur in der Nähe der Krebszellen aktiviert und wirkt daher nur lokal (physische Selektivität).

Unserer Arbeitsgruppe hat sich auf Letzteres spezialisiert, die physische Selektivität. Unsere Chemotherapeutika beinhalten das Metall Ruthenium und verschiedene organische Seitengruppen (Liganden genannt), die an das Metall gebunden sind. Die resultierenden Stoffe zeigen keinerlei giftige Eigenschaften solange sie in Dunkelheit gehalten werden. Erst nach Lichtbestrahlung wird eine der Verbindungen zwischen Metall und Ligand zerbrochen. Diese chemische Umwandlung führt zur Bildung des aktiven Chemotherapeutikums. Jetzt erst ist der Stoff im Stande um in den Zellen eine Bindung mit Zellbestandteilen (Proteinen) anzugehen. Die Verbindung zwischen aktiviertem Stoff und Protein führt zu einer Behinderung des natürlichen Zellmechanismus und letztendlich zum kontrollierten Zelltod. Auf diese Weise kann man mit Hilfe von Licht lokal die Krebszellen bekämpfen, und gesunde Zellen von der Behandlung ausschließen. Diese Methode der Krebsbehandlung nennt man lichtaktivierbare Chemotherapie (*photoactivated chemotherapy, PACT*).



**Figur 1.** Licht verursacht die Spaltung einer Bindung im inaktive Chemotherapeutikum zwischen Metall (M) und Ligand (L). Dadurch kommt es zur Umwandlung in die aktive Form des Chemotherapeutikums. Erst im aktivem Zustand kann es an Zellbestandteile binden und damit den Zellmechanismus stören und zum Zelltod führen.

### Die Wirkungsweise eines Chemotherapeutikums untersuchen

Abhängig vom Chemotherapeutikum und der Krebsart kann ein anderes Protein den zellulären Bindungspartner (Target genannt) des aktivierte Medikaments darstellen und einen spezifischen Wirkungsmechanismus einleiten. Je mehr man über die Wirkungsweise und das Target des Medikamentes weiß, desto besser. Diese Informationen ermöglichen es nämlich um den wirksamen Stoff noch effizienter zu machen und eventuell auftretende Nebenwirkungen frühzeitig zu beseitigen. Es gibt bereits verschiedene Methoden, die Wirkungsweise eines Medikamentes zu erforschen. So kann man zum Beispiel untersuchen, welchen Effekt das Medikament auf die Zellen hat. Je nachdem welche Proteine in einer erhöhten, niedrigen, oder gleichbleibenden Anzahl in den Zellen zu finden sind, lässt sich schlussfolgern auf welchen Zellmechanismus der Stoff Einfluss hat. Außerdem kann das Targetprotein identifiziert werden. So werden oft vorkommende Proteine aus der Zelle isoliert und die Bindung derer mit dem Medikament untersucht. Allerdings beinhaltet eine Zelle zu viele Proteine um sie alle nacheinander ausprobieren zu können. Daher ist es sinnvoll um die Auswahl möglicher Proteintargets im Vorherein zu begrenzen. Mit Hilfe der Lokalisierung des Chemotherapeutikums in der Zelle ist eine Eingrenzung vielversprechender Proteine möglich. Abhängig von der Stelle in der Zelle (in der Nähe von Zellorganellen) sind bestimmte Proteine wahrscheinlicher als andere.

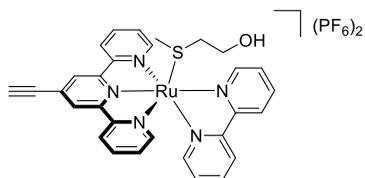
## Lokalisierung eines unsichtbaren Stoffes

Die von uns hergestellten Rutheniumstoffe haben jedoch keine fluoreszierten Eigenschaften und sind daher unter einem Mikroskop nicht sichtbar. Darum ist es notwendig um einen Fluorophor, also ein lichtaussendenden Stoff, an unser Chemotherapeutikum zu koppeln, um dieses in den Zellen zu sehen. So ein Fluorophor kann aber die Eigenschaften des Medikaments verändern: Die Aufnahme des Stoffes durch die Zelle, die Verteilung in der Zelle und die Interaktion mit dem Target können durch die lichtgebende Gruppe stark beeinflusst werden.

Meine Aufgabe war es eine Methode zu entwickeln, die es uns ermöglicht die unsichtbaren Chemotherapeutika in den Zellen zu lokalisieren und zu erfahren mit welchen Zellorganellen sie interagieren, um Rückschlüsse auf ihre Wirkungsweise ziehen zu können. Anstelle den Fluorophor vor der Behandlung an das Medikament zu koppeln und damit eine Beeinflussung der Stoffeigenschaften zu riskieren, wollten wir den Fluorophor erst dann an das Chemotherapeutikum koppeln, wenn es bereits von der Zelle aufgenommen wurde und an sein Target gebunden ist. Die Kopplung erfolgt also in der Zelle.

## Die Herstellung des alkynierten Chemotherapeutikums

Um den Fluorophor in der Zelle an das Chemotherapeutikum koppeln zu können, muss der wirksame Stoff mit einem minimalen „Griff“ versehen werden, an den die Kopplung erfolgen kann. Dieser „Griff“ war in unserem Falle ein Alkyn ( $C\equiv C$ ), das erst an das Chemotherapeutikum befestigt werden musste. Alle Anleitungen, die in der Literatur zur Herstellung vergleichbarer Stoffe zu finden sind, waren mit niedriger Ausbeute und vielen Nebenprodukten verbunden. Wir haben es geschafft um eine neue Herstellungsrouten zu entwickeln, die durch gezielten Einsatz von chemischen Schutzgruppen zu einer höheren Ausbeute für das alkynierte Produkt führte.

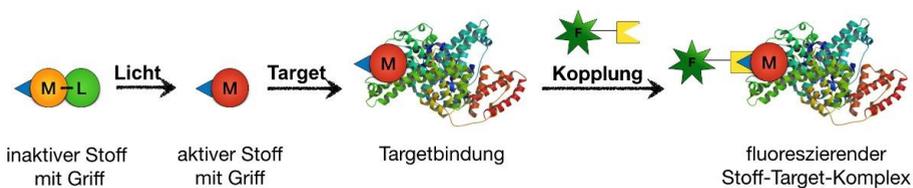


**Figur 2.** Das Chemotherapeutikum, basiert auf dem Metall Ruthenium. An der linken Seite wurde das Alkyn als Griff für die Kopplungsreaktion angebracht.

Nach der Herstellung haben wir überprüft, ob das Chemotherapeutikum mit Alkyn die gleichen Eigenschaften hat wie das Medikament ohne. Dies ist notwendig um feststellen zu können ob das kleine Alkyn allein nicht bereits einen Einfluss auf die Stoffeigenschaften hat. Verschiedene Analysetechniken wurden von uns verwendet, die uns Aufschluss über die Struktur des Stoffes lieferten, seine Zusammensetzung zeigte und seine Fähigkeit mit Hilfe von Licht aktiviert zu werden bestätigten. Die Experimente ergaben, dass das Alkyn keinen maßgeblichen Einfluss auf diese Eigenschaften hat und man davon ausgehen kann, dass sich das alkynierte Chemotherapeutikum genauso verhält wie das ursprüngliche ohne Alkyn.

### Das Unsichtbare sichtbar machen

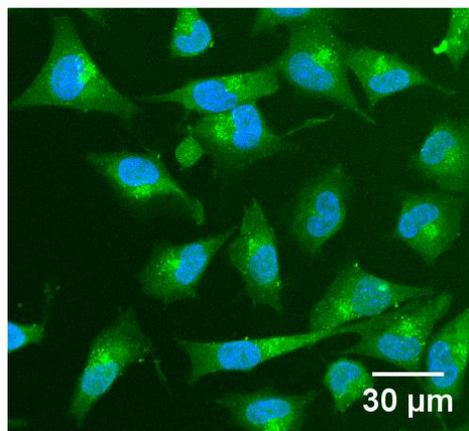
Danach wollten wir die Kopplung von Fluorophor und alkynierten Chemotherapeutikum testen. Dies taten wir unter Benutzung des Transporterprotein *bovine serum albumin* (BSA). BSA dient in diesem Falle als Modeltarget an das das Chemotherapeutikum nach Lichtaktivierung binden kann. Nach dieser Bindung wurde der Fluorophor zum Versuch hinzugeben und konnte die Kopplungsreaktion stattfinden. Wir kamen zu zwei wichtigen Erkenntnissen: 1) die Kopplung war erfolgreich. Wir sahen ein fluoreszentes Signal, das dem Fluorophore-Chemotherapeutikum-BSA Komplexes zuzuschreiben war. Und 2) ohne Lichtaktivierung war keine Bindung zwischen dem Chemotherapeutikum und BSA möglich. Dementsprechend erfüllt unser Stoff die Kriterien eines lichtaktivierbaren Chemotherapiestoffes (kein Effekt im Dunkeln, aber Wirkung nach Lichtaktivierung).



**Figur 3.** Nach Lichtaktivierung des Chemotherapeutikums kann die Bindung an das zelluläre Target stattfinden. Danach erfolgt die Kopplung des Fluorophores über den Griff an den Stoff-Target-Komplex.

Nachdem das Experiment erfolgreich an isoliertem BSA ausgeführt wurde, wurde der Versuch in Zellen wiederholt. Hierfür wurden Krebszellen gezüchtet und mit dem inaktiven Stoff gefüttert. Nach der Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Zellen mit Licht beschienen. Die Zellen wurden danach fixiert (konserviert) und der

Fluorophor wurde hinzugeben. Nach der Kopplungsreaktion des Fluorophors an das Chemotherapeutikum in den Zellen konnte wieder festgestellt werden, dass nur der aktivierte Stoff bindet, während der inaktive Stoff keine Interaktion innerhalb der Zelle eingehen kann und daher auch keine Wirkung zeigt. Mit Hilfe von Mikroskopie konnte das Signal des fluoreszenten Chemotherapeutikums in der Zelle lokalisiert werden. Entgegen der allgemeinen Auffassung, dass die wirksamen Stoffe einer Chemokur mit dem Zellkern interagieren, wurde unser Stoff außerhalb des Zellkerns gefunden. Nach der Einfärbung der verschiedenen Zellorganellen konnte nach dem Ausschlussprinzip ein Zellorganell, der Golgi Apparat, als möglicher Zielort des Chemotherapeutikums identifiziert werden.



**Figur 4.** Unser Chemotherapeutikum (grün) in Krebszellen. Wie man sieht befindet sich der Stoff nicht im Zellkern (blau).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir lichtaktivierbare rutheniumhaltige Chemotherapeutika erfolgreich mit einem Alkyn herstellen konnten, an das ein Fluorophor gekoppelt werden kann. Diese Kopplung ist auch in Zellen erfolgreich und hilft damit die chemische Substanz zu lokalisieren. Weitere Experimente sind nötig um die ersten Resultate zu bestätigen und das genaue Target des Stoffes zu erforschen.

