

Einfluss des Abbaus von Pentathiepinen durch Glutathion
auf deren biologische Wirkungen sowie Optimierung der
Löslichkeit und Stabilität durch Verwendung liposomaler
Substanzträger

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von
Martin Napierkowski

Greifswald, Dezember 2023

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

Professor Dr. Gerald Kerth

Professor Dr. Patrick J. Bednarski

Professor Dr. Dennis Schade

12. April 2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
1.1 Natürlich vorkommende organische Polysulfide und die Bedeutung biologisch aktiver Schwefelverbindungen	1
1.2 Pentathiepine	4
1.2.1 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen von Pentathiepinen	4
1.2.2 Wirkmechanismus der Pentathiepine	6
1.2.3 Weitere biologische Effekte von Pentathiepinen.....	7
1.3 Regulation des Redoxstatus in Zellen und mögliche Beeinflussung durch Pentathiepine	9
1.3.1 Glutathionperoxidasen	12
1.3.2 Pentathiepine und ihre Wirkung auf die Redoxhomöostase.....	14
1.4 Liposomen: partikuläre Arzneistoffträger.....	15
1.4.1 Einleitung zu Liposomen.....	15
1.4.2 Herstellung von Liposomen.....	19
1.4.3 Beladung von Liposomen.....	20
1.4.4 Charakterisierung von Liposomen.....	21
1.5 Zielstellung	21
2 Ergebnisse	23
2.1 Untersuchungen zur Reinheit der untersuchten Pentathiepine.....	23
2.2 Untersuchungen zum Verteilungskoeffizienten (log <i>P</i>) von Pentathiepinen	25
2.2.1 Bestimmung unter Verwendung einer sphärischen RP-HPLC-Säule	27
2.2.2 Bestimmung unter Verwendung einer monolithischen RP-HPLC-Säule.....	29

2.2.3	Quantifizierung des Einflusses des Pentathiepinrings auf den Verteilungskoeffizienten	31
2.2.4	Zusammenfassung der Untersuchungen zum Verteilungskoeffizienten	32
2.3	Untersuchungen zur Stabilität von Pentathiepinen in Gegenwart von Glutathion	33
2.3.1	Ergebnisse der Voruntersuchungen	33
2.3.2	Stabilitätsuntersuchungen mittels RP-HPLC	36
2.3.3	Untersuchungen mittels UV-Vis-Diodenarray-Spektralphotometer	37
2.3.4	pH-Abhängigkeit der Pentathiepinstabilität	44
2.3.5	Einfluss der Stabilität des Pentathiepins in Gegenwart von GSH auf die inhibitorische Wirkung auf GPx-1	44
2.3.6	Veränderung der antiproliferativen Wirkung durch gezielten Abbau des Pentathiepins	45
2.3.7	Veränderung der zytotoxischen Wirkung der Pentathiepine auf drei humane Krebszelllinien nach Vorinkubation mit DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin	46
2.3.8	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Stabilität von Pentathiepinen in Gegenwart von Glutathion	49
2.4	Untersuchungen zu Abbauprodukten von Pentathiepinen in Gegenwart von GSH.....	49
2.4.1	Untersuchungen zur Freisetzung von GSSH aus den Pentathiepinen 25 und 26 durch Reaktion mit GSH	49
2.4.2	Bestimmung der Freisetzung von GSSG aus Pentathiepin 26 in Gegenwart von GSH	52
2.4.3	Detektion des Abbauproduktes von Pentathiepin 25	54
2.4.4	Zusammenfassung zur Untersuchung zu Abbauprodukten von Pentathiepinen.....	55
2.5	Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften repräsentativer Pentathiepine an boviner GPx-1.....	56
2.5.1	Reversibilität	57
2.5.2	Inkubationsbedingte Änderungen der Enzymhemmung	59
2.5.3	Hemmung der bovinen GPx-1 durch Hydropersulfide und H ₂ S.....	63
2.5.4	Bestimmung enzymkinetischer Parameter	64
2.5.5	Zusammenfassung zur Untersuchung inhibitorischer Eigenschaften.....	67
2.6	Entwicklung eines GPx-Aktivitäts-Assays mittels RP-HPLC	68
2.6.1	Entwicklung einer RP-HPLC-Methode zur gleichzeitigen Quantifizierung von GSH und GSSG.....	69
2.6.2	Probenkonservierung	69
2.6.3	Charakterisierung der Kalibrierfunktion für GSSG	71
2.6.4	Vergleich der Ergebnisse des RP-HPLC- und NADPH-Mikrotiterplattenassays am Beispiel Mercaptobernsteinsäure.....	73

2.7	Liposomen als Träger von Pentathiepinen.....	74
2.7.1	Charakterisierung der Liposomen	75
2.7.2	Etablierung eines Extraktionsverfahrens sowie der RP-HPLC-Analytik zur Bestimmung der Konzentration von Pentathiepin 36 in Liposomen	77
2.7.3	Löslichkeit des Pentathiepins 36 in wässrigem Medium und in liposomaler Zubereitung	80
2.7.4	Stabilität des Pentathiepin 36 in Liposomen in Gegenwart von 10mM GSH	81
2.7.5	Vorgehen zur Keimminderung der liposomalen Zubereitung bei Lagerung	83
2.7.6	Lagerstabilität der liposomalen Zubereitung	84
2.7.7	Bestimmung der antiproliferativen Aktivität der Liposomen im Vergleich zum freien Pentathiepin	85
2.7.8	Zusammenfassung der Verwendung einer liposomalen Formulierung	86
3	Diskussion ausgewählter Ergebnisse	87
3.1	Diskussion der Stabilitätsuntersuchungen.....	87
3.1.1	Diskussion der verwendeten UV-Vis-spektroskopischen Methode.....	88
3.1.2	Diskussion der Stabilität der Pentathiepine.....	90
3.1.3	Diskussion der besonderen Stabilität von Pentathiepin IZ-3	91
3.1.4	Diskussion der Stabilität im Zusammenhang mit biologischen Daten.....	94
3.2	Diskussion der Glutathionperoxidasehemmung von Pentathiepinen	96
3.2.1	Diskussion des Einflusses des Abbaus von Pentathiepin 26 in Gegenwart von Glutathion auf die Inhibierung von GPx.....	98
3.2.2	Diskussion der RP-HPLC-Methode zur Durchführung des GPx-Assays	99
3.3	Diskussion der Analytik von Pentathiepinen in Liposomen	103
3.3.1	Diskussion der Extraktion und Gehaltsbestimmung	104
3.3.2	Diskussion der Stabilitätsuntersuchungen der liposomalen Zubereitung	105
3.3.3	Diskussion der Stabilität sowie der Zytotoxizität des Pentathiepins 36 in Liposomen	106
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
5	Experimenteller Teil.....	115
5.1	Untersuchte Substanzen	115
5.2	Material.....	122
5.2.1	Verwendete Geräte.....	122
5.2.2	Verwendete Chemikalien	123
5.3	RP-HPLC- und UV-Vis-Untersuchungen	125

5.3.1	RP-HPLC zur Reinheitsuntersuchung von Pentathiepinen	125
5.3.2	RP-HPLC zur Abschätzung des <i>n</i> -Octanol-Wasser-Koeffizienten von Pentathiepinen.....	125
5.3.3	RP-HPLC zur Stabilitätsuntersuchung von Pentathiepinen	128
5.3.4	UV-Vis-Spektroskopie zur Stabilitätsuntersuchung von Pentathiepinen	129
5.3.5	UV-Vis-Spektroskopie zur GSSH-Detektion	131
5.3.6	RP-HPLC zur simultanen Detektion von GSH und GSSG	132
5.3.7	RP-HPLC zur Detektion eines Pentathiepinabbauproduktes	133
5.3.8	RP-HPLC zur quantitativen Bestimmung von Pentathiepinen in Liposomen	133
5.3.9	RP-HPLC zur Löslichkeitsbestimmung von Pentathiepinen in Wasser	135
5.4	Biochemische Untersuchungsmethoden	136
5.4.1	Glutathionperoxidase-Assay mittels Spektrophotometer	136
5.4.2	Glutathionperoxidase-Assay mittels RP-HPLC	146
5.4.3	Glutathionreduktase-Assay	147
5.5	Zellkulturarbeiten	148
5.5.1	Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen	148
5.5.2	Auftauen der Zellen.....	149
5.5.3	Passagieren und Aussaat der Zellen.....	149
5.5.4	Proliferationsassay – Kristallviolett	150
5.5.5	MTT-Assay – Messung der zellulären, metabolischen Aktivität.....	154
5.6	Moleküldynamik-Simulation	157
6	Literaturverzeichnis	159
	Liste der Veröffentlichungen und anderer wissenschaftlicher Leistungen.....	175

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	In <i>Allium sativum</i> L. enthaltene lineare Polysulfide	1
Abbildung 2:	Lenthionin aus Shiitake-Pilzen und ein Trithian aus <i>Asparagus</i> -Arten.....	2
Abbildung 3:	Struktur des Pentathiepirings.....	4
Abbildung 4:	Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Sulfanen in Lösung.....	5
Abbildung 5:	Strukturen von Varacin, Lissoclinotoxin A sowie 7-Methylbenzopentathiepin.....	5
Abbildung 6:	Aminvermittelte intramolekulare Pentathiepin-Spaltung in Varacin.....	6
Abbildung 7:	Abbau von 7-Methylbenzopentathiepin in Gegenwart eines Überschusses an Mercaptoethanol.....	7
Abbildung 8:	Katalysezyklus der Thioredoxinreduktase	11
Abbildung 9:	Katalysezyklus der Glutathionperoxidasen	13
Abbildung 10:	Postulierter Wirkmechanismus der Pentathiepine in Zellen	15
Abbildung 11:	Schematische Darstellung eines amphipatischen Phospholipids sowie eines unilamellaren Liposoms	15
Abbildung 12:	$\log P$ -Werte für Pentathiepine.....	26
Abbildung 13:	Gelbliche Pentathiepinanlagerung auf der eigentlich weißen Teflonoberfläche der verwendeten Rührfische.....	27
Abbildung 14:	RP-HPLC-Chromatogramm der Referenzen zur $\log P$ -Wert-Abschätzung mittels sphärischer RP-HPLC-Säule	28
Abbildung 15:	Kalibrierfunktion zur $\log P$ -Wert Abschätzung mittels sphärischer RP-HPLC-Säule	28
Abbildung 16:	RP-HPLC-Chromatogramm der Referenzen zur $\log P$ -Wert Abschätzung mittels monolithischer RP-HPLC-Säule	29
Abbildung 17:	Kalibrierfunktion zur $\log P$ -Wert Abschätzung mittels monolithischer RP-HPLC-Säule.....	30
Abbildung 18:	Errechnete $\log P$ und mittels RP-HPLC bestimmte $\log P$ -Werte für Pentathiepine	31
Abbildung 19:	Erhöhung der Lipophilie um mehrere Größenordnungen durch Anellierung eines Pentathiepirings	31
Abbildung 20:	RP-HPLC-Chromatogramme zur Stabilität von Pentathiepin 25 in Gegenwart von 250 μM GSH.....	33

Abbildung 21: Vergleich der Pentathiepine 25, 26, 33, 36 sowie 37 hinsichtlich ihrer Stabilität in Gegenwart von 250 μ M GSH mittels RP-HPLC.....	34
Abbildung 22: Vergleich der Pentathiepine IN-1, IZ-1, IZ-2, IZ-3, PP-1 sowie PC-1 hinsichtlich ihrer Stabilität in Gegenwart von 250 μ M GSH mittels RP-HPLC.....	36
Abbildung 23: RP-HPLC-Abbaukurven der Pentathiepine bei 1 und 10 mM GSH.	37
Abbildung 24: UV-Vis-Spektrenvergleich von IN-1 und seiner Vorstufe.....	38
Abbildung 25: Übersicht über die Absorptionsspektren der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine.....	39
Abbildung 26: Übersicht über die Differenzspektren der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine.....	40
Abbildung 27: Aufnahme von Differenzspektren von 5 μ M IN-1 (Pentathiepin 25) in Gegenwart von 250 μ M GSH über 60 min.....	41
Abbildung 28: Abnahme der Konzentration der Pentathiepine (Startkonzentration 5 μ M) in Gegenwart von 5 mM GSH gemessen mittels UV-Vis-Spektroskopie	42
Abbildung 29: Darstellung der Halbwertszeiten und initialen Abbaugeschwindigkeiten der Pentathiepine (5 μ M) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen GSH (0,25–10 mM).....	43
Abbildung 30: Stabilität der Pentathiepine IN-1 sowie IN-2 in Gegenwart von 250 μ M GSH bei pH=6,5.....	44
Abbildung 31: IC ₅₀ -Werte der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine an GPx-1 ..	45
Abbildung 32: Ergebnis des Kristallviolett-Assays nach Inkubation von Pentathiepin 36 mit GSH.....	46
Abbildung 33: Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays mit und ohne 6 h BSO-Inkubation (200 μ M) ..	48
Abbildung 34: Detektion von während der Reaktion von Na ₂ S mit GSSG freigesetztem GSSH	50
Abbildung 35: UV-Vis-Spektren der Reaktionsansätze von Pentathiepin 26 zur GSSH-Bestimmung.....	50
Abbildung 36: UV-Vis-Spektren der Reaktionsansätze von Pentathiepin 25 zur GSSH-Bestimmung.....	51
Abbildung 37: UV-Vis-Spektren von Pentathiepin 26 nach Thiocyanatbildung	52
Abbildung 38: RP-HPLC-Chromatogramme der Freisetzung von GSSG aus Pentathiepin 26	53
Abbildung 39: RP-HPLC Chromatogramme zur Detektion des Abbauproduktes von Pentathiepin 25.....	54
Abbildung 40: Vergleich der Absorptionsspektren der Abbauprodukte von Pentathiepin 25	55
Abbildung 41: Katalysezyklus der GPx-1 mit GR-Messreaktion	56
Abbildung 42: Ergebnisse der <i>jump dilution</i> für Pentathiepin 26 und MSA an boviner GPx-1	59
Abbildung 43: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von Na ₂ S und GSSH an boviner GPx-1 bei Raumtemperatur.....	63
Abbildung 44: Abnahme der Absorption im GPx-Assay in Abwesenheit von GPx-1 bei Raumtemperatur.....	65

Abbildung 45: Bestimmung des K_m -Wertes von <i>t</i> -BHO in boviner GPx-1 bei Raumtemperatur ..	66
Abbildung 46: Konzentrations-Aktivitäts-Kurven mit $[t\text{-BHO}] = K_m$ für bovine GPx-1 bei Raumtemperatur	67
Abbildung 47: Strukturen von L-Glutathion und L-Glutathiondisulfid	69
Abbildung 48: Bildung von Artefakten im RP-HPLC-Chromatogramm durch niedrigen pH-Wert.....	70
Abbildung 49: RP-HPLC-Chromatogramm und Auswertung des Anstieges der GSSG-Konzentration im RP-HPLC-basierten GPx-Assay.....	70
Abbildung 50: Dosis-Aktivitäts-Kurve von Mercaptobernsteinsäure im RP-HPLC-GPx-Assay....	73
Abbildung 51: Struktur von Pentathiepin 36.....	74
Abbildung 52: Vergleich der UV-Vis-Spektren beladener und unbeladener Liposomen.....	75
Abbildung 53: Vergleichende DLS-Messung beladener und unbeladener Liposomen	76
Abbildung 54: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme sowie der UV-Vis-Spektren des freien und liposomalen Pentathiepins 36 nach Extraktion aus Liposomen	78
Abbildung 55: Vergleich zweier Kalibrationsmethoden für Pentathiepin 36 in Liposomen.....	79
Abbildung 56: Repräsentative Daten der Abnahme der Absorption des freien und liposomalen Pentathiepins in Gegenwart von 10 mM GSH.....	82
Abbildung 57: Vergleich der antiproliferativen Eigenschaften des freien liposomalen Pentathiepins 36 in zwei Zelllinien.....	85
Abbildung 58: Abbau von 7-Methylbenzopentathiepin in Gegenwart eines Überschusses an Mercaptoethanol.....	87
Abbildung 59: Vergleich der Stabilitätsuntersuchungen von fünf Pentathiepinen mittels RP-HPLC sowie UV-Vis-Spektroskopie	89
Abbildung 60: Differenzspektren von PP-1 ($c=5\ \mu\text{M}$) in GPx-Puffer in Gegenwart von 5 mM GSH.....	90
Abbildung 61: Abbau von IZ-3 in Gegenwart von 10 mM GSH über sechs Tage	92
Abbildung 62: Vergleich der Strukturen von IZ-2 und IZ-3.....	92
Abbildung 63: Simulierte Dimerisierung sowie Häufigkeitsverteilung der Torsionswinkel für IZ-2 und IZ-3.....	93
Abbildung 64: Korrelation der Aktivität der Pentathiepine im MTT-Assay mit der gemessenen Halbwertszeit in Gegenwart von 5 mM GSH	95
Abbildung 65: Relative GPx-Aktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration für Pentathiepin 25	97
Abbildung 66: Strukturen der Pentathiepine 30 und 36	104
Abbildung 67: Vergleich der Differenzspektren des liposomalen sowie freien Pentathiepins 36	106
Abbildung 68: Katalysezyklus der Glutathionperoxidase.....	136
Abbildung 69: Prinzip der <i>jump dilution</i>	141
Abbildung 70: Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von den Assaybedingungen	144

Abbildung 71: Plattenbelegung Proliferationsassay nach Umsetzung mit GSH 153

Abbildung 72: Struktur von DL-Buthionin-(*S,R*)-sulfoximin 156

Abbildung 73: Pipettierschema MTT-Assay mit vorheriger BSO-Inkubation..... 156

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der Liposomen nach Größe und Lamellarität	16
Tabelle 2:	Phasenübergangstemperaturen gängiger Phospholipide	17
Tabelle 3:	Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen an Pentathiepinen.....	24
Tabelle 4:	Übersicht über die Ergebnisse der log <i>P</i> -Schätzung mit sphärischer RP-HPLC-Säule	28
Tabelle 5:	Übersicht über die Ergebnisse der log <i>P</i> -Schätzung mit monolithischer RP-HPLC-Säule.....	30
Tabelle 6:	Übersicht berechneter (clog <i>P</i>) und chromatographisch bestimmter log <i>P</i> -Werte...	32
Tabelle 7:	Übersicht der Strukturen sowie IUPAC-Bezeichnungen der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine.....	35
Tabelle 8:	Übersicht der spektroskopischen Kerndaten der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine	38
Tabelle 9:	Langwelligste Minima in den Differenzspektren der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine.	41
Tabelle 10:	Übersicht über Halbwertszeiten und initiale Abbaugeschwindigkeiten der Pentathiepine IN-1, IZ-1, IZ-2, IZ-3, PP-1 sowie PC-1 (5 μM) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen GSH (0,25–10 mM).....	43
Tabelle 11:	Ergebnisse des MTT-Assays an drei humanen Krebszelllinien mit und ohne 6 h BSO-Inkubation (200 μM).....	47
Tabelle 12:	Übersicht über die Ergebnisse des Dialyseversuchs zur Reversibilitätstestung	58
Tabelle 13:	GPx-1-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer des Pentathiepins 25 oder 26 bei Raumtemperatur.	60
Tabelle 14:	Hemmung der bovinen GPx-1 durch Pentathiepin 26 nach Inkubation des Pentathiepins mit GSH	61
Tabelle 15:	Abweichende Pipettierreihenfolge GR Inkubation	62
Tabelle 16:	Gemessene Aktivität boviner GPx-1 nach vorherigem Umsatz des Assayansatzes mit GR.....	62
Tabelle 17:	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von GSSG unter Verwendung zweier Lösungsmittel	72
Tabelle 18:	Richtigkeit des RP-HPLC basierten GPx-Assays	72

Tabelle 19:	Vergleich der Parameter zweier Kalibrationsmethoden für Pentathiepin 36 in Liposomen.....	79
Tabelle 20:	Gemessene Konzentrationen an Pentathiepin 36 in Liposomen	81
Tabelle 21:	Übersicht der Ergebnisse der vergleichenden Stabilitätsuntersuchung zwischen dem liposomalen und freien Pentathiepin 36	82
Tabelle 22:	Vergleich filtrierter und unfiltrierter liposomaler Zubereitungen.....	83
Tabelle 23:	Veränderung der Pentathiepinkonzentration in Liposomen über mehrere Wochen bei 8 °C.....	84
Tabelle 24:	Vergleich der DLS-Ergebnisse über mehrere Wochen bei 8 °C Lagerung	84
Tabelle 25:	Vergleich der GI ₅₀ -Werte des Kristallviolett-Assays für das freie und liposomale Pentathiepin 36.....	86
Tabelle 26:	Gegenüberstellung der Aktivität der Pentathiepine im MTT-Assay mit den mittels RP-HPLC geschätzten Verteilungskoeffizienten sowie dem intrazellulären Glutathiongehalt der verwendeten Krebszelllinien	95
Tabelle 27:	Übersicht über flüssigchromatographische Bestimmungsmethoden von GSH.....	101
Tabelle 28:	In dieser Arbeit verwendete Pentathiepine.....	115
Tabelle 29:	Referenzen zur Abschätzung der Verteilungskoeffizienten	127
Tabelle 30:	Laufmittel und Retentionszeiten der mittels RP-HPLC auf Stabilität untersuchten Substanzen.....	129
Tabelle 31:	Geräteparameter UV-Vis-Spektroskopie zur Stabilitätsuntersuchung Specord S600	130
Tabelle 32:	GPx-Assay – Pipettierreihenfolge	137
Tabelle 33:	GPx-Assay – Endkonzentrationen in den Kavitäten.....	137
Tabelle 34:	Pipettierreihenfolge GPx-Reversibilitätsbestimmung Dialyse	139
Tabelle 35:	Pipettierreihenfolge <i>jump dilution</i> -Experiment an boviner GPx-1.....	142
Tabelle 36:	GPx-Assay – Pipettierreihenfolge für die HPLC	147
Tabelle 37:	GR-Assay – Pipettierreihenfolge.....	148
Tabelle 38:	GR-Assay – Endkonzentrationen in den Kavitäten	148
Tabelle 39:	Eigenschaften und Bedingungen verwendeter Zelllinien.....	150
Tabelle 40:	Zellzahlen zur Aussaat der verschiedenen Zelllinien – Kristallviolett-Assay.....	151
Tabelle 41:	Zellzahlen zur Aussaat der verschiedenen Zelllinien – MTT-Assay	154

Abkürzungsverzeichnis

3-MST	3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase
ANOVA	<i>analysis of variance</i> – Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BSO	DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin
CAT	<i>catalase</i> – Katalase
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CSE	Cystathionin- γ -Lyase
DAD	Dioden-Array-Detektor
DLPC	Dilauroyl-Phosphocholin
DLS	<i>dynamic light scattering</i> – Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimyristoyl-Phosphocholin, 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	Dioleoyl-Phosphocholin, 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin, Dipalmitoyl-Phosphocholin
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin, Distearoyl-Phosphocholin
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i> – erhöhte Permeabilität und Retention
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i> – US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i> – feline Immunodefizienz-Virus
GI ₅₀	Konzentration 50%iger Proliferationshemmung
GPx	Glutathionperoxidase
GPx1	Glutathionperoxidase-1
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSH	Glutathionhydropersulfid
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
K_i	Dissoziationskonstante Enzym-Inhibitor
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LM	Lösungsmittel
LOD	<i>limit of detection</i> – Nachweisgrenze
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i>
MLV	<i>multilamellar vesicle</i>
MSA	<i>mercapto succinic acid</i> – Mercaptobernsteinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVL	<i>multivesicular liposomes</i>
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCp	nukleinsäure bindendes Nucleocapsid
OLV	<i>oligolamellar vesicle</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – phosphatgepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
PSA	<i>prostataspezifisches Antigen</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> – Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RSD	<i>relative standard deviation</i> – Relative Standardabweichung
S	<i>slope</i> – Anstieg
SD	<i>standard deviation</i> – Standardabweichung
SFCA	<i>surfactant-free cellulose acetate</i> – netzmittelfreies Celluloseacetat
SOD	Superoxiddismutase
STEP	<i>striatal-enriched protein tyrosine phosphatase</i>
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i>
<i>t</i> -BHO	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
T_c	Phasenübergangstemperatur
TDP1	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1
t_M	Totzeit
t_R	Retentionszeit
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i> – vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
VF	Verdünnungsfaktor
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Natürlich vorkommende organische Polysulfide und die Bedeutung biologisch aktiver Schwefelverbindungen

Pentathiepine sind siebengliedrige, heterocyclische Polysulfane. Sie gehören damit zur Gruppe organischer Polysulfide und somit zu einer Stoffklasse, die in den letzten Jahren wachsendes Interesse hinsichtlich pharmazeutisch/medizinisch nutzbarer Eigenschaften geweckt hat.^[1-3]

Bereits seit der Antike ist die antibakterielle Wirkung von Inhaltsstoffen der Pflanzenfamilie *Alliaceae*, insbesondere der Gattung *Allium*, wie zum Beispiel *Allium sativum* L. (Knoblauch), oder des Knoblauchbaums (*Scorodophloeus zenkeri* HARMS.) aus der Familie der *Fabaceae* bekannt und ist auf das Vorkommen verschiedener linearer Polysulfide, wie zum Beispiel Diallyltrisulfid und Diallyltetrasulfid zurückzuführen.^[4]

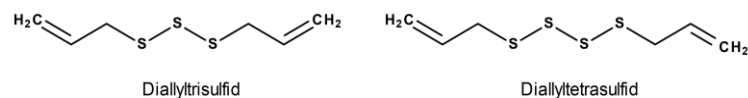


Abbildung 1: In *Allium sativum* L. enthaltene lineare Polysulfide

Diese im Knoblauch enzymatisch aus Allicin gebildeten Substanzen und deren korrespondierende Reaktionsprodukte bestimmen zum Teil die antifungalen und antibiotischen Eigenschaften zur Abwehr von Mikroorganismen und Fressfeinden.^[5, 6] Des Weiteren konnte eine zytotoxische Aktivität der linearen Polysulfane nachgewiesen werden, welche sich in Form des Auslösens des Zellzyklusarrests und der Apoptose darstellte.^[7, 8] Besonders bemerkenswert ist das Vorkommen dieser Polysulfane in essbaren Pflanzen, da sie als relativ untoxisch gelten. So zum Beispiel auch das cyclische Polysulfan Lenthionin in Shiitake-Pilzen oder andere Trithiane in Asparagus-Arten, welche ebenfalls antimikrobielle und antifungale Eigenschaften aufweisen (Abbildung 2).^[9, 10]

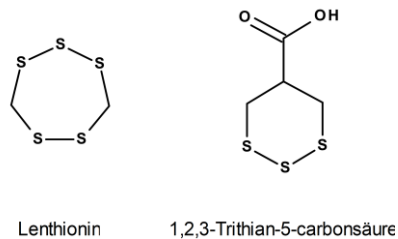


Abbildung 2: Lenthionin aus Shiitake-Pilzen und ein Trithian aus *Asparagus*-Arten

Das pharmakologisch Interessante dieser und verwandter Verbindungen ist, dass sie trotz ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften eine relative Selektivität zu Pilz-, Bakterien- und Krebszellen aufweisen und somit als Kandidaten für die therapeutische Verwendung in Frage kommen.^[8] Diese möglich Anwendung wurde zuletzt auch an Extrakten von *Gallesia integrifolia* HARMs. gezeigt, welche große Mengen Polysulfane enthalten.^[11, 12] Der Wirkmechanismus dieser Substanzen unterscheidet sich deutlich von der Reaktivität von Thiolen und Disulfiden.^[1] Auf die möglichen Wirkungswege von Polysulfiden und Polysulfanen wird deshalb gesondert im nächsten Kapitel eingegangen.

Das schwefelhaltige Glutathion/Glutathiondisulfid-System ist das wichtigste Redoxpuffersystem in lebenden Zellen.^[1] Es existiert in leichten Abwandlungen, zum Beispiel als Homoglutathionsystem in Hülsenfrüchten, überall.^[1] Das Verhältnis zwischen den beiden Spezies Glutathion und Glutathiondisulfid ist in Säugetierzellen durch das Glutathionperoxidase- und Thioredoxinreduktase-System enzymatisch kontrolliert. Zusätzlich ist bereits nachgewiesen, dass durch Reaktion von Polysulfiden mit Thiolen reaktive Sauerstoffspezies entstehen.^[13]

In Glutathion (GSH) – der größten Schwefelquelle innerhalb der Säugetierzelle – liegt Schwefel im Oxidationszustand -2 vor, dem reduziertesten Zustand, den Schwefel einnehmen kann. Gleichzeitig ist es als aliphatisches Thiol unter physiologischen Bedingungen zum großen Teil ungeladen ($pK_a \approx 8,3$)^[14] und somit weder besonders nukleophil, noch besonders redoxreaktiv. Zwischen dem reduziertesten und oxidiertesten Zustand von Schwefel (SO_4^{2-} , $+6$) gibt es eine Vielzahl von Spezies unterschiedlicher Oxidationsstufen und somit unterschiedlicher Reaktivität: Polysulfide und Hydropersulfide liegen als gemischte Sulfide in den Oxidationsstufen -1 und 0 vor, während Disulfide ausschließlich den Oxidationszustand -1 besitzt. Die große Bandbreite an Oxidationsstufen ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen und Funktionen im physiologischen System, die noch nicht vollständig verstanden, aber Gegenstand aktueller Forschung sind.^[2, 15-18]

Neben der Bildung schwefelradikalischer Verbindungen und anschließender Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), haben viele physiologische Schwefelspezies eine direkte Wirkung auf Zellen. Da Pentathiepine und lineare Polysulfane in Gegenwart hoher Konzentrationen Glutathion unter anderem Schwefelwasserstoff und Polysulfane freisetzen (Abbildung 7, Seite 7) lohnt sich ein Blick auf mögliche Reaktionswege von Schwefelwasserstoff und verwandten Verbindungen.

Hinsichtlich antioxidativer und zytoprotektiver Eigenschaften, sowie die Fähigkeit, als Schwefelspeicher innerhalb der Zelle zu agieren, ergibt sich in Hinsicht auf Krebszellen ein gemischtes Bild. In vielen Krebszelllinien wurde eine erhöhte Konzentration an H₂S-produzierenden Enzymen gemessen. Cystathionin-β-Synthase (CBS), Cystathionin-γ-Lyase (CSE) und 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase (3-MST) führen zu einer erhöhten H₂S-Produktionskapazität. Die dadurch ausgelösten Signalwege führen zur Hochregulierung bioenergetischer Funktionen wie Glykolyse, oxidativer Phosphorylierung, maximaler Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion, verstärkter Proliferation und Aufrechterhaltung eines mesenchymalen Status. Das begünstigt Migration und Metastasierung der Krebszellen. Zusätzlich kommt es zu einer effektiveren mitochondrialen DNA-Reparatur, was das unkontrollierte Wachstum beschleunigt.^[19]

Dem gegenüber ist Schwefelwasserstoff zum Beispiel in der Lage, intrazellulär Hydropersulfide aus Di- und Polysulfiden zu erzeugen:



Diese Reaktion kann unter physiologischen Bedingungen insbesondere in Zellkompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum stattfinden. Das verändert potentiell die Konformation und die Aktivität betroffener Enzyme. Da 10–25 % der Leberproteine physiologisch Hydropersulfide aufweisen, ist davon auszugehen, dass sie eine physiologische Funktion, zum Beispiel Signaltransduktion, besitzen.^[20] Aufgrund ihres um 1–2 Größenordnungen geringeren pK_a-Wertes gegenüber dem korrespondierenden Thiolen^[21] besitzen sie eine größere Nukleophilie sowie ein höheres reduktives Potential. Deswegen besitzen Hydropersulfide das Potential, schädliche Veränderungen hervorzurufen. Eine Oxidation unter Radikalbildung mit anschließender radikalischer Alkylierung oder einfachen Dimerisierungen sind möglich:



Die Dimere sind ebenfalls in der Lage, funktionelle Veränderungen an intrazellulären Proteinen hervorzurufen. So wurde für *Rhodobacter capsulatus* gezeigt, dass die intramolekulare RSSSR-Bildung die Bindung des Transkriptionsrepressors SqrR hemmt.^[22] Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass *in-situ* erzeugtes Glutathionpersulfid (GSSH) Papain unspezifisch, konzentrationsunabhängig hemmt.^[23] Ähnliche Reaktionen, wie sie für H₂S aufgeführt sind, können theoretisch auch für Hydropolysulfide, wie sie aus Pentathiepinen durch Glutathion freigesetzt werden, formuliert werden. Die so gebildeten Schwefelspezies könnten antikarzinogen wirken.

Pentathiepine (Kapitel 1.2) könnten demnach nicht nur in der Lage sein, reaktive Sauerstoffspezies (Kapitel 1.3) zu erzeugen, sondern sind möglicherweise fähig, direkt in die Signaltransduktion und in die Funktionsfähigkeit von Proteinen einzugreifen, sofern die notwendige Lokalisation innerhalb der Zelle gegeben ist.

1.2 Pentathiepine

1.2.1 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen von Pentathiepinen

Der Siebenring der Pentathiepine zeichnet sich durch fünf Schwefel- und zwei durch eine Doppelbindung verbundene Kohlenstoffatome aus (Abbildung 3). Der siebengliedrige heteroatomische Ring liegt in einer dem elementaren Schwefel ähnlichen Sessel-Konformation vor.^[24] Der Ring ist ausgesprochen lipophil und weist sowohl Stabilität als auch Reaktivität ähnlich dem thermodynamisch stabilsten elementaren Cyclooctaschwefel S₈ auf.^[24] Gegenüber Säuren weist er eine hohe Stabilität auf,^[24] wogegen Basen und Nukleophile den Ring leicht öffnen können.^[25]

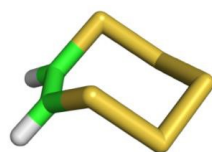


Abbildung 3: Struktur des Pentathiepinrings. Dargestellt ist das einfachste Pentathiepin – 1,2,3,4,5-Pentathiepin (weiß – Wasserstoff, grün – Kohlenstoff, gelb – Schwefel)

In Lösung ist ein Gleichgewicht zwischen dem Pentasulfan, Trisulfan und Heptasulfan beschrieben (Abbildung 4).^[26] Dabei ist die Lage des Gleichgewichtes von der Löslichkeit elementaren Schwefels im gewählten Lösungsmittel abhängig. Das Pentathiepin stellt in diesem Gleichgewicht aufgrund seiner dem S₈ ähnlichen Konformation den stabilsten und mengenmäßig größten Bestandteil des Gleichgewichtes dar.

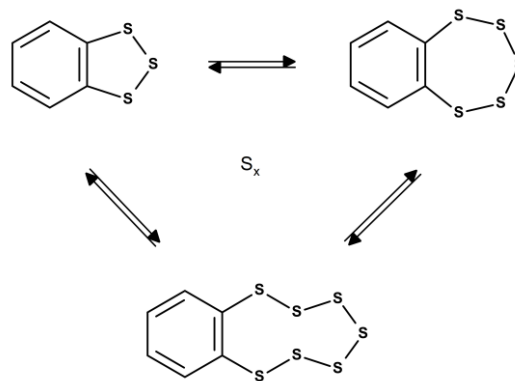


Abbildung 4: Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Sulfanen in Lösung. Das Pentathiepin stellt das Hauptprodukt des gezeigten Gleichgewichtes dar. Die Ausbildung und Lage des Gleichgewichtes ist von der Löslichkeit elementaren Schwefels im gewählten Lösungsmittel abhängig. Abbildung modifiziert nach MAHENDRAN *et al.* 2016^[26]

Pentathiepine sind eine seit den 70er Jahren^[27] synthetisch zugängliche Stoffklasse und wurden zu Beginn der 1990er Jahre aus marinen Organismen isoliert. Aus der Seescheide *Lissoclinum perforatum* wurde eine gegen *Candida albicans* ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) und andere Pilze antifungal wirkende Struktur isoliert. Sie war außerdem gegen verschiedene grampositive und -negative Bakterienstämme (u.a. *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*) im Bereich von $0,6\text{--}0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ antimikrobiell wirksam. Des Weiteren zeigte sie zytotoxische Eigenschaften und wurde zunächst fälschlicherweise als 1,2,3-Trithian-Derivat identifiziert.^[28] In Anlehnung an die Ursprungsspezies wurde diese Substanz als Lissoclinotoxin A bezeichnet.

Im gleichen Zeitraum wurde Varacin aus *Lissoclinum vareau* sowie *Polycitor spec.* isoliert und hinsichtlich antimikrobieller, antifungaler und zytotoxischer Eigenschaften bewertet.^[29, 30] Nach weiterer Strukturaufklärung wurde sowohl für Varacin, als auch für Lissoclinotoxin A die Pentathiepinstruktur bestätigt.^[31]

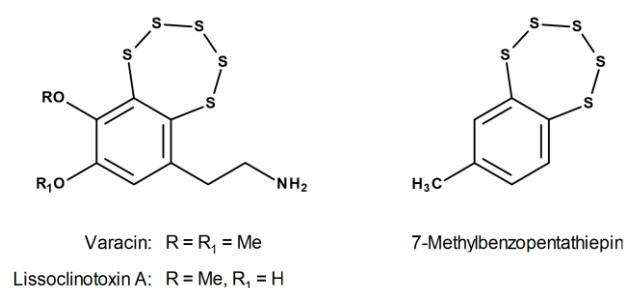


Abbildung 5: Strukturen von Varacin, Lissoclinotoxin A sowie 7-Methylbenzopentathiepin

Varacin zeigte dabei gegen die humane Darmkrebszelllinie HCT116 eine 100-fach stärkere Zytotoxizität als 5-Fluoruracil. Die 1,5-fach höhere Zytotoxizität gegen die CHO-Zelllinien EM9 (Chlordesoxyuridin-sensitiv) gegenüber BR1 (Carmustin-resistent) gaben erste Hinweise auf eine durch DNA-Einzelstrangbrüche hervorgerufene Zytotoxizität.^[30, 32]

1.2.2 Wirkmechanismus der Pentathiepine

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit und aufwendigen Extraktion aus marinen, wirbellosten Organismen, wurden zeitnah Anstrengungen unternommen, die natürlich vorkommenden Pentathiepine vollsynthetisch zugänglich zu machen. Dies gelang FORD UND DAVIDSON 1993^[33] sowie FORD *et al.* 1994^[34]. Dadurch wurden weitergehende Untersuchungen zum Wirkmechanismus ermöglicht. Es stellte sich heraus, dass Varacin und Lissoclinotoxin A in der Lage sind, in Gegenwart von Thiolen *in-vitro* DNA zu spalten. Auch für das synthetisch erzeugte Pentathiepin 7-Methylbenzopentathiepin konnte gezeigt werden, dass es in Gegenwart von Thiolen DNA-Fragmente zu erzeugen vermag.^[35] Die Wirkung der natürlich vorkommenden Pentathiepine erwies sich jedoch als stärker.

Begründet werden konnte dieser Unterschied zwischen Varacin und 7-Methylbenzopentathiepin mit dem vorhandenen Amin in den Strukturen Varacin und Lissoclinotoxin A. Unter sauren Bedingungen konnte die Fähigkeit zur DNA-Spaltung noch verstärkt werden und ebenfalls eine von der Thiol-Konzentration abhängige Wirkung gezeigt werden.^[36] Unter physiologischen Bedingungen ist das Amin des Varacins und Lissoclinotoxin A in der Lage, die Spaltung des Pentathiepinrings zu beschleunigen (Abbildung 6, Seite 6).^[25] Der in Abbildung 6 gezeigte Aktivierungsmechanismus wurde mittels errechneter Orbitalenergien postuliert.

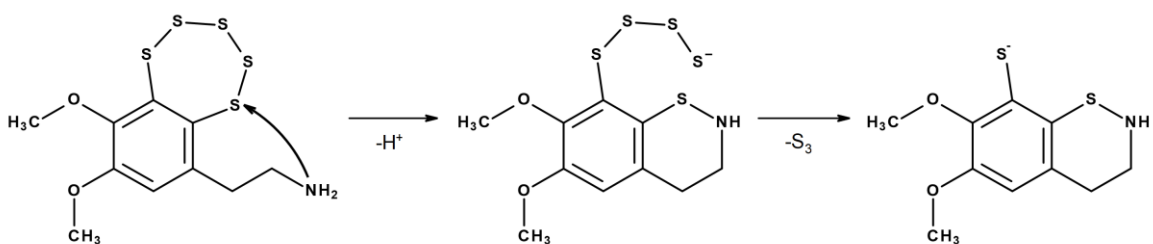


Abbildung 6: Aminvermittelte intramolekulare Pentathiepin-Spaltung in Varacin^[25]

Analoge Überlegungen wurden auch für die Reaktion von Pentathiepinen mit Thiolen angestellt, wobei experimentell folgender Mechanismus postuliert wurde.^[37]

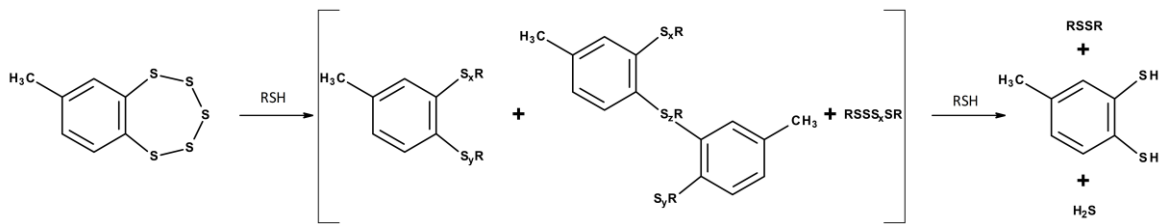


Abbildung 7: Abbau von 7-Methylbenzopentathiepin in Gegenwart eines Überschusses an Mercaptoethanol. Modifiziert nach CHATTERJI UND GATES 2003^[37]. Die Hauptprodukte der Reaktion sind das aromatische, vicinale Dithiol sowie H₂S und das Disulfid des eingesetzten Thiols

Sowohl die intramolekulare Spaltung durch das Amin in Varacin als auch die Spaltung des Pentathiepinrings durch Thiole enthielten zwei Implikationen: Einerseits schien die Wirkung des Pentathiepins intrazellulär durch Spaltung des Pentathiepins eingeleitet zu werden, andererseits war die Möglichkeit der Wirkungsvermittlung durch reaktive Schwefelspezies aufgeworfen worden. Dass reaktive Schwefelspezies, wie zum Beispiel das Hydropersulfid RSSH, prinzipiell in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies (Kapitel 1.3) zu erzeugen und so das Redoxgleichgewicht innerhalb der Zellen zu verschieben, konnte durch CHATTERJI *et al.* 2005^[13] gezeigt werden:



Wahrscheinlich kommt es durch Spuren von Metallionen zur initialen Oxidation des Hydropersulfidanions. Anschließend ist das reduzierte Metallion in der Lage Sauerstoff zum Superoxid zu reduzieren. Das infolgedessen gebildete Wasserstoffperoxid ist seinerseits fähig, in Gegenwart von Metallionen radikalische Reaktionen einzugehen, hier am Beispiel der Fenton-Reaktion mit Eisen-II gezeigt (Formel (1–10)). Das gebildete Persulfidradikal kann anschließend im Sinne der Formel (1–4) zum Dimer abreagieren. Dies stellt neben der direkten Wirkung reaktiver Schwefelspezies einen weiteren möglichen Weg dar, wie Pentathiepine ihre Wirkung entfalten.

1.2.3 Weitere biologische Effekte von Pentathiepinen

Durch die Entdeckung einer vergleichsweise einfachen Synthese polycyclischer Pentathiepine durch ZUBAIR *et al.* 2013^[38] sowie durch die Synthese einfacherer Indol-Pentathiepine

im Arbeitskreis von Prof. Dr. Patrick J. Bednarski^[39] war es möglich, weitere biologische Eigenschaften dieser Stoffgruppe zu untersuchen. In zwei vorangegangenen Dissertationen von Dr. Steven Behnisch-Cornwell^[40] und Dr. Lisa Wolff^[41] wurden verschiedene Pentathiepine untersucht. Es handelte sich bei den untersuchten Substanzen um die Strukturen **18**, **22**, **25**, **26**, **28-31**^[42] sowie **32-37**^[43]. Die Strukturen sind in Kapitel 5.1 gesammelt dargestellt. Bei den Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

BEHNISCH 2017^[40] fand heraus, dass Pentathiepine die stärksten bisher bekannten Glutathionperoxidase-1 (GPx-1)-Inhibitoren sind, zehnmal stärker, als Mercaptobernsteinsäure, dem bis dahin stärksten bekannten Inhibitor. Die Inhibierung erfolgt selektiv. Das heißt, dass keine anderen antioxidativen Enzyme durch die Pentathiepine beeinflusst werden, wie zum Beispiel Katalase (CAT) oder Thioredoxinreduktase (TrxR). Es konnte gezeigt werden, dass Pentathiepine auch in lebenden Zellen in kurzer Zeit in hohem Maße zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies führen.^[40] Dabei stören sie das mitochondriale Membranpotential. Es gab keinen Hinweis auf durch GPx-4 eingeleitete Ferroptose. Allerdings korrelierte die zytotoxische Wirkung nicht mit der Expression von GPx-1 in der Zelllinie. Die zytotoxische Wirkung bestand auch in GPx-1 *knock-out* Zellen. Das ist ein Hinweis darauf, dass die biologische Wirkung der Pentathiepine entweder nicht durch die Inhibition von GPx-1 hervorgerufen wird, oder die Inhibierung der GPx-1 durch das zelluläre Redoxsystem ausgeglichen werden kann.

Die untersuchten Pentathiepine hemmen das Wachstum verschiedener humaner Krebszelllinien bei Konzentrationen im einstelligen mikromolaren Bereich. Dabei nahm die Zytotoxizität unter hypoxischen Bedingungen ab und mit steigender Proliferationsrate der getesteten Zelllinie zu. Diese Ergebnisse sprechen für die Hypothese, dass die Wirkung der Pentathiepine in Gegenwart von Sauerstoff ausgelöst wird. Dennoch wurde dieser Effekt nicht für alle getesteten Pentathiepine beschrieben, was auf eine ambivalente Rolle hinweist.^[41]

Auch für die untersuchten Pentathiepine konnten DNA-schädigende Eigenschaften in Gegenwart von Thiolen an Plasmiden und in einer humanen Krebszelllinie gezeigt werden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptose als programmierter Zelltod ausgelöst wird.

Insbesondere die Hemmung der GPx-1 sowie das Erzeugen von ROS machen es wahrscheinlich, dass die Beeinflussung der Redoxhomöostase der Krebszellen den Hauptwirkmechanismus der zytotoxischen Wirkung der Pentathiepine darstellt.

Zusätzlich finden sich in der Literatur weitere mögliche Wirkungen von Pentathiepinen. So wurde die Hemmung des Felinen Immundefizienz-Virus (*feline immunodeficiency virus*, FIV) beobachtet. Das Target des getesteten Pentathiepins stellt dabei ein nukleinsäurebindendes Nucleocapsid-Protein (*short basic nucleic acid binding nucleocapsid protein*, NCp) dar. Dieses weist ein Zink-Finger-Motiv auf. Die Modifikation dieses Motivs führt zu Inaktivierung des Virus. Der mögliche Mechanismus beruht dabei auf einer Öffnung des Pentathiepins und anschließender Zinkkomplexierung.^[44]

Darüber hinaus wurde berichtet, dass Pentathiepine spezifische Inhibitoren der Protein-kinase C (PKC), der *striatal-enriched protein-tyrosine phosphatase* (STEP), die bei der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielt, und der Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1) sind, die zur DNA-Reparatur bei verschiedenen Krebserkrankungen und neurodegenerativen Störungen beitragen.^[45, 46]

1.3 Regulation des Redoxstatus in Zellen und mögliche Beeinflussung durch Pentathiepine

Zellen mit aerobem Stoffwechsel nutzen Sauerstoff als Elektronenakzeptor am Ende vorgelegter energiereicher Prozesse. Dessen Reduktion findet durch die Oxidoreduktase Cytochrom-C-Oxidase, dem Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette, statt. Neben der Bildung energiereicher Produkte wie ATP und Nebenprodukten wie CO₂ kommt es bei diesen Reaktionen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche das Superoxidion (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) sowie das Hydroxylradikal (OH[•]) umfassen. Diese reaktiven Spezies besitzen neben ihren toxischen Eigenschaften essentielle biologische Funktionen. Durch direkte Reaktion und Modulation von an Signaltransduktion beteiligten Proteinen, Transkriptionsfaktoren und Genen kommt ihnen eine große Bedeutung in der intrazellulären Kommunikation zu. Sie beeinflussen das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und dienen dazu, Noxen zu beseitigen (zum Beispiel in Peroxisomen). Andererseits sind sie in der Lage, Zellkompartimente durch radikalische Reaktionen zu schädigen. Mögliche schädigende Reaktionen sind beispielsweise die Peroxidbildung an Membranlipiden und Adduktbildung an der Nukleobase Guanin. Ersteres kann zu eingeschränkter Integrität der membranösen Zellstrukturen führen, Letzteres ist in der Lage, Mutationen der DNA auszulösen.

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ist ein physiologischer Vorgang und nicht exklusiv der Zellatmung zuzuschreiben. Auch während der Arachidonsäureoxidation durch die 5-Lipoxygenase von Arachidonsäure zu 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure entstehen in

einem ersten Schritt Superoxidanionen als Nebenprodukt.^[47] Daneben bestehen auch Prozesse, bei denen die reaktiven Spezies das Ziel sind, so wird zum Beispiel durch die in Phagozytenmembranen lokalisierte NADPH-Oxidase $O_2^{\bullet-}$ erzeugt, um aufgenommene Mikroorganismen oxidativ zu verdauen.^[47, 48] Weitere Quellen reaktiver Sauerstoffspezies sind unter anderem einige Cytochrom-P450-Isoformen (2E1, 3A4), Xanthin-Oxidasen sowie peroxisomale Oxidasen. Exogene Quellen für reaktive Sauerstoffspezies sind unter anderem ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, Infektionen und Tabakrauch.^[48]

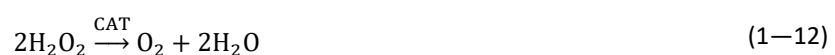
Die Entstehung dieser Radikale und reaktiven Verbindungen ist somit ein stetiger, physiologischer Prozess. Erhöhte ROS-Konzentrationen sind mit chronischen Entzündungen sowie Apoptose, aber auch mit der Auslösung von Krebs assoziiert.^[49] Aufgrund der Reaktivität ist eine strenge Regulierung der Vorkommen nötig. Dafür existieren verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische zelluläre Mechanismen, die sich teilweise überschneiden.

Es können folgende nicht-enzymatischen Prozesse beschrieben werden: In saurer Umgebung können zwei Superoxidanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid disproportionieren (Formel (1–8), Seite 7). Wasserstoffperoxid kann anschließend enzymatisch umgesetzt werden. Die Komplexierung von Metallionen an Transportproteine, wie zum Beispiel Ferritin und Transferrin, dient zur Verhinderung von metallkatalysierten radikalischen Kettenreaktionen. Des Weiteren stehen niedermolekulare Substanzen als Redoxpartner zur Verfügung. So sind Ascorbinsäure und Glutathion im Cytosol und α -Tocopherol in membranösen Kompartimenten in der Lage, radikalische Kettenreaktionen zu unterbrechen. GSH stellt dabei das physiologisch bedeutendste, niedermolekulare System zur ROS-Regulierung dar.

Die Regulierung reaktiver Sauerstoffspezies findet jedoch hauptsächlich enzymatisch durch vier Enzyme statt. Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Disproportionierung des Superoxidanions zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff:



Die Oxidoreduktase Katalase setzt zwei Moleküle Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser um:



Die Glutathionperoxidase ergänzt die enzymatische Regulation reaktiver Sauerstoffspezies durch die Fähigkeit, zusätzlich organische Peroxide zu Alkoholen umzusetzen. Thioredoxine (Trx) fungieren enzymatisch als Oxidoreduktasen. Sie sind etwa 100 Aminosäuren große Proteine mit Disulfidbrücken im aktiven Zentrum. Thioredoxinreduktasen aktivieren Thioredoxine zu ihren korrespondierenden Thiolen, welche anschließend in der Lage sind ihrerseits Substrate zu reduzieren:

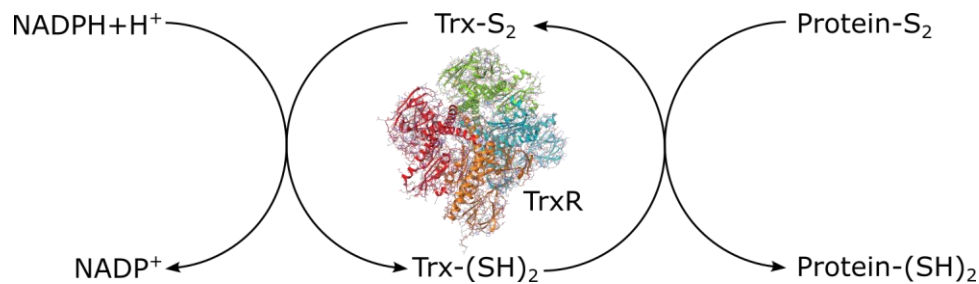


Abbildung 8: Katalysezyklus der Thioredoxinreduktase. Die Thioredoxinreduktase reduziert unter Verbrauch von NADPH+H⁺ die in Thioredoxinen enthaltenen Disulfide zu freien Thiolen. Diese stehen anschließend wieder reduktiv zur Verfügung, um beispielsweise Disulfide in Proteinen zu reduzieren.^[50] TrxR1, human^[51, 52], 2ZZ0

Die Beeinflussung der Redox-Homöostase ist Gegenstand aktueller Forschung. Das Erzeugen reaktiver Sauerstoffspezies in Krebszellen wird als ein Weg angesehen, die Zelle zu schädigen, Apoptose auszulösen und das Tumorwachstum zu begrenzen.^[48, 53] Dabei besteht einerseits die Möglichkeit, die Bildung von ROS durch sogenannte *redox cyclers* zu verstärken. Das Antikrebstherapeutikum Doxorubicin beispielsweise reagiert mit Flavoproteinen in Gegenwart von reduziertem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) unter der Bildung von Superoxid zum Semichinonradikal.^[54] Dadurch angestoßene, weitere Prozesse führen zu einer vermehrten Eisenaufnahme in die Zelle, was im weiteren Verlauf zusätzliche Radikalbildungen im Sinne der Formel (1–10) hervorruft.^[55] Die verstärkte Bildung von ROS erklärt im Fall der Anthracycline sowohl die zytostatische Wirkung, als auch die starken Nebenwirkungen.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, in das ROS-regulierende System einzugreifen. DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO) verringert als Inhibitor der γ -Glutamylcysteinsynthetase die Biosynthese von Glutathion und führt deshalb zu höheren ROS-Belastungen.^[56] Eine Hemmung der TrxR, der SOD und anderer antioxidativer Enzyme erzeugt auf ähnliche Weise höhere ROS-Belastungen, was in der Krebstherapie von Nutzen sein könnte.^[48]

Im Folgenden wird spezifisch auf die Inhibierung der Glutathionperoxidase und die Folgen für die intrazelluläre ROS-Entwicklung sowie Resistenz- und Wirkbeeinflussung von Zytostatika eingegangen.

1.3.1 Glutathionperoxidasen

Die Beeinflussung des Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies ist aus mehreren Gründen für die Entwicklung neuer Zytostatika interessant und relevant. Da Krebszellen häufig einen bereits hohen Spiegel an ROS aufweisen, sind sie eher anfällig für eine weitere Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration und dem Erzeugen von oxidativen Stress, weisen aber auch mögliche Resistenzen gegen bestehende Zytostatika auf.^[57] Für Glutathionperoxidasen als Bestandteil der Redoxhomöostase konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Gehalt in einigen Krebszelllinien oxidativen Stress verhindert und an der Resistenzbildung gegen Zytostatika beteiligt ist. Deshalb kann eine Hemmung der GPx zur Abschwächung der Resistenz gegen zum Beispiel Cisplatin, Etoposid, Methotrexat und Bortezomib beitragen.^[58]

Bei Glutathionperoxidasen handelt es sich um ubiquitär vorkommende Peroxidasen, die in mindestens acht Isoformen existieren. Dabei unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer histologischen und zytologischen Lokalisation, der Präferenz zu Substraten sowie dem Vorhandensein eines Selenocysteinrestes (Sec, U) im aktiven Zentrum.

1.3.1.1 Isoformen der Glutathionperoxidase

Es existieren acht bekannte Isoformen der Glutathionperoxidase (GPx-1–8). Dabei enthalten die Isoformen 1–4 sowie 6 in Säugetieren ein Selenocystein im aktiven Zentrum. Zudem stellen GPx-1–4 die wichtigsten Isoformen dar, was in den folgenden Absätzen näher erläutert wird.

GPx-1 wurde bereits in den 1950er Jahren als antioxidatives, Hämoglobin-protectives Enzym entdeckt und isoliert.^[59] Es ist die am häufigsten auftretende Isoform und kommt in nahezu allen Geweben mit Ausnahme der Milz, der Herz- sowie Skelettmuskulatur und der Plazenta vor. Sie ist hauptsächlich zytosolisch lokalisiert, liegt aber auch in Mitochondrien, Peroxisomen und Zellkernen vor. GPx-1 ist ein Homotetramer. Trotz der umfassenden Verteilung sind GPx-1 *knock-out* Mäuse überlebensfähig, was auf eine Kompensationsmöglichkeit des Organismus hindeutet.

GPx-2 ist hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt lokalisiert und wird mit dem Schutz vor während der Verdauung entstehenden ROS in Verbindung gebracht.

GPx-3 wird extrazellulär sezerniert und liegt glykosyliert vor. Die Umsatzrate ist deutlich langsamer, als die der GPx-1.^[60]

GPx-4 liegt als Monomer in membranösen Zellkompartimenten vor und hat die Möglichkeit Lipidperoxide zu reduzieren. Eine induzierte Überexpression verhindert die Auslösung von Ferroptose. GPx-4 *knock-out* Mäuse sind nicht überlebensfähig und versterben bereits während der Embryogenese.^[61]

Die Unterschiede in der Selektivität hinsichtlich der Peroxide, insbesondere zwischen GPx-1 und GPx-4, macht ein tieferes Verständnis der Möglichkeiten der Beeinflussung interessant.

1.3.1.2 Katalytischer Zyklus der Glutathionperoxidase

Glutathionperoxidasen arbeiten nach dem Prinzip der Reduktion von Peroxiden zu Wasser wobei die Gegenreaktion die Oxidation von zwei Äquivalenten GSH zu einem Äquivalent Glutathiondisulfid (GSSG) darstellt (Abbildung 9).

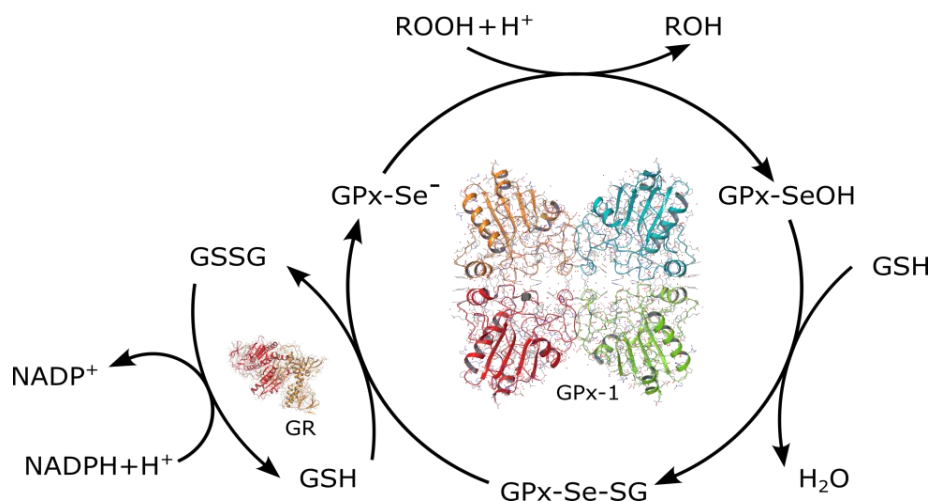


Abbildung 9: Katalysezyklus der Glutathionperoxidasen GPx-1, bovin^[62, 63] 1GP1; GR, human^[64, 65] 2GRT

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Selenocystein im katalytischen Zentrum deprotoniert als Selenolat vor. Nach Oxidation durch ein entsprechendes Peroxid zur Selenensäure wird die Wiederherstellung des Ausgangszustandes durch die Reaktion des Selens mit einem Äquivalent GSH unter Abspaltung von Wasser eingeleitet. In einem zweiten Schritt führt ein zweites Äquivalent GSH im katalytischen Zentrum unter Bildung eines

Äquivalents GSSG zur Wiederherstellung des Ausgangszustandes durch Reduktion des Selens. GSSG wird im Anschluss durch die Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch von einem Reduktionsäquivalent NADPH zu Glutathion recycelt. Die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion ist dabei die Restauration des katalytischen Zentrums der GPx. Daraus ergibt sich eine Besonderheit im Reaktionsmechanismus. Da die Substrate nicht gleichzeitig am katalytischen Zentrum vorliegen, handelt es sich um eine Sonderform der Mehrsubstratreaktion, einem „ping-pong“ Mechanismus, bei dem die Regeneration des Enzyms langsamer abläuft, als die eigentliche Katalyse.^[66] Die besondere Stellung der GPx bei der Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Redoxstatus wird dadurch unterstrichen, dass die rechnerische Maximalgeschwindigkeit als unendlich angegeben werden kann und die maximale Umsatzrate lediglich von der Enzymkonzentration abhängig ist.^[67]

1.3.1.3 GPx in der Krebstherapie

Die Rolle der GPx in der Krebstherapie ist ambivalent. Einerseits schützen hohe GPx-Konzentrationen theoretisch vor schädlichen Einflüssen durch reaktive Sauerstoffspezies, welche zu Malignität führen können (siehe oben), andererseits weisen Krebszellen häufig eine hohe Expression von antioxidativen Enzymen auf, was sie wiederum selbst schützt. Diese ambivalente Rolle kann ausgenutzt werden, indem die individuellen Eigenschaften der Krebszellen adäquat adressiert werden. Ein aktuelles Review von ZHAO *et al.* 2022^[68] stellt einen Zusammenhang zwischen erniedrigtem GPx-Level und Tumorentstehung her, zeigt aber auch, dass verschiedene Krebszelllinien GPx-1 sowohl unter, als auch überexprimieren. Dabei ist kein Zusammenhang sicher nachweisbar.

Eine erhöhte Expression von GPx-1 kann mit Resistenzen gegen Zytostatika wie Cisplatin und Doxorubicin assoziiert sein, die sich teilweise durch Inhibition der GPx-1 überwinden lassen.^[58] Somit stellt insbesondere das Überwinden von Resistenzen ein interessantes Arbeitsfeld in Bezug auf die Inhibierung von GPx-1 dar.

1.3.2 Pentathiepine und ihre Wirkung auf die Redoxhomöostase

Da Pentathiepine in der Lage sind, sowohl ROS zu produzieren, als auch GPx-1 zu inhibieren, wurde folgendes Schema zum Wirkmechanismus der Pentathiepine erstellt:

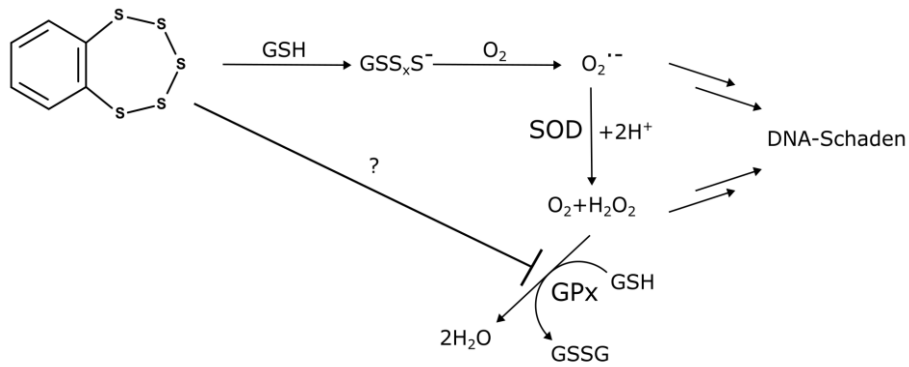


Abbildung 10: Postulierter Wirkmechanismus der Pentathiepine in Zellen. Die Reaktion mit Glutathion erzeugt über Zwischenschritte reaktive Sauerstoffspezies, die nachfolgend zu Schäden der DNA führen. Eine Hemmung der GPx ist unter Umständen zusätzlich an der Wirkung beteiligt. Modifiziert nach BEHNISCH-CORNWELL *et al.* 2020^[42]

Die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies durch Pentathiepine ist zweifelsohne nachgewiesen. Ob eine Hemmung der Glutathionperoxidase in lebenden Zellen an der Wirkung beteiligt ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

1.4 Liposomen: partikuläre Arzneistoffträger

1.4.1 Einleitung zu Liposomen

Liposomen werden in der Pharmazie als Arzneistoffträger und zum *drug targeting* im Rahmen der „Nanomedizin“ eingesetzt. Es handelt sich bei Liposomen um artifizielle, sphärische Spezies, die sich durch eine (unilamellar) oder mehrere (multilamellar) konzentrische,

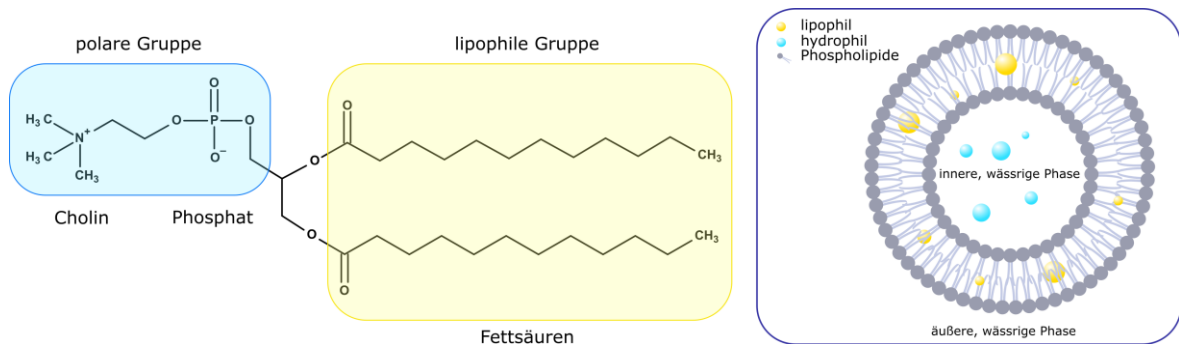


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines amphipatischen Phospholipids sowie eines unilamellaren Liposoms. Beim gezeigten Phospholipid handelt es sich um Dilaurylphosphocholin

4–5 nm dicke Lipid-Doppelschichten auszeichnen. Dabei trennen die Lipid-Doppelschichten eine wässrige, innere Phase von einer wässrigen, äußeren Phase. Die Membran wird durch spontane Anordnung amphipatischer Phospholipide gebildet. Abbildung 11 stellt

schematisch den Aufbau eines unilamellaren Liposoms dar. Aufgrund der Membranbildung ist es möglich, hydrophile Stoffe im Inneren des Liposoms zu verkapseln. Lipophile Stoffe können sich hingegen in der Membran einlagern.

Kommerziell finden Liposomen in Kosmetika und als Träger von Arzneistoffen Anwendung. In der Forschung dienen sie als Modell für Zellmembranen. Seit Mitte der 1960er Jahre wird auf dem Gebiet geforscht, welches bis heute eine Reihe zugelassener liposomaler Arzneimittel unterschiedlicher Administrationsrouten hervorgebracht hat, wobei Doxil® als PEGyliertes Nanoliposom das erste von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene *nano drug* mit der Indikation *AIDS-related Kaposi's sarcoma* war.^[69] Hauptsächlich zur intravenösen Verabreichung entwickelt, gibt es jedoch auch Beispiele für epidurale, intrathekale und intramuskuläre Applikation sowie für Inhalation oder lokale Infiltration liposomaler Zubereitungen. Oft für die Behandlung von Krebs eingesetzt (z.B. Doxorubicin, Daunorubicin, Cytarabin, Vincristin) gibt es jedoch auch antibiotische (Amikacin), immunologische (Shingrix®, Comirnaty®) oder antinozizeptive (Morphin, Bupivacain) Indikationen für die Anwendung liposomaler Arzneiformen.^[70]

Eine Klassifizierung der Liposomen erfolgt hauptsächlich nach ihrer Größe und der Anzahl der Membranen:

Tabelle 1: Einteilung der Liposomen nach Größe und Lamellarität. *small unilamellar vesicles* (SUV), *large unilamellar vesicle* (LUV), *giant unilamellar vesicle* (GUV), *oligolamellar vesicle* (OLV), *multilamellar vesicles* (MLV), *multivesicular liposomes* (MVL)^[70]

Kategorie	Größe	Lamellarität
SUV	20–100 nm	einfach
LUV	>100 nm	einfach
GUV	>1–100 µM	einfach
OLV	100–1000 nm	2–5
MLV	>500 nm	>5
MVL	>1 µM	verschachtelt

Für die Verwendung als Arzneistoffträger haben sich die *small unilamellar vesicles* (SUV) als am geeignetsten herausgestellt. Sie weisen die geringsten Probleme hinsichtlich Toxizität und Verteilung im Zielorgan auf. Insbesondere die Ausnutzung großer, fenestrierter Kapillaren mit porösen Kapillargewebe (>100 nm) in gut durchbluteten Geweben, insbesondere Tumorgeweben, und der relativ langen Zirkulationszeiten stehen im Vordergrund.

Generell erwartet man von Liposomen eine erhöhte Therapie-Effektivität durch Verlängerung der Plasmahalbwertszeit des verarbeiteten Arzneistoffes, eine erhöhte Stabilität der

eingeschlossenen Substanzen gegenüber externen Einflüssen, die Möglichkeit der gesteuerten Freisetzung der eingeschlossenen Arzneistoffe und somit weniger systemische Nebenwirkungen, eine Vergrößerung des therapeutischen Fensters und somit verbesserte therapeutische Eigenschaften.

Die Art und Zusammensetzung der Lipide, der Zusatz von Modifiern wie Cholesterol sowie die Veränderung der Liposomenoberfläche beeinflussen die biophysikalischen und thermodynamischen Eigenschaften der Vesikel. Insbesondere die Fluidität der Liposomenmembran kann durch die Auswahl unterschiedlicher Lipide beeinflusst werden. Beschrieben wird diese Eigenschaft durch die Phasenübergangstemperatur T_c der verschiedenen Phospholipide. In Tabelle 2 sind geläufige Lipide mit ihren korrespondierenden Phasenübergangstemperaturen aufgelistet. Ist die T_c der Lipidmembran unterschritten, liegt die Doppelmembran im sogenannten *gel state* vor. In diesem Zustand hoher Ordnung und geringer Fluidität ist die Diffusion hydrophiler Stoffe durch die Membran sehr gering.

Tabelle 2: Phasenübergangstemperaturen gängiger Phospholipide. Temperaturen aus AVANTI POLAR LIPIDS 2023^[71]

Bezeichnung	Abkürzung	Phasenübergangstemperatur
Distearoyl-Phosphocholin	DSPC	55 °C
Dipalmitoyl-Phosphocholin	DPPC	41 °C
Dimyristoyl-Phosphocholin	DMPC	24 °C
Dilauroyl-Phosphocholin	DLPC	-2 °C
Dioleoyl-Phosphocholin	DOPC	-17 °C

Oberhalb der Phasenübergangstemperatur erreicht die Doppelmembran einen sogenannten *liquid crystalline state*, in dem die Fluidität der Doppelmembran deutlich erhöht, die Diffusion hydrophiler Stoffe durch die Membran leicht möglich und sogar das Eindringen von Wasser in die Doppelmembran wahrscheinlich ist. Generell hängt die Phasenübergangstemperatur mit dem Aufbau des Phospholipids zusammen. Sie sinkt mit abnehmender Kettenlänge, mit steigender Anzahl von Doppelbindungen in den Fettsäureresten, mit zunehmender Größe der polaren Gruppe und mit steigendem Verzweigungsgrad der Fettsäurereste.

Das ist einerseits bei der Herstellung zu beachten – die Herstellung der Liposomen sollte immer 10K oberhalb der Phasenübergangstemperatur erfolgen – andererseits wird sich diese Eigenschaft hinsichtlich der gezielten Freisetzung bei der Entwicklung thermosensitiver Liposomen zunutze gemacht. Dabei werden Lipidzusammensetzungen gewählt, die eine Phasenübergangstemperatur knapp oberhalb der physiologischen humanen Körper-

temperatur von 37°C aufweisen. In erwärmten Geweben wird die Phasenübergangstemperatur überschritten und der wasserlösliche Arzneistoff schnell aus den Liposomen freigesetzt. Die Temperaturerhöhung am Zielort ist entweder physiologisch, zum Beispiel durch entzündetes Gewebe, oder künstlich, im Rahmen der Therapie, herbeizuführen. Genannt sei hier die Bestrahlung von Tumorgewebe. Von der spontanen Freisetzung betroffen sind insbesondere wasserlösliche Substanzen. Lipophile, in der Membran des Liposomen angereicherte Substanzen verbleiben auch oberhalb der Phasenübergangstemperatur aufgrund des Verteilungsgleichgewichtes zwischen wässriger und lipophiler Phase bevorzugt in der Membran.^[72-75]

Die in Tabelle 2 aufgeführten Phospholipide sind aufgrund des Phosphatidylcholinrestes ausnahmslos nach außen ungeladen, die Liposomen bestehend aus diesen Phospholipiden weisen eine neutrale Gesamtladung auf. Durch Verwendung geladener Phospholipide, wie zum Beispiel 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP, kationisch) oder 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-Serin (DOPS, anionisch) entstehen nach außen hin geladene Liposomen. Dies führt zu einer Abstoßung gleichförmig geladener Teilchen, was die die Stabilität der Formulierung^[76] sowie des eingeschlossenen Arzneistoffes^[77] erhöhen kann, jedoch toxikologische Untersuchungen notwendig macht.^[78] Da Säugetierzellmembranen eine negative Gesamtladung aufweisen, beeinflusst die Ladung der Liposomen ebenso deren mögliche Absorption.^[79] Zur Charakterisierung der Gesamtladung der Liposomen wird das Zetapotential genutzt. Es beschreibt die Potentialdifferenz zwischen der Partikeloberfläche und der Scherschicht des bewegten Partikels. Es ermöglicht die Einschätzung der in der Formulierung vorherrschenden Abstoßungs- und Adsorptionskräfte. Erhalten werden Spannungen im mV-Bereich, welche in gewissem Maße Vorhersagen über die Stabilität der nanopartikulären Dispersion ermöglichen. Werte zwischen -30mV und +30mV weisen auf eine relative Instabilität hin, größere oder kleinere Werte weisen auf eine höhere Lagerstabilität hin.^[80, 81]

Besondere Aufmerksamkeit erlangten Liposomen wegen der Möglichkeit, Zielkompartimente direkt zu adressieren – sogenanntes *drug targeting*. Passives *targeting* erfolgt dabei über den bereits erwähnten *enhanced permeability and retention* (EPR) Effekt an diskontinuierlichen Gefäßepithelien. Aktives *targeting* kann über Ligand/Rezeptor-Interaktionen gesteuert werden. Tumorzellen exprimieren an ihrer Oberfläche bestimmte Rezeptoren in besonderem Maße: beispielsweise *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR), *epidermal growth factor receptor* (EGFR), Folsäurerezeptoren, Integrine, CD44, CD13 und prostataspe-

zifische Antigene (PSA). Mit entsprechenden Liganden dieser Rezeptoren ausgestattete Liposomen können somit spezifisch gesteuert werden. In Frage kommen zum Beispiel Antikörper, Nukleinsäuren, Proteine, Peptide, niedermolekulare Verbindungen, Carbohydrate etc.^[70]

Oberflächenmodifikationen werden auch zur Stabilitätsverbesserung von Liposomen verwendet. So erschwert die Verwendung PEGylierter Lipide durch sterische Hinderung die Konfluenz kleiner Partikel zu großen Partikeln. Beispiele dafür sind Doxil®, Comirnaty® und Onivyde® (Irinotecan). PEGylierung erhöht die Zirkulationszeit nach intravenöser Applikation und vergrößert das passive *targeting* mittels EPR-Effekt.

1.4.2 Herstellung von Liposomen

Liposomen bilden sich selbsttätig durch thermodynamisch gesteuerte Anordnung der Phospholipide während einer fortlaufenden Hydratation. Dabei richten sich die polaren Kopfgruppen der Phospholipide zur wässrigen Phase aus, während die lipophilen Fettsäurereste selbst eine lipophile Phase bilden. Hierbei entstehen Liposomen unterschiedlicher Größe und Lamellarität. Nachgelagerte Uniformierungs-, Reinigungs- und Beladungsprozesse führen zu den gewünschten Formulierungen.

1.4.2.1 Filmmethode

Eine Lösung der Lipide in organischem Lösungsmittel, meist Chloroform, Methanol oder eine Mischung aus beiden, wird im Teilvakuum unter Beachtung der Phasenübergangstemperatur eingeeengt und das Lösungsmittel entfernt.

Anschließend wird durch Zugabe der wässrigen Phase, beispielsweise Puffer oder Wasser mit eingestellter Ionenstärke, die Bildung von Liposomen ausgelöst. Dabei entstehen in der Regel MLV, welche noch uniformiert werden müssen.

Eine Möglichkeit der Herstellung von SUV besteht darin, die mittels Filmmethode erzeugten MLV mehrfach unter hohem Druck durch eine Membran entsprechender Porengröße (z.B. 100 nm) zu extrudieren, wobei durch mechanische Einflüsse SUV gebildet werden. Der Verlust an Lipiden und gegebenenfalls Arzneistoff ist bei dieser Methode relativ groß.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anwendung von Ultraschall auf die Dispersion der MLV. Ultraschall zerstört multilamellare Strukturen und erzeugt SUV. Insbesondere bei Verwendung von ungesättigten Fettsäuren sollte diese Methode zur Verhinderung von Lipidoxidation unter Stickstoff ausgeführt werden.^[81]

Aufgrund der großen Anzahl anpassbarer Parameter während des Herstellungsprozesses, stellt die Filmmethode insbesondere zu Forschungszwecken einen geeigneten Weg zur Herstellung von Liposomen mit bestimmten Eigenschaften dar und wurde in dieser Arbeit zur Produktion der untersuchten Liposomen verwendet.

1.4.2.2 Hochdruckhomogenisation / Mikrofluidisierung

Durch mehrfaches Pumpen einer Phospholipiddispersion unter hohem Druck durch eine Interaktionskammer, werden MLV durch Mikrokavitation, Scher- und Stoßkräfte zu SUV verarbeitet. Diese Methode bietet insbesondere die Möglichkeit große Volumina kontinuierlich und reproduzierbar herzustellen und verringert im Vergleich zur Filmmethode die Exposition der verwendeten Bestandteile gegenüber externen Einflüssen deutlich.^[81]

1.4.2.3 Lösungsmittelinjektion

Die Lipide werden in einem organischen Lösungsmittel gelöst und in einen großen Überschuss einer wässrigen Phase injiziert. In Abhängigkeit des gewählten Lösungsmittels (Siedepunkt), des angelegten (Unter)drucks, der Temperatur und der Injektionsgeschwindigkeit werden unilamellare Liposomen im Bereich von 80–300 nm erhalten. Diese Methode benötigt keine weitere Behandlung wie Extrusion oder Ultraschalluniformierung. Im Anschluss muss jedoch meist ein Reinigungsschritt durchgeführt werden, um das verwendete Lösungsmittel zu entfernen.^[70]

1.4.2.4 Emulsifikationsmethode

Bei dieser Methode wird zunächst eine Emulsion unter Zuhilfenahme von Detergenzien hergestellt. Die Konzentration und Auswahl des Detergens beeinflusst die Teilchengröße und Teilchengrößenverteilung. Im Anschluss wird das Detergens mittels Dialyse entfernt.

1.4.3 Beladung von Liposomen

Generell kann die Beladung von Liposomen aktiv oder passiv erfolgen. Der passive Ansatz basiert auf dem Einschluss der Substanz während des Bildungsprozesses des Liposomens. Dabei wird die Substanz in der Regel in einem organischen Lösungsmittel gelöst und zusammen mit den gelösten Lipiden verarbeitet. Mit optimierten Parametern können dabei hohe Beladungseffektivitäten erreicht werden.

Die aktive Beladung zeichnet sich dadurch aus, dass zunächst die Liposomen produziert werden. In einem sich der Herstellung anschließenden Schritt werden die Arzneistoffe eingeführt. Das kann zum Beispiel durch pH-Gradienten (Doxil®) oder Ionengradienten (Onivyde®) erfolgen. Dabei diffundiert der Arzneistoff aus dem umgebenden wässrigen Medium ins Innere des Liposoms. Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung von Ultraschall oder die kovalente Bindung von Arzneistoffen an Phospholipide, welche dann zu Liposomen verarbeitet werden.^[70]

1.4.4 Charakterisierung von Liposomen

Die wichtigsten Parameter zur Beurteilung der liposomalen Formulierung sind die mittlere Größe (hydrodynamischer Durchmesser) sowie die Größenverteilung (Polydispersitätsindex) der Liposomen. Sie geben Aufschluss über die Qualität und Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode sowie über die Stabilität der Formulierung (Veränderung über die Zeit). Das Zeta-Potential gibt Auskunft über die Gesamtladung der Teilchen und erlaubt Rückschlüsse auf die Stabilität sowie die biophysikalischen Eigenschaften der Liposomen. Aus der eingesetzten Menge Substanz und den erzielten Konzentrationen in der finalen Dispersion lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf den Herstellungsprozess ziehen. Anhand dieser Parameter wird die Herstellungsmethode beurteilt und gegebenenfalls angepasst.

1.5 Zielstellung

Pentathiepine wurden als Substanzklasse mit vielfältigen biologischen Eigenschaften identifiziert. Es wurden multiple Effekte beschrieben, die wahrscheinlich auf die Aktivierung durch Thiole, hauptsächlich Glutathion, zurückzuführen sind: die Fragmentierung von DNA und die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies. Gleichzeitig wurde in weiteren Experimenten herausgefunden, dass Pentathiepine als Feststoff stabil sind, jedoch in Lösung und insbesondere in Gegenwart von Basen und Nukleophilen wie Thiolen relativ schnell angegriffen und abgebaut werden. Daraus ergaben sich mehrere Forschungsfragen, die in dieser Arbeit bearbeitet werden sollten.

Zum einen sollte herausgefunden werden, ob es sich bei der Hemmung der Glutathionperoxidase um eine irreversible Hemmung handelt, wie es für Mercaptobernsteinsäure beschrieben ist. Gleichzeitig sollte betrachtet werden, ob für die Hemmung der bovinen Glutathionperoxidase der Pentathiepinring in intakter Form nötig ist, oder ob eventuelle

Abbauprodukte in Gegenwart von Thiolen zur Hemmung führen. Dafür sollten verschiedene Experimente an der GPx-1 mit unterschiedlichen Inkubationsbedingungen, sowie mit *in-situ* erzeugten Abbauprodukten erfolgen.

Zum anderen ergab sich aus der Beobachtung, dass Pentathiepine unterschiedliche Reaktivität gegenüber Glutathion zeigen, die Fragestellung inwieweit diese Reaktivität die biologischen Wirkungen beeinflusst. Dafür sollte systematisch untersucht werden, ob strukturelle Gründe für die unterschiedliche Reaktivität gefunden werden können. Im Vorlauf war es nötig, geeignete Umkehrphasen-hochleistungsflüssigkeitschromatographische (RP-HPLC) sowie UV-Vis-spektroskopische Methoden zu etablieren, mit denen die Stabilität in Gegenwart von Glutathion untersucht werden konnte.

Eine dritte Fragestellung ergab sich aus der Reaktivität der Pentathiepine gegenüber Glutathion. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Mihaela Delcea sollte ein Modellträgersystem von Pentathiepinen mittels Liposomen entwickelt werden, welches die Frage beantworten sollte, ob Liposomen ein geeignetes Vehikel für den Transport von Pentathiepinen darstellen. Primäre Ziele der liposomalen Formulierung sollte der Schutz des Pentathiepins vor Glutathion sowie die Erhöhung der Wasserlöslichkeit sein. Die Produktion und Auswahl geeigneter Methoden lag dabei in Hand des Arbeitskreises von Prof. Dr. Mihaela Delcea. Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur Konzentrationsbestimmung sowie zur Beurteilung der Lipophilie der Pentathiepine. Die mit diesen Methoden erzielten Ergebnisse sollten anschließend zur Optimierung der Herstellungsmethode verwendet werden. Ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Bewertung der Stabilität des verwendeten Pentathiepins in Liposomen, die Wasserlöslichkeit sowie die biologische Aktivität hinsichtlich der antiproliferativen Wirkung des liposomalen Pentathiepins.

2 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in fünf wesentliche Teile gegliedert. Nach Feststellung der Reinheit der untersuchten Pentathiepine wird zunächst auf die Beurteilung der Lipophilie der verwendeten Pentathiepine eingegangen. Nach den anschließenden Experimenten zur Stabilität der Pentathiepine in Gegenwart von GSH werden Untersuchungen an und mit der GPx-1 aufgeführt. Zur Stabilitäts- und Löslichkeitsverbesserung wurden Liposomen als Substanzträger verwendet. Dafür wird die Etablierung eines analytischen Verfahrens zur Konzentrationsbestimmung eines Pentathiepins in Liposomen, sowie daraufhin die Veränderung ausgewählter Eigenschaften des Pentathiepins durch die Beladung auf Liposomen behandelt.

2.1 Untersuchungen zur Reinheit der untersuchten Pentathiepine

Bevor die untersuchten Pentathiepine für biologische Assays verwendet wurden, mussten sie auf ihre Reinheit geprüft werden, um durch Abbauprodukte oder zu geringen Gehalt verfälschte Ergebnisse zu verhindern. Zur Bestimmung der Reinheit der Pentathiepine wurde eine RP-HPLC-Methode ausgewählt. Die Auswertung erfolgte mittels 100%-Flächenmethode. Die unter 5.3.1 beschriebene RP-HPLC-Methode zeigte sich geeignet, die Pentathiepine in relativ kurzen Laufzeiten (≤ 10 min) zu untersuchen. Die mobile Phase wurde für jede Substanz dahingehend optimiert, dass die Retentionszeit t_R des Analyten mindestens der doppelten Durchflusszeit t_M des chromatographischen Systems von 0,72 min entspricht um ausreichende Selektivität sowie Spezifität zu gewährleisten. Eine auf die Peakflächen bezogene Reinheit von über 95 % wurde als ausreichend angesehen. Alle untersuchten Pentathiepine sind in Kapitel 5.1 mit ihrer Strukturformel, der Herkunft, sowie zur besseren Rückverfolgbarkeit mit der entsprechenden Trivialbezeichnung gelistet. Tabelle 3 beinhaltet die Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen.

Tabelle 3: Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen an Pentathiepinen. Angegeben sind die Retentionszeit t_R des Analyten, die Volumenanteile φ der Komponenten der mobilen Phase in %, sowie der prozentuale Flächengehalt der Analyse. Alle untersuchten Pentathiepine sind in Kapitel 5.1 auf Seite 115 mit ihrer Strukturformel aufgelistet. Fortsetzung auf der folgenden Seite

Pentathiepin	t_R / min	Eluent	Reinheit / %
1	1,44	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,25
2	4,67	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,42
3	1,61	Acetonitril/Wasser (75/25)	100,00
4	2,50	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,19
5	1,59	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,80
6	2,11	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
7	3,97	Acetonitril/Wasser (80/20)	98,80
8	1,47	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
9	2,87	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
10	1,65	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
11	3,41	Acetonitril/Wasser (70/30)	100,00
12	5,16	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,27
13	4,39	Acetonitril/Wasser (70/30)	100,00
14	2,55	Acetonitril/Wasser (60/40)	100,00
15	1,71	Acetonitril/Wasser (50/50)	99,50
16	3,21	Acetonitril/Wasser (80/20)	95,59
17	2,32	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,27
18	2,85	Acetonitril/Wasser (80/20) ¹	95,27
19	3,25	Acetonitril/Wasser (80/20)	96,32
20	2,59	Acetonitril/Wasser (80/20)	93,27
21	3,00	Acetonitril/Wasser (80/20)	95,94
22	4,16	Acetonitril/Wasser (80/20) ¹	95,18
23	2,86	Acetonitril/Wasser (80/20)	92,72
24	2,63	Acetonitril/Wasser (80/20)	98,39
25	5,31	Acetonitril/Wasser (80/20) ¹	96,53
26	6,45	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
27	3,95	Acetonitril/Wasser (80/20)	37,99
28	3,07	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,07
29	3,82	Acetonitril/Wasser (80/20)	94,92
30	6,21	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
31	4,76	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00
32	5,67	Acetonitril/Phosphatpuffer pH=2 (70/30)	97,79
33	2,13	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,77
34	1,41	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,55

¹ Abweichend von der allgemeinen Vorschrift der Methode wurde eine Elution mit 1 mL min⁻¹ verwendet.

Tabelle 3: Fortsetzung von Seite 24: Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen an Pentathiepinen. Angegeben sind die Retentionszeit t_R des Analyten, die Volumenanteile φ der Komponenten der mobilen Phase in %, sowie der prozentuale Flächengehalt der Analyse

Pentathiepin	t_R / min	Eluent	Reinheit / %
35	1,89	Acetonitril/Wasser (80/20)	99,30
36	1,49	Acetonitril/Wasser (75/25)	100,00
37	1,58	Acetonitril/Wasser (80/20)	100,00

Wie in Tabelle 3 ersichtlich ist, liegen fast alle Pentathiepine in der geforderten Reinheit vor. Lediglich die Substanzen **20**, **23**, sowie **27** sind nicht rein genug für eine biologische Testung und konnten auch durch weitere Schritte nicht aufgereinigt werden. Sie wurden daher von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Pentathiepin **29** weist einen gerundeten Gehalt von 95 % auf und wurde unter Angabe dieser Reinheit bereits in BEHNISCH-CORNWELL *et al.* 2019^[82] publiziert.

2.2 Untersuchungen zum Verteilungskoeffizienten ($\log P$) von Pentathiepinen

Der *n*-Octanol-Wasser-Koeffizient P beschreibt das Verhältnis der Massen beziehungsweise der Konzentrationen eines Stoffes nach Verteilung zwischen einer wässrigen und einer *n*-Octanol-Phase. Er ist ein wichtiger Faktor zur Abschätzung der Löslichkeit und Verteilung einer Substanz in physiologischen Medien und Zellen. Zur Beurteilung der Lipophilie der Pentathiepine sollte der $\log P$ -Wert der Pentathiepine bestimmt werden. Die mittels Schrödinger QikProp berechneten $\log P$ -Werte für die Pentathiepine lagen zwischen 4 und 8.

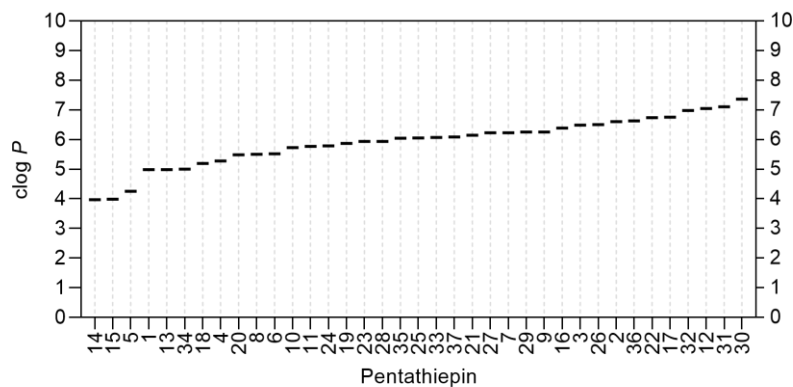


Abbildung 12: clog P -Werte für Pentathiepine. Die Berechnung erfolgte mittels Schrödinger QikProp Algorithmus². Ersichtlich ist, dass alle errechneten Werte zwischen 4 und 8 liegen, wobei Pentathiepin **14** den geringsten und Pentathiepin **30** den höchsten Wert aufweist

Zunächst wurde versucht den log P -Wert mittels *shake-flask*-Methode zu bestimmen. Aufgrund der hohen erwarteten log P -Werte war eine Detektion der Pentathiepine in der wässrigen Phase ohne Änderungen der Methode nicht möglich. Die *shake-flask* Methode wurde dafür zur *slow-stirring*-Methode modifiziert, welche den Einsatz kleiner Mengen *n*-Octanol und großer Mengen Wasser sowie anschließender Aufkonzentrierung auf einer Festphase vorsieht. Dieses Vorgehen soll die Emulsionsbildung zwischen *n*-Octanol und Wasser minimieren, welche bei hohen Verteilungskoeffizienten einen großen Einfluss auf das gemessene Ergebnis hat.^[83, 84] Die Experimente verliefen jedoch ergebnislos, da in der wässrigen Phase keine Substanz nachgewiesen werden konnte, was log P -Werten weit oberhalb von 8 entsprochen hätte. Letztendlich erwies sich die Methode als ungeeignet, da sich die verwendeten Pentathiepine sowohl an den verwendeten Teflon-Schläuchen, als auch an der Teflon-Oberfläche der Rührfische anlagerten:

² Berechnungen durchgeführt durch Dr. Lukas Schulig im Arbeitskreis Prof. Dr. Andreas Link, Institut für Pharmazie, Universität Greifswald

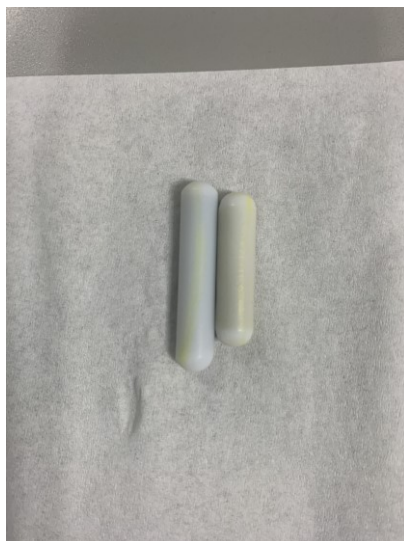


Abbildung 13: Gelbliche Pentathiepinanlagerung auf der eigentlich weißen Teflonoberfläche der verwendeten Rührfische

Aufgrund dessen und der aus Abbildung 12 ersichtlichen sehr hohen $\log P$ -Werte, wurde eine RP-HPLC-Methode zur Abschätzung des Verteilungskoeffizienten durch die Bestimmung der Kapazitätsfaktoren k' der Pentathiepine verwendet (siehe Kapitel 5.3.2). Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

2.2.1 Bestimmung unter Verwendung einer sphärischen RP-HPLC-Säule

Die ersten Versuche wurden mit der Säule MN EC 150/4.6 Nucleosil 100-5 C18 HD vorgenommen. Dabei handelt es sich um eine *endcapped* RP-18-Säule hoher Lipophilie. Mittels dieser Säule und der in Kapitel 5.3.2 aufgeführten Referenzen wurde das in Abbildung 14 dargestellte Referenz-Chromatogramm erhalten. Aus den Retentionszeiten wurde der korrespondierende Kapazitätsfaktor errechnet und dessen dekadischer Logarithmus gegen die Literatur $\log P$ -Werte der Referenzen aufgetragen:

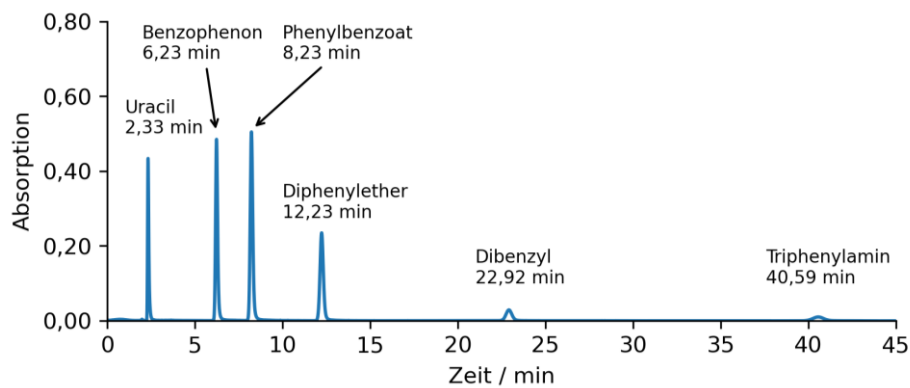


Abbildung 14: RP-HPLC-Chromatogramm der Referenzen zur $\log P$ -Wert-Abschätzung mittels sphärischer RP-HPLC-Säule. Methanol/Phosphatpuffer 10 mM pH=7,4 (75/25), 1 mL min^{-1} , MN EC 150/4.6 Nucleosil 100-5 C18 HD, Detektion $\lambda = 254 \text{ nm}$. Der erste Peak entspricht Uracil als Totzeitmarker (t_M)

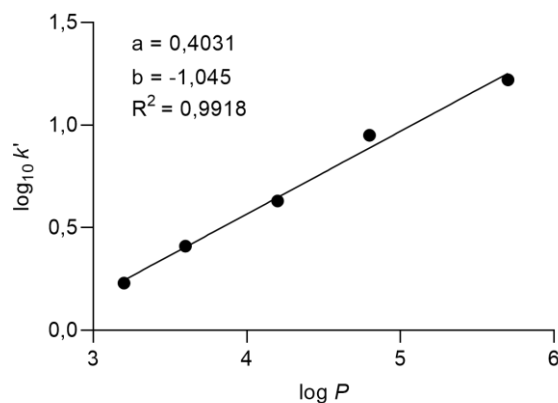


Abbildung 15: Kalibrierfunktion zur $\log P$ -Wert Abschätzung mittels sphärischer RP-HPLC-Säule. a = Anstieg der Kalibrierfunktion; b = Y-Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

Aus der so erhaltenen Kalibrierfunktion wurden die korrespondierenden $\log P$ -Schätzwerte errechnet:

Tabelle 4: Übersicht über die Ergebnisse der $\log P$ -Schätzung mit sphärischer RP-HPLC-Säule. $t_M = 2,33 \text{ min}$

Substanz	Retentionszeit / min	Kapazitätsfaktor k'	$\log_{10} k'$	HPLC-Verteilungskoeffizient
14	27,77	10,92	1,04	5,24
15	6,95	1,98	0,30	3,42
11	48,99	20,03	1,30	>5,7 (5,89)
36	34,74	14,03	1,15	5,43

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Pentathiepin **11** zeigt eine Retentionszeit größer als der höchste Standard und liegt somit außerhalb

des kalibrierten Messbereiches. Somit weisen bereits Pentathiepine mit einem $\log P$ -Wert von etwa 6,0 sehr lange Retentionszeiten auf. Da laut Berechnungen deutlich höhere $\log P$ -Werte erwartet wurden, musste eine Möglichkeit gefunden werden, diese in deutlich geringerer Zeit zu messen. Dafür war die Verwendung einer alternativen RP-HPLC-Säule notwendig, um die Pentathiepine detektieren zu können. Auch wenn die Retentionszeiten höher sind, als der höchste Standard und eine Berechnung nur durch Extrapolation stattfinden kann, so ist doch die Bestimmung der Retentionszeit notwendig, um eine relative Aussage zum höchsten Standard zu treffen.

2.2.2 Bestimmung unter Verwendung einer monolithischen RP-HPLC-Säule

Mit der in Kapitel 2.2.1 verwendeten Methode sind sehr lange Retentionszeiten für hohe $\log P$ -Werte zu erwarten: 155 min ($\log P=6$), 510 min ($\log P=7$) bzw. 1900 min ($\log P=8$). Zur Detektion von Pentathiepine mit solch hohen $\log P$ -Werten war demnach ein System mit deutlich verkürzten Retentionszeiten notwendig. Die monolithische Säule Chromolith® SpeedRod RP18e 50-4,6 mm ermöglicht dies. Unter Verwendung der gleichen Referenzen wurden das Chromatogramm in Abbildung 16 sowie die daraus abgeleitete Kalibration in Abbildung 17 auf Seite 30 erhalten:

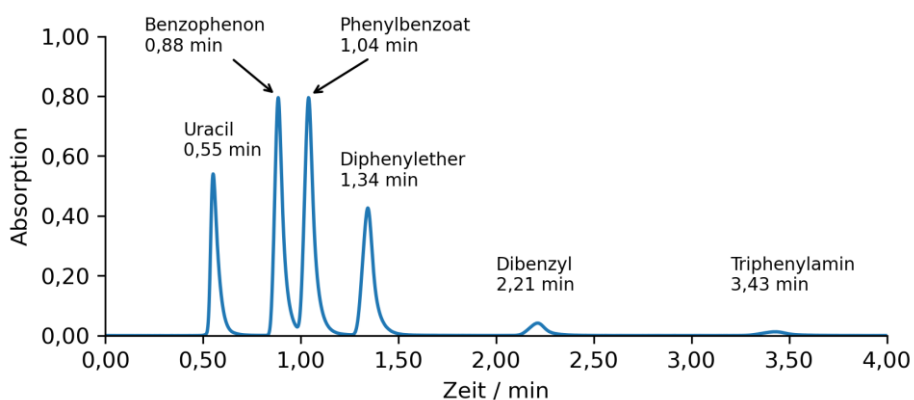


Abbildung 16: RP-HPLC-Chromatogramm der Referenzen zur $\log P$ -Wert Abschätzung mittels monolithischer RP-HPLC-Säule. Methanol/Phosphatpuffer 10 mM pH=7,4 (75/25), 1,5 mL min⁻¹, Chromolith® SpeedRod RP18e 50-4,6 mm, Detektion $\lambda=254$ nm. Der erste Peak entspricht Uracil als Totzeitmarker (t_M)

Aus den Retentionszeiten wurde der korrespondierende Retentionsfaktor errechnet und dessen Logarithmus gegen die Literatur $\log P$ -Werte der Referenzen aufgetragen.

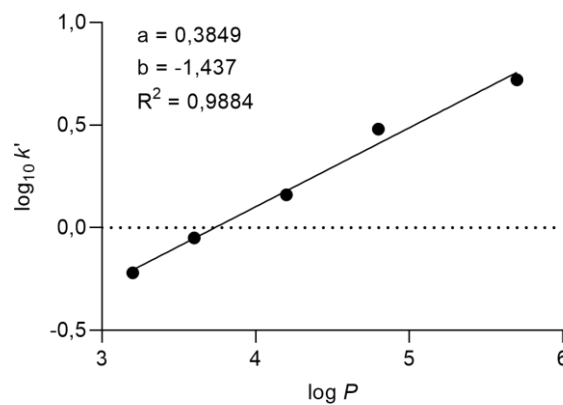


Abbildung 17: Kalibrierfunktion zur $\log P$ -Wert Abschätzung mittels monolithischer RP-HPLC-Säule. a = Anstieg der Kalibrierfunktion; b = Y-Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen, dass die Kalibration ebenfalls mit der monolithischen Säule durchgeführt werden kann, wodurch die Retentionszeiten drastisch verkürzt sind. Diese Methode konnte nun genutzt werden, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse mit der ersten Methode aus Kapitel 2.2.1 vergleichbar sind.

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse der $\log P$ -Schätzung mit monolithischer RP-HPLC-Säule. Die rechte Spalte stellt die Ergebnisse mit monolithischer und sphärischer RP-HPLC-Säule gegenüber, $t_M = 2,33$ min

Pentathiepin	Retentionszeit / min	Kapazitätsfaktor k'	$\log_{10} k'$	HPLC-Verteilungskoeffizient	
				monolithisch	sphärisch
14	2,82	4,13	0,62	5,34	5,24
15	0,96	0,75	-0,13	3,41	3,42
11	4,24	6,71	0,83	>5,7 (5,88)	>5,7 (5,89)

Tabelle 5 stellt die Werte, welche mit der monolithischen Säule erhalten wurden den Ergebnissen mit der sphärischen Säule gegenüber. Dabei zeigt sich, dass bei deutlich verringerten Retentionszeiten die Ergebnisse vergleichbar sind. Mit dieser Methode wurde fortgeföhren und die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse erhalten. Die mittels RP-HPLC bestimmten $\log P$ -Werte weichen im Mittel nach oben von den Berechnungen ab, wobei Werte zwischen 3,43 (**15**) und 7,93 (**7**) erhalten wurden.

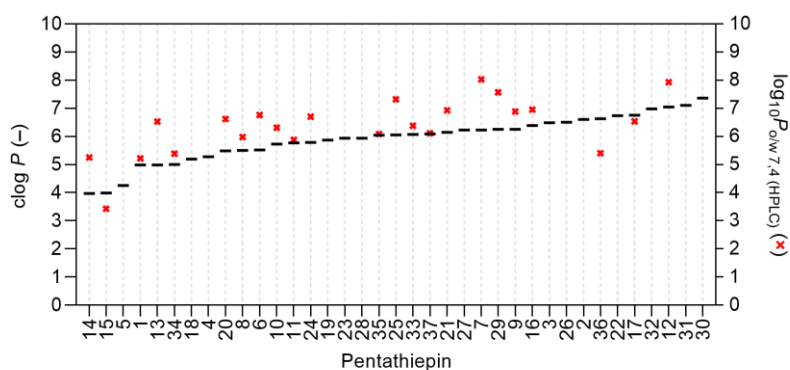


Abbildung 18: Errechnete $\log P$ und mittels RP-HPLC bestimmte $\log P$ -Werte für Pentathiepine. Die Berechnung erfolgte mittels Schrödinger QuikProp Algorithmus³. Ersichtlich ist, dass alle errechneten Werte (-) zwischen 4 und 8 liegen, wobei Pentathiepin **14** den geringsten (3,96) und Pentathiepin **30** den höchsten (7,36) Wert aufweist. Die experimentell bestimmten Werte (x) sind zusätzlich aufgetragen

2.2.3 Quantifizierung des Einflusses des Pentathiepinrings auf den Verteilungskoeffizienten

Um den Einfluss des Pentathiepinrings allein auf den Verteilungskoeffizienten der untersuchten Pentathiepine isoliert quantifizieren zu können, wurde ein Analogon benötigt, welches kein Pentathiepin besitzt. Es bot sich aufgrund der Verfügbarkeit des für die Synthese von **25** genutzten Eduktes an, den Versuch mit Pentathiepin **25** durchzuführen.

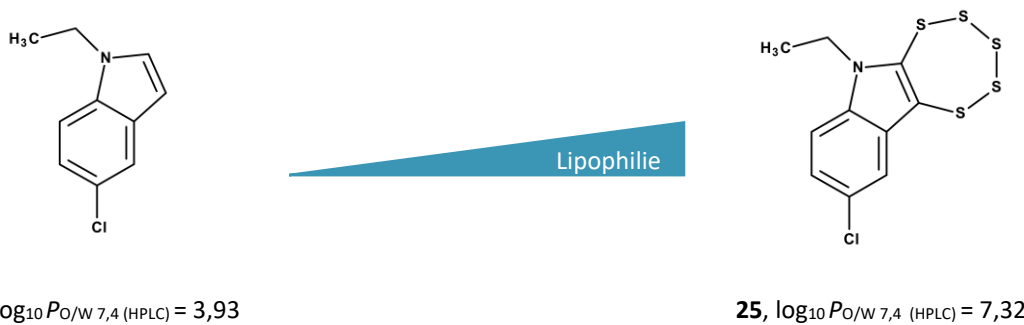


Abbildung 19: Erhöhung der Lipophilie um mehrere Größenordnungen durch Anellierung eines Pentathiepinrings

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass die Lipophilie von **25E** durch Anellierung des Pentathiepinrings zu Pentathiepin **25** um mehr als drei Größenordnungen zunimmt.

³ Berechnungen durchgeführt durch Dr. Lukas Schulig im Arbeitskreis Prof. Dr. Andreas Link, Institut für Pharmazie, Universität Greifswald

2.2.4 Zusammenfassung der Untersuchungen zum Verteilungskoeffizienten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mithilfe einer monolithischen Säule möglich war, die $\log P$ -Werte der Pentathiepine bei $\text{pH}=7,4$ mittels RP-HPLC abzuschätzen. Die bestimmten Werte liegen in einem Bereich von etwa 4 bis 8 und unterscheiden sich damit innerhalb der Pentathiepine um mehrere Größenordnungen. Die am Computer berechneten Werte $\text{clog} P$ weisen für fast alle Pentathiepine eine Abweichung nach unten auf, was dafür spricht, dass der verwendete Algorithmus den Einfluss des Pentathiepinrings unterschätzt. Die errechneten und bestimmten Werte sind in der folgenden Tabelle 6 numerisch dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht berechneter ($\text{clog} P$) und chromatographisch bestimmter $\log P$ -Werte

Struktur	$\text{clog} P_{o/w}$	$\log P_{o/w} 7.4 \text{ HPLC}$
1	4,98	5,22
6	5,52	>5,7 (6,76)
7	6,23	>5,7 (8,03)
8	5,50	>5,7 (5,98)
9	6,25	>5,7 (6,89)
10	5,72	>5,7 (6,31)
11	5,77	>5,7 (5,88)
12	7,04	>5,7 (7,93)
13	4,98	>5,7 (6,53)
14	3,96	5,25
15	3,98	3,43
16	6,38	>5,7 (6,95)
17	6,75	>5,7 (6,54)
20	5,49	>5,7 (6,62)
21	6,14	>5,7 (6,93)
24	5,78	>5,7 (6,70)
25	6,05	>5,7 (7,32)
29	6,25	>5,7 (7,57)
33	6,06	>5,7 (6,38)
34	5,00	5,39
35	6,04	>5,7 (6,09)
36	6,63	5,40
37	6,08	>5,7 (6,11)

2.3 Untersuchungen zur Stabilität von Pentathiepinen in Gegenwart von Glutathion

Die Pentathiepine, die bisher untersucht wurden, sind prinzipiell gegenüber GSH instabil – auch bei bereits sehr geringen Konzentrationen. Dies wirft die Frage auf, ob es einen Zusammenhang zwischen Stabilität und Struktur des Pentathiepins und weiterführend zwischen Stabilität und biologischer Aktivität gibt.

2.3.1 Ergebnisse der Voruntersuchungen

Die Stabilität unterschiedlicher Pentathiepine wurde zuerst unter den gleichen Bedingungen, wie im GPx-Assay vorgeschrieben, untersucht, d.h. in wässrigem Medium bei pH=7,4 und in Gegenwart von 250 μM GSH bei Raumtemperatur. Dafür wurden die Pentathiepine **25**, **26**, **33**, **36** sowie **37** wie in Kapitel 5.3.3 beschrieben in Acetonitril zu 20 μM gelöst. Sofort nach Zusatz von GSH wurde eine chromatographische Messung durchgeführt. Aller 10 min wurde ein weiteres Chromatogramm aufgenommen. Die Ergebnisse für Pentathiepin **25** sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

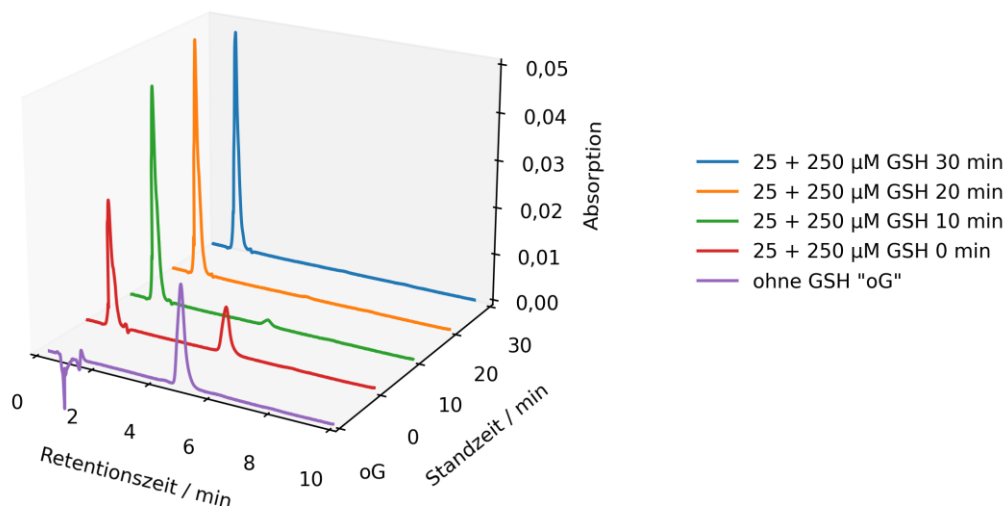


Abbildung 20: RP-HPLC-Chromatogramme zur Stabilität von Pentathiepin **25** in Gegenwart von 250 μM GSH. Acetonitril/Wasser (80/20), 1,0 mL min^{-1} , Chromolith® SpeedRod RP18e 50–4,6 mm, Detektion $\lambda=240\text{--}260\text{ nm}$ integriert. Der Peak bei etwa 5 min stellt den Substanzpeak dar

Aus Abbildung 20 lassen sich die folgenden Aussagen entnehmen. Substanz **25** ist in Gegenwart von 250 μM GSH so instabil, dass bereits die Zeit von Zugabe von GSH bis zur ersten Injektion einen maßgeblichen Substanzabbau und hieraus resultierend eine dementsprechende Reduktion der Peakfläche zufolge hat, sodass die Probe zum Zeitpunkt $t=0\text{ min}$ nicht als Kontrolle geeignet ist. Beim Abbauprodukt scheint es sich um ein hydrophileres

Molekül zu handeln, da der Peak bei 1,0 min mit der Zeit in der Fläche zunimmt. Dieselbe Untersuchung wurde mit den vier anderen genannten Pentathiepinen ebenfalls durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Es zeigten sich zwischen den Pentathiepinen sehr starke Unterschiede hinsichtlich ihrer Stabilität in Gegenwart von 250 μM GSH.

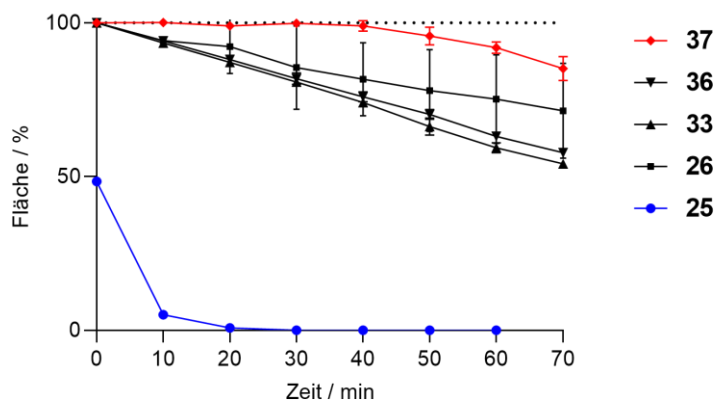
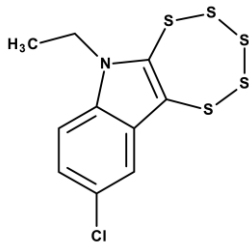


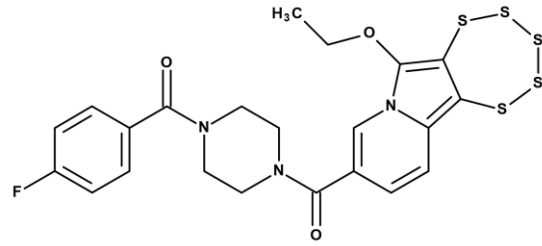
Abbildung 21: Vergleich der Pentathiepine **25**, **26**, **33**, **36** sowie **37** hinsichtlich ihrer Stabilität in Gegenwart von 250 μM GSH mittels RP-HPLC. $c_{(\text{GSH})} = 250 \mu\text{M}$, $c_{(\text{Pentathiepine})} = 5 \mu\text{M}$, 23 °C, blau: Struktur **25**, instabilste Substanz; rot: Struktur **37**, stabilste Substanz. Der prozentuale Flächenanteil ist die Fläche des Hauptpeaks im jeweiligen Chromatogramm bezogen auf die erste Injektion oder die Kontrollinjektion ohne GSH \pm SD

Um die Unterschiede in der Stabilität genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Herrn Tom Schöne an sechs neuen Pentathiepinen aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Carola Schulzke mit unterschiedlichen Grundgerüsten systematisch die Stabilität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Tabelle 7 enthält eine Übersicht über die verwendeten Pentathiepine, ihre IUPAC-Namen sowie Kurzbezeichnungen zur besseren Nachverfolgbarkeit. Im Rahmen der Untersuchungen wurden somit die Grundgerüste Indol, Indolizin, Pyrrolopyrazin sowie Pyrrolochinoxalin einer näheren Betrachtung unterzogen.

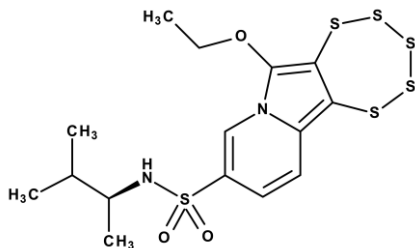
Tabelle 7: Übersicht der Strukturen sowie IUPAC-Bezeichnungen der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine. Zusätzlich angegeben ist ein Kurzname mit Bezug auf das strukturelle Grundgerüst zur vereinfachten Übersicht



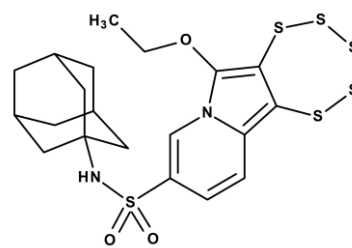
Pentathiepin **25** / **IN-1**



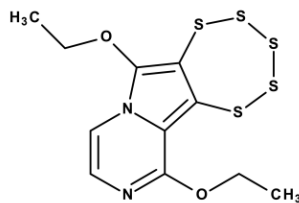
Pentathiepin **36** / **IZ-1**



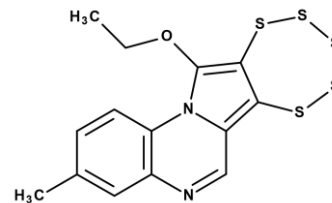
Pentathiepin **6** / **IZ-2**



Pentathiepin **7** / **IZ-3**



Pentathiepin **9** / **PP-1**



Pentathiepin **29** / **PC-1**

Bezeichnung	IUPAC-Name	Kurzname
6	<i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-1,2-Dimethylpropyl]-6-ethoxy-[1,2,3,4,5]pentathiepino[6,7- <i>a</i>]indolizin-9-sulfonamid	IZ-2
7	<i>N</i> -[(3 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 7 <i>S</i>)Adamantan-1-yl]-6-ethoxy-[1,2,3,4,5]pentathiepino[6,7- <i>a</i>]indolizin-9-sulfonamid	IZ-3
9	6,11-Diethoxy-[1,2,3,4,5]pentathiepino[6',7':3,4]pyrrolo[1,2- <i>a</i>]pyrazin	PP-1
25	9-Chlor-6-ethyl-6 <i>H</i> -[1,2,3,4,5]pentathiepino[6,7- <i>b</i>]indol	IN-1
29	12-Ethoxy-3-methyl-[1,2,3,4,5]pentathiepino[6',7':3,4]pyrrolo[1,2- <i>a</i>]chinoxalin	PC-1
36	(6-Ethoxy-[1,2,3,4,5]pentathiepino[6,7- <i>a</i>]indolizin-9-yl)[4-(4-fluorbenzoyl)piperazinyl]methanon	IZ-1

2.3.2 Stabilitätsuntersuchungen mittels RP-HPLC

Die Prüfung der Stabilität der Pentathiepine wurde gemäß den HPLC-Bedingungen in Kapitel 5.3.3 vorgenommen. Die Ergebnisse für die Inkubation mit 250 μM GSH sind in Abbildung 22 dargestellt.

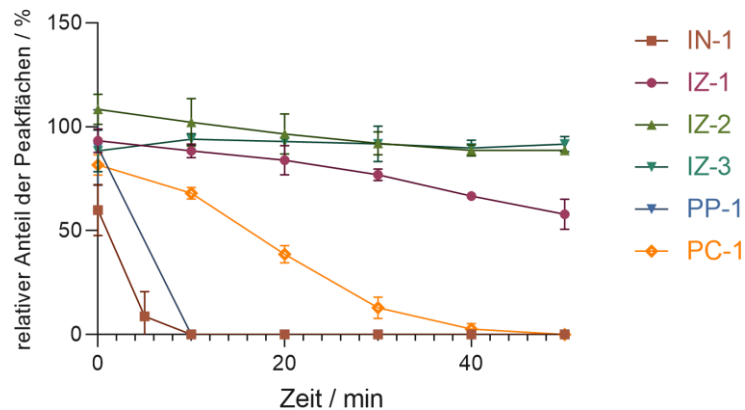


Abbildung 22: Vergleich der Pentathiepine **IN-1**, **IZ-1**, **IZ-2**, **IZ-3**, **PP-1** sowie **PC-1** hinsichtlich ihrer Stabilität in Gegenwart von 250 μM GSH mittels RP-HPLC. $c_{(\text{Pentathiepine})} = 5 \mu\text{M}$, Inkubation bei 23 °C. Darstellung der Mittelwerte aus drei Versuchen, Fehlerbalken sind Standardabweichung, relativer Anteil bezogen auf eine Kontrollinjektion ohne GSH, Grafik aus SCHÖNE 2022^[85]

In Abbildung 22 sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der untersuchten Pentathiepine in Gegenwart von 250 μM GSH zu erkennen. Während die Verbindungen **IN-1** und **PP-1** bereits nach 10 min nicht mehr nachweisbar waren, ist der Abbau der Pentathiepine mit einem Indolizingrundgerüst, **IZ-1–3**, nach 50 min relativ gering. Die Stabilität von **PC-1** liegt dazwischen, es ist erst nach 50 min vollständig abgebaut. Da es sich bei der Glutathionkonzentration von 250 μM lediglich um eine artifizielle, dem GPx-Assay entlehnte Konzentration handelt, wurde der Versuch mit höheren GSH-Konzentrationen wiederholt, die zwischen 1 und 12 mM liegen und den Zustand in Zellen besser nachahmen.^[86] Die Ergebnisse der Versuche mit 1 bzw. 10 mM sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Unterschiede der einzelnen Pentathiepine lassen sich deutlich erkennen. Während das Indolderivat **IN-1** bereits in Gegenwart von 1 mM GSH beim ersten Messpunkt nicht mehr nachweisbar war, zeigten die Indolizinderivate eine deutlich höhere Stabilität, wobei in Gegenwart von 10 mM GSH **IZ-1** erst nach 10 min und **IZ-2** erst nach 20 min vollständig abgebaut war. Auf die außerordentliche Stabilität von **IZ-3** wird in der Diskussion in Kapitel 3.1.3 näher eingegangen. Die Abbildung zeigt auch die Nachteile der RP-HPLC-Methode zur Bestimmung der Stabilität von Pentathiepinen in Gegenwart von GSH. Bereits ab 1 mM GSH lassen sich die Unterschiede zwischen den Pentathiepine **IN-1**, **PP-1** und

PC-1 nicht mehr darstellen. Eine vergleichende Auswertung ist dadurch bei hohen Konzentrationen nicht mehr möglich.

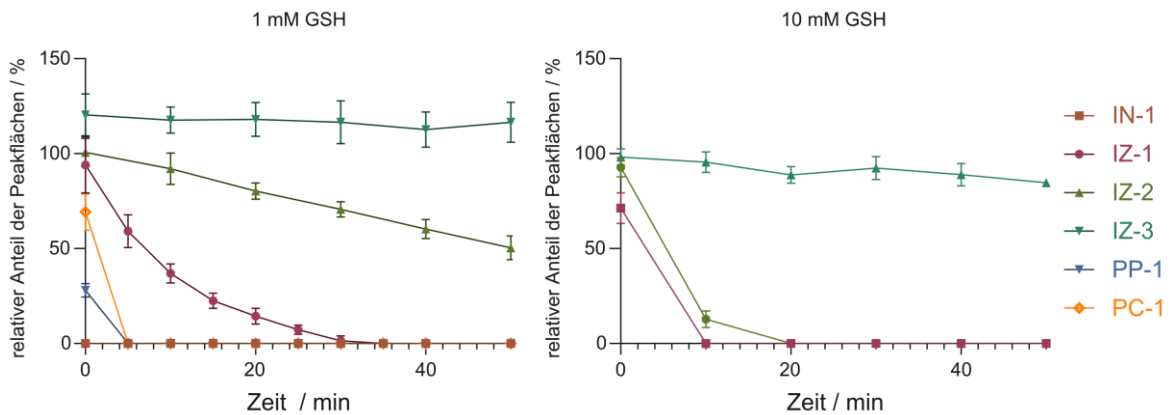


Abbildung 23: RP-HPLC-Abbaukurven der Pentathiepine bei 1 und 10 mM GSH. $C_{\text{Pentathiepine}} = 5 \mu\text{M}$, 23°C . Darstellung der Mittelwerte aus drei Versuchen, Fehlerbalken sind Standardabweichung, relativer Anteil bezogen auf eine Kontrollinjektion ohne GSH^[85]

Das ist insofern relevant, als dass intrazelluläre Glutathionkonzentrationen bis zu 12 mM gemessen worden sind.^[86] Auch in extrazellulären Räumen kommt GSH in niedrigen Konzentrationen vor.^[87] Vorhersagen zum Verhalten unter physiologischen Bedingungen sind so kaum möglich. Benötigt wurde ein Messsystem, mit dem sehr kurze Messabstände möglich waren, um bei höheren GSH-Konzentrationen zu messen. Ein solches Messsystem stellt sich in einem Diodenarray-Spektralphotometer dar, welches Messung im Abstand weniger Sekunden aufnehmen kann.

2.3.3 Untersuchungen mittels UV-Vis-Diodenarray-Spektralphotometer

Die UV-Vis-spektroskopische Messung mittels eines Diodenarray-Spektralphotometers wurde gewählt, um kurze Messabstände (bis 10 s) zu ermöglichen und somit die Stabilitäten der Pentathiepine bei hohen Glutathionkonzentrationen quantifizieren zu können. Der experimentelle Aufbau ist in Kapitel 5.3.4 ausführlich beschrieben.

2.3.3.1 Bestimmung des Einflusses des Pentathiepinrings auf das UV-Vis-Spektrum

Um den Abbau des Pentathiepinrings anhand des UV-Vis-Spektrums bestimmen zu können, ist es nötig, die Beteiligung des Pentathiepinrings am gesamten UV-Vis-Spektrum der Substanz zu kennen. Für die Substanz IN-1 war die Synthesevorstufe ohne Pentathiepinring aufgrund des Syntheseweges leicht zugänglich.^[42] Das Ergebnis des Vergleichs ist in

Abbildung 24 dargestellt. Die farblose Lösung von 5-Chlor-*N*-ethylindol weist keine Absorption oberhalb von $\lambda=310\text{nm}$ auf. Durch Anellierung des Pentathiepinrings kommt es zur Ausbildung eines breiten Peaks mit Maximum bei $\lambda=340\text{nm}$, was die gelbe Farbe des Pentathiepins und dessen Lösung erklärt. Ein Absorptionsmaximum oberhalb von 350nm war für alle Pentathiepine im UV-Vis-Spektrum messbar und wird dem Pentathiepinring zugeschrieben.^[85] So konnte das langwelligste Absorptionsmaximum zur Quantifizierung des Pentathiepins herangezogen werden.

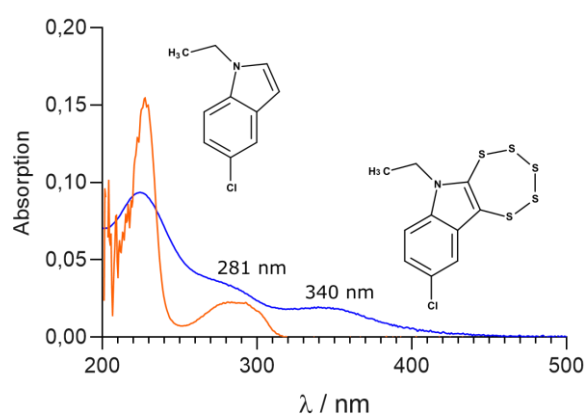


Abbildung 24: UV-Vis-Spektrenvergleich von **IN-1** und seiner Vorstufe. Aufgenommen bei $5\ \mu\text{M}$ in GPx-Puffer ($\text{pH}=7,4$, $T=23\ \text{°C}$, $d=1\ \text{cm}$). Orange: 5-Chlor-*N*-ethylindol, Blau: **IN-1**^[85]

Die spektroskopischen Daten der untersuchten Pentathiepine sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Eine Übersicht über die Absorptionsspektren findet sich in Abbildung 25. Die aufgenommenen Differenzspektren sind in Abbildung 26 auf Seite 40 dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der spektroskopischen Kenndaten der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine. $5\ \mu\text{M}$ in GPx-Puffer ($\text{pH}=7,4$, $T=23\ \text{°C}$, $d=1\ \text{cm}$).^[85]

Verbindung	Wellenlänge Maxima (nm)	Absorption	ϵ in $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
IN-1	224,0	0,093590	18718
	340,0	0,019199	3840
IZ-1	242,0	0,127689	25538
	410,0	0,022938	4588
IZ-2	252,5	0,143238	28648
	406,0	0,026556	5311
IZ-3	256,0	0,177205	35441
	403,0	0,041790	8358
PP-1	234,0	0,124035	24807
	380,0	0,029147	5829
PC-1	254,0	0,112625	22525
	398,0	0,034523	6905

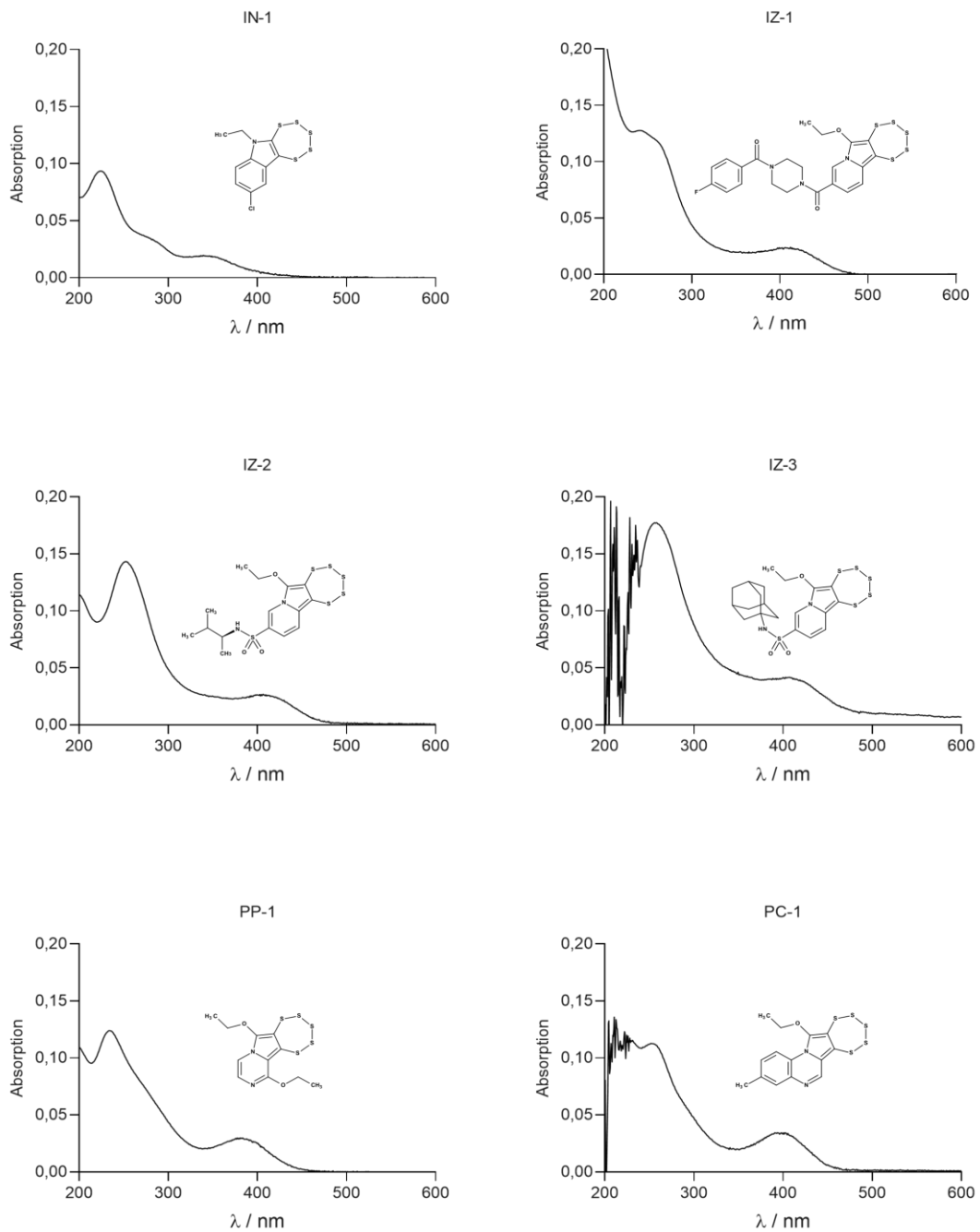


Abbildung 25: Übersicht über die Absorptionsspektren der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine. $T=23^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$, $d=1\text{ cm}$, $5\ \mu\text{M}$ Pentathiepin in GPx-Puffer^[85]

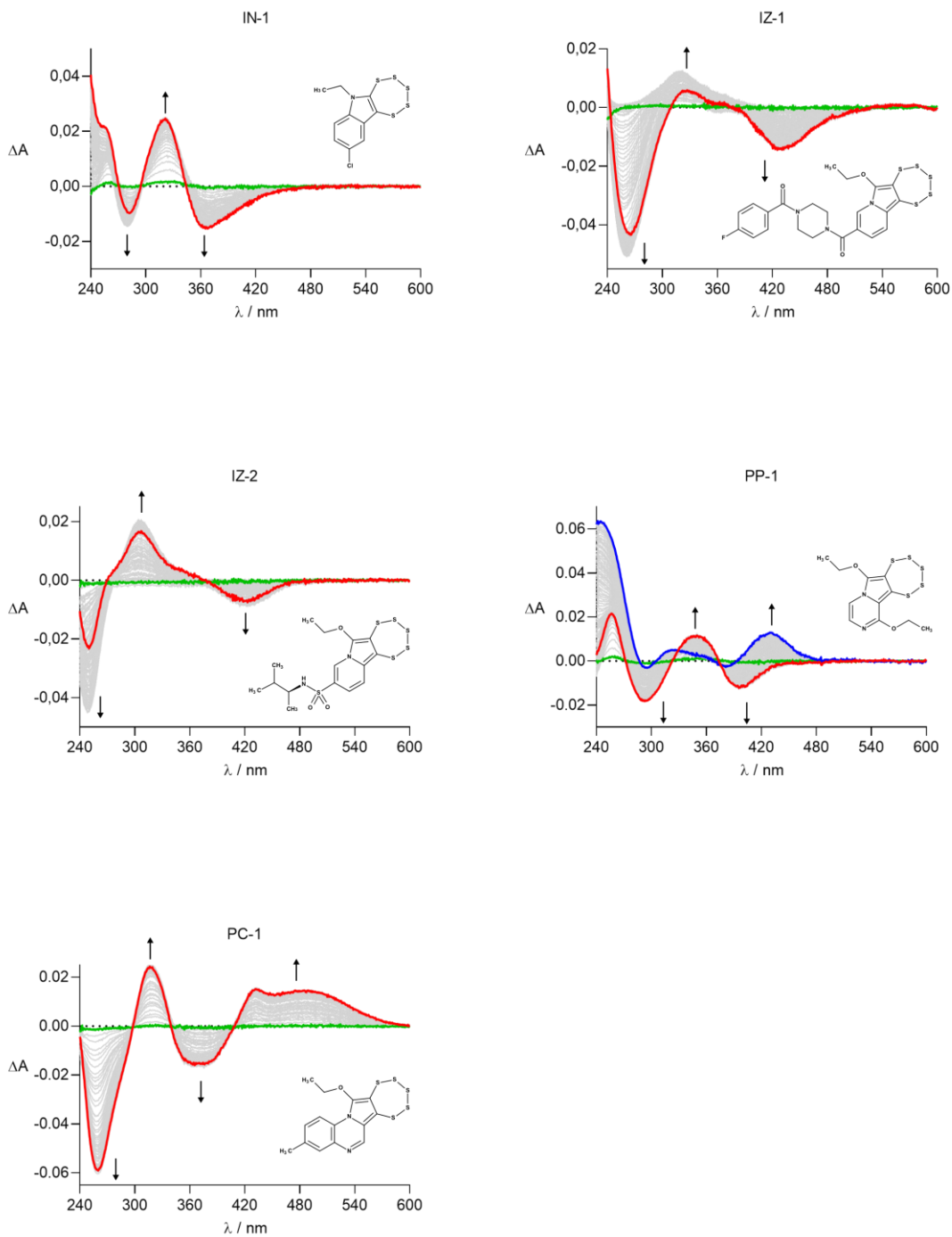


Abbildung 26: Übersicht über die Differenzspektren der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine. $T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$, $d=1\text{ cm}$, $5\text{ }\mu\text{M}$ Pentathiepin, 5 mM GSH. Grün stellt die erste Messung dar, rot die Letzte (87 Messungen über 60 min). Für **PP-1** stellt die blaue Linie den beobachteten Shift des Absorptionsspektrums dar. **IZ-3** zeigte keinen Abbau, deshalb gibt es kein Differenzspektrum^[85]

2.3.3.2 Aufnahme von Differenzspektren zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden sowohl Absolut- als auch Differenzspektren aufgenommen. Es stellte sich heraus, dass die direkte Aufnahme von Differenzspektren in den gewählten Konzentrationsbereichen deutlich reproduzierbarer war, als die nachträgliche Berechnung der Differenzspektren aus den Absolutspektraldaten. Im Folgenden werden aus diesem Grund nur die aufgenommenen Differenzspektren und die daraus ermittelten Daten gezeigt. Die folgende Abbildung stellt beispielhaft ein aufgenommenes Differenzspektrum von **IN-1** in Gegenwart von 250 μM GSH dar.

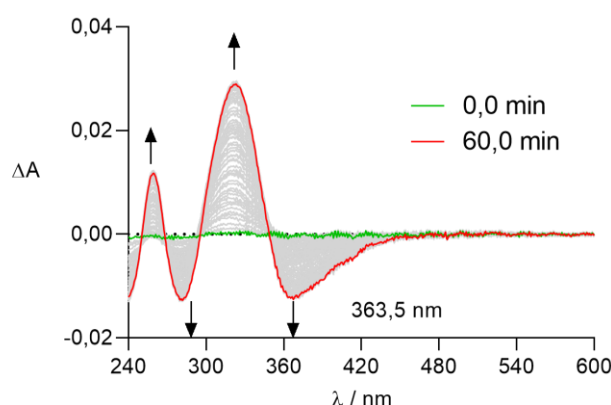


Abbildung 27: Aufnahme von Differenzspektren von 5 μM **IN-1** (Pentathiepin **25**) in Gegenwart von 250 μM GSH über 60 min. $T = 23^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $d = 1\text{ cm}$. Grün stellt die erste Messung dar, rot die Letzte (87 Messungen über 60 min)^[85]

Abbildung 27 lässt erkennen, dass im Laufe der Reaktion eine Abnahme der Absorption bei 363,5 nm erfolgt. Das liegt im Bereich des dem Pentathiepin zugeordneten Absorptionsmaximums für **IN-1**. Dieses lokale Minimum des Differenzspektrums wird im Folgenden für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten genutzt. Für die fünf anderen Pentathiepine wurde die Bestimmung unter den gleichen Bedingungen vorgenommen und das langwelligste Minimum im Differenzspektrum ausgewertet. Spektroskopische Daten der einzelnen Pentathiepine hinsichtlich der Differenzspektren sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Langwelligste Minima in den Differenzspektren der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine., 23°C , $\text{pH} = 7,4$, $d = 1\text{ cm}$ ^[85]

Verbindung	λ des Minimums
IN-1	363,5 nm
IZ-1	427,0 nm
IZ-2	424,0 nm
PP-1	396,0 nm
PC-1	377,0 nm

Für jede Verbindung wurden Experimente mit einer Pentathiepinkonzentration von $5\ \mu\text{M}$ bei Glutathionkonzentrationen von $250\ \mu\text{M}$ – $10\ \text{mM}$ durchgeführt. Die Absorptionsabnahmen bei der entsprechenden Wellenlänge (siehe Tabelle 9) wurden mit der Konzentration korreliert und anschließend als Konzentration über der Zeit dargestellt, beispielhaft gezeigt in Abbildung 28.

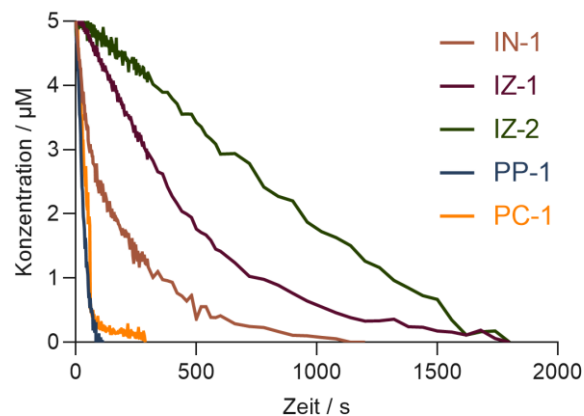


Abbildung 28: Abnahme der Konzentration der Pentathiepine (Startkonzentration $5\ \mu\text{M}$) in Gegenwart von $5\ \text{mM}$ GSH gemessen mittels UV-Vis-Spektroskopie. Errechnet aus der Absorptionsabnahme im Differenzspektrum im jeweiligen Minimum (Tabelle 9). Die Spektren wurden aufgenommen bei $T = 23\ ^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $d = 1\ \text{cm}$ ^[85]

Aus den aufgenommenen Absorptionsdaten wurden einerseits die Halbwertszeiten gemäß Kapitel 5.3.4 andererseits die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet. Beides ist in der folgenden Tabelle 10 dargestellt. Aus der Abbildung 28 sowie Abbildung 29 ergeben sich folgende Ergebnisse: Die Pentathiepine **IZ-1** und **IZ-2** zeigen deutlich höhere Halbwertszeiten sowie deutlich geringere Anfangsgeschwindigkeiten als die Pentathiepine **PP-1**, **PC-1** sowie **IN-1**. **PP-1** stellte sich in den Versuchen als die instabilste Substanz heraus.

Tabelle 10: Übersicht über Halbwertszeiten und initiale Abbaugeschwindigkeiten der Pentathiepine **IN-1**, **IZ-1**, **IZ-2**, **IZ-3**, **PP-1** sowie **PC-1** ($5\ \mu\text{M}$) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen GSH ($0,25\text{--}10\ \text{mM}$). Errechnet aus der Absorptionsabnahme im Differenzspektrum im jeweiligen Minimum (Tabelle 9). $\text{pH}=7,4$, $T=23^\circ\text{C}$, $d=1\ \text{cm}$ ^[85]

GSH / mM	Halbwertszeit / s (\pm SD)					initiale Abbaugeschwindigkeit / nM s^{-1} (\pm SD)				
	IN-1	IZ-1	IZ-2	PP-1	PC-1	IN-1	IZ-1	IZ-2	PP-1	PC-1
0.25	566,7 (90,2)	X	X	180,0 (34,6)	900,0 (60,0)	4,1 (1,8)	X	X	11,6 (3,3)	3,4 (0,1)
1	112,3 (20,3)	1480,0 (34,6)	X	68,7 (2,3)	163,0 (4,6)	24,3 (4,2)	X	X	36,8 (2,6)	16,3 (1,9)
3	102,2 (17,9)	760,0 (34,6)	1460,0 (124,9)	32,0 (2,0)	54,0 (4,0)	29,8 (4,3)	0,7 (0,4)	1,2 (0,2)	77,7 (2,7)	50,6 (3,9)
5	99,3 (64,8)	419,7 (68,7)	780,0 (0,0)	27,3 (2,3)	30,0 (5,3)	33,8 (12,0)	5,4 (1,2)	2,8 (0,2)	78,0 (1,0)	74,9 (10,9)
7	44,7 (9,0)	320,0 (0,0)	720,0 (60,0)	26,7 (4,2)	35,3 (7,6)	48,5 (2,4)	7,5 (0,4)	3,6 (0,5)	75,0 (1,6)	66,4 (6,3)
9	63,3 (30,1)	247,0 (32,9)	700,0 (34,6)	22,7 (5,8)	27,3 (4,2)	42,4 (6,1)	11,1 (2,4)	3,5 (0,3)	76,0 (4,7)	81,5 (7,0)
10	246,7 (61,1)	253,3 (11,5)	366,7 (94,5)	16,7 (5,8)	33,3 (5,8)	15,3 (4,9)	11,3 (0,5)	5,4 (1,5)	112,0 (4,7)	57,0 (3,1)

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Daten in Abbildung 29 als Heatmap dargestellt:

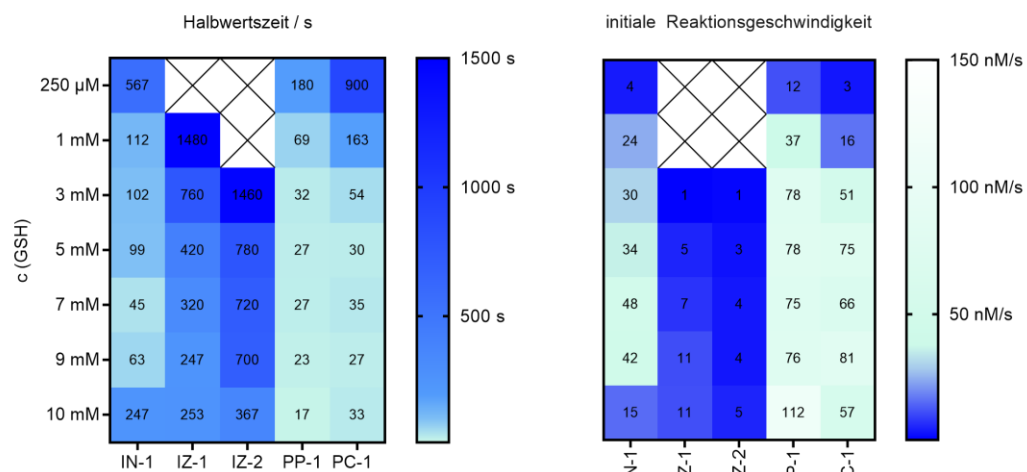


Abbildung 29: Darstellung der Halbwertszeiten und initialen Abbaugeschwindigkeiten der Pentathiepine ($5\ \mu\text{M}$) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen GSH ($0,25\text{--}10\ \text{mM}$). Errechnet aus der Absorptionsabnahme im Differenzspektrum im jeweiligen Minimum (Tabelle 9). Die Spektren wurden aufgenommen bei $\text{pH}=7,4$, $T=23^\circ\text{C}$, $d=1\ \text{cm}$ ^[85]

2.3.4 pH-Abhängigkeit der Pentathiepinstabilität

Vorversuche haben gezeigt, dass die Stabilität von Pentathiepinen im Basischen abnimmt, aber im Sauren steigt. Die Stabilität bei pH=6,5 sollte getestet werden, um herauszufinden, ob bereits eine derart kleine Änderung des pH-Wertes die Stabilität maßgeblich erhöht. Dafür wurden die Pentathiepine **25 (IN-1)** und **36 (IZ-1)** ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine der instabilsten Pentathiepine in Gegenwart von GSH (siehe oben) sowie die für die Experimente mit Liposomen (Kapitel 2.7) verwendete Substanz mit mittlerer Stabilität. Das Ergebnis dieser Pentathiepine sollte demnach auf die anderen Substanzen übertragbar sein.

Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

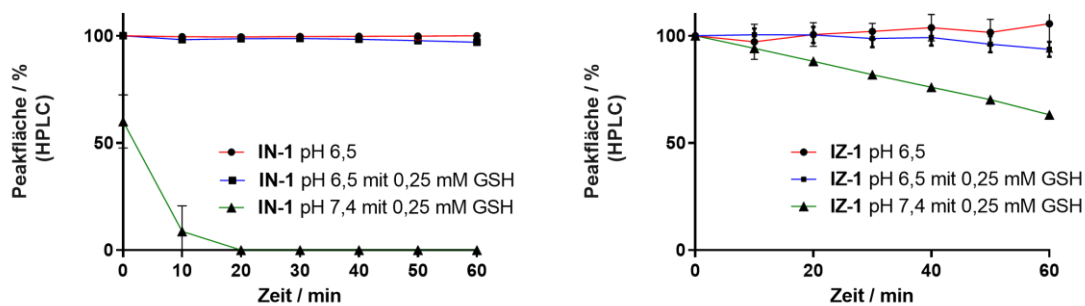


Abbildung 30: Stabilität der Pentathiepine **IN-1** sowie **IN-2** in Gegenwart von 250 µM GSH bei pH=6,5

Die Stabilität der beiden untersuchten Pentathiepine wurde durch die Absenkung des pH-Wertes auf 6,5 drastisch erhöht. Während **IN-1** bei pH=7,4 bereits nach 20 min nicht mehr nachgewiesen werden konnte, ist das Pentathiepin bei pH=6,5 über den gesamten Messzeitraum stabil. Das Ergebnis ist auf **IZ-1** übertragbar (siehe Abbildung 30).

2.3.5 Einfluss der Stabilität des Pentathiepins in Gegenwart von GSH auf die inhibitorische Wirkung auf GPx-1

In Untersuchungen in unserem Arbeitskreis wurde herausgefunden, dass Pentathiepine in der Lage sind, die bovine GPx-1 zu inhibieren.^[42] In den vorangegangenen Experimenten in diesem Kapitel wurden teils starke Unterschiede in der Stabilität des Pentathiepins gegenüber GSH festgestellt. Es stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Stabilitäten Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der untersuchten Pentathiepine auf die GPx-1 haben. Um diese Frage zu beantworten, wurde von allen sechs untersuchten Pentathiepinen im Rahmen der durchgeführten Diplomarbeit von Herrn Tom Schöne die IC₅₀-Werte an GPx-

1 bestimmt. Dabei wurde entsprechend Kapitel 5.4.1 vorgegangen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind im Folgenden dargestellt.

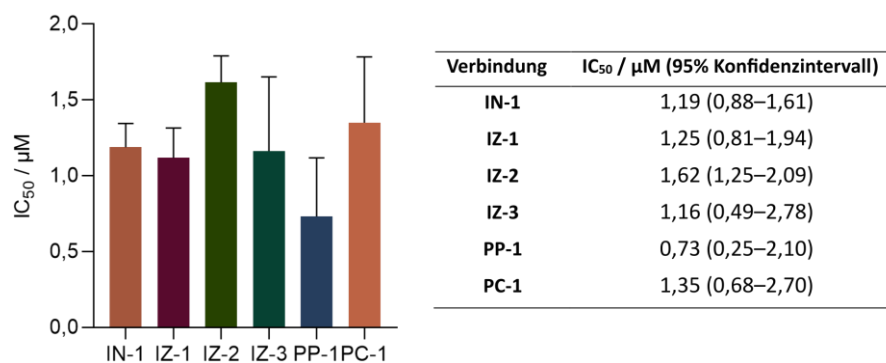


Abbildung 31: IC₅₀-Werte der hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchten Pentathiepine an GPx-1. Geometrische Mittelwerte mit geometrischer Standardabweichung. Mittelwerte (95% Konfidenzintervall), n=3, T=23 °C, pH=7,4

Dass alle getesteten Pentathiepine einen IC₅₀-Wert im unteren mikromolaren Bereich aufweisen, lässt sich aus Abbildung 31 entnehmen. Sie liegen im Bereich von 0,73–1,62 μM. Diese Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen der vorangegangenen Testungen der inhibitorischen Aktivität der Pentathiepine auf GPx-1.^[42, 43] Zwischen den einzelnen Substanzen konnten mittels *one-way*-ANOVA keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Inhibierung von GPx-1 scheint somit auf die Partialstruktur des Pentathiepins zurückzuführen zu sein, da eine – maßgebliche – Veränderung des strukturellen Grundgerüsts sowie der substituierten Reste nur geringen Einfluss auf die Hemmung des Enzyms zu haben scheinen. Des Weiteren ist kein Zusammenhang zwischen der Stabilität der Pentathiepine und der Hemmung der GPx-1 zu erkennen. Insbesondere ein Vergleich zwischen **IZ-3** und **IN-1** zeigt, dass die Hemmung weder durch das strukturelle Grundgerüst, noch durch die Instabilität des Pentathiepins gegenüber GSH beeinflusst ist. **IZ-3** zeigte dabei keinen Abbau bei allen getesteten Glutathionkonzentrationen, während **IN-1** bereits innerhalb von Sekunden bis Minuten komplett abgebaut war.

2.3.6 Veränderung der antiproliferativen Wirkung durch gezielten Abbau des Pentathiepins

Der Einfluss des Pentathiepinrings auf die antiproliferative Wirkung sollte in einem Experiment untersucht werden. Dafür wurde Pentathiepin **36** mit der vierfachen Konzentration GSH versetzt wodurch der Pentathiepinring abgebaut werden sollte. Anschließend wurden die damit inkubierten Zellen im Kristallviolett-Assay (Kapitel 5.5.4.2) getestet. Die

Ergebnisse des Assays in Abbildung 32 zeigen, dass der Abbau des Pentathiepins zu einem deutlichen Verlust der antiproliferativen Aktivität des Pentathiepins führt. Daraus ist zu schließen, dass der Pentathiepinring für die antiproliferative Wirkung essentiell ist.

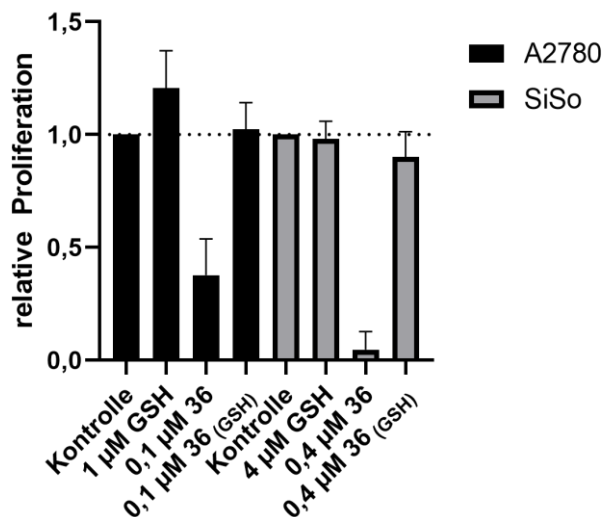


Abbildung 32: Ergebnis des Kristallviolett-Assays nach Inkubation von Pentathiepin **36** mit GSH. **36_(GSH)**: mit GSH inkubiertes Pentathiepin **36** in angegebener Konzentration.

2.3.7 Veränderung der zytotoxischen Wirkung der Pentathiepine auf drei humane Krebszelllinien nach Vorinkubation mit DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin

Ausgehend von der Grundannahme, dass Pentathiepine innerhalb der Zelle zunächst durch GSH aktiviert werden müssen, sollte der Einfluss der Glutathionkonzentration innerhalb der Zelle, sowie die Wirkung eines artifiziell geänderten Glutathionspiegels auf die Zytotoxizität der Pentathiepine untersucht werden. Die grundlegende Arbeitshypothese für dieses Experiment war die Annahme, dass durch geringe und/oder verringerte Glutathionspiegel die zytotoxische Aktivität insbesondere der als am stabilsten festgestellten Pentathiepine abnimmt.

DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin ist ein spezifischer Inhibitor der Glutamylcysteinligase. Dabei handelt es sich um ein an der Glutathionsynthese beteiligtes Enzym. Durch Inkubation mit BSO wird in Säugetierzellen die Synthese von GSH schnell und nachhaltig gehemmt,^[88] was zu einer bis zu 90%igen Senkung des intrazellulären Glutathionspiegels führt.^[86] Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden, Effekte des Glutathionspiegels auf die Toxizität von Xenobiotika zu untersuchen.^[89] Im nachfolgend beschriebenen Experiment sollte der Einfluss der GSH-Spiegelsenkung auf die Zytotoxizität der Pentathiepine in Abhängigkeit

von ihrer Stabilität gegenüber GSH untersucht werden. Dafür wurden drei Zelllinien ausgewählt: KYSE-70, DAN-G sowie LCLC-103H. Die Wahl fiel auf diese Zelllinien, da sie in durchgeführten Experimenten in unserem Arbeitskreis Unterschiede hinsichtlich des Ansprechens auf eine BSO-Behandlung gezeigt haben. Zusätzlich zeigen die Zelllinien mit 10,8 (KYSE-70), 5,25 (DAN-G) respektive 3,73 (LCLC-103H) mM GSH bezogen auf das Zellvolumen unterschiedliche Ausgangsspiegel an GSH.^[86] So sollten bei ähnlicher prozentualer Verringerung des Glutathionspiegels unterschiedlich große absolute Effekte untersucht werden. Die Zytotoxizität der Pentathiepine wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dabei wurden Zellen 6h mit 200 μ M BSO präinkubiert oder ohne BSO-Inkubation belassen. Der MTT-Assay erlaubt die Messung der Viabilität und somit die Bestimmung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen. Gemessen wird die Absorption eines durch Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) gebildeten Stoffes mittels UV-Vis-spektroskopischer Methode. Vorgehen, Auswertung und Prinzip des Assays sind in Kapitel 5.5.5.2 genauer dargelegt.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 11 sowie Abbildung 33 dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse des MTT-Assays an drei humanen Krebszelllinien mit und ohne 6h BSO-Inkubation (200 μ M). IC₅₀-Werte in μ M (95 % Konfidenzintervall) ohne BSO-Inkubation (-), mit BSO-Inkubation (+), n \geq 3

	KYSE-70		DAN-G		LCLC-103H	
	-	+	-	+	-	+
IN-1	12,97 (10,69–15,74)	8,27 (6,21–11,00)	11,92 (10,45–13,60)	7,40 (6,32–8,66)	6,78 (3,45–13,35)	3,85 (2,26–6,55)
IZ-1	0,88 (0,72–1,07)	0,67 (0,53–0,89)	1,07 (0,89–1,28)	0,75 (0,60–0,92)	0,78 (0,53–1,15)	0,53 (0,36–0,78)
IZ-2	4,89 (2,94–8,14)	2,28 (1,52–3,42)	3,05 (2,29–4,07)	1,57 (1,24–1,97)	2,56 (1,96–3,33)	1,07 (0,88–1,30)
IZ-3	5,27 (3,73–7,45)	1,95 (1,21–3,14)	4,01 (1,91–8,38)	3,21 (1,95–5,26)	2,99 (0,89–10,08)	1,69 (1,00–2,87)
PP-1	11,56 (7,90–16,93)	6,75 (3,84–11,85)	10,54 (8,21–13,53)	7,63 (6,01–9,69)	6,55 (4,43–9,69)	3,66 (2,35–5,71)
PC-1	7,41 (5,15–10,64)	4,78 (3,31–6,90)	11,10 (7,37–16,71)	9,29 (5,88–14,67)	7,72 (5,89–10,12)	4,55 (3,34–6,19)

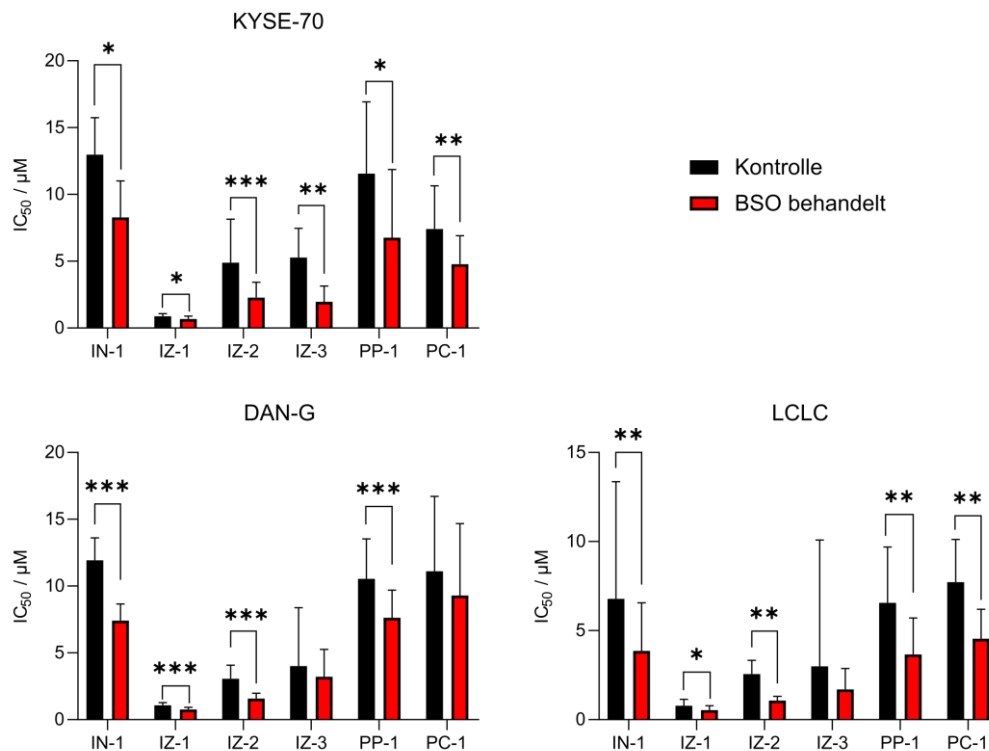


Abbildung 33: Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays mit und ohne 6h BSO-Inkubation (200 μM). IC₅₀-Werte in μM ± 95% Konfidenzintervall, n≥3. Gepaarter t-Test angewendet auf den Mittelwert und die Standardabweichung der logIC₅₀-Werte. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)

Tabelle 11 und Abbildung 33 stellen die Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays an drei verschiedenen Krebszelllinien übersichtlich und graphisch dar. Für alle Substanzen und alle Zelllinien zeigt sich nach 6h Vorinkubation mit BSO eine gesteigerte zytotoxische Aktivität aller getesteten Pentathiepine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wobei in keinem der getesteten Fälle eine Reduktion des IC₅₀-Wertes um eine Größenordnung erfolgte. Bis auf drei Kombinationen zeigen alle Pentathiepin/Zelllinien-Kombinationen eine signifikante Zytotoxizitätssteigerung (gepaarter t-Test).

Die wahrscheinlichste Erklärung für die generelle Zytotoxizitätssteigerung ist die Reduzierung der zellulären Redoxabwehr durch BSO.^[90] Ein Zusammenhang zwischen Stabilität, Grundgerüst des Pentathiepins, Zytotoxizität, Glutathiongehalt der Zelllinie sowie gesenktem intrazellulären Glutathiongehalt gibt es anscheinend nicht.

2.3.8 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Stabilität von Pentathiepinen in Gegenwart von Glutathion

Für sechs Pentathiepine mit vier unterschiedlichen Grundstrukturen wurde die Stabilität in 5 μM Konzentration in Gegenwart von 250 μM –10 mM GSH UV-Vis-spektroskopisch bestimmt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Halbwertszeit bei den untersuchten Pentathiepinen. Die inhibitorische Wirkung an GPx-1 und die antiproliferative Wirkung *in-vitro* auf humane Krebszelllinien, mit und ohne BSO-Inkubation, zeigten keine Abhängigkeit von der Stabilität der eingesetzten Substanzen. Diese Ergebnisse stellen die These der Aktivierung der Pentathiepine in Krebszellen durch GSH in Frage, da eine Abhängigkeit der beobachteten Wirkung von der Stabilität zu erwarten wäre.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das intakte Pentathiepin für eine antiproliferative Wirkung *in-vitro* notwendig ist. Eine Möglichkeit der Stabilisierung des Pentathiepins bei Lagerung besteht in der Absenkung des pH-Wertes des Lösungsmittels, da sich gezeigt hat, dass bereits eine geringe Absenkung des pH-Wertes zu einem starken Anstieg der Stabilität des untersuchten Pentathiepins führt.

2.4 Untersuchungen zu Abbauprodukten von Pentathiepinen in Gegenwart von GSH

Die Ergebnisse der bis hier beschriebenen Experimente werfen die Frage auf, ob ein Abbauprodukt der Reaktion der Pentathiepine mit GSH, wie zum Beispiel GSSH, an den biologischen Effekten der Pentathiepine beteiligt ist, und inwiefern das intakte Pentathiepin z.B. für die Hemmung der GPx-1 notwendig ist.

2.4.1 Untersuchungen zur Freisetzung von GSSH aus den Pentathiepinen 25 und 26 durch Reaktion mit GSH

Die Pentathiepine **25** und **26** wurden mit dem in Kapitel 5.3.5.2 beschriebenen Assay auf die Eigenschaft geprüft, bei der Reaktion mit GSH die reaktive Schwefelspezies GSSH freizusetzen. Diese könnte in der Lage sein, GPx-1 zu hemmen (siehe Kapitel 2.5.3). Dafür wurden die Pentathiepine bei 37 °C mit GSH inkubiert. Durch die Reaktion des Pentathiepins mit GSH kam es zur Entfärbung der vorher gelben Lösung. Nach anschließendem Umsatz mit Cyanid zu Thiocyanat sollte Letzteres durch Bildung eines tiefroten Eisen-III-Komplexes UV-Vis-spektroskopisch nachgewiesen werden. Abbildung 34 zeigt die Detektion von Thiocyanat nach der Inkubation von 500 μM Na₂S mit 500 μM GSSG bei 37 °C. Dabei soll *in-*

situ GSSH gebildet werden.^[23] Das gebildete Maximum bei $\lambda=458$ nm weist auf die Durchführbarkeit der Methode hin. Durch Pentathiepine freigesetztes GSSH sollte prinzipiell durch diese Methode nachgewiesen werden können.

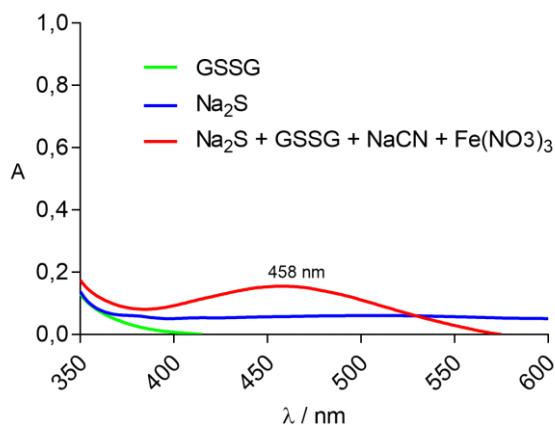


Abbildung 34: Detektion von während der Reaktion von Na₂S mit GSSG freigesetztem GSSH. Das bei 458 nm gebildete Maximum weist auf die Bildung von Thiocyanat hin und belegt die prinzipielle Funktionalität der Methode. Spektren aufgenommen bei Raumtemperatur und um das jeweilige Lösungsmittel(gemisch) korrigiert

Die Ergebnisse der Untersuchungen für Pentathiepin **26** sind in Abbildung 35 dargestellt.

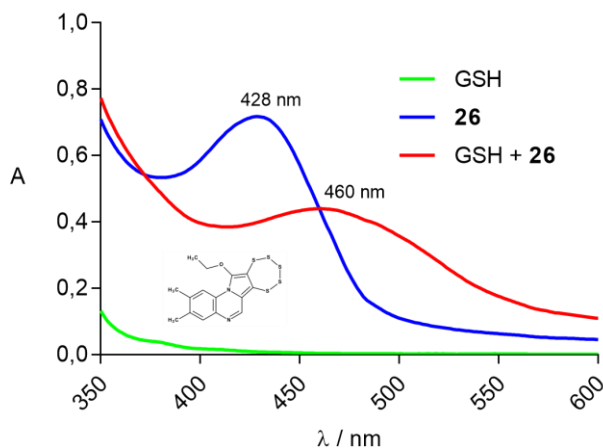


Abbildung 35: UV-Vis-Spektren der Reaktionsansätze von Pentathiepin **26** zur GSSH-Bestimmung. Aufnahme der Spektren bei Raumtemperatur nach Inkubation von **26** mit GSH bei 37 °C, Umsatz mit Cyanid und anschließender Zugabe von Eisen-III-Nitrat in salpetersaurer Lösung (rot). Zum Vergleich sind die Spektren der uninkubierten Substanz **26** (blau) sowie von GSH (grün) gezeigt. Die Spektren sind um das jeweilige Lösungsmittel(gemisch) korrigiert

Aus Abbildung 35 ist zu entnehmen, dass das dem Pentathiepin zuzuordnende Maximum bei $\lambda=428\text{nm}$ abnimmt, was die Entfärbung der Lösung erklärt. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass nach Zugabe des Eisen-III-Nitrates zur Bildung des Maximums bei $\lambda=460\text{nm}$ kommt, was dem Eisen-III-Thiocyanat-Komplex entspricht. Dies könnte als Hinweis auf die Bildung von GSSH interpretiert werden. Dieses Ergebnis wurde dadurch in Frage gestellt, dass für Pentathiepin **25** die abweichenden in Abbildung 36 dargestellten Ergebnisse erhalten wurden.

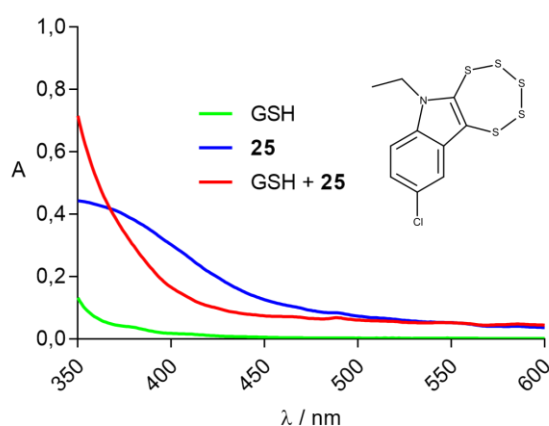


Abbildung 36: UV-Vis-Spektren der Reaktionsansätze von Pentathiepin **25** zur GSSH-Bestimmung. Aufnahme der Spektren bei Raumtemperatur nach Inkubation von **25** mit GSH bei 37°C , Umsatz mit Cyanid und anschließender Zugabe von Eisen-III-Nitrat in salpetersaurer Lösung (rot). Zum Vergleich sind die Spektren der uninkubierten Substanz **25** (blau) sowie von GSH (grün) gezeigt. Die Spektren sind um das jeweilige Lösungsmittel(gemisch) korrigiert

Die Abnahme der gelben Farbe der Lösung durch Reaktion mit GSH ist im UV-Vis-Spektrum durch die Abnahme der Absorption unterhalb von 400nm zu erkennen. Entgegen den Ergebnissen für Pentathiepin **26** zeigte sich in wiederholten Versuchen keine Bildung des Maximums um 460nm . Für Verbindung **25** konnte die Bildung von GSSH somit nicht gezeigt werden.

Beide Pentathiepine weisen durch die Inkubation mit GSH eine Abnahme der Absorption im Bereich des dem Pentathiepin zuzuordnendem Absorptionsmaximums auf. Es gab keinen Grund anzunehmen, dass die Zerstörung des Pentathiepins durch Glutathion bei beiden Substanzen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen sollte. Um dem Unterschied zwischen Pentathiepin **25** und **26** auf dem Grund zu gehen, wurde Pentathiepin **26** erneut unter den gleichen Bedingungen mit GSH inkubiert und die resultierende Lösung mit NaCN versetzt.

Die anschließende Komplexbildung mit Eisen wurde näher untersucht, indem in drei Ansätzen je die entsprechende Menge Wasser, Salpetersäure und eine salpetersaure Eisen-III-Lösung hinzugegeben wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt.

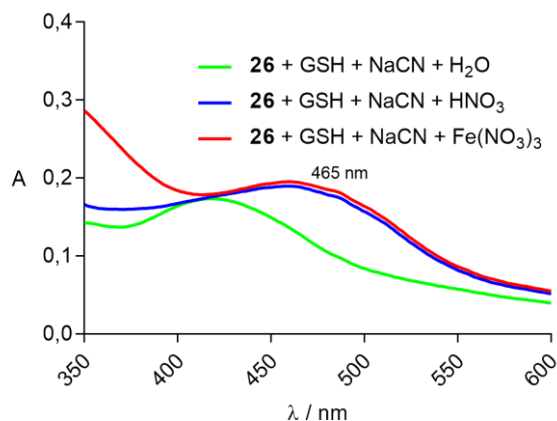


Abbildung 37: UV-Vis-Spektren von Pentathiepin **26** nach Thiocyanatbildung. Grün zeigt das UV-Vis-Spektrum nach Zugabe von Wasser, blau nach Zugabe einer 16%igen HNO₃-Lösung und rot nach Zugabe einer 2,5 mM Lösung aus Eisen-III-Nitrat in 16%iger HNO₃

Aus Abbildung 37 lässt sich entnehmen, dass die Bildung des detektierten Maximums um $\lambda=460\text{nm}$ nicht durch die Bildung von Eisen-III-thiocyanat hervorgerufen wird, sondern durch Halochromie des Abbauproduktes von Verbindung **26** bei Reaktion mit GSH.

Somit handelt es sich bei dem zunächst positiven Nachweis um ein Artefakt und es konnte keine Bildung von GSSH durch Reaktion von Glutathion mit Pentathiepinen nachgewiesen werden.

2.4.2 Bestimmung der Freisetzung von GSSG aus Pentathiepin 26 in Gegenwart von GSH

Die Reaktion von Pentathiepinen mit Thiolen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben^[36, 37] und die Wirkung der reduktiven Zerstörung des Pentathiepinrings untersucht.^[45] Um zu untersuchen, ob die in CHATTERJI UND GATES 2003^[37] beschriebene Bildung eines Disulfides durch die Reaktion eines Pentathiepins in Gegenwart von Mercaptoethanol in Chloroform auch auf wässrige Medien mit physiologischem pH-Wert in Gegenwart von Glutathion zutrifft, wurde eine HPLC-Methode zur Detektion von oxidiertem GSH (5.3.6) verwendet. 100 μM **26** wurde in GPx-Phosphatpuffer (siehe Kapitel 5.4.1.1) mit 1 mM GSH für 15 min bei 37°C umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend chromatogra-

phisch vermessen. Dabei wurden die Chromatogramme in Abbildung 38 erhalten. Der Einfluss von DMF bei einer Detektionswellenlänge von $\lambda=210\text{nm}$ ist sehr deutlich zu erkennen. Der Unterschied in den Retentionszeiten zwischen dem detektierten Produkt und dem verwendeten Standard ist wahrscheinlich auf den Einfluss des DMF zurückzuführen. Qualitativ kann die Bildung von GSSG bei der Reaktion von Pentathiepin **26** mit GSH in wässrigem Medium bei 10-fachem GSH-Überschuss als bestätigt angesehen werden.

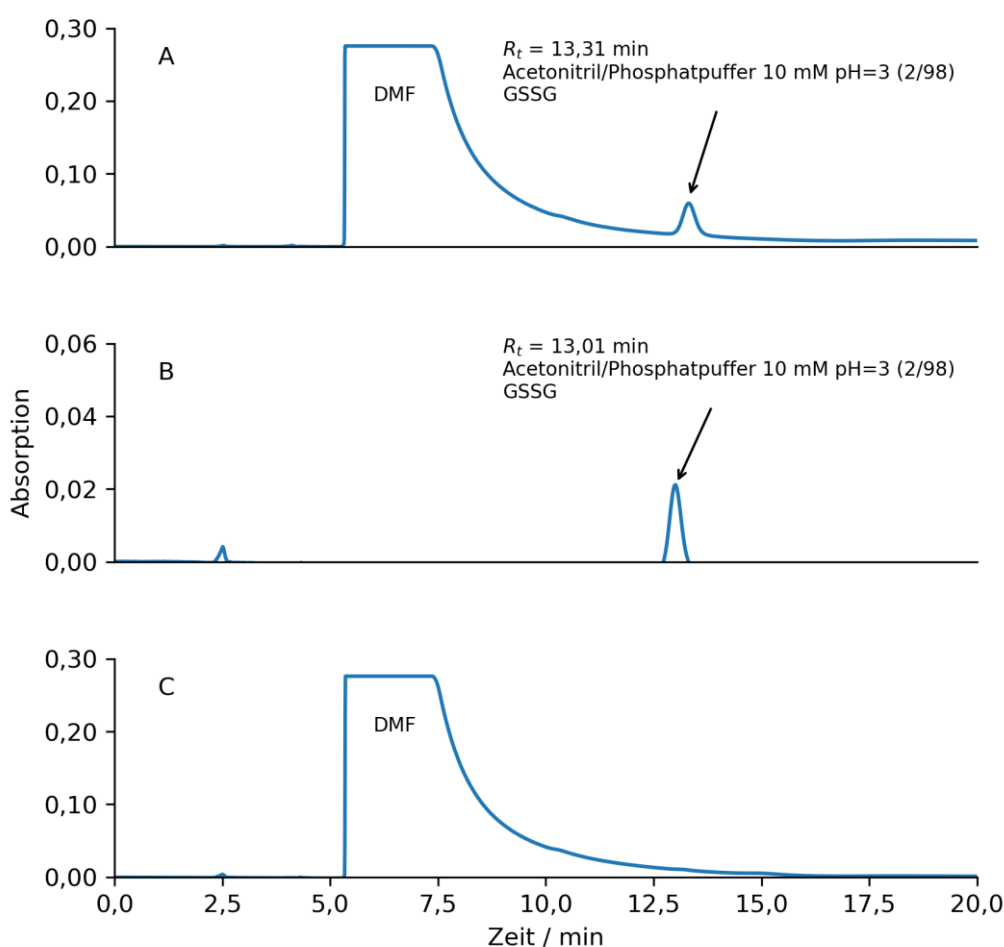


Abbildung 38: RP-HPLC-Chromatogramme der Freisetzung von GSSG aus Pentathiepin **26**. **A)** RP-HPLC-Chromatogramm von Verbindung **26** nach Inkubation mit GSH. Der Peak bei 13,31 min ist dem großen Peak von DMF aufgesetzt und entspricht der Retentionszeit von GSSG. **B)** RP-HPLC-Chromatogramm von GSSG $83,3\ \mu\text{M}$. **C)** DMF in entsprechender Menge nach Inkubation mit GSH. Detektionswellenlänge: $\lambda=210\text{ nm}$, $1\ \text{mLmin}^{-1}$

2.4.3 Detektion des Abbauproduktes von Pentathiepin 25

CHATTERJI UND GATES 2003^[37] beschreiben die mercaptoethanolkonzentrationsabhängige Bildung unterschiedlicher Reaktionsprodukte mit Pentathiepinen in organischen Lösungsmitteln. Dabei kommt es bei niedrigeren Thiolüberschüssen zur Bildung eines Gemisches von Polysulfiden. Bei hohen Thiolüberschüssen kommt es zur Bildung eines Hauptproduktes – ein vicinales, aromatisches Dithiol. Es stellte sich die Frage, ob der etwa 10-fache Glutathionüberschuss, wie er im Glutathionperoxidaseassay vorhanden ist, ausreicht, um die Bildung des Hauptproduktes zu erreichen.

Pentathiepin **25** wurde zu 20 μM in mobiler Phase mit 200 μM GSH in mobiler Phase versetzt und nach 30 min durch Injektion von 100 μL dieser Lösung chromatographiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 39 dargestellt.

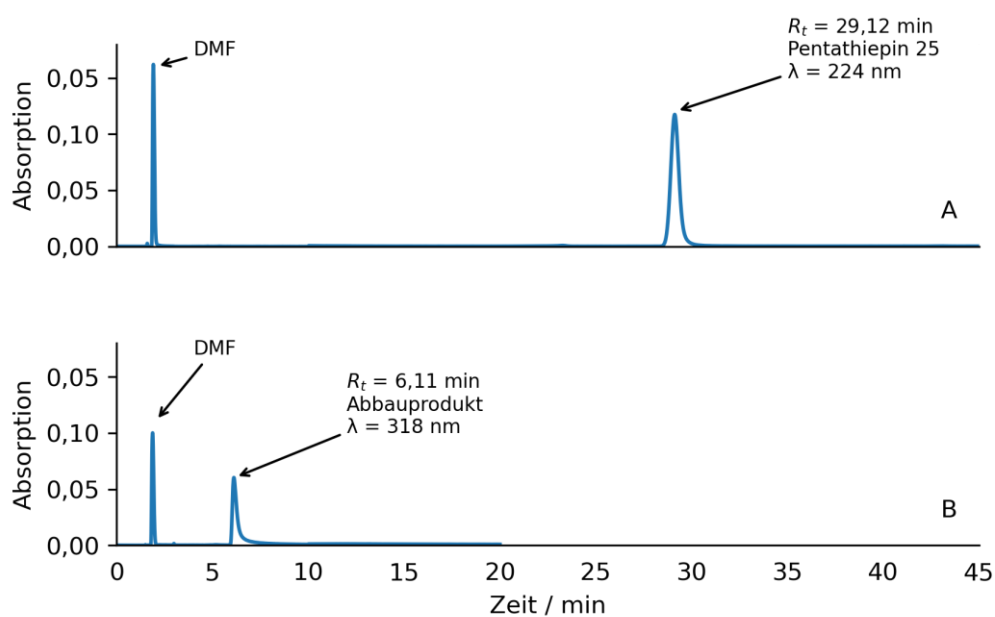


Abbildung 39: RP-HPLC Chromatogramme zur Detektion des Abbauproduktes von Pentathiepin **25**. MN Nucleodur PolarTec, Acetonitril/Wasser (80/20), 1,0 mL min⁻¹. Detektionswellenlängen analytisch spezifisch für maximale Sensitivität. **A)** 20 μM **25** in mobiler Phase **B)** 20 μM Pentathiepin **25** inkubiert mit 200 μM GSH nach 30 min

Wie in Abbildung 39 zu erkennen ist, kommt es unter den gewählten Bedingungen – geringe Konzentration und Reaktion in mobiler Phase – zur Bildung eines einzelnen Abbauproduktes. Da aufgrund störender Einflüsse auf die Detektion in der HPLC in diesem Experiment kein GPx-Puffer verwendet werden konnte, sondern auf mobile Phase als

Reaktionsmedium zurückgegriffen werden musste, wurden zusätzlich die Absorptionsspektren der in der RP-HPLC erhaltenen Peaks mit Absorptionsspektren verglichen, die vor und nach Reaktion von GSH mit Pentathiepin **25** in GPx-Puffer erhalten wurden. Die UV-Vis-Spektren, aufgenommen entweder mit einem HPLC-DAD oder einem Spekol-Photometer, des durchgeführten Versuches sind in Abbildung 40 dargestellt. Sie zeigt deutlich den Einfluss des Phosphatpuffers und DMFs auf die Absorption im Bereich unterhalb von 290 nm. Ersichtlich ist auch, dass die Maxima der Absorptionsspektren qualitativ übereinstimmen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem im RP-HPLC-Versuch detektierten Abbauprodukt um das gleiche Produkt handelt, wie es auch unter physiologischeren Bedingungen erhalten wird – wahrscheinlich um das vicinale, aromatische Dithiol.

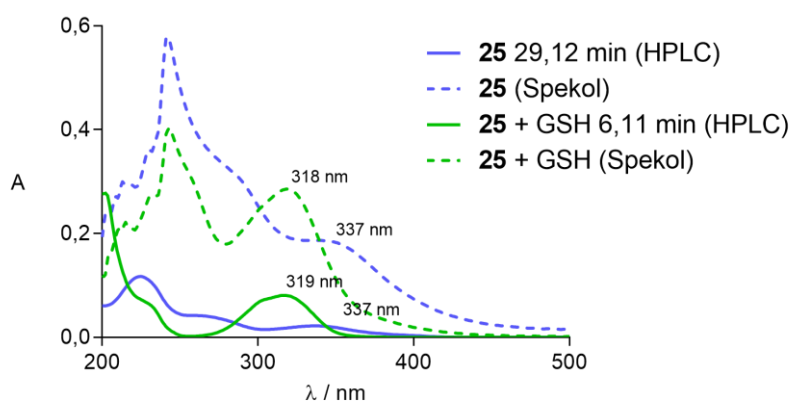


Abbildung 40: Vergleich der Absorptionsspektren der Abbauprodukte von Pentathiepin **25**. Die gestrichelten Linien zeigen die Absorptionsspektren der intakten Verbindung **25** und des Abbauproduktes durchgeführt im wässrigen Medium bei pH=7,4 bei Raumtemperatur. Die durchgezogenen Linien zeigen die im HPLC-Versuch erhaltenen Absorptionsspektren

2.4.4 Zusammenfassung zur Untersuchung zu Abbauprodukten von Pentathiepinen

Es konnte gezeigt werden, dass aus der Reaktion von Pentathiepin in Gegenwart hoher Konzentrationen Glutathion ein einzelnes Hauptabbauprodukt gebildet wird, welches sowohl bei pH=7,4 entsteht, als auch in einem Gemisch organischem Lösungsmittel und Wasser. Dabei wird GSSG freigesetzt, wobei keine Freisetzung von GSSH detektiert werden konnte. Die Bildung von H₂S wurde olfaktorisch festgestellt. Damit ist der postulierte Abbaumechanismus auch unter physiologischeren Bedingungen bestätigt.

2.5 Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften repräsentativer Pentathiepine an boviner GPx-1

Pentathiepine wurden als Inhibitoren der GPx-1 identifiziert.^[42] Abbildung 41 zeigt den Katalysezyklus der GPx-1. Die unterschiedliche Reaktivität der Pentathiepine gegenüber GSH bei gleichzeitig vergleichbarer inhibitorischer Wirkung auf die bovine GPx-1 wirft die Frage nach dem genauen Inhibierungsmechanismus auf. In vorhergegangenen Versuchen in unserem Arbeitskreis wurden uneindeutige Ergebnisse für die Art der Hemmung erhalten – kompetitiv/nicht-kompetitiv/unkompetitiv. Da die Bestimmung der Art der Hemmung eine uneingeschränkte Michaelis-Menten-Kinetik erfordert, kamen verschiedene Ursachen für die uneindeutigen Ergebnisse in Betracht. Dazu zählen irreversible Inhibierung (*tight binding inhibitors, covalent inhibitors*), zeitabhängige Inhibierung (*slow binding inhibitors*), Inhibierung unter Verbrauch des Inhibitors (*suicide inhibitors*) sowie Reaktionen am aktiven Zentrum, die durch die Eigenschaft der Glutathionperoxidase bedingt sind, zwei Substrate zu besitzen. In einer Reihe von Experimenten wurden an ausgewählten Substanzen diese Möglichkeiten untersucht.

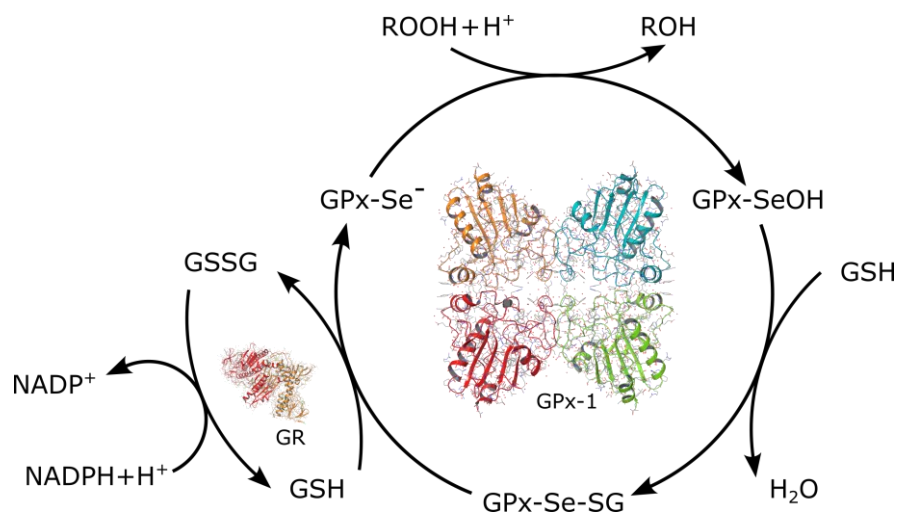


Abbildung 41: Katalysezyklus der GPx-1 mit GR-Messreaktion. Peroxide, organisch oder anorganisch, oxidieren das selenocysteinhaltige, aktive Zentrum der GPx zur Selenensäure.^[91] Unter Verbrauch von zwei Äquivalenten GSH kommt es zur Reduktion, wobei ein Äquivalent GSSG gebildet wird. Das ebenfalls eingesetzte Enzym GR reduziert das Disulfid unter Verbrauch von NADPH zu 2 Äquivalenten GSH. Die gemessene Abnahme der optischen Dichte bei $\lambda=340\text{nm}$ ist proportional zur Abnahme der NADPH-Konzentration und somit zur GPx-1-Aktivität

2.5.1 Reversibilität

Die Bestimmung des IC₅₀-Wertes dient zur vergleichenden Bestimmung der Affinitäten verschiedener Inhibitoren zum aktiven Zentrum eines Enzyms. Voraussetzung für die einfache Bestimmung des IC₅₀-Wertes als Maß für die Affinität ist das Vorliegen eines reversiblen, schnell bindenden Inhibitors. Liegt eine Besonderheit in der Bindungsmodalität vor, ist die ausschließliche Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration im *steady state* nicht ausreichend. Für die Bestimmung der Reversibilität gibt es mehrere Möglichkeiten. Die direkte Messung kann mittels Dialyse stattfinden (siehe Kapitel 5.4.1.2), dabei wird das Enzym mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend gegen einen geeigneten Puffer dialysiert. Eine anschließende Aktivitätstestung des Enzyms ergibt, ob die Hemmung irreversibel oder reversibel erfolgte. Steht die Möglichkeit der Dialyse, zum Beispiel aus Gründen der Stabilität des Enzyms, nicht zur Verfügung kann die einfach durchzuführende *jump dilution* (siehe Kapitel 5.4.1.3) genutzt werden. Dabei wird die 100-fache Enzymkonzentration mit der 10-fachen IC₅₀-Konzentration inkubiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wird das Reaktionsgemisch in dem vorbereiteten Enzymassay 100-fach verdünnt. Aus der gemessenen Enzymaktivität kann eine Aussage zur Reversibilität bzw. Irreversibilität abgeleitet werden.

2.5.1.1 Dialyseversuche

Für die Dialyseversuche wurden drei verschiedene Konditionen gewählt, die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 5.4.1.2 beschrieben unter Verwendung von Verbindung **26**. Kurz zusammengefasst: Die bovine GPx-1 wurde unter drei verschiedenen Bedingungen mit dem Pentathiepin inkubiert. Die Enzymkonzentration entsprach dabei insoweit der normalen Assaykonzentration, als dass der anschließend durchgeführte Enzymassay mit den Konzentrationen aller Bestandteile des Standardassays (Kapitel 5.4.1.1) durchgeführt wurde. Einerseits wurde die GPx-1 mit DMF als Lösungsmittel inkubiert, andererseits mit Pentathiepin **26** in einer Konzentration von 2,5 µM in DMF. Das entspricht dem experimentell bestimmten IC₅₀-Wert der Substanz.^[42] Eine dritte Bedingung beinhaltete zusätzlich 2 mM GSH, um eine eventuelle Abhängigkeit von der Anwesenheit des einen Substrates zu erkennen. Nach 24 h Dialyse wurden folgende, in Tabelle 12 dargestellte Enzymaktivitäten erhalten:

Tabelle 12: Übersicht über die Ergebnisse des Dialyseversuchs zur Reversibilitätstestung. Dargestellt sind die Ergebnisse des an die Dialyse (24 h, 4 °C, GPx-Puffer) anschließenden GPx-Enzym-Assays in UL^{-1} . Die relative Aktivität in Prozent ist auf die Kondition „GPx“ bezogen. Das Experiment wurde zweifach durchgeführt. Assay ausgeführt bei Raumtemperatur. *n=1

Kondition	UL^{-1}	%	Bereich / UL^{-1}
GPx (undialysiert)	≈5,0	–	–
GPx	0,96	100,00	0,62–1,30
GPx + GSH	1,38	105,52	–*
GPx + Inhibitor	1,04	108,33	0,67–1,70
GPx + GSH + Inhibitor	1,88	242,59	1,43–2,32

Unter Berücksichtigung, dass die normalerweise gemessene Enzymaktivität von GPx bei der eingesetzten Konzentration etwa $5 UL^{-1}$ entspricht, lassen die in Tabelle 12 dargestellten Ergebnisse des Reversibilitätstests mittels Dialyse folgende Schlussfolgerungen zu: Die Stabilität von GPx ist bei 4 °C in Phosphatpuffer nicht ausreichend, um nach 24 h die Aktivität bestimmen zu können. Die erhaltenen Ergebnisse sind somit nicht auswertbar. Insbesondere die Kondition bei der sowohl Inhibitor, als auch Glutathion eingesetzt wurden, weist eine sehr starke Schwankung auf.

Da die Messung der Aktivität nach erfolgter Dialyse durchgeführt wurde, war es nicht möglich den Einfluss des als Reaktionsstarter eingesetzten *tert*-Butylhydroperoxides (*t-BHO*) auf die Reversibilität des Inhibitors zu testen.

Diese zwei Problemstellungen konnten durch die Verwendung der *jump dilution* gelöst werden.

2.5.1.2 Jump Dilution Methode

Um die Probleme des Dialyseversuches zu umgehen wurde als alternativer Versuch die *jump dilution* Methode verwendet. Dieser Versuch beruht auf der Grundlage, dass die Konzentration des Enzyms bei vollreversiblen Inhibitoren keinen Einfluss auf den IC_{50} -Wert besitzt. Die 100-fache Konzentration der GPx-1 wird mit der 10-fachen IC_{50} -Konzentration des Inhibitors inkubiert. Nach einer 1:100-Verdünnung wird die Enzymaktivität gemessen und ausgewertet, ob sie der erwarteten Enzymaktivität bei Inhibierung durch den Inhibitor bei einer dem 0,1-Fachen der IC_{50} -Konzentration entsprechenden Menge entspricht. Ist die Inhibierung größer, das heißt die Enzymaktivität geringer, handelt es sich nicht um einen vollreversiblen Inhibitor. Da GPx mehrere Kosubstrate besitzt, wurde die Reversibilitätstestung mittels *jump dilution* unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt: I) mit GSH und

t-BHO II) mit GSH III) ohne GSH und ohne *t*-BHO. Jede Bedingung erhält eine eigene Kontrolle (ohne Inhibitor) sowie einen eigenen Leerwert (ohne GPx, mit Inhibitor). Der Leerwert dient der Kontrolle, ob die einzelnen Bestandteile miteinander reagieren. Grundlagen und genaues Vorgehen bei diesem Versuch sind in Kapitel 5.4.1.3 beschrieben. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse des *jump dilution* Experimentes für Mercaptobernsteinsäure (MSA), einem bekannten irreversiblen Inhibitor und Pentathiepin **26**.

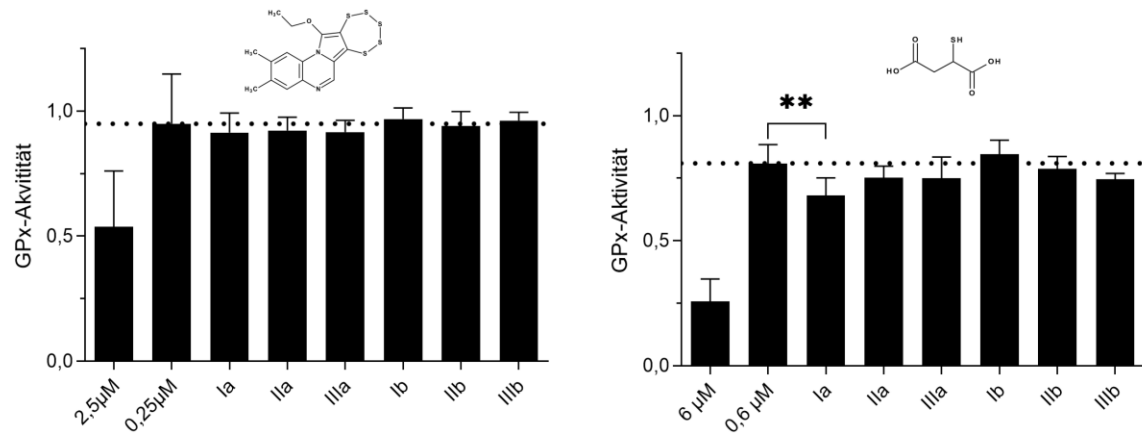


Abbildung 42: Ergebnisse der *jump dilution* für Pentathiepin **26** und MSA an boviner GPx-1. Links: Pentathiepin **26**. Rechts: MSA. Gepunktete Linie: Enzymaktivität bei jeweiliger 0,1-fachen IC₅₀-Konzentration. I) GSH + *t*-BHO, II) GSH, III) kein Substrat, a) mit GPx, b) ohne GPx, n≥3. Signifikanzniveau ** p≤0,01

Es ist zu erkennen, dass keine der für Pentathiepin **26** getesteten Konditionen eine stärkere Hemmung der Glutathionperoxidase im Vergleich zu in einer Konzentration des 0,1-Fachen des IC₅₀ (IC₅₀=2,5 µM) frisch hinzugegebenem Inhibitor zeigt. Somit scheint das Pentathiepin **26** ein vollreversibler Inhibitor der Glutathionperoxidase zu sein, wogegen für MSA die Kondition Ia eine signifikant geringere Aktivität im Vergleich zum 0,1-Fachen des IC₅₀ (IC₅₀=0,6 µM) der GPx zeigt, während alle anderen Konditionen keine verringerte Aktivität zeigen. Bei der Kondition Ia wurden alle Bestandteile des GPx-Assays inklusive des Peroxides zum Reaktionsstart hinzugegeben. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es sich bei MSA um einen irreversiblen oder langsam reversiblen Inhibitor der bovinen GPx-1 handelt. Es scheint zum Ablauf der Enzymreaktion kommen zu müssen, um eine irreversible oder langsam reversible Hemmung zu bewirken.

2.5.2 Inkubationsbedingte Änderungen der Enzymhemmung

Die im vorigen Kapitel behandelte Reversibilität der Hemmung beschreibt die Geschwindigkeit der Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Auch bei dessen Bildung kann

es zu Abweichungen vom normalen Verhalten kommen, welche die Enzymkinetik beeinflussen. Im Fall der Pentathiepine spielten zwei Möglichkeiten eine Rolle. Die erste Möglichkeit beschreibt einen *slow binding* Inhibitor, welcher mit einer gewissen Verzögerung einen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet. Um dies zu untersuchen wurde die Abhängigkeit der Enzymgeschwindigkeit von der Inkubationszeit mit einer einzelnen Konzentration des Inhibitors untersucht. Eine zweite Möglichkeit beinhaltet eine Reaktion zwischen dem Substrat GSH und dem Inhibitor, bevor es zur Enzymhemmung kommen kann. Diese Möglichkeiten wurden auf verschiedenen Wegen untersucht.

2.5.2.1 Inkubation der Pentathiepine 25 und 26 mit allen Bestandteilen des GPx-Assays und Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Um zu überprüfen, ob die Vorlagezeit im GPx-Assay einen Einfluss auf die gemessene Enzymaktivität hat, wurden die Pentathiepine **25** und **26** bei ihrer IC₅₀-Konzentration im GPx-Assay getestet, wie er in Kapitel 5.4.1 beschrieben ist. Alle Assaybestandteile außer dem Inhibitor sowie dem Peroxid wurden zu Beginn des Assays vorgelegt. Alle zwei Minuten wurde eine 10-fach konzentrierte Inhibitorlösung 1:10 in den Ansatz verdünnt. Insgesamt wurde die Inkubation über 20 min durchgeführt. Unmittelbar nach der elften Zugabe des Inhibitors wurde der Assay mittels Zugabe des Peroxids gestartet und entsprechend ausgewertet. Als Kontrolle wurde anstelle des Inhibitors eine entsprechende Menge Lösungsmittel DMF hinzugegeben. Tabelle 13 gibt die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung wieder.

Tabelle 13: GPx-1-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer des Pentathiepins **25** oder **26** bei Raumtemperatur. Angabe der gemessenen relativen Enzymaktivität in %. 0 min – unmittelbar nach Zugabe des Inhibitors wurde der Assay gestartet

Zeit / min	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
DMF	100,0	102,7	99,4	89,8	98,6	98,9	97,3	98,8	98,2	98,6	105,5
0,5 µM 25	50,2	44,6	56,3	51,5	51,8	54,9	58,3	59,6	60,1	60,9	62,0
2,5 µM 26	37,1	35,9	37,8	40,9	37,6	37,7	40,1	31,9	38,3	40,9	36,8

Für keine der beiden getesteten Substanzen konnte eine Abhängigkeit der Enzymhemmung von der Inkubationszeit im Enzymassay gezeigt werden. Das bestätigt die Ergebnisse des *jump dilution* Assays, dass es keine irreversible Enzymhemmung gibt.

2.5.2.2 Inkubation von Pentathiepin 26 mit GSH und Testung des Ansatzes im GPx-Assay im Zeitverlauf

Die 10-fache IC_{50} -Konzentration von Verbindung **26** ($25\ \mu\text{M}$) wurde mit der 10-fachen Assay-Konzentration von GSH ($2,5\ \mu\text{M}$) versetzt und aller 3 min in eine vorbereitete Küvette pipettiert, welche die sonstigen Assay-Bestandteile enthielt (Kapitel 5.4.1.1). Sofort wurde der Assay durch Zugabe des Peroxides gestartet und die Abnahme der NADPH-Absorption bei $\lambda=340\text{ nm}$ über 120 s gemessen. Tabelle 14 fasst die Ergebnisse dieses Experimentes zusammen.

Tabelle 14: Hemmung der bovinen GPx-1 durch Pentathiepin **26** nach Inkubation des Pentathiepins mit GSH bei Raumtemperatur. Verdünnung des Reaktionsgemisches aus $25\ \mu\text{M}$ Pentathiepin **26** und $2,5\ \text{mM}$ GSH 1:10 in den vorbereiteten Enzymassay aller t_x min. Kontrolle – $2,5\ \text{mM}$ GSH 1:10 in den vorbereiteten Enzymassay verdünnt. Relative Aktivität bezogen auf die Aktivität der Kontrolle

	Kontrolle	$t_{0\text{ min}}$	$t_{3\text{ min}}$	$t_{6\text{ min}}$	$t_{9\text{ min}}$	$t_{12\text{ min}}$
Enzymaktivität / UL^{-1}	4,61	1,82	1,82	1,82	1,93	2,14
Relative Aktivität / %	100,0	39,5	39,5	39,5	41,9	46,5

Für die Dauer von 12 min hat die Inkubation des Pentathiepins **26** mit GSH keinen Einfluss auf die gemessene Enzymaktivität. Obwohl die Pentathiepinstruktur dabei abgebaut wird, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass das intakte Pentathiepin nicht direkt die Wirkung an boviner GPx-1 verursacht, sondern Abbauprodukte der Reaktion mit GSH mindestens an der Wirkung beteiligt sind.

2.5.2.3 Initiales Inkubieren von Pentathiepin 26 mit Glutathionreduktase und anschließendem Enzymassay

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die Reaktion von Pentathiepinen und GSH zur Bildung von GSSG führt (siehe Kapitel 2.4.2). Wie in Abbildung 41 ersichtlich ist, stellt GSSG ein Substrat der GR dar, welche die Messreaktion des GPx-Assays katalysiert. Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass die Reaktion so effektiv ablaufen kann, dass der Enzymassay nicht ausgewertet werden kann. Die Fragestellung war daher, ob das vorherige Reagierenlassen der Indikatorreaktion eine Auswertung des Assays ermöglicht. Um den Einfluss der Reaktion auf das Assaysystem zu testen, wurde ein abgewandelter GPx-Assay verwendet. Dafür wurde die 10-fache IC_{50} -Konzentration von Pentathiepin **26**, $6,25\ \mu\text{M}$, mit $2,5\ \text{mM}$ GSH inkubiert und in serieller Verdünnung untersucht. Nachdem alle Bestandteile des Assays außer GPx sowie dem Peroxid vorhanden waren, wurde zunächst gewartet, bis keine Abnahme von NADPH bei $\lambda=340\text{ nm}$ mehr beobachtet werden konnte.

Anschließend wurde GPx hinzupipettiert und die Reaktion durch Zugabe des Peroxids gestartet. Ein uninkubierter Inhibitor wurde identisch behandelt und in der IC₅₀-Konzentration getestet. Nachfolgend ist die von Kapitel 5.4.1 abweichende Pipettierreihenfolge des GPx-Assays zusammengefasst:

Tabelle 15: Abweichende Pipettierreihenfolge GR Inkubation. Die verwendeten Konzentrationen der Lösungen mit Ausnahme von *t*-BHO entsprechen denen des GPx-Assays in Kapitel 5.4.1

	ohne GPx	Kontrolle	inkubierter Inhibitor	frischer Inhibitor
Puffer	180 µL	150 µL	180 µL	150 µL
Inhibitorlösung	0 µL	0 µL	30 µL	30 µL
extra LM	30 µL	30 µL	0 µL	0 µL
GSH	30 µL	30 µL	0 µL	30 µL
GR/NADPH	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL
↓ Fortsetzen, wenn keine Abnahme der Absorption mehr erfolgt. ↓				
GPx	0 µL	30 µL	30 µL	30 µL
225 µM <i>t</i> -BHO	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL

Bei diesem Experiment stellte sich heraus, dass das Abreagieren durch die Glutathionreduktase vor der Hinzugabe der Glutathionperoxidase zu einer Inaktivierung des Pentathiepins als Glutathionperoxidaseinhibitor führt, was in Tabelle 16 ersichtlich ist:

Tabelle 16: Gemessene Aktivität boviner GPx-1 nach vorherigem Umsatz des Assayansatzes mit GR, bei Raumtemperatur

Konz. / µM	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,020	0,625 frisch
Aktivität / %	77,07	91,85	88,15	92,48	94,22	96,01	92,12	92,75	93,18	91,84
rel. SD / %	7,43	7,42	3,18	2,87	5,36	6,48	10,96	5,11	6,57	6,44

Besonders auffällig ist die Beobachtung, dass nicht nur die mit Glutathion vorinkubierten Ansätze keine Enzymhemmung mehr zeigten, sondern auch der Ansatz, welcher lediglich dem Abbau der GR unterlag (0,625 µM frisch). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass durch die GR Reaktionsprodukte der Reaktion des Pentathiepins mit GSH abgebaut werden und die Desaktivierung des Pentathiepins durch Glutathion dadurch beschleunigt wird. Wie auch schon die Aktivitätsmessung nach Umsatz mit GSH in Kapitel 2.5.2.2. zeigt das Ergebnis dieses Experimentes, dass die Hemmung der bovinen GPx-1 wahrscheinlich durch Reaktionsprodukte der Reaktion des Pentathiepins mit GSH hervorgerufen wird. Diese Produkte werden durch die GR anscheinend abgebaut.

2.5.3 Hemmung der bovinen GPx-1 durch Hydropersulfide und H₂S

Die Kapitel 2.5.2.3 und 2.5.2.3 werfen die Frage auf, inwieweit reaktive Schwefelspezies, die aus den Pentathiepinen durch GSH gebildet werden könnten, an der Hemmung der Glutathionperoxidase beteiligt sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurde sich der Eigenschaft von Schwefelwasserstoff bedient, in Gegenwart von Polysulfiden reaktive Schwefelspezies zu bilden.^[23]



Dem beschriebenen Vorgehen in Kapitel 5.4.1.7 folgend, wurde der IC₅₀-Wert für Na₂S sowie der hypothetische IC₅₀-Wert für *in-situ* erzeugtes GSSH bestimmt. Der hypothetische IC₅₀-Wert bezieht sich dabei auf die eingesetzte Startkonzentration an GSSG und Na₂S. Da die Versuche in einem Phosphatpuffer bei pH=7,4 durchgeführt wurden, entspricht der errechnete IC₅₀-Wert für Na₂S dem von H₂S, da sich aus beiden Substanzen pH-bedingt das gleiche Verhältnis an protonierten und deprotonierten Spezies bildet:



Die Versuche wurden mindestens dreimal im betreffenden Konzentrationsbereich durchgeführt. Abbildung 43 zeigt die Messergebnisse des Assays.

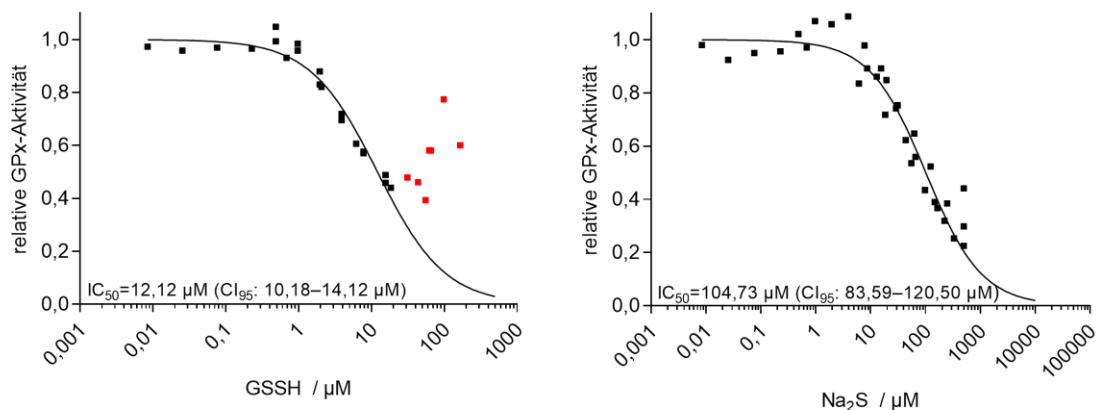


Abbildung 43: Bestimmung der IC₅₀-Werte von Na₂S und GSSH an boviner GPx-1 bei Raumtemperatur. Die Abbildung zeigt alle Messwerte über alle Versuche (n≥3). Nicht in die Berechnung einbezogene Werte sind rot markiert. Bei dem Ergebnis für GSSH handelt es sich um einen hypothetischen Wert, auf die Ausgangskonzentration der Ausgangsstoffe bezogen, da keine absolute Konzentration bekannt ist

Auffällig in Abbildung 43 ist, dass die Aktivität der GPx-1 bei höheren Konzentrationen von GSSH scheinbar steigt. Wie in Formel (2–13) dargestellt ist, wird GSSH *in situ* aus GSSG erzeugt. Der Umsatz dabei erfolgt nicht vollständig. Das bedeutet, dass auch immer GSSG mit in den Assay übertragen wird. Da GSSG ein Substrat der GR ist, wird dadurch die Messreaktion beeinflusst und die Aktivität der GPx-1 steigt scheinbar.

Dieses Experiment zeigt, dass Natriumsulfid, respektive Schwefelwasserstoff, ein schwacher Hemmer der Glutathionperoxidase ist. Die Schwankung des Ergebnisses ist wahrscheinlich auf die Bildung volatiler H₂S-Spezies zurückzuführen.

Der IC₅₀-Wert von 12,12 µM für GSSH ist sehr niedrig und dennoch als zu hoch einzuschätzen, da die Vollständigkeit der Bildung von GSSH aus den beiden Ausgangsstoffen nicht eingeschätzt werden kann. FRANCOLEON *et al.* 2011^[23] bewerten die Ausbeute der GSSH Bildung auf Grundlage von Messungen der GSSG- und GSH-Konzentrationen als 30 %. Der bestimmte IC₅₀-Wert für GSSH liegt somit schätzungsweise bei 4 µM.

2.5.4 Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente ließen die Erkenntnis zu, dass der GPx-Assay in der verwendeten Form geeignet ist, um weitere enzymkinetische Parameter, wie zum Beispiel den K_i-Wert des Pentathiepins zu bestimmen. Der K_i-Wert ist die Gleichgewichtskonstante der Bildung und Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes und beschreibt die Hemmung quantitativ genauer als der beobachtete IC₅₀-Wert, da dieser von den gewählten Assaybedingungen abhängig ist.^[92] Gleichzeitig ist es möglich, aus den dazugehörigen Experimenten die Art der Hemmung zu berechnen, wie es in Kapitel 5.4.1.5 beschrieben ist.

2.5.4.1 Versuchte Bestimmung des K_i-wertes gegen GSH von Pentathiepin 26

Um den K_i-Wert zu bestimmen, wurde die Hemmung der bovinen GPx-1 mit verschiedenen Pentathiepin- und GSH-Konzentrationen untersucht. Die Hemmung wurde bei Konzentrationen des Pentathiepins **26** zwischen 0–10 µM und GSH-Konzentrationen zwischen 0–4 mM bestimmt. Allerdings konnte der Versuch nicht ausgewertet werden, da bereits ohne Anwesenheit des Enzyms GPx-1 folgendes Verhalten beobachtet wurde:

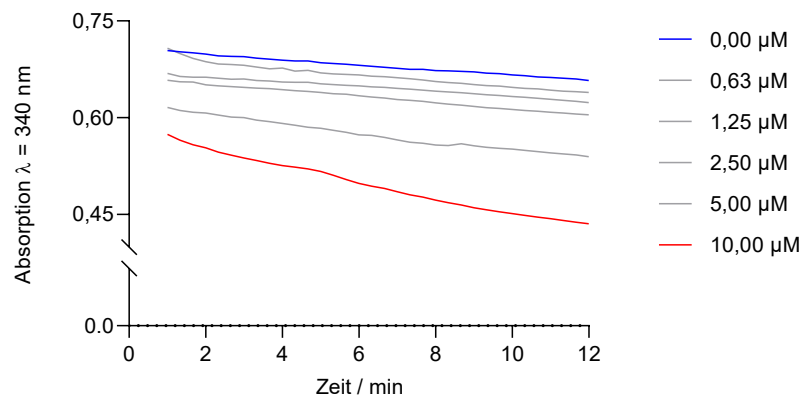


Abbildung 44: Abnahme der Absorption im GPx-Assay in Abwesenheit von GPx-1 bei Raumtemperatur. Bei einer Konzentration von 3 mM GSH wurden unterschiedliche Konzentrationen von Pentathiepin 26 getestet. Dargestellt ist die Abnahme der Absorption bei $\lambda = 340$ nm nach Zugabe aller Assaybestandteile ohne Zugabe von GPx-1. Die Reaktion zwischen GSH und Pentathiepin 26 beeinflusst die Messreaktion stark

Obwohl sich in diesem Experiment bereits auf die Konzentrationen von GSH bis maximal 4 mM beschränkt wurde, beeinflusst die Reaktion zwischen Pentathiepin 26 und GSH ohne Anwesenheit von GPx-1 die Messreaktionskinetik so stark, dass die Auswertung der erhaltenen GPx-Aktivitäten nicht möglich war.

2.5.4.2 Bestimmung des K_m -Wertes von *t*-BHO an boviner GPx-1

Um die Probleme bei der Bestimmung des K_i -Wertes von Pentathiepin 26 zu umgehen, sollte der Versuch bei gleichbleibender GSH-Konzentration von 250 μ M erfolgen, während die Konzentration des zweiten Kosubstrates *t*-BHO, verändert wurde, um so eine Bestimmung eines K_i -Wertes zu ermöglichen. Dazu war es notwendig, zunächst den K_m -Wert von *t*-BHO als GPx-1-Substrat zu bestimmen. Die Bestimmung erfolgte, wie in Kapitel 5.4.1.6 beschrieben und führte zu den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen.

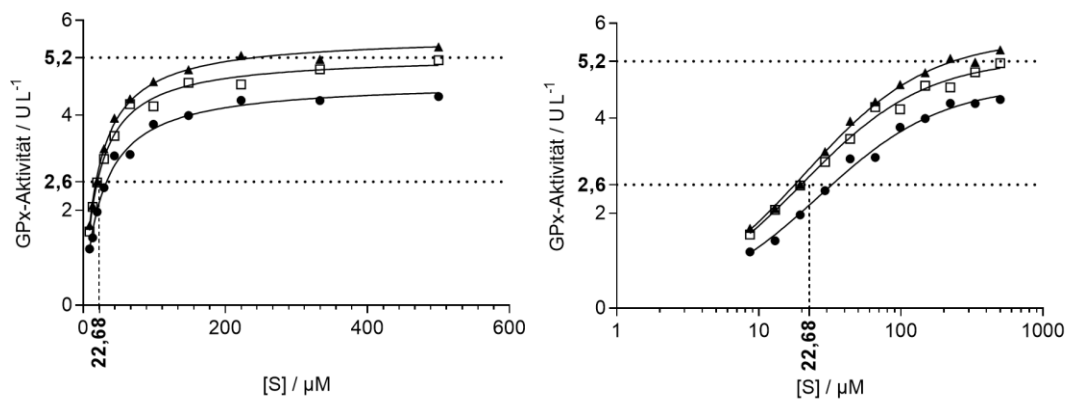


Abbildung 45: Bestimmung des K_m -Wertes von t -BHO in boviner GPx-1 bei Raumtemperatur. Die Abbildung stellt die gemessene GPx-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration an t -BHO dar – links als lineare, rechts als halblogarithmische Auftragung $c_{(\text{GSH})} = 250 \mu\text{M}$. Eingezeichnet sind die Ergebnisse für V_{max} sowie K_m . Unterschiedliche Symbole stehen für die drei unabhängigen Durchführungen

Bei einer Konzentration von $250 \mu\text{M}$ GSH erfolgt das Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $2,61 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ bei einer Konzentration von $22,68 \pm 3,34 \mu\text{M}$, ausgehend von einer bestimmten maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} von $5,22 \pm 0,48 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$. Dieser Wert stellt den K_m -Wert für t -BHO an der Glutathionperoxidase dar. Der K_m -Wert liegt damit im Bereich für publizierte Werte für H_2O_2 in CARSOL *et al.* 1997^[93], wo ein Wert von $27 \mu\text{M}$ angegeben ist.

2.5.4.3 Versuch der Bestimmung des K_i -Wertes von Pentathiepinen an GPx-1 gegen t -BHO

Unter Verwendung der in 2.5.4.2 bestimmten Michaelis-Menten-Konstante für t -BHO wurde der Versuch unternommen, den IC_{50} -Wert sowie den K_i -Wert für die Pentathiepine **25** und **26** zu bestimmen. Dafür wurde nach Bedingungen entsprechend Kapitel 5.4.1.1, mit Ausnahme der veränderten Konzentration für das Peroxid, vorgegangen. Konzentrations-Aktivitäts-Beziehungen für beide Verbindungen sind in Abbildung 46 dargestellt.

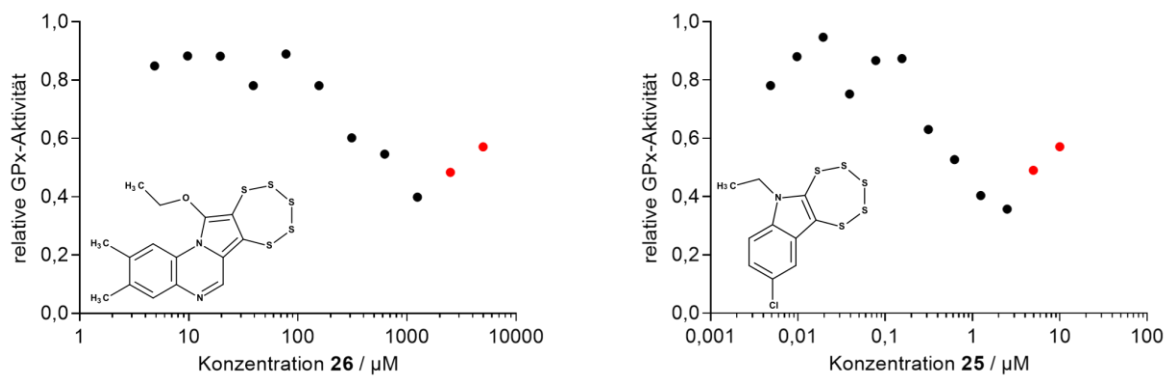


Abbildung 46: Konzentrations-Aktivitäts-Kurven mit $[t\text{-BHO}] = K_m$ für bovine GPx-1 bei Raumtemperatur links: Pentathiepin **26** $5 \cdot 10^{-3}$ – $5,0 \mu\text{M}$ – rechts: Pentathiepin **25** $5 \cdot 10^{-3}$ – $10,0 \mu\text{M}$. Ab $2,5 \mu\text{M}$ eingesetztem Pentathiepin kommt es zu einem Anstieg der gemessenen Enzymaktivität (rot markiert)

Durch die geringere Reaktionsgeschwindigkeit der GPx-1, hervorgerufen durch die verringerte eingesetzte Substratkonzentration, wirkt sich die Reaktion des Pentathiepins mit dem Substrat GSH stärker auf die Messreaktion aus, als unter Standardbedingungen. IC_{50} -Werte sind so nur abzuschätzen, eine verlässliche Bestimmung des K_i ist nicht möglich. Für beide Pentathiepine lässt sich ein IC_{50} -Wert von etwa $0,625 \mu\text{M}$ mit großer Unsicherheit graphisch bestimmen.

2.5.5 Zusammenfassung zur Untersuchung inhibitorischer Eigenschaften

Ein repräsentatives Pentathiepin wurde mittels *jump dilution* als reversibler Inhibitor der GPx-1 identifiziert. Es konnte keine zeitabhängige Hemmung festgestellt werden. Weiterhin führte die Vorinkubation eines Pentathiepins mit GSH nicht zu einer veränderten inhibitorischen Wirkung, obwohl ein Abbau unter diesen Bedingungen erfolgte. Wurde der Ansatz vor der Zugabe von GPx-1 mit GR umgesetzt, zeigte sich keine inhibitorische Wirkung des Pentathiepins mehr, was auf eine Beteiligung von Abbauprodukten an der Hemmung, sowie auf die Notwendigkeit eines zu Beginn des Assays intakten Pentathiepinrings für die Hemmung hindeutet. Ein mögliches, wenn auch nicht nachgewiesenes, reaktives Abbauprodukt, GSSH, wurde als möglicher Hemmer der GPx-1 identifiziert, wogegen H_2S keine starke Hemmung der GPx-1 zeigte. Das eröffnet ebenfalls die Möglichkeit der Wirkung durch Abbauprodukte. Diese Reaktionen jedoch führten dazu, dass eine Bestimmung enzymkinetischer Parameter aufgrund der Beeinflussung der Messreaktion nicht möglich war.

2.6 Entwicklung eines GPx-Aktivitäts-Assays mittels RP-HPLC

Da die Reaktion von Pentathiepinen mit GSH GSSG (Kapitel 2.4.2) und wahrscheinlich zusätzlich andere Polysulfide erzeugt, wird die Messreaktion des Glutathionperoxidase-assays gestört. Die GR reduziert dabei GSSG unter Verbrauch von NADPH. Dass die GR nicht nur GSSG sondern auch andere Polysulfide als Substrate reduzieren kann,^[94] trägt zusätzlich zur Beeinflussung des Assays bei der Messung der inhibitorischen Aktivität von Pentathiepinen bei. Dies stellte insbesondere bei der Bestimmung enzymkinetischer Parameter ein Problem dar. Dabei werden Enzymaktivitäten in Gegenwart des Inhibitors bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen, die sich in einem Konzentrationsbereich von $[S]=K_m$ befinden. Der K_m -Wert für Glutathion an der bovinen GPx-1 wurde zu 1,7mM bestimmt.^[82] Die Verwendung dieser hohen Glutathionkonzentration führte durch den Abbau der Pentathiepine zu nicht auswertbaren Ergebnissen. Die Hypothese war, dass durch das Entfernen der NADPH-Messreaktion, diese störenden Einflüsse eliminiert werden können. Deshalb wurde der Versuch unternommen, die Messung der GPx-Aktivität unabhängig von der NADPH-Messreaktion mittels RP-HPLC durch direkte Quantifizierung des gebildeten GSSG der GPx-1-Reaktion zu bestimmen. Um den Übertrag der Methode auf die HPLC zu ermöglichen, waren drei Hauptvoraussetzungen erforderlich:

- 1) Die Reaktion der GPx-1 muss nach einer gewissen Reaktionszeit sofort gestoppt werden können, um die Menge des gebildeten GSSG zu bestimmen.
- 2) Im Gegensatz zum Mikrotiterplattenassay mit der NADPH-Messreaktion ist ohne die GR eine kontinuierliche Messung nicht möglich. Die Enzymaktivität muss mittels initialer Geschwindigkeit bestimmt werden. Die Messmethode muss demnach eine Nachweisgrenze (LOD) besitzen, die so hoch ist, dass eine fünfzigprozentige Hemmung des Enzyms bestimmt werden kann.
- 3) Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten die Ergebnisse mit den Werten übereinstimmen, die mittels Mikrotiterplattenassay mit NADPH-Messreaktion bestimmt wurden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Beurteilung der vorangestellten drei Punkte besprochen.

2.6.1 Entwicklung einer RP-HPLC-Methode zur gleichzeitigen Quantifizierung von GSH und GSSG

Die in Kapitel 5.3.6 beschriebene Methode zur Detektion von GSSG wurde zur Aktivitätsbestimmung der GPx-1 verwendet. Eine Quantifizierung ist für Substanzen möglich, die eine Retentionszeit über 6 min und somit einen Kapazitätsfaktor von ≥ 1 aufweisen. Da weder GSH noch GSSG ein ausladendes Chromophor besitzen (siehe Abbildung 47), wird GSH in der Literatur erst derivatisiert und durch UV-Vis-Spektroskopie bzw. Fluorimetrie detektiert.^[95] Da es wichtig war, die Reaktionslösung so schnell wie möglich mittels HPLC zu quantifizieren, wurde auf eine Derivatisierung verzichtet. Anstatt GSH und GSSG zu derivatisieren, wurde die relativ schwache Absorption der Peptidbindungen des GSH bzw. GSSG direkt bei einer Wellenlänge von 210 nm photometrisch gemessen.

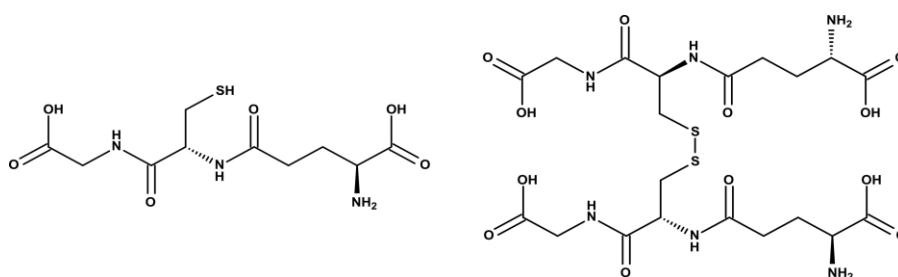


Abbildung 47: Strukturen von L-Glutathion und L-Glutathiondisulfid

Unter Verwendung einer Umkehrphase (Machery Nagel EC 250/4 Nucleodur PolarTec, 5 μm) und einer mobilen Phase von 2% Acetonitril in 10 mM Phosphatpuffer pH=3 konnten sowohl Glutathion, als auch Glutathiondisulfid mit ausreichend langen Retentionszeiten detektiert werden ($t_{R(\text{GSH})} = 6,7$ min und $t_{R(\text{GSSG})} \approx 12$ min).

2.6.2 Probenkonservierung

Im Verlauf der Entwicklung des Assays stellte sich die Probenkonservierung als der kritischste Punkt bei der Verwendung der HPLC als Analysemethode für den GPx-Assay heraus. Standardmäßig wird die Oxidation von Glutathion dadurch verhindert, dass die Probe mit einem Phosphorsäurederivat angesäuert wird^[96-98] oder der Nachweis nach Derivatisierung durchgeführt wird.^[97, 99, 100] Aufgrund des 50 mM Phosphatpuffers in der Analysenlösung war ein Ansäuern nur unter starker Verdünnung möglich bzw. führte zu Artefakten im HPLC-Chromatogramm, wenn das Ansäuern mit konzentrierten Säuren erfolgte (siehe Abbildung 48).

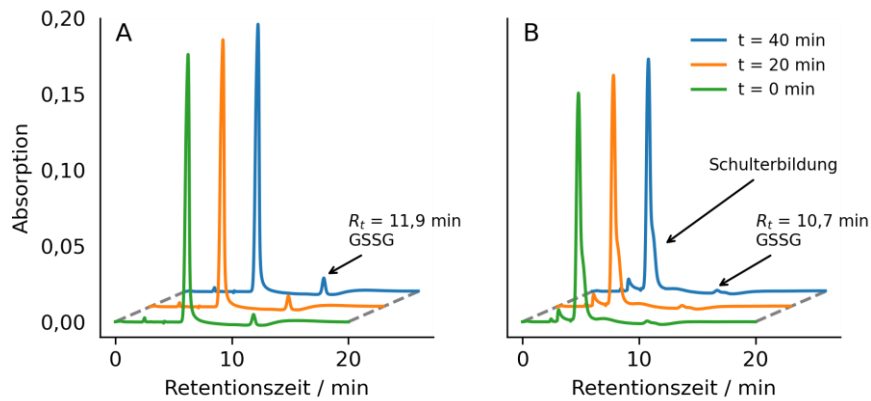


Abbildung 48: Bildung von Artefakten im RP-HPLC-Chromatogramm durch niedrigen pH-Wert. **A)** Bei Verwendung von MS zum Stoppen der Enzymreaktion kommt es durch Oxidation zur geringen Bildung von GSSG während der Standzeit im Autosampler. **B)** pH = 1,2; niedrige pH-Werte verhindern die zusätzliche Bildung von GSSG, führen aber zu Doppelpeaks von GSH und GSSG sowie erniedrigten Retentionszeiten im RP-HPLC-Chromatogramm

Aus diesem Grund wurde sich dafür entschieden, die Enzymreaktion unter Verwendung von Mercaptobernsteinsäure, einem starken, irreversiblen Inhibitor der GPx, zu stoppen. Mithilfe dieser Methode konnte die Bestimmung der Enzymaktivität mittels RP-HPLC durchgeführt werden. Die RP-HPLC-Chromatogramme aus Abbildung 49 zeigen, dass die Durchführung des GPx-Assays und das Stoppen der Enzymreaktion prinzipiell funktionieren.

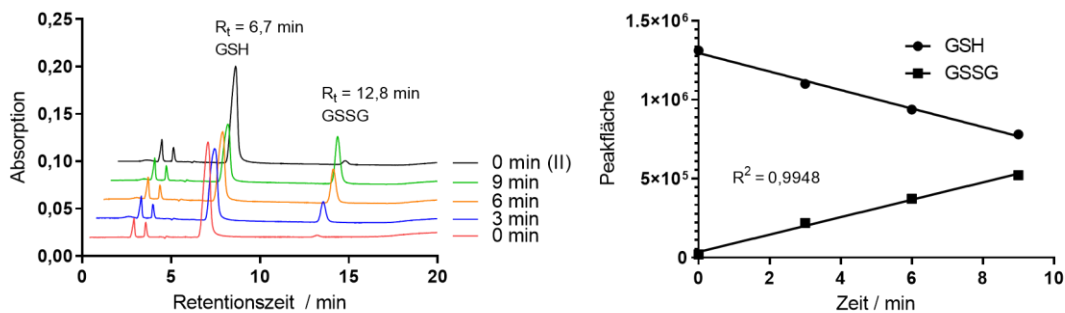


Abbildung 49: RP-HPLC-Chromatogramm und Auswertung des Anstieges der GSSG-Konzentration im RP-HPLC-basierten GPx-Assay. Links: RP-HPLC-Chromatogramme von GSH und GSSG im GPx-Assay. Die Enzymreaktion wurde aller drei Minuten durch Pipettieren von 900 μ L des Reaktionsansatzes zu 100 μ L einer 5 mM Lösung von Mercaptobernsteinsäure gestoppt. Mittels HPLC wurde die GSSG-Konzentration über die Zeit bestimmt. Rechts: Auswertung der Peakflächen von GSH und GSSG im GPx-Assay

Die GSH-Konzentration nimmt kontinuierlich ab (Peak bei 6,7 min), während die GSSG-Konzentration kontinuierlich zunimmt (Peak bei 12,8 min). Nach Abschluss der Messungen wurde ein weiteres Mal die erste Probe (t=0 min) vermessen, um die Änderung der GSSG-Konzentration zu überprüfen, welche durch die Standzeit im Autosampler zustande kommt. Die im Autosampler gebildete Menge GSSG ist zu vernachlässigen; somit ist Mercaptobernsteinsäure geeignet, nach der Probenentnahme die Reaktion zu stoppen. Wie in Abbildung 49 ebenfalls zu sehen ist, verlaufen die Abnahme der GSH-Konzentration sowie die Zunahme der GSSG-Konzentration annähernd linear, was die Bestimmung der Enzymaktivität ermöglicht.

2.6.3 Charakterisierung der Kalibrierfunktion für GSSG

Die Grenzen der Methode ergeben sich hauptsächlich aus den Grenzen der GSSG-Konzentrationsbestimmung. Der erste Messpunkt muss oberhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) liegen. Daraus und aus der Gegebenheit, dass es sich um eine Bestimmung der Initialgeschwindigkeit handelt, ergeben sich Mindestenzymaktivitäten, die gemessen werden können. Im Folgenden sind die Nachweisgrenze sowie die Bestimmungsgrenze gemäß *ICH Guideline Validation of Analytical Procedures*^[101] bestimmt:

$$\text{LOD} = \frac{3,3\sigma}{S} \quad (2-16)$$

LOD = *detection limit* – Nachweisgrenze

σ = Standardabweichung des Schnittpunkts der Kalibrationsgerade mit der Y-Achse

S = *slope* – Anstieg der Kalibrationsgerade

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S} \quad (2-17)$$

LOQ = *quantitation limit* – Bestimmungsgrenze

σ = Standardabweichung des Schnittpunkts der Kalibrationsgerade mit der Y-Achse

S = *slope* – Anstieg der Kalibrationsgerade

Zur Bestimmung beider Werte wurde eine GSSG-Kalibrationsgerade mit den Konzentrationen 1,85 – 5,56 – 16,67 – 50,00 – 150,00 μM GSSG dreimal unabhängig voneinander aufgenommen und die entsprechenden Parameter errechnet. Die Ergebnisse unter Verwendung von GPx-Puffer sowie 0,1 % DMF als Lösungsmittel für Inhibitoren sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 17: Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von GSSG unter Verwendung zweier Lösungsmittel

Lösungsmittel:	GPx-Puffer	0,1% DMF
Nachweisgrenze	1,08 μM	1,82 μM
Bestimmungsgrenze	3,28 μM	5,53 μM

Das bedeutet, dass die erste gemessene GSSG-Konzentration nicht niedriger sein darf, als die entsprechende Bestimmungsgrenze. Der in Kapitel 5.4.2 beschriebene GPx-Assay hält diese Vorgaben ein.

Da es sich bei der Detektion bei $\lambda=210\text{ nm}$ um eine grenzwertige Detektion am *cut-off* des Phosphatpuffers handelt, wurde mittels einer weiteren GSSG-Kalibrationsgeraden (6,00–12,00–24,00–50,00–150,00 μM) die Richtigkeit der Methode bestimmt. Dazu wurde eine assayähnliche Probe mit 9,00, 12,00, 24,00, 48,00, sowie 96,00 μM GSSG versetzt und die Wiederfindung bestimmt. Die Probe wurde behandelt wie eine Kontrolle des GPx-Assays, wurde jedoch vor der Zugabe von *t*-BHO der Analyse unterzogen. Das Experiment wurde sechsmal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 18: Richtigkeit des RP-HPLC basierten GPx-Assays

Zielkonzentration / μM	mittleres Ergebnis / μM	%	RSD / %
9,00	9,17	101,88	16,58
12,00	11,66	97,13	12,70
24,00	21,85	91,03	9,26
48,00	43,47	90,57	7,85
96,00	87,46	91,10	9,81

Die Wiederfindung von GSSG lag zwischen 101,88% im unteren Konzentrationsbereich und 90,57% im oberen Konzentrationsbereich. Die Präzision der niedrigeren Konzentrationen wurde zu 16,58% bestimmt, während sie sich im oberen Konzentrationsbereich auf bis zu 7,85% verbesserte.

Die Wiederholpräzision wurde durch 10-fach-Injektion des mit 9 μM GSSG gespikten Standards zu 3,5% berechnet.

Die vergleichsweise niedrige Reproduzierbarkeit ist auf die Detektionsmethode zurückzuführen, für diesen Enzymassay jedoch ausreichend, da Unterschiede zwischen Testsubstanzen erst ab 5–10-fachen Unterschieden als relevant angesehen werden können.^[102] Somit ist die HPLC-Methode prinzipiell geeignet die Enzymaktivität von boviner GPx-1 durch direkte Messung des Reaktionsproduktes zu bestimmen.

2.6.4 Vergleich der Ergebnisse des RP-HPLC- und NADPH-Mikrotiterplattenassays am Beispiel Mercaptobernsteinsäure

Zur Überprüfung, ob der neue RP-HPLC-basierte Enzymassay vergleichbare zu dem klassischen NADPH-Mikrotiterplattenassay lieferte, wurde der IC_{50} -Wert von Mercaptobernsteinsäure verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen für GSH (1,7 mM) und der GPx-1 ($0,015 \text{ U mL}^{-1}$) unterscheiden sich vom Standard-Assay, um die Bestimmung enzymkinetischer Parameter zu ermöglichen.^[82]

Nach dreifacher Durchführung des Versuches wurden die in Abbildung 50 dargestellten Werte erhalten:

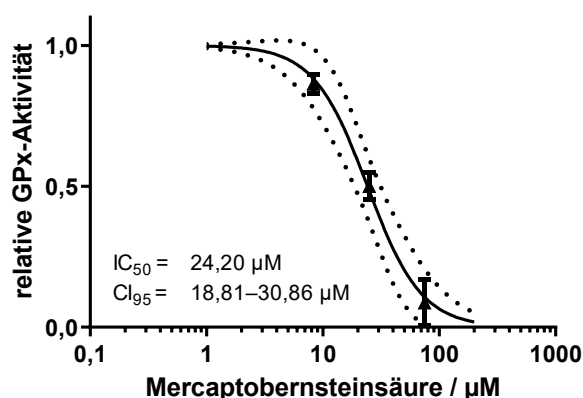


Abbildung 50: Dosis-Aktivitäts-Kurve von Mercaptobernsteinsäure im RP-HPLC-GPx-Assay

Der mit dem HPLC-Assay bestimmte Wert von $24,20 \mu\text{M}$ entspricht dem im Mikrotiterassay bestimmten Wert in BEHNISCH-CORNWELL *et al.* 2019^[82] von $24,73 \mu\text{M}$ unter den gleichen Bedingungen hinsichtlich eingesetzter Konzentrationen.

Jedoch konnte der RP-HPLC-Assay zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Pentathiepine nicht verwendet werden. Während der Standzeit im Autosampler kam es in Gegenwart von Pentathiepin und Peroxid zur Oxidation von GSH zu GSSG. Diese Oxidation konnte durch MS nicht unterbunden werden.

2.7 Liposomen als Träger von Pentathiepinen

Pentathiepine weisen eine hohe Lipophilie, geringe Wasserlöslichkeit sowie eine geringe chemische Stabilität in biologischen Medien auf, insbesondere in Gegenwart von Glutathion. Das erschwert die biologische Testung in *in-vitro* sowie *in-vivo* Modellen zur Testung der antitumoralen Aktivität. Weiterhin stellte sich die Frage, inwieweit der postulierte Aktivierungsmechanismus der Pentathiepine durch GSH, welcher außerhalb lebender Zellen gezeigt werden konnte,^[13, 37, 42, 43] auf den Aktivierungsmechanismus innerhalb der Zellen *in-vitro* angewendet werden kann. Zusätzlich zu den Stabilitätsuntersuchungen an Pentathiepinen mit unterschiedlichem Grundgerüst (siehe Kapitel 2.3) sollte ein Beispielpentathiepin (6-Ethoxy-[1,2,3,4,5]pentathiepino[6,7-*a*]indolizin-9-yl)[4-(4-fluorbenzoyl)piperazinyl]methanon – das bereits in Kapitel 2.3 getestete Pentathiepin **36**, in Liposomen inkorporiert werden.

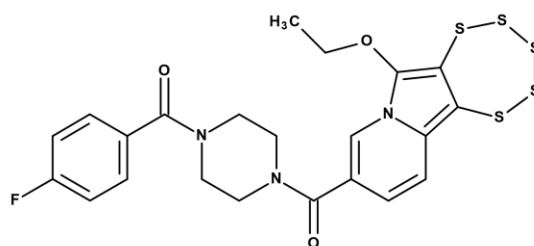


Abbildung 51: Struktur von Pentathiepin **36**

Durch eine liposomale Formulierung, so die Arbeitshypothese, sollte das Pentathiepin von extra- wie intrazellulärem GSH abgeschirmt, die Substanz stabilisiert und somit die Wirkdauer erhöht werden, um so eine verbesserte antiproliferative Wirkung zu erzeugen. Dazu war es zunächst notwendig, eine geeignete Analytik zu etablieren, um die Menge an Wirkstoff in den beladenen Liposomen zu quantifizieren. Der Fokus dieses Kapitels liegt somit auf der Entwicklung und Anwendung einer RP-HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Pentathiepin **36** in Liposomen. Des Weiteren sollte die Stabilität des liposomalen Pentathiepins in Gegenwart von GSH bestimmt, sowie dessen antiproliferative Aktivität an humanen Krebszelllinien in Kultur bewertet werden.

2.7.1 Charakterisierung der Liposomen

Die DOPC-basierten Liposomen, welche im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mihaela Delcea hergestellt wurden, wurden nach der Herstellung mittels UV-Vis-Spektroskopie hinsichtlich der Beladung mit Pentathiepinen charakterisiert:⁴

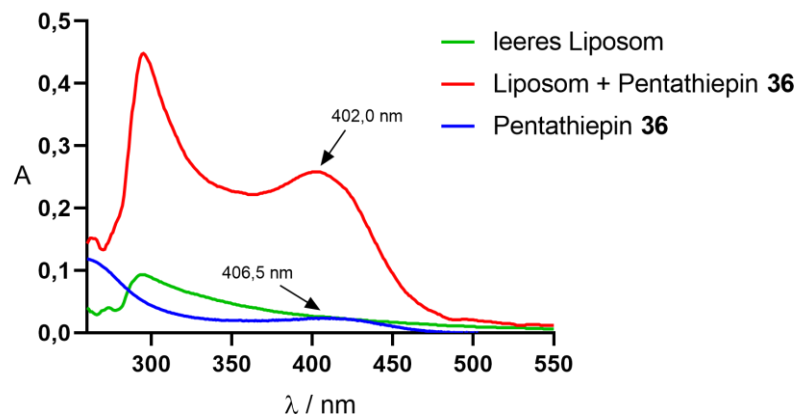


Abbildung 52: Vergleich der UV-Vis-Spektren beladener und unbeladener Liposomen. UV-Vis-Spektren von Liposomen mit Pentathiepin (rot) in PBS und Kontroll-Liposomen ohne Pentathiepin (grün) in PBS sowie das UV-Vis-Spektrum von Verbindung **36** bei einer Konzentration von 5 μ M in PBS. pH=7,4, T=23°C, d=1 cm

Abbildung 52 zeigt die UV-Vis-Spektren der leeren Liposomen, beladenen Liposomen sowie des freien Pentathiepins **36** in *phosphate buffered saline* (PBS) bei pH=7,4. Auffällig ist die deutliche Veränderung des Absorptionsspektrums der leeren Liposomen nach Beladung mit Pentathiepin. Durch die Beladung wird ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=402,0$ nm erzeugt. Dieses Maximum liegt in etwaiger Übereinstimmung mit dem gemessenen Maximum bei 406,5 nm des freien Pentathiepins. Der Unterschied in der gemessenen Wellenlänge geht möglicherweise auf die veränderte elektronische Umgebung durch die liposomale Membran, die limitierte Konzentration des freien Pentathiepins in wässrigen Medium sowie auf die Verwendung von zwei unterschiedlichen UV-Spektrometern zurück. Während die Liposomen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mihaela Delcea an einem DS-11-FX μ Volume Spektrophotometer (T=23°C, d=1 cm) aufgenommen wurden, fand die Aufzeichnung des Spektrums von Verbindung **36** mit einem Specord S 600 in unserem Arbeitskreis statt. Zusätzlich handelt es sich bei der liposomalen Zubereitung um eine Nano-

⁴ Durchgeführt durch Mitarbeiter des Arbeitskreises von Prof. Dr. Mihaela Delcea.

dispersion. Der für die UV-Vis-Spektroskopie freie Strahlengang ist demnach teilweise unterbrochen. Dennoch ist der Schluss zulässig, dass aufgrund dieser Ergebnisse die Beladung des Liposomens mit Pentathiepin erfolgreich verlaufen erscheint.

Die Größenverteilung der Liposomen sollte sich für biologische Anwendungen um 100 nm befinden. Zusätzlich ermöglicht dieser Größenbereich eine Filtration durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 μM . Zur Bestimmung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers sowie der Größenverteilung kam *dynamic light scattering* (DLS) zum Einsatz.⁴ DLS basiert auf der mathematischen Auswertung von Beugungsmustern beim Lichtdurchgang durch partikelenthaltende Flüssigkeiten. Das Ergebnis der Charakterisierung ist in Abbildung 53 dargestellt. Die DLS-Messungen in Abbildung 53 zeigen, dass die Größenverteilung der mit Pentathiepin beladenen und unbeladenen Liposomen im avisierten Bereich liegt und somit für die weitere Verwendung geeignet war.

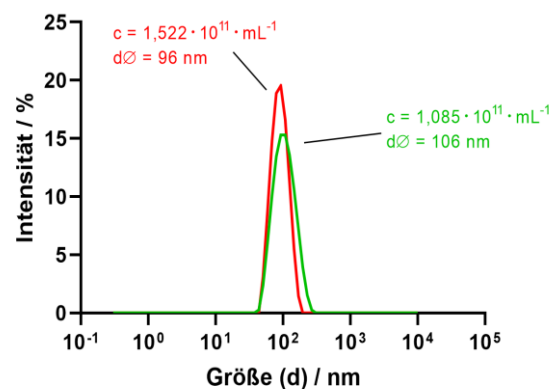


Abbildung 53: Vergleichende DLS-Messung beladener und unbeladener Liposomen. Größenverteilung der Kontroll-Liposomen ohne Pentathiepin (grün) bei einer Partikelkonzentration von $1,085 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ in PBS bei Raumtemperatur mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $106 \pm 31 \text{ nm}$ ($\text{PDI} = 0,152$) und mit Pentathiepin beladene Liposomen (rot) mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $96 \pm 16 \text{ nm}$ ($\text{PDI} = 0,188$) bei einer Partikelkonzentration von $1,522 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$

Das Zetapotential der Liposomen wurde nach 10-facher Verdünnung in deionisiertem Wasser zu $-8,0 \pm 0,4 \text{ mV}$ für die mit Pentathiepin beladenen und $-12,6 \pm 1,43 \text{ mV}$ für die unbeladenen Liposomen bestimmt.⁵ Diese Zetapotentiale liegen innerhalb des erwarteten Bereiches für neutrale Liposomen aus Phosphocholin enthaltenden Lipiden.^[76] Das gemessene Potential weist darauf hin, dass die Liposomen im Wesentlichen ungeladen sind.

⁵ Durchgeführt durch Mitarbeiter des Arbeitskreises von Prof. Dr. Mihaela Delcea.

2.7.2 Etablierung eines Extraktionsverfahrens sowie der RP-HPLC-Analytik zur Bestimmung der Konzentration von Pentathiepin 36 in Liposomen

Die Entwicklung des Extraktionsverfahrens für Pentathiepine in Liposomen basierte auf der Publikation von IMMORDINO *et al.* 2003^[103], in der die Extraktion von Paclitaxel aus Liposomen beschrieben ist. Das auf die Liposomen mit Pentathiepinen angepasste Vorgehen ist in Kapitel 5.3.8 ausführlich beschrieben. Das Verfahren ist für die Extraktion lipophiler Substanzen aus der Liposomenmembran geeignet. Durch das Versetzen mit einer Acetonitril-Wasser-Mischung kommt es zur Desintegration der Liposomenmembran^[104] und zur Freisetzung des in die Membran inkorporierten Pentathiepins. Die freigesetzte Substanz kann dann mittels eines mit Acetonitril/Wasser möglichst nicht mischbaren organischen Lösungsmittels, in diesem Fall Diethylether, extrahiert werden. Nach Zentrifugation und Eindampfen unter einem Stickstoffstrom konnte der dabei entstehende Rückstand in einem geeigneten Lösungsmittel (hier mobile Phase) für die RP-HPLC-Untersuchung aufgenommen werden. Im Folgenden wird auf die Überprüfung der Identität der so extrahierten Substanz, die Reproduzierbarkeit der verwendeten Kalibrationsmethode, sowie Möglichkeiten zur Keiminderung in Liposomen eingegangen.

2.7.2.1 Überprüfen der Identität der extrahierten Substanz

Verschiedene mit Pentathiepin 36 beladene Liposomen wurden gemäß dem Protokoll in Kapitel 5.3.8 extrahiert und die erhaltene Konzentration an Pentathiepin in $\mu\text{mol L}^{-1}$ berechnet. Vor der Verwendung der Methode musste sichergestellt werden, dass es sich bei der extrahierten Substanz um das zu bestimmende Pentathiepin handelte und kein Abbauprodukt enthalten war. Für die Identitätsbestätigung wurde die Retentionszeit der extrahierten Substanz, sowie das mittels Dioden-Array-Detektor (DAD) erhaltene UV-Vis-Spektrum herangezogen. Verglichen wurde das Produkt der Extraktion mit einer frisch hergestellten Lösung von Verbindung 36.

Aus Abbildung 54 ist ersichtlich, dass es sich bei der extrahierten Substanz um Pentathiepin 36 handelt. Die Retentionszeiten beider Substanzen stimmen im RP-HPLC-Chromatogramm unter identischen Bedingungen überein. Des Weiteren sind die UV-Vis-Spektren der Peaks im Bereich von 200–500 nm vergleichbar. Die Spektren wurden mittels

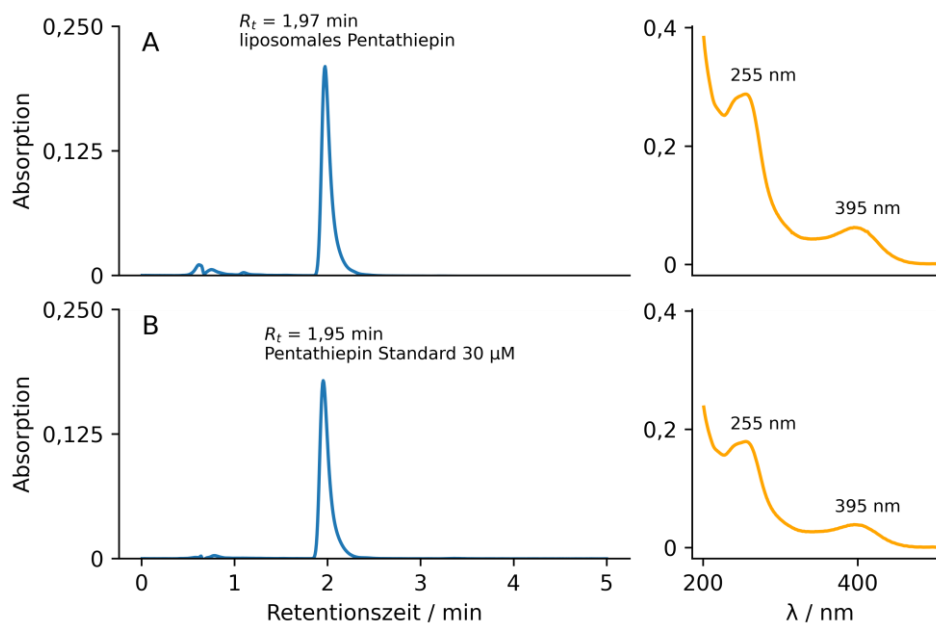


Abbildung 54: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme sowie der UV-Vis-Spektren des freien und liposomalen Pentathiepins **36** nach Extraktion aus Liposomen. Acetonitril/Wasser (80/20), $1,25 \text{ mL min}^{-1}$, Chromolith® SpeedRod RP18e 50-4,6 mm, Detektion $\lambda = 240\text{--}260 \text{ nm}$ integriert. A) liposomales Pentathiepin **36** nach Extraktion aus Liposomen, UV-Vis-Spektrum des Peaks bei 1,97 min. B) freies Pentathiepin **36** $30 \mu\text{M}$, UV-Vis-Spektrum des Peaks bei 1,95 min

DAD aufgenommen. Ersichtlich ist die generell niedrigere Absorption des freien Pentathiepins, was mit der geringeren Konzentration in der analysierten Lösung zusammenhängt. Die Maxima befinden sich jedoch bei denselben Wellenlängen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Beladung und Extraktion erfolgreich verlaufen sind.

Zusätzlich wurde in einer zweiten Extraktion der bereits einmal extrahierten Liposomen kein weiteres Pentathiepin detektiert (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Informationen lässt sich schließen, dass die Extraktion vollständig und selektiv erfolgt.

2.7.2.2 Vergleich der Standardadditions- und externen Kalibriermethode

Obwohl die Vollständigkeit der Extraktion wahrscheinlich ist (siehe Kapitel 2.7.2.1), können Matrix-Effekte während der Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht von vornherein ausgeschlossen werden und müssen überprüft werden. Die Richtigkeit einer externen Kalibrierungsmethode kann mittels einer Standardadditions-Methode überprüft werden. Dafür wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der dieselbe Probe gleichzeitig mit Externer-Standard- sowie Standardadditionsmethode bestimmt wurde. Gewählt wurden folgende Pentathiepinstandardkonzentrationen: $2,78 - 5,56 - 11,11 - 16,67 - 22,22 \mu\text{M}$ (externe Kalibrierung) sowie $0,00 - 2,50 - 5,00 - 10,00 - 15,00 \mu\text{M}$ (Standardaddition). Abweichend von der

allgemeinen Vorschrift wurde für die Aufbereitung der Proben folgende Prozedur genutzt: Für die Standardadditionsmethode wurden 450 μL des Standards zu 50 μL Probe hinzugefügt und nach Extraktion in 100 μL mobiler Phase aufgenommen. Für die externe Kalibrationsmethode wurden 50 μL eingesetzt und nach der Extraktion in 100 μL mobiler Phase aufgenommen. Somit muss für die externe Kalibrationsmethode ein Verdünnungsfaktor von $\text{VF}=2,66$ und für die Standardadditionsmethode von $\text{VF}=10$ berücksichtigt werden. Die beiden Kalibrationen sind nachfolgend graphisch dargestellt.

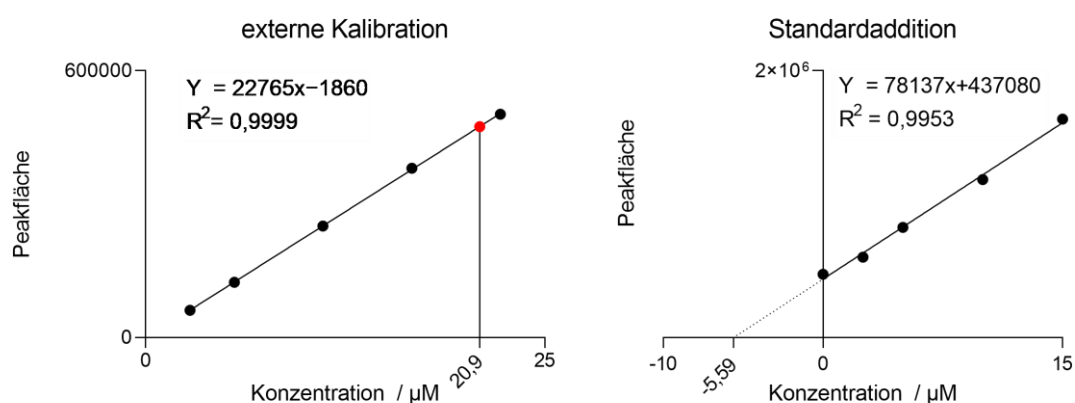


Abbildung 55: Vergleich zweier Kalibrationsmethoden für Pentathiepin **36** in Liposomen. Beispielhafte Darstellung zweier Experimente aus $n=3$. Auf beide errechnete Konzentrationen muss im Anschluss der jeweilige Verdünnungsfaktor angewendet werden

Mithilfe der Kalibrationen aus Abbildung 55 wurden in drei Versuchen die Konzentrationen der liposomalen Zubereitung bestimmt.

Tabelle 19: Vergleich der Parameter zweier Kalibrationsmethoden für Pentathiepin **36** in Liposomen; Angegeben sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmung, das Bestimmtheitsmaß R^2 ; die um den jeweiligen Verdünnungsfaktor korrigierte Steigung der Kalibrationsgeraden sowie die relative Standardabweichung (RSD) des Mittelwertes der bestimmten Konzentration

Method	Mittelwert	R^2	korrigierte Steigung	RSD
Standardaddition	58,51 μM	0,9953	7814 $\text{mAU } \mu\text{mol}^{-1}\text{L}^{-1}$	0,103
externe Kalibration	56,29 μM	0,9999	8558 $\text{mAU } \mu\text{mol}^{-1}\text{L}^{-1}$	0,092

Für die externe Kalibration wurde unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors von $\text{VF}=2,66$ eine Wiederfindung mit Mittelwert von 56,29 μM und einer relativen Standardabweichung von 9,21 % ermittelt. Dagegen wurde für die Standardaddition unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors von $\text{VF}=10$ ein Mittelwert von 58,51 μM und eine relative Standardabweichung von 10,31 % errechnet. Die Differenz der beiden Kalibrationsmethoden war nicht signifikant ($t(3,911)=0,4848$, $p>0,05$ (Welch-Test, Normalverteilung mit

Shapiro-Wilk-Test überprüft ($\alpha=0,05$)). Die Steigung der Kalibrationsgeraden nach Anwendung der Verdünnungsfaktoren ist annähernd gleich. Somit wird angenommen, dass die Extraktion durch Matrixeffekte nicht beeinflusst wurde und eine einfache externe Kalibration verwendet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das verwendete Extraktions- und Quantifizierungsverfahren vollständig und selektiv verläuft. Dabei kann die einfachere und schnellere externe Kalibrationsmethode zur Quantifizierung herangezogen werden, da die Matrix-Effekte unbedeutend sind. Die relative Standardabweichung von etwa 10% für die Quantifizierung bei der Verwendung beider Kalibrationsmethoden ist vergleichsweise hoch und der aufwändigen Probenbehandlung geschuldet.

2.7.3 Löslichkeit des Pentathiepins 36 in wässrigem Medium und in liposomaler Zubereitung

Die Löslichkeit des freien Pentathiepins wurde bestimmt, indem der Feststoff von Pentathiepin 36 vor Licht geschützt vorsichtig für 24 h in PBS geschüttelt wurde. Anschließend wurde der Überstand zentrifugiert, filtriert und mittels RP-HPLC vermessen. Dabei ergab sich, dass im dreifach durchgeführten Versuch kein Peak für das Pentathiepin in der RP-HPLC ermittelt werden konnte. Die Löslichkeit ist somit geringer, als der kleinste verwendete Standard und ist somit als $<3 \mu\text{M}$ anzugeben.

Die in Kapitel 2.7.2.2 bestimmten Konzentrationen bewegten sich im Bereich von $50\text{--}60 \mu\text{M}$. Da $60 \mu\text{M}$ für eine biologische Testung aufgrund der Notwendigkeit mehrfacher Verdünnung zu gering war, wurde im Arbeitskreis von Prof. Mihaela Delcea die eingesetzte Menge Pentathiepin verfünffacht, um höhere Konzentrationen in der liposomalen Zubereitung zu erreichen. Konkret wurden in den mit mehr Pentathiepin hergestellten Chargen die in Tabelle 20 angegebenen Konzentrationen gemessen.

Nach Optimierung der eingesetzten Menge Pentathiepin während des Herstellungsprozesses wurden Konzentrationen zwischen 120 und $410 \mu\text{M}$ erreicht, wobei die durchschnittliche Konzentration bei $257 \mu\text{M}$ lag. Die relative Standardabweichung von 30% weist auf die hohe Variabilität des Herstellungsprozesses hin, wogegen die relativen Standardabweichungen der einzelnen Triplikate von 2,1% bis 13,3% reichen. Die durchschnittliche RSD beträgt 7,5%. Für ein Extraktionsverfahren dieser Art wird diese Präzision als ausreichend angesehen. Die erreichten Konzentrationen des Pentathiepins in Liposomen sind ausreichend für eine Verwendung in biologischen Versuchen. Die Löslichkeit des Pentathiepins wurde durch die liposomale Formulierung demnach etwa 10–100-fach verbessert.

Tabelle 20: Gemessene Konzentrationen an Pentathiepin **36** in Liposomen. Angegeben sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen und die für den jeweiligen Versuch erreichte RSD. Die in der letzten Zeile angegebene RSD bezieht sich auf den Mittelwert der Konzentrationsbestimmungen

Charge	Konzentration / μM	RSD
1	305,60	0,130
2	238,89	0,030
3	282,23	0,054
4	284,89	0,098
5	121,25	0,080
6	368,21	0,133
7	182,39	0,106
8	205,61	0,097
9	267,69	0,054
10	410,22	0,070
11	232,18	0,049
12	175,12	0,021
13	225,08	0,042
14	305,84	0,084
\emptyset	257,51	0,075
RSD	0,30	

Die erreichte Konzentration von etwa 400 μM entspricht bei einer eingesetzten Stoffmenge von 1,92 μmol Substanz in einem 1,5 mL-Ansatz einer Beladungseffektivität von etwa 30 %.

2.7.4 Stabilität des Pentathiepin 36 in Liposomen in Gegenwart von 10 mM GSH

Um einen direkten Vergleich des liposomalen Pentathiepins mit dem freien Pentathiepin hinsichtlich der Stabilität in Gegenwart von GSH zu ermöglichen, wurde ein Experiment analog zur Stabilitätsbestimmung des freien Pentathiepins in Gegenwart von 10 mM GSH durchgeführt, wobei die gleichen Bedingungen eingehalten wurden, wie in Kapitel 2.3.3 sowie Kapitel 5.3.4 beschrieben. Die Konzentration von 10 mM wurde gewählt, um eine Aussage zum Verhalten in Gegenwart von physiologisch vorkommenden Glutathionkonzentrationen treffen zu können.

Zu einer 5 μM Lösung des freien oder liposomalen Pentathiepins wurde GSH in einer Zielkonzentration von 10 mM zugefügt und über 50–60 min Differenzspektren bei 23 °C aufgenommen. Der Abbau des Pentathiepinrings führte zu einer Abnahme der Absorption im korrespondierenden lokalen Maximum des UV-Vis-Spektrums. Die Wellenlänge des im Differenzspektrum entstehenden lokalen Minimums wurde zur Beobachtung des Abbaus

verwendet. Dabei wurde für das liposomale Pentathiepin eine leicht hypsochrome Verschiebung der Absorption beobachtet. Die jeweiligen durchgeführten Kontrollen ohne GSH zeigten keine Abnahme der Absorption. Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Abbildung 56 dargestellt.

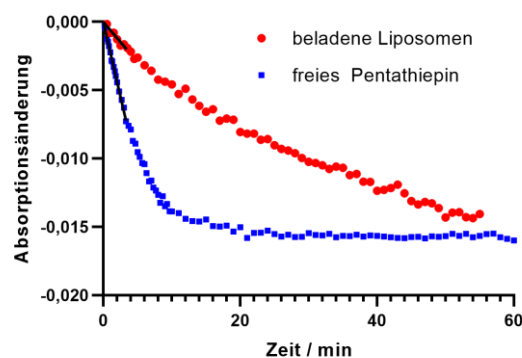


Abbildung 56: Repräsentative Daten der Abnahme der Absorption des freien und liposomalen Pentathiepins in Gegenwart von 10 mM GSH, $T = 23\text{ °C}$, $\lambda = 415\text{ nm}$ (Liposomen, rote Kreise) und $\lambda = 427\text{ nm}$ (Pentathiepin **36**, blaue Quadrate). Absorptionsabnahme des liposomalen Pentathiepins erfolgt 4-mal langsamer, als die des freien Pentathiepins. Experiment durchgeführt bei Raumtemperatur

Abbildung 56 zeigt einen deutlichen Unterschied in der Stabilität zwischen der liposomalen Formulierung und dem freien Pentathiepin. Während das freie Pentathiepin **36** in Gegenwart von 10 mM GSH nach 13 min bereits vollständig abgebaut war, zeigte sich das Einstellen eines Plateaus bei der liposomalen Zubereitung erst nach etwa 50 min. Auch die initiale Reaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt als die Steigung der Absorptionsänderung während der ersten 5 min, unterscheidet sich 4-fach. Tabelle 21 fasst die Ergebnisse dieses Versuches übersichtlich zusammen.

Tabelle 21: Übersicht der Ergebnisse der vergleichenden Stabilitätsuntersuchung zwischen dem liposomalen und freien Pentathiepin **36**. Initiale Reaktionsgeschwindigkeit als Abnahme der Absorption bei der angegebenen Wellenlänge

Probe	Wellenlänge (λ)	Plateau erreicht nach	initiale Geschwindigkeit
Pentathiepin 36	427 nm	13 min	$-2,2 \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$
Liposomales Pentathiepin 36	415 nm	50 min	$-0,6 \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$

Die Stabilität gegenüber GSH wurde durch die liposomale Verarbeitung auf das 4-fache gesteigert, was die Liposomen prinzipiell als Carrier für Pentathiepine geeignet erscheinen lässt.

2.7.5 Vorgehen zur Keimminderung der liposomalen Zubereitung bei Lagerung

Vor der Verwendung der Liposomen für Zellversuche musste eine geeignete Methode zur Keimminderung bei Lagerung ausgewählt werden. Standardmethoden wie Autoklavieren, trockene Hitze oder UV-Strahlung wurden wegen der thermischen und weiteren energetischen Einwirkung auf die Liposomen verworfen.^[105] Gewählt wurde eine Filtration durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter Minisart SFCA (netzmittelfreies Celluloseacetat) mit Luer-Lock. In einem Vorversuch wurde überprüft, ob durch die Filtration Veränderungen an den Liposomen auftraten. Dafür wurden die Parameter mittlerer hydrodynamischer Durchmesser, Partikelanzahl und Pentathiepin-Konzentration gemessen und verglichen. Exemplarisch sind die Ergebnisse zweier Chargen im Folgenden dargestellt.

Tabelle 22: Vergleich filtrierter und unfiltrierter liposomaler Zubereitungen. Die jeweilige Charge wurde nach Filtration durch einen 200 nm SFCA-Filter hinsichtlich mittlerem hydrodynamischen Durchmesser, Partikelkonzentration sowie Pentathiepinkonzentration vermessen

Charge	Ø Durchmesser	Partikelkonzentration / mL ⁻¹	Pentathiepinkonzentration ± SD
1	89,5 nm	1,56 · 10 ¹¹	282,23 ± 15,11 µM
1 (filtriert)	89,6 nm	2,06 · 10 ¹¹	267,69 ± 23,29 µM
2	97,9 nm	1,15 · 10 ¹¹	284,89 ± 27,95 µM
2 (filtriert)	94,8 nm	1,38 · 10 ¹¹	313,21 ± 19,55 µM

Die Ergebnisse in Tabelle 22 lassen den Schluss zu, dass die Filtration durch einen entsprechenden 0,2 µm Filter mit der verwendeten SFCA-Membran weder zu einem Verlust von Liposomen, noch zu einer maßgeblichen Veränderung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers der Liposomen führt. Die zu erkennende Erhöhung der Partikelkonzentration in beiden Chargen ist eventuell auf den Verlust von Lösungsmittel während der Filtration zurückzuführen. Die Pentathiepinkonzentration ändert sich im Rahmen der Methodenunsicherheit nicht. Die Filtration unter der Laminar-Flow-Box wurde als geeignete Methode zur Keimreduzierung identifiziert. Dies bestätigte sich in Versuchen von anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises⁶. Nach der Filtration wurden für alle Chargen die DLS-Messungen wiederholt.

⁶Nach Aussage von Hoai-Nhi Lam führte die Filtration zum Ausbleiben einer Trübung während eines Sterilitätstests auf Anaerobier und Aerobier im Arbeitskreis von Prof. Dr. Katharina Schaufler, durchgeführt durch Dr. Elias Eger. Die unfiltrierten Proben zeigten mikrobielle Kontamination.

2.7.6 Lagerstabilität der liposomalen Zubereitung

Für die Verwendung der Liposomen im Zellversuch war es notwendig, die Stabilität nach Filtration bei einer Lagertemperatur bei 8 °C zu bestimmen. Dazu wurden die Liposomen im Kühlschrank gelagert und jede Woche deren Pentathiepinkonzentration bestimmt. Zwei Wochen nach Herstellung wurde zusätzlich die Größenverteilung der Liposomen mittels DLS überprüft, um eine Konfluenz der Liposomen auszuschließen. Dieses Vorgehen sollte sicherstellen, dass eine Liposomencharge für mindestens drei Durchführungen genutzt werden konnte.

Tabelle 23: Veränderung der Pentathiepinkonzentration in Liposomen über mehrere Wochen bei 8 °C. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier Testchargen ±SD

Woche	Konzentration Charge 1	Konzentration Charge 2
1	267,69 ± 23,29 µM	313,21 ± 19,55 µM
2	267,25 ± 12,75 µM	321,81 ± 12,25 µM
3	249,15 ± 25,07 µM	310,52 ± 7,69 µM
4	263,57 ± 24,57 µM	350,01 ± 12,59 µM

Die Konzentrationsmessungen innerhalb einer Charge Liposomen im Zeitverlauf über 4 Wochen sollten aufzeigen, dass es während der Lagerung weder zu einer Adsorption des Pentathiepins an der Kunststoffgefäßwandung des Aufbewahrungsbehältnisses, noch zum Abbau des Pentathiepins kommt. Beide Chargen zeigen keinen maßgeblichen Verlust an Pentathiepin. Die Schwankungen in den gemessenen Konzentrationen sind wahrscheinlich auf Sedimentationsprozesse zurückzuführen. Ein Aufschütteln vor der Verwendung ist deshalb erforderlich.

Dieses Verhalten warf gleichzeitig die Frage auf, ob es zur Konfluenz der Liposomen während der Lagerung kam. Deshalb wurde in Woche 3 eine weitere DLS-Messung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 24: Vergleich der DLS-Ergebnisse über mehrere Wochen bei 8 °C Lagerung. Die Proben wurden vor der Messung 1:10 in PBS verdünnt

Woche	Charge 1		Charge 2	
	∅	Partikel / mL ⁻¹	∅	Partikel / mL ⁻¹
1	89,60 nm	2,06 · 10 ¹¹	94,8 nm	1,38 · 10 ¹¹
3	86,24 nm	1,81 · 10 ¹¹	94,0 nm	1,11 · 10 ¹¹

Die Ergebnisse der DLS-Messung in Tabelle 24 zeigen keine Veränderung hinsichtlich der durchschnittlichen Partikelgröße. Die Abnahme der Partikelkonzentration liegt im Rahmen

der üblichen Messschwankungen und kann andererseits durch Sedimentation entstehen. Eine Verwendung der gelagerten Proben erfolgte aus diesem Grund immer erst nach vorsichtigem Aufschütteln der Proben.

2.7.7 Bestimmung der antiproliferativen Aktivität der Liposomen im Vergleich zum freien Pentathiepin

Da die Reaktion mit Glutathion als Aktivierungsmechanismus der Pentathiepine innerhalb der Zellen angesehen wird,^[13, 35, 37] stellte sich die Frage, inwieweit die biologische Aktivität hinsichtlich antiproliferativer Eigenschaften durch die mögliche Abschirmung des Pentathiepins von GSH die Wirksamkeit des getesteten Pentathiepins *in-vitro* beeinflusst. Um diese Frage zu beantworten wurde sowohl für das freie Pentathiepin als auch für die liposomale Pentathiepinzubereitung diejenige Konzentration bestimmt, die im Kristallviolett-Assay (Kapitel 5.5.4) zu einer 50%igen Reduktion des Zellwachstums (GI_{50}) führte. Durchgeführt wurde das Experiment an zwei Zelllinien, die bereits zur Charakterisierung des freien Pentathiepins genutzt wurden:^[43] SiSo (*cervical cancer cells*) sowie A2780 (*human ovarian cancer cells*). Der Kristallviolett-Assay beruht auf der Tatsache, dass Kristallviolett nur in fixierte Zellen eindringen kann und anschließend einen wasserunlöslichen Komplex mit der DNA bildet. Nach einem Waschschriff wird der Kristallviolett-DNA-Komplex in Ethanol gelöst und kann UV-Vis-spektroskopisch bei $\lambda=570\text{nm}$ gemessen werden. Die relative Aktivität wurde auf eine Lösungsmittelkontrolle bezogen. Die Methode misst die Proliferation der kultivierten Krebszellen durch Quantifizierung der DNA-Äquivalente in den Wells, was ein Maß für die Anzahl der Krebszellen ergibt.

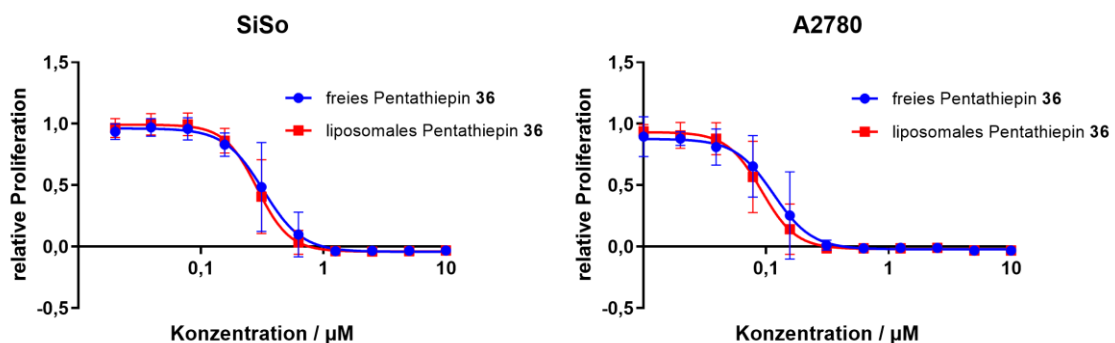


Abbildung 57: Vergleich der antiproliferativen Eigenschaften des freien liposomalen Pentathiepins **36** in zwei Zelllinien. Aufnahme einer Dosis-Proliferations-Kurve mittels Kristallviolett-Assay, Mittelwerte aus $n=3 \pm SD$

Die in Abbildung 57 gezeigten Ergebnisse werden durch die GI₅₀-Zahlenwerte (50% Wachstumshemmung, *growth inhibition*) entsprechend bestätigt:

Tabelle 25: Vergleich der GI₅₀-Werte des Kristallviolett-Assays für das freie und liposomale Pentathiepin **36**.
n=3

Probe	A2780 GI ₅₀ (CI ₉₅) / μM	SiSo GI ₅₀ (CI ₉₅) / μM
freies Pentathiepin 36	0,10 (0,03–0,38)	0,32 (0,11–0,97)
Liposomales Pentathiepin 36	0,09 (0,03–0,27)	0,29 (0,12–0,71)

Abbildung 57 sowie Tabelle 25 legen nahe, dass es zwischen dem liposomalen und freien Pentathiepin keinen Unterschied hinsichtlich der antiproliferativen Eigenschaften gegenüber den getesteten Krebszelllinien gibt. Weder erzeugt die höhere Stabilität gegen GSH einen biologisch messbaren Effekt, noch wird durch andere Effekte, zum Beispiel veränderter Uptake, die Wirksamkeit des Pentathiepins abgemildert. Das weist darauf hin, dass die intrazelluläre Verteilung des Pentathiepins aufgrund seiner von sich aus hohen Lipophilie nicht durch die Formulierung in Liposomen geändert wird.

2.7.8 Zusammenfassung der Verwendung einer liposomalen Formulierung

Durch die Verwendung eines DOPC-basierten liposomalen Trägersystems für Pentathiepin **36** wurde die Löslichkeit in wässrigen Medien pH=7,4 von unter 3 μM auf über 400 μM erhöht. Es war möglich, die erhaltene Formulierung vor Assays in der Zellkultur durch einen 0,2 μM SFCA-Filter zu filtrieren. Weitere Untersuchungen ergaben ausreichende Stabilität für die Testung in der Zellkultur, sowie eine vierfach erhöhte Stabilität des Pentathiepins in Gegenwart von 10 mM GSH. Die antiproliferative Wirkung des Pentathiepins wurde durch die Liposomen nicht beeinträchtigt.

3 Diskussion ausgewählter Ergebnisse

3.1 Diskussion der Stabilitätsuntersuchungen

In Kapitel 2.3 wurde die Reaktion repräsentativer Pentathiepine mit dem biologisch vorkommenden Thiol Glutathion untersucht. Erste Untersuchungen zur Stabilität von Pentathiepinen wurden von CHATTERJI UND GATES 2003^[37] publiziert. Dabei lag das Augenmerk auf der Reaktion von 7-Methylbenzopentathiepin mit Mercaptoethanol in Chloroform. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass in Gegenwart eines Überschusses an Thiol das Pentathiepin nukleophil angegriffen wird und unter Abspaltung von H₂S zum aromatischen, vicinalen Dithiol abgebaut wird.^[106] Das Reaktionsschema ist in Abbildung 58 dargestellt.

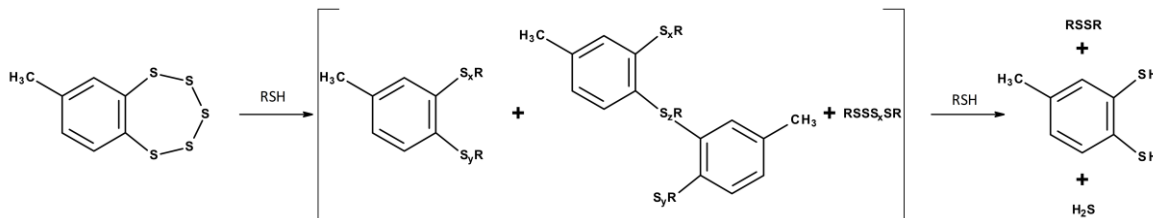


Abbildung 58: Abbau von 7-Methylbenzopentathiepin in Gegenwart eines Überschusses an Mercaptoethanol. Modifiziert nach CHATTERJI UND GATES 2003^[37]. Die Hauptprodukte der Reaktion sind das aromatische, vicinale Dithiol sowie H₂S und das Disulfid des eingesetzten Thiols

Die Bedingungen dieser Untersuchungen sind sehr artifiziell und spiegeln nicht die biologischen Gegebenheiten wieder. In einem weiteren Experiment wurde durch die gleiche Arbeitsgruppe 6,25 μM 7-Methylbenzopentathiepin in Gegenwart von 188 μM GSH in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH=7,0) mit 30 % Acetonitril bei 25 °C untersucht. Dabei wurde eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute festgestellt. Die Arbeiten von, CHATTERJI UND GATES 1998^[35], CHATTERJI UND GATES 2003^[37] und CHATTERJI *et al.* 2005^[13] legen nahe, dass die Reaktion mit biologischen Thiolen durch Erzeugung reaktiver, reduzierender Schwefelspezies und das Erzeugen von Schwefelwasserstoff zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies und in der Folge zu DNA-Spaltung sowie Apoptose führt.

Da sich die Studien nur auf ein einzelnes Pentathiepin bezogen, sollte für eine Reihe Pentathiepine mit unterschiedlichen Grundgerüsten die Stabilität untersucht, sowie anschließend die bestimmte Stabilität mit den biologischen Daten korreliert werden. Herangezogen wurden dafür die Hemmung der GPx-1, die antiproliferative Wirkung auf drei humane Krebszelllinien, sowie die Modulation der GSH-Spiegel innerhalb der Zellen durch DL-Butionin-(*S,R*)-sulfoximin. Die Bedingungen sollten so physiologisch wie experimentell vertretbar gestaltet werden. Gewählt wurde eine Konzentration von 5 μM Pentathiepin, da es bei höheren Konzentrationen zum Tyndall-Effekt, also einer nicht vollständigen Lösung des Pentathiepins kam. Die Konzentration an Acetonitril sollte so gering wie möglich gehalten werden, um den Einfluss auf die Nukleophilie von Glutathion zu minimieren. Die Temperatur betrug 23 °C, da der GPx-Assay bei dieser Temperatur durchgeführt wird. Die GSH-Konzentrationen reichten von 0,250–10 mM. Da dieser Bereich einerseits die verwendete Konzentration im GPx-Assay (250 μM), andererseits die physiologisch möglichen intrazellulären Glutathionkonzentrationen (bis 12 mM^[86]) abdeckt.

3.1.1 Diskussion der verwendeten UV-Vis-spektroskopischen Methode

Die ersten Stabilitätsuntersuchungen wurden mittels RP-HPLC-Bestimmung vorgenommen (Kapitel 0). Bei der verwendeten flüssigchromatographischen Methode (Kapitel 5.3.3) war eine Datenpunktaufnahme lediglich aller 5 min möglich. Bei niedrigen GSH-Konzentrationen, zum Beispiel 250 μM , konnte der Abbau des Pentathiepins noch verfolgt werden. Bei höheren GSH-Konzentrationen war teilweise bereits bei der ersten Injektion kein Pentathiepin mehr detektierbar. Um die Datendichte zeitbezogen zu erhöhen, wurde der Stabilitätsversuch in einen UV-Vis-spektroskopischen Versuch überführt (Kapitel 5.3.4), der mit Hilfe eines Diodenarrayspektralphotometers (Spekord) eine Datenaufnahme aller 20 s ermöglicht. Es wurden zunächst die gleichen Bedingungen wie bei der RP-HPLC-Bestimmung eingehalten. Nun konnte insbesondere zu Beginn der Reaktion mehrfach innerhalb weniger Sekunden gemessen werden. In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob die UV-Vis-spektroskopische Methode vergleichbare Ergebnisse liefert, wie die RP-HPLC. Dafür wurden die Daten der Untersuchungen mit 1 mM GSH beider Methoden in Abbildung 59 verglichen.

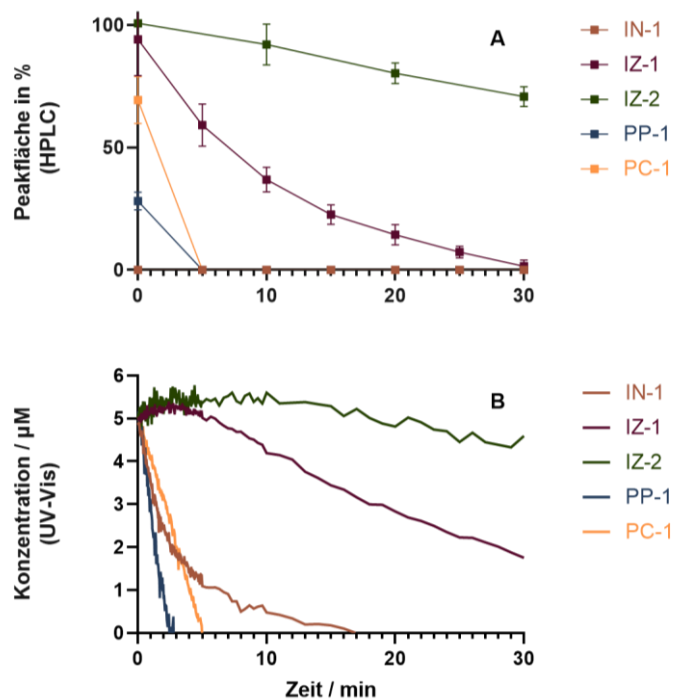


Abbildung 59: Vergleich der Stabilitätsuntersuchungen von fünf Pentathiepinen mittels RP-HPLC sowie UV-Vis-Spektroskopie. **A)** RP-HPLC-Abbaukurven der Pentathiepine in Gegenwart von 1 mM GSH. Startkonzentration 5 µM, Darstellung der Mittelwerte aus drei Versuchen, Fehlerbalken sind Standardabweichung.^[85] **B)** Abnahme der Konzentration der Pentathiepine (Startkonzentration 5 µM) in Gegenwart von 1 mM GSH gemessen mittels UV-Vis-Spektroskopie. Errechnet aus der Absorptionsabnahme im Differenzspektrum im jeweiligen Minimum (Tabelle 9), Darstellung der Mittelwerte aus drei Versuchen. Die Spektren wurden aufgenommen bei pH = 7,4, T = 23°C, d = 1 cm^[85]

Aus Abbildung 59 können mehrere Informationen entnommen werden. Einerseits ist zu erkennen, dass sich die aufgenommenen Stabilitätsdaten qualitativ gleichen. Relativ zu einander sind die Informationen vergleichbar, auch wenn die Absolutwerte nicht exakt übereinstimmen. Auffällig ist die Unschärfe der RP-HPLC-Methode in den ersten fünf Minuten. So ist für **IN-1** in der HPLC keine Restsubstanz nach der ersten Injektion erkennbar, wogegen im UV-Vis-Spektrum eine Halbwertszeit von 2 min gemessen wird. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die UV-Vis-spektroskopische Methode qualitativ bessere kinetische Daten liefert, als die HPLC, aber ohne Informationen zur Produktbildung.

Für die Substanz **PP-1** ergab sich eine Besonderheit. Während der Messung kam es zu einer Verschiebung des UV-Vis-Spektrums. Dieses Verhalten ist in Abbildung 60 dargestellt.

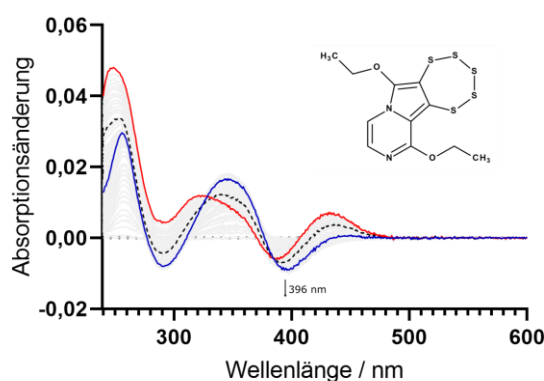


Abbildung 60: Differenzspektren von **PP-1** ($c=5\mu\text{M}$) in GPx-Puffer in Gegenwart von 5 mM GSH. $c_{(\text{GSH})}=5\text{ mM}$ ($T=23\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=7,4$; $d=1\text{ cm}$); in blau ist das Differenzspektrum nach 60 s abgebildet; in schwarz ist das mittlere Differenzspektrum dargestellt (15 min); in rot das zuletzt aufgenommene Differenzspektrum (30 min)^[85]

Bis etwa 60 s nach Reaktionsstart nahm die Absorption bis zum eingezeichneten, blauen Spektrum ab. Anschließend fand ein Shift hin zum rot dargestellten Spektrum statt. Da die Abnahme der Absorption bei 396 nm bis zum Ende der Absorptionsabnahme mit den RP-HPLC-Ergebnissen weitestgehend übereinstimmte, wurde diese Wellenlänge zur Bestimmung der Stabilität herangezogen. Der Shift der Wellenlängen sowie die Tatsache, dass es nicht zur Bildung isosbestischer Punkte kommt, weist darauf hin, dass es sich um eine mehrstufige Reaktion handelt.

Als prinzipiell problematisch stellte sich heraus, dass kein Pentathiepin eine Absorptionsänderung bei einer singulären Wellenlänge zeigte. Da die Absorptionsspektren der Abbauprodukte nicht bekannt sind, konnte keine Wellenlänge gewählt werden, bei der das Produkt nicht absorbiert. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Falle einer mehrstufigen Reaktion die Absorptionsspektren überlagern. Für die Auswertung der Differenzspektren wurde deshalb das langwelligste lokale Minimum gewählt, welches am wahrscheinlichsten für das Pentathiepin steht und dessen Absorptionsabnahme am besten mit den spezifischen Ergebnissen der RP-HPLC übereinstimmt.

3.1.2 Diskussion der Stabilität der Pentathiepine

Wie in Abbildung 59 zu erkennen ist, besitzen die Grundgerüste der Pentathiepine einen starken Einfluss auf die Stabilität gegenüber GSH. Indol-, Pyrrolo[1,2-*a*]pyrazin- sowie Pyrrolo[1,2-*a*]chinoxalinpentathiepine reagierten sehr schnell und wiesen nur sehr kurze Halbwertszeiten und hohe Anfangsgeschwindigkeiten bereits bei niedrigen Konzentrationen GSH auf. Die Indolizinderivate wiesen die höchste Stabilität gegenüber Glutathion auf.

Ausgehend von der These von GREER 2001^[106], dass der Angriff von GSH am aromatisch gebundenen Schwefel nukleophil erfolgt, können die Stabilitätsunterschiede der Pentathiepine durch elektronische Effekte begründet werden. Pyrrolo[1,2-*a*]pyrazin- sowie Pyrrolo[1,2-*a*]chinoxalinpentathiepine weisen Elektronenmangelaromaten auf, was die Elektronendichte am Pentathiepinring verringert und den nukleophilen Angriff von GSH erleichtert. Dem Indol fehlt dagegen die Ethoxygruppe in Position 6, welche einen +M, also einen elektronenliefernden Effekt auf das aromatische System ausübt. Generell liegen die Stabilitäten dieser drei Verbindungen im Bereich der bereits publizierten Stabilität für 7-Methylbenzopentathiepin.^[37] Die Indolizinderivate weisen diesen Elektronenmangel nicht auf, was die höhere Stabilität dieser Derivate erklären könnte. Die Unterschiede innerhalb der Indolizinderivate lassen sich weiterhin durch deren Substitution erklären. Während Pentathiepin **36** mit einem Amid in Position 9 einen Substituenten mit -M und -I-Effekt besitzt, weist das Sulfonamid in Position 9 der Verbindungen **IZ-2** und **IZ-3** diese Effekte in stark verringerten Maß auf.^[107] Die Unterschiede zwischen den Pentathiepinen **IZ-2** und **IZ-3** werden in Kapitel 3.1.3 diskutiert. Zusammengefasst sind die Unterschiede in der Stabilität innerhalb der sechs getesteten Substanzen plausibel. Diese Annahme müsste durch die Testung weiterer Substanzen gleicher sowie unterschiedlicher Grundgerüste bestätigt werden.

Bemerkenswert ist die Erhöhung der Halbwertszeit einiger Substanzen bei hohen GSH-Konzentrationen. Wahrscheinlich liegt es an der Latenz zwischen Zugabe des Glutathions zum Reaktionsgemisch und Start der Messung. Bei hohen Konzentrationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Messung größer. Dies führt dazu, dass bei Messbeginn bereits ein Teil des Pentathiepins abreagiert und die Reaktion bis zur ersten Messung deutlich langsamer geworden ist.

3.1.3 Diskussion der besonderen Stabilität von Pentathiepin **IZ-3**

Für das stabilste Pentathiepin **IZ-3** war es erst in einem über 150h dauernden RP-HPLC-Experiment möglich, einen vollständigen Abbau der Substanz in Gegenwart von 10mM Glutathion zu erreichen. Dies ist in Abbildung 61 graphisch dargestellt.

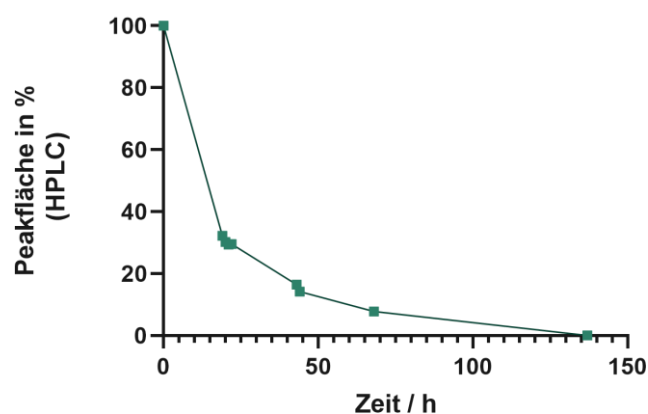


Abbildung 61: Abbau von **IZ-3** in Gegenwart von 10 mM GSH über sechs Tage. $t = 137$ h ($n = 1$, $\text{pH} = 7,4$, 23 °C)^[85]

Aufgrund dessen, dass es sich bei den Pentathiepinen **IZ-3** und **IZ-2** lediglich um sich am Substituenten des Sulfonamids unterscheidende Stoffe handelt, ist es nicht zu erklären, wieso der Abbau von **IZ-3** im Vergleich zu **IZ-2** etwa 400-mal länger dauert:

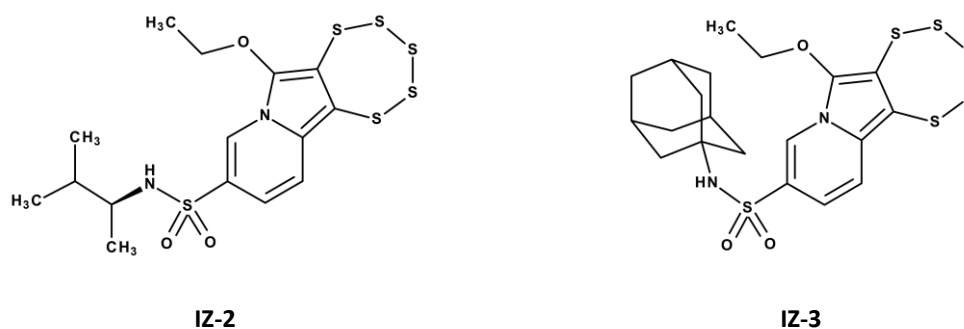


Abbildung 62: Vergleich der Strukturen von **IZ-2** und **IZ-3**. Beide Verbindungen unterscheiden sich lediglich im Substituenten des Sulfonamids. Die stark unterschiedliche Stabilität ist nicht offensichtlich

Die Lipophilie beider Substanzen unterscheidet sich etwa um eine Größenordnung (Kapitel 2.2.2), wobei beide Substanzen mit einem $\log P_{0/w,7,4 \text{ HPLC}}$ von 6,76 (**IZ-2**) und 8,03 (**IZ-3**) sehr lipophil sind. Ein Löslichkeitsproblem konnte durch eine Verdünnungsreihe ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit war eine sterische Hinderung des Angriffs von GSH am Pentathiepinring. Dies wurde von Dr. Lukas Schulig mit den in Kapitel 5.6 aufgeführten Parametern überprüft. Kurz gesagt wurde die Neigung beider Substanzen, stabile Dimere zu bilden, theoretisch mit Computerberechnungen getestet, indem zwei Moleküle auf einer Achse fixiert und die Moleküldynamik in TIP3P Wasser über 50 ns simuliert, die Positionen aller 20 ps ausgewertet und in einem Histogramm dargestellt wurden. Dabei wird der Win-

kel zwischen dem Schwefel des Sulfonamids (Molekül 1), dem mittleren Schwefel des Pentathiepins (Molekül 2) und dem Schwefel des Sulfonamids (Molekül 2) gemessen. Abbildung 63 zeigt die errechneten wahrscheinlichsten Torsionswinkel sowie die dazugehörige Häufigkeitsverteilung. Theoretisch bildet **IZ-3**, wahrscheinlich aufgrund des Adamantyl-Restes, deutlich stabilere Dimere bei etwa -90° aus, um die hydrophoben Flächen in einer hydrophilen Umgebung maximal zu verdecken. Das führt in der Simulation zu einer Abschirmung des Pentathiepinrings und könnte die höhere Stabilität von **IZ-3** gegenüber GSH erklären. In Zukunft wäre es möglich, diese These in einem weiteren Experiment zu überprüfen, indem die Reaktion zum Beispiel in einem lipophileren Lösungsmittel, wie Chloroform, in Gegenwart von Mercaptoethanol anstatt GSH durchgeführt werden würde. Käme eine Dimerisierung von **IZ-3** in wässrigen Medien zustande, sollte die Stabilität der beiden Pentathiepine **IZ-2** und **IZ-3** in Chloroform identisch sein, da die entropischen Kräfte, hydrophobe Flächen in Wasser abzudecken, in Chloroform entfallen.

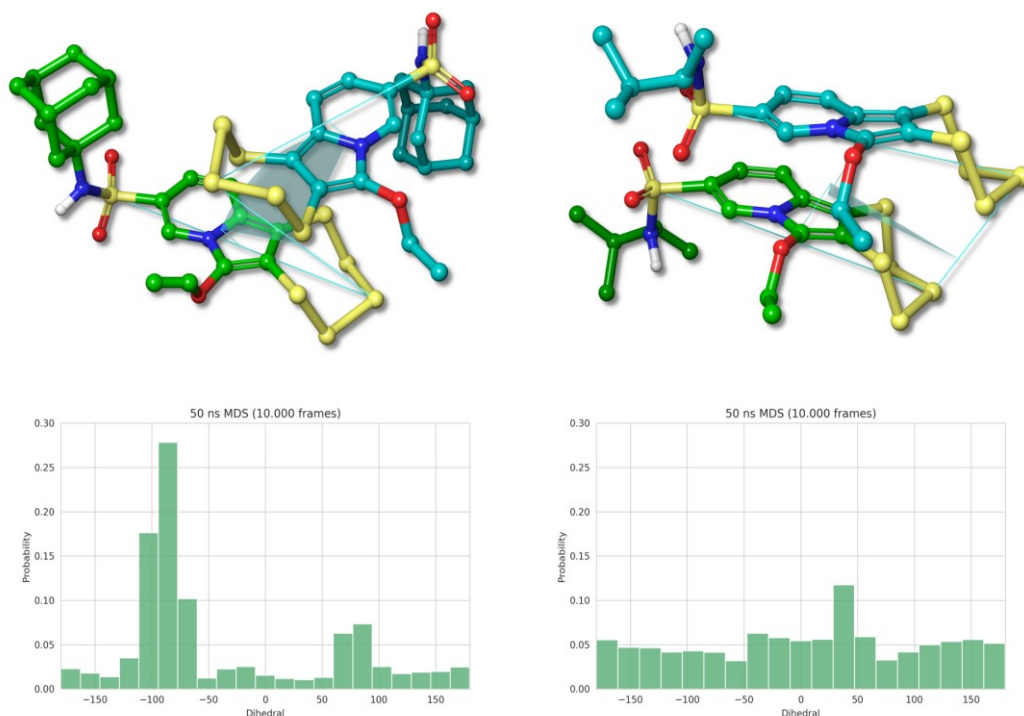


Abbildung 63: Simulierte Dimerisierung sowie Häufigkeitsverteilung der Torsionswinkel für **IZ-2** und **IZ-3**. Links: **IZ-3**-Dimerbildung beim wahrscheinlichsten Torsionswinkel bei Simulation der Moleküldynamik über 50 ns. Rechts: **IZ-2**-Dimerbildung beim wahrscheinlichsten Torsionswinkel bei Simulation der Moleküldynamik über 50 ns, Auswertung durch Dr. Lukas Schulig

3.1.4 Diskussion der Stabilität im Zusammenhang mit biologischen Daten

3.1.4.1 Abhängigkeit der GPx-Hemmung von der Stabilität der Pentathiepine

Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Stabilität der Pentathiepine und der inhibitorischen Aktivität auf GPx-1 gefunden. Unabhängig von der Reaktionsgeschwindigkeit mit GSH zeigen alle Pentathiepine in etwa die gleiche GPx-1-Hemmung. Davon ausgehend, dass die Hemmung durch Spaltung des Pentathiepinrings erfolgt, lässt sich dieses Verhalten durch die um drei Größenordnungen stärkere Azidität des Selenocysteins im aktiven Zentrum der Glutathionperoxidase, sowie die um eine Größenordnung größere Nukleophilie^[108, 109] des Selenolat-Ions gegenüber dem Thiolat-Ion erklären. Der pKa-Wert für GSH liegt in etwa bei 8,3, wogegen der pKa-Wert für Selenocystein bei 5,2 liegt.^[14] Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 liegt das Thiol von GSH protoniert vor, während das Selenocystein fast vollständig ionisiert als Selenolat vorliegt. Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich die festgestellte besondere Stabilität von IZ-3 (Struktur 7) nicht in den Ergebnissen des GPx-Assays widerspiegelt.

3.1.4.2 Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung von der Stabilität von Pentathiepin 36

In Kapitel 2.3.6 konnte gezeigt werden, dass Pentathiepin 36 bei seiner IC₅₀-Konzentration nach der Reaktion mit GSH keine antiproliferative Wirkung an zwei getesteten, humanen Krebszelllinien mehr besitzt. Das steht im Einklang mit der Literatur, die für das korrespondierende Dithiol zu Varacin eine zehnfach schwächere zytotoxische Wirkung in HeLa53-Zellen beschreibt.^[110] Die Ursache für diese unterschiedliche Wirkung ist wahrscheinlich einerseits die erhöhte Lipophilie des Pentathiepins. Diese kann die passive Aufnahme durch Membranen in Zellen erhöhen. Zusätzlich ist der intakte Pentathiepinring notwendig, um die reaktiven Schwefelspezies zu erzeugen, die weitere Wirkung entfalten. Daraus ist zu schließen, dass der Pentathiepinring für eine gesteigerte Wirkung notwendig ist.

3.1.4.3 Abhängigkeit der Aktivität im MTT-Assay von der Stabilität der Pentathiepine

In drei Zelllinien, die aufgrund ihres unterschiedlichen Glutathiongehaltes für dieses Experiment ausgewählt wurden, konnte die viabilitätsmindernde Wirkung der sechs Pentathiepine mittels MTT-Assay bestimmt werden. Dabei wurde keine Korrelation des Effekts der Pentathiepine mit dem Glutathiongehalt der Krebszelllinien festgestellt. Auch hier zeigt die in Gegenwart von GSH augenscheinlich besonders stabile Substanz IZ-3 keine abweichende Aktivität von den anderen eingesetzten Substanzen mit Indolizin-Grundgerüst.

Generell zeigten die stabileren Substanzen eine höhere Aktivität im MTT-Assay, als die instabileren. Für alle drei Zelllinien ist der Zusammenhang zwischen gemessener Aktivität sowie der Halbwertszeit in Gegenwart von 5 mM GSH in Abbildung 64 dargestellt.

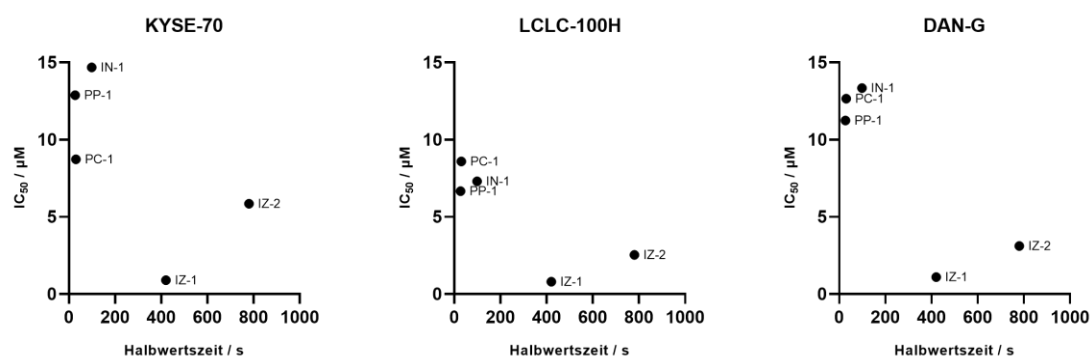


Abbildung 64: Korrelation der Aktivität der Pentathiepine im MTT-Assay mit der gemessenen Halbwertszeit in Gegenwart von 5 mM GSH. Substanzen mit höherer Stabilität weisen geringere IC_{50} -Werte im MTT-Assay auf

Die Beobachtungen, dass stabilere Pentathiepine auch höhere Zytotoxizität aufweisen, sowie, dass keine Korrelation der IC_{50} -Werte der getesteten Substanzen mit dem unterschiedlichen intrazellulären Glutathiongehalt der drei Krebszelllinien existiert, unterstützen die These der Aktivierung von Pentathiepinen durch Glutathion nicht.

Eine Abhängigkeit vom mittels RP-HPLC bestimmten $\log P$ -Wert existiert ebenfalls nicht:

Tabelle 26: Gegenüberstellung der Aktivität der Pentathiepine im MTT-Assay mit den mittels RP-HPLC geschätzten Verteilungskoeffizienten sowie dem intrazellulären Glutathiongehalt der verwendeten Krebszelllinien. Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen $[C_{(GSH)}]$ aus NEUMANN *et al.* 2003^[86], Verteilungskoeffizienten vgl. Kapitel 2.2.1 sowie 2.2.2, IC_{50} -Werte vgl. Kapitel 2.3.7

Pentathiepin	$\log_{10}P_{o/w}$ 7,4 HPLC	Kurzname	IC_{50} / μ M	IC_{50} / μ M	IC_{50} / μ M
			KYSE-70 $c_{(GSH)} = 10,8$ mM	LCLC-103H $c_{(GSH)} = 3,73$ mM	DAN-G $c_{(GSH)} = 5,25$ mM
6	6,76	IZ-2	4,89	2,56	3,05
7	8,03	IZ-3	5,27	2,99	4,01
9	6,89	PP-1	11,56	6,55	10,54
25	7,32	IN-1	12,97	6,78	11,92
29	7,51	PC-1	7,41	7,72	11,10
36	5,40	IZ-1	0,88	0,78	1,07

Insbesondere **IZ-3** zeigt bei sehr hohem Verteilungskoeffizienten IC_{50} -Werte im Bereich von **IZ-2**, obwohl sich deren Koeffizienten um fast zwei Größenordnungen unterscheiden.

Auch die anderen Pentathiepine folgen hinsichtlich der zytotoxischen Wirksamkeit nicht ausschließlich der Reihe der Lipophilie.

3.1.4.4 Vorinkubation von Zellen mit BSO

Um die oben erhaltenen Ergebnisse einer weiteren Prüfung zu unterziehen, wurden die Zellen für 6 h mit BSO inkubiert. BSO inhibiert die Biosynthese von GSH und senkt schnell den intrazellulären Glutathionspiegel.^[56] Ein Vergleich der Zytotoxizität der Pentathiepine mit und ohne vorherige BSO-Inkubation sollte Aufschluss über den Wirkmechanismus geben.

Für alle Pentathiepine wurde mindestens eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität durch Vorinkubation mit BSO beobachtet. Dieses Ergebnis steht ebenfalls im Widerspruch zum postulierten Wirkmechanismus, der vorhersagt, dass geringere Glutathionspiegel innerhalb der Zelle zu einer Verringerung der Toxizität führen sollten. Die Erhöhung der Toxizität durch Senkung des Glutathionspiegels und dadurch Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies ist für BSO auch schon für andere Zytostatika beschrieben, zum Beispiel für Melphalan^[111, 112] und Cisplatin^[89].

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass in den Stabilitätsuntersuchungen in Kombination mit dem GPx-Assay und den MTT-Assays mit und ohne BSO-Inkubation keine von der Stabilität oder den intrazellulären Glutathionkonzentrationen abhängige Wirkung gefunden wurde. Diese Ergebnisse stellen den postulierten Wirkmechanismus der Aktivierung der Pentathiepine durch GSH innerhalb der Zelle in Frage.

3.2 Diskussion der Glutathionperoxidasehemmung von Pentathiepinen

In den vorherigen Arbeiten von BEHNISCH 2017^[40] sowie WOLFF 2021^[41] wurden eine Reihe von Pentathiepinen als Glutathionperoxidaseinhibitoren mit IC₅₀-Werten im unteren mikromolaren Bereich charakterisiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der weitergehenden Beurteilung der Hemmwirkung. Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen war die Beobachtung, dass die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Pentathiepine nur bis zu einer bestimmten Konzentration der normalen Langmuir-Hill-Gleichung (Formel (5–28)) mit einem Hill-Faktor von etwa 1 entsprechen (Abbildung 65).

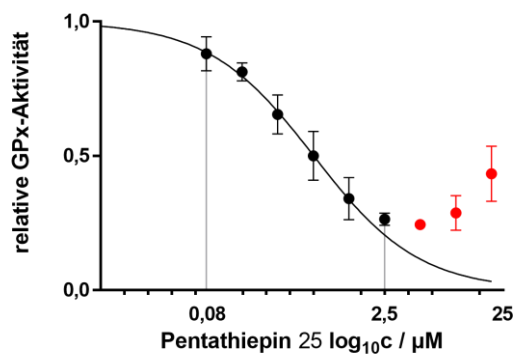


Abbildung 65: Relative GPx-Aktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration für Pentathiepin 25. Bis zu einer Konzentration von 2,5 µM folgt die Hemmkurve der idealtypischen Form. Höhere Konzentrationen weisen eine erhöhte GPx-Aktivität auf

Abbildung 65 stellt den Zusammenhang zwischen der Konzentration des Inhibitors (Pentathiepin 25) und der relativen GPx-Aktivität dar. Dabei ist ersichtlich, dass sich der Inhibitor wie erwartet verhält, die Hemmkurve jedoch ab einer Konzentration von über 2,5 µM von der idealtypischen Form abweicht. Zu erklären ist dieses Verhalten mit den Ergebnissen aus den Kapitel 2.4.2 (GSSG Freisetzung), sowie der Veranschaulichung des Katalysezyklus der GPx. Das freigesetzte GSSG ist in der Lage, in der NADPH-Messreaktion des Assaysystems als Substrat zu dienen und die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit bei hoher Pentathiepin-Konzentration sogar zu erhöhen. Dennoch stellte sich die Frage, inwieweit die beobachtete Hemmung auf die Bildung von Abbauprodukten durch die Reaktion zwischen GSH und dem Pentathiepin zurückzuführen ist. Um das Verhalten genauer zu beurteilen, wurde zunächst die Reversibilität der Hemmung von Pentathiepinen an der GPx-1 bestimmt. Da aufgrund der geringen Stabilität der GPx-1 ein Dialyseversuch nicht durchgeführt werden konnte, wurde auf die *jump dilution* Methode ausgewichen. Bei irreversiblen und langsam diffundierenden Inhibitoren, sollte die gemessene Enzymaktivität dabei erniedrigt sein. Das war für das getestete Pentathiepin aber nicht der Fall und deutet auf eine reversible Hemmung hin. Dass die *jump dilution* prinzipiell in der Lage ist, Irreversibilität zu erkennen, konnte an der Positivkontrolle Mercaptobernsteinsäure gezeigt werden. MSA wurde als irreversibler Inhibitor im *jump dilution* Assay identifiziert, wenn die Inkubation unter Bedingungen erfolgte, in denen die Glutathionperoxidase katalytisch aktiv ist. Das ist in Übereinstimmung mit massenspektroskopischen Untersuchungen von HALL *et al.* 2014^{[113][114]} hinsichtlich des irreversiblen Inhibierungsmodus von MSA. Im Gegensatz konnte für die Pentathiepine keine erniedrigte Enzymaktivität gezeigt werden, was auf eine reversible Hemmung der GPx-1 hindeutet.

3.2.1 Diskussion des Einflusses des Abbaus von Pentathiepin 26 in Gegenwart von Glutathion auf die Inhibierung von GPx

Um den Einfluss der beobachteten Reaktion von GSH mit dem Pentathiepin näher einschätzen zu können, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt:

- 1) Inkubation des Inhibitors mit allen Bestandteilen des GPx-Assays außer dem Peroxid (Kapitel 2.5.2.1). Dabei sollte einerseits herausgefunden werden, ob es sich bei dem Pentathiepin um einen *slow-binding*-Inhibitor handelt. Andererseits wurde so überprüft, ob eventuell gebildete Produkte aus Inhibitor und Assay-Bestandteilen eine inhibierende Spezies bilden. Für beide Annahmen wurde kein Hinweis gefunden. Das Pentathiepin ist kein *slow-binding*-Inhibitor und die Inkubation des Pentathiepins mit den Assay-Bestandteilen führt über die Zeit nicht zu einer veränderten Inhibierung.
- 2) Die zehnfache IC₅₀-Konzentration von Pentathiepin **26** wurde mit der zehnfachen GSH-Konzentration des GPx-Assays versetzt (Kapitel 2.5.2.2). Dabei handelt es sich um eine Glutathionkonzentration, die zum Abbau des Pentathiepins führte. Die gelbe Farbe der Pentathiepinlösung änderte sich rasch zu bräunlich. Dieses Gemisch wurde im Zeitverlauf nach zehnfacher Verdünnung als Inhibitor im GPx-Assay eingesetzt, um herauszufinden, ob ein Abbauprodukt welches über die Zeit gebildet wurde, eine Enzymhemmung verursachen kann. Die inhibitorische Wirkung auf die GPx war gleichbleibend bei etwa 40% und entspricht in etwa der erwarteten Hemmung des nicht vorinkubierten Pentathiepins. Möglicherweise ist der intakte Pentathiepinring für die Hemmung der Glutathionperoxidase nicht entscheidend, da auch nach Inkubation mit GSH, welches unter den Bedingungen zum Abbau des Pentathiepinrings führen sollte, die inhibitorische Wirkung auf die Glutathionperoxidase weiter besteht.
- 3) Wurde Pentathiepin **26** im normalen GPx-Assay-Ansatz zunächst ohne GPx mit GR angesetzt und erst nach Beenden der mittels UV-Spektroskopie beobachteten GR-Reaktion mit GPx versetzt (Kapitel 2.5.2.3) wurde keine Hemmung der Glutathionperoxidase mehr beobachtet. Es ergibt sich die Vermutung, dass es im Verlauf der Reaktion mit GSH und/oder zusätzlich *t*-BHO zur Bildung von Produkten aus dem Pentathiepinring kommt, die dann die inhibitorische Wirkung verursachen. Dabei muss es sich nicht ausschließlich um GSSG handeln, da die Glutathionreduktase auch in der Lage ist, andere Polysulfide umzusetzen.^[94] Der Pentathiepinring fungiert in diesem Fall als Träger für reaktive Schwefelspezies.

- 4) Mögliche Reaktionsprodukte zwischen dem Pentathiepin und GSH (GSSH sowie H₂S), wurden isoliert als Inhibitoren der Glutathionperoxidase charakterisiert (Kapitel 2.5.3). Dabei wurde für GSSH ein IC₅₀-Wert von etwa 4–12 µM bestimmt. Für Schwefelwasserstoff wurde ein IC₅₀-Wert von 104 µM (CI₉₅: 83,59–120,50 µM) gemessen.

Bei den in 4) getesteten möglichen Abbauprodukten handelt es sich wahrscheinlich nicht um die entsprechenden, inhibitorisch wirksamen Spezies. Der für Schwefelwasserstoff bestimmte IC₅₀-Wert ist mit etwa 100 µM viel zu hoch, um als alleiniger Inhibitor in Frage zu kommen, da jeder Pentathiepin-Ring wahrscheinlich nur zu maximal fünf Äquivalenten H₂S beitragen kann. Die große relative Standardabweichung von 30,07% ergibt sich aus der Flüchtigkeit von Schwefelwasserstoff. Der niedrigere IC₅₀-Wert von etwa 4 µM für GSSH geht von einer 30% Bildungsrate von GSSH unter den gewählten Bedingungen aus,^[23] wobei die Menge nicht überprüft wurde. Da bei der Reaktion von Glutathion mit den beiden Pentathiepinen **25** sowie **26** keine Freisetzung von GSSH beobachtet werden konnte, ist nicht davon auszugehen, dass es sich dabei um die reaktive Spezies im GPx-Assay handelt, obwohl sie als sehr reaktiv identifiziert wurde. Nicht überprüft werden konnte die Auswirkung von GSSH auf die Glutathionreduktase, da für die *in-situ*-Erzeugung von GSSH das Disulfid GSSG eingesetzt wird, welches Bestandteil im Glutathionreduktase-Assay ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Pentathiepinring wahrscheinlich für eine Hemmung an der Glutathionperoxidase durch GSH geöffnet werden muss. Welches gebildete Produkt die Hemmung letztendlich verursacht, konnte nicht geklärt werden.

3.2.2 Diskussion der RP-HPLC-Methode zur Durchführung des GPx-Assays

In den vorangegangenen Versuchen zeigte sich, dass die Bildung von GSSG in der Reaktion von Pentathiepinen mit GSH die Messreaktion des GPx-Assays verfälscht. Um die Messreaktion des enzymatischen Mikrotiterassays zu eliminieren, sollte das gebildete Produkt GSSG direkt analytisch bestimmt werden. Zur Quantifizierung von GSH, auch in biologischen Medien, kann eine Bandbreite von verschiedenen Methoden herangezogen werden.^[115] Die direkte Quantifizierung von GSH und GSSG ist jedoch aus folgenden Gründen erschwert: 1) GSH kann während der Analysezeit zu GSSG oxidiert werden. 2) Weder GSH, noch GSSG besitzen ein ausgedehntes Chromophor, was eine Detektion mittels UV-Vis-Spektroskopie sowie direkter Fluorimetrie nicht einfach macht. Aus diesem Grund enthalten die meisten publizierten RP-HPLC-Methoden zur Detektion von Glutathion und Glutathiondisulfid nach Reduktion einen Derivatisierungsschritt.

Tabelle 27 führt eine Reihe von flüssigchromatographischen Bestimmungen von GSH auf. Hierbei werden Detektion, Derivatisierung sowie qualitative Merkmale der Bestimmung von GSH mit den in dieser Arbeit experimentell ermittelten Daten verglichen.

Üblicherweise werden Disulfide nach Reduktion als korrespondierende Thiole nachgewiesen.^[115] Als Reduktionsmittel kommen zum Beispiel Dithiothreitol^[97] oder Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP)^[116] in Frage. Durch die Bearbeitungsschritte ergeben sich in den beschriebenen Methoden einige Probleme. Die Bestimmung von GSSG nach Reduktion bedingt, dass jede Probe zweifach vermessen werden muss. Je einmal vor und nach dem Reduktionsschritt. Die Differenz der bestimmten Glutathionkonzentration ergibt die gebildete Menge GSSG. Der Derivatisierungsschritt nimmt weitere Zeit sowie Material in Anspruch. Beide Schritte können außerdem die Richtigkeit der Methode verschlechtern.

Wie in Tabelle 27 zu sehen ist, erhöht die Verwendung von Derivatisierungsreagenzien und Detektionsmethoden wie Fluorimetrie oder elektrochemische Detektion die Sensitivität der Methode um mehrere Größenordnungen. Für die Anwendung im GPx-Assay ist eine Sensitivität im mikromolaren Bereich ausreichend, da die Enzymaktivität unter den gewählten Bedingungen im Bereich von 5 U L^{-1} liegt. Das entspricht einer Peroxidumsatzrate von $5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ und der dementsprechend gleichen Bildungsrate von GSSG.

Tabelle 27: Übersicht über flüssigchromatographische Bestimmungsmethoden von GSH. Entnommen und modifiziert nach HAMAD *et al.* 2019^[115]. Angegeben sind Nachweisgrenze (LOD), Bestimmungsgrenze (LOQ) sowie relative Standardabweichung (RSD). Letzte Zeile: Ergebnisse dieser Arbeit

Säule	Derivatisierung	Detektion	LOD	LOQ	RSD	
RP-HPLC	-	ECD	15 fM	50 fM	-	[98]
RP-HPLC	-	ECD	50 nM	150 nM	3,85 %	[117]
RP-HPLC	NBD-F	FL	0,03 µM	0,1 µM	≤6,3 %	[118]
RP-HPLC	SBD-F	FL	0,03 µM	0,5 µM	≤1,9 %	[119]
RP-HPLC	SBD-BF	FL	0,02 µM	0,05 µM	1,87 %	[120]
RP-HPLC	TMPAB-I	FL	0,3 nM	0,9 nM	2,1 %	[121]
RP-HPLC	OPA	FL	1,0 nM	3 nM	2,39 %	[122]
RP-HPLC	OPA	FL	70 nM	-	1,3–10,6 %	[123]
RP-HPLC	DNFB	FL	1 µM	3 µM	3,3 %	[124]
RP-HPLC	NDA	FL	0,1 µM	0,3 µM	≤12 %	[125]
RP-HPLC	OPA 2-Aminoethanol	FL	0,195 µM	0,650 µM	-	[126]
RP-HPLC	AgNO ₃	MS	0,390 nM	1,302 nM	≤6,2 %	[127]
RP-HPLC	NEM	MS/MS	0,4 µM	1,5 µM	-	[128]
RP-HPLC	-	MS/MS	0,2 µM	0,5 µM	≤10 %	[129]
RP-HPLC	-	MS/MS	0,01 µM	0,78 µM	2,1–8,3 %	[130]
RP-HPLC	NEM	UV	15 µM	50 µM	-	[131]
RP-HPLC	-	UV λ = 215 nm	1,952 µM	5,857 µM	0,2 %	[132]
RP-HPLC	CNBF	UV λ = 230 nm	0,04 µM	0,12 µM	3,32 %	[133]
RP-HPLC	Ethylpropionat	UV λ = 285 nm	0,1 µM	0,3 µM	-	[134]
RP-HPLC	p-Benzoquinon	UV λ = 303 nm	0,055 µM	0,185 µM	7,4 %	[135]
RP-HPLC	BCPB	UV λ = 315 nm	0,2 µM	0,5 µM	2,40 %	[116]
RP-HPLC	CMQT	UV λ = 355 nm	0,2 µM	0,5 µM	4,25 %	[136]
RP-HPLC	DNFB	UV λ = 375 nm	0,065 µM	0,260 µM	≤1 %	[137]
RP-HPLC	DTNB	Vis λ = 410 nm	0,05 µM	0,15 µM	3,2–5,4 %	[138]
IPC	CMQT	UV λ = 355 nm	0,8 µM	2 µM	0,47–1,92 %	[139]
HILIC	SBD-F	FL	8,2 fM	25 fM	≤4 %	[140]
HILIC	-	MS/MS	8 nM	-	25–30 %	[141]
HILIC	d ⁷ -BQB	MS/MS	3,27 nM	10 nM	2,25–8,97 %	[142]
RP-HPLC	-	UV λ = 210 nm	2,34 µM _(GSH) 1,08 µM _(GSSG)	7,09 µM _(GSH) 3,28 µM _(GSSG)	3,5 % _(GSSG)	diese Arbeit

In der Tabelle neu eingeführte Abkürzungen: BCPB – 1-Benzyl-2-chlorpyridiniumbromid; BQB – ω-Bromacetylcholinoliumbromid; CMQT – 2-Chlor-1-methylcholinoliumtetrafluorborat; CNBF – 4-Chlor-3,5-dinitrobenzotrifluorid; DNFB – 1-Fluor-2,4-dinitrobenzodioxan; DTNB – 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure; HILIC – *hydrophilic interaction LC*; NBD-F – 4-Fluor-7-nitrobenzofurazan; NDA – Naphthalen-2,3-dicarboxaldehyd; NEM – N-Ethylmaleinimid; PA – o-Phthaldialdehyd; SBD-BF – Ammonium-5-brom-7-fluorbenz-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat; SBD-F – Ammonium-7-fluorbenz-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat; TMPAB-I – 1,3,5,7-Tetramethyl-8-phenyl-(4-iodoacetamid)difluorboradiaza-s-indacen

Als flüssigchromatographisches System wurde ein RP-HPLC-System mit einer Machery Nagel EC 250/4 Nucleodur PolarTec, 5 μm sowie einer mobilen Phase mit 2% Acetonitril und 98% Phosphatpuffer 10 mM pH-Wert=3,0 verwendet. Die Flussrate der isokratischen Elution betrug 0,7 mL min^{-1} . Die PolarTec-Säule ermöglicht sehr hohe hydrophile Anteile in der mobilen Phase. Dadurch konnte eine Elution von GSH mit einem Retentionsfaktor $k' = 1$ erreicht werden. GSSG zeigte in diesem System eine deutlich längere Retentionszeit. Somit war eine simultane Detektion und Quantifizierung von GSH und GSSG möglich.

Um die Sensitivität unter den gewählten Bedingungen dennoch so hoch wie möglich zu halten, wurde mittels DAD der Wellenlängenbereich von 200–220 nm integriert zur Detektion verwendet. Dieser Wellenlängenbereich befindet sich knapp oberhalb des UV-cut-offs von Phosphatpuffer^[143] und nutzt die Absorption der Peptidbindung von GSH respektive GSSG im Bereich von 190–210 nm aus.

Mit dem beschriebenen System wurden die in Tabelle 27 aufgeführten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die beiden Spezies erhalten. Sie sind mit 2,34 $\mu\text{M}_{(\text{GSH})}$ sowie 1,08 $\mu\text{M}_{(\text{GSSG})}$ für die Nachweisgrenze von GSH und GSSG und 7,09 $\mu\text{M}_{(\text{GSH})}$ sowie 3,28 $\mu\text{M}_{(\text{GSSG})}$ als Bestimmungsgrenze von GSH und GSSG relativ hoch im Vergleich zu den meisten publizierten Assays. Sie liegen jedoch im Bereich der ähnlich durchgeführten Versuche von SUTARIYA *et al.* 2012^[132]. Die Grenzen sind ausreichend für die Verwendung im GPx-Assay.

Beim erstmaligen Versuch der Bestimmung der IC_{50} -Werte lief die Reaktion unter den Standardassaybedingungen hinsichtlich Enzym- und Substratkonzentration (Kapitel 5.4.1) zu schnell ab, sodass eine Messung im linearen Kalibrationsbereich von 6–150 μM nicht möglich war. In Anlehnung an BEHNISCH-CORNWELL *et al.* 2019^[82] wurde entsprechend die GPx-Konzentration auf 0,015 U L^{-1} reduziert und die GSH-Konzentration auf 1,7 mM angepasst. Somit findet die IC_{50} -Bestimmung in diesem Assay bei $[\text{S}] = K_m$ für 200 μM *t*-BHO statt. Unter den geänderten Bedingungen konnte für MSA mit 24,20 μM (CI_{95} : 18,34–30,05 μM) der gleiche IC_{50} -Wert erhalten werden, wie in den bereits publizierten Arbeiten mit Mikrotiterassay.^[82] Die katalytische Reaktion der GPx-1 wurde dabei durch Zugabe hoher Mengen des irreversiblen GPx-1-Inhibitors MSA gestoppt, was eine Verweilzeit im Autosampler ermöglichte.

Es wurde eine RP-HPLC-Methode entwickelt und teilvalidiert, die die gleichen Qualitätsmerkmale aufweist, wie bereits publizierte, ähnliche Methoden. Eine Verbesserung hin-

sichtlich bereits publizierter Daten ist die Verwendung einer PolarTec-Säule, welche Retentionszeiten von GSH und GSSG ermöglicht, bei denen eine Quantifizierung mit größerer Sicherheit möglich ist. Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind literaturähnlich. Die Identifizierung von Inhibitoren der GPx-1 ist mit dieser Methode möglich. Nachteilig ist die lange HPLC-Analysezeit von etwa 20 min pro Analyse. Die Bestimmung eines IC₅₀-Wertes nimmt somit mindestens 4 h in Anspruch (Kontrolle, Leerwert, jede Inhibitorkonzentration an mindestens drei Zeitpunkten). Ein weiterer Nachteil ist die Beeinflussung durch organische Lösungsmittel. Die Verwendung von DMF muss auf ein Mindestmaß reduziert werden, da DMF die Detektion von GSH verhindert und in höheren Konzentrationen die Detektion von GSSG beeinflusst.

Letztendlich konnte das ursprüngliche Problem, die Beeinflussung des Assays durch Autooxidation, nicht gelöst werden, da das Pentathiepin in Gegenwart von *t*-BHO und Glutathion, trotz Hemmung der Enzymreaktion durch MSA, GSH zu GSSG oxidierte. Diese Autooxidation konnte nicht unterbunden werden, da im für den Assay verwendeten GPx-Puffer 50 mM Phosphatpuffer pH=7,4 enthalten waren. Den pH-Wert auf Werte unterhalb 3,0 abzusenken war nur unter Einsatz hoher Mengen konzentrierter Säure möglich, was zu Doppelpeaks im Chromatogramm führte. Deswegen wurde der HPLC-Assay für die Bestimmung der GPx-Enzymkinetik nicht weiter verwendet.

3.3 Diskussion der Analytik von Pentathiepinen in Liposomen

In bisherigen Arbeiten haben fast alle Pentathiepine eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien sowie eine Instabilität gegenüber GSH gezeigt. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde über Trägersysteme nachgedacht, die beide negativen Merkmale lösen könnten. Das Hauptaugenmerk bei der Anwendung von Liposomen als Träger für Pentathiepine lag auf der verbesserten Stabilität gegenüber GSH, um bei hypothetischer parenteraler Gabe in *in-vivo* Modellen einen Abbau vor Erreichen des Ziels zu verhindern. Ein weiterer Aspekt war die Verbesserung der Wasserlöslichkeit, da nur gelöste Substanzen auch bioverfügbar sind.^[144] Im Folgenden werden die Eigenschaften der Liposomen diskutiert, zu denen eigene Untersuchungen durchgeführt wurden. Grundlegend kann gesagt werden, dass die Größe der erzeugten Liposomen 90–100 nm im etablierten Bereich für SUV liegen.^[145]

Zur Herstellung ausgewählt wurden zunächst die beiden Pentathiepine **30** und **36**, welche beide sehr lipophil und zytotoxisch sind.

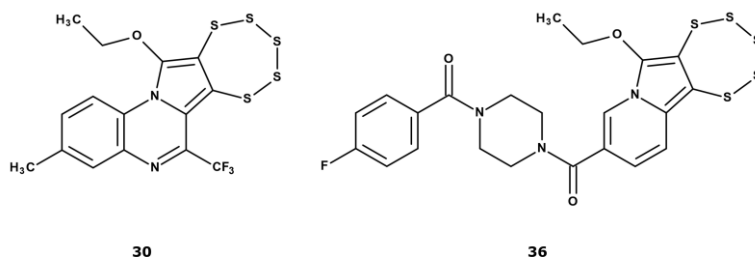


Abbildung 66: Strukturen der Pentathiepine **30** und **36**, die für die Untersuchungen mit Liposomen ausgewählt wurden

Die Herstellung der Liposomen mit Pentathiepin **30** war leider nicht erfolgreich. Während der Extrusion der Liposomen sind große Mengen des Pentathiepins ausgefallen, weshalb nur geringe mikromolare Konzentrationen im Endprodukt erreicht werden konnten. Ursächlich ist wahrscheinlich die hohe Lipophilie der Struktur. Der errechnete $\log P$ -Wert liegt bei 7,36. Der für das verwendete Pentathiepin **36** errechnete $\log P$ -Wert beträgt 6,63 und der mittels RP-HPLC bestimmte Wert ist 5,40. Das deutet darauf hin, dass mit dieser Herstellungsmethode auch Grenzen für die Lipophilie nach oben existieren.

3.3.1 Diskussion der Extraktion und Gehaltsbestimmung

In den beladenen Liposomen wurden, nach Optimierung der Herstellung im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mihaela Delcea, Pentathiepinkonzentrationen in PBS von 121,5–410,22 μM bestimmt. Die Ergebnisse weisen eine herstellungsbedingte Schwankung auf, die es nötig macht, die Konzentration jeder Charge zu bestimmen.

Die erhaltenen Konzentrationen an Pentathiepin in der liposomalen Zubereitung ergeben eine Beladungseffektivität von etwa 30% bezogen auf die initial eingesetzte Stoffmenge von Pentathiepin. Dieser Wert liegt in dem Bereich, der von IMMORDINO *et al.* 2003^[103] für Paclitaxel (31–34%) berichtet wird. Er liegt allerdings deutlich unter der berichteten Effektivität von 56–83%, die dieselbe Arbeitsgruppe für Docetaxel erreicht hat. Die Effektivität ist dabei von der Zusammensetzung der Lipide und der Verwendung von Cholesterol abhängig, welches die Fluidität der Membran beeinflusst und so die Durchlässigkeit der Membran für gelöste Substanzen verändert.^[81] Eine Optimierung der Lipidzusammensetzung könnte die Beladungseffektivität erhöhen. Die Verwendung der Extrusionsmethode kann ebenfalls zu einer niedrigeren Effektivität führen.^[146]

Die Extraktions- und Konzentrationsbestimmungsmethode selbst weist vergleichsweise hohe Schwankungen mit einer relativen Standardabweichung von 2,1–13,3% (siehe Tabelle 20, Seite 81) innerhalb einer Charge auf. Diese sind wahrscheinlich auf die Verwendung

von Diethylether als organisches, leicht flüchtiges, lipophiles Extraktionsmittel zurückzuführen. Da die erzielte Standardabweichung für den Zweck ausreichend war, wurde keine weitere Optimierung des Extraktionsvorgangs vorgenommen. Andere Methoden der Aufschließung der Liposomen, wie zum Beispiel mittels Detergenzien, Osmolaritäts-, pH- oder Temperaturänderungen sowie Vortexen oder Hydrokavitation wurden wegen des apparativen Aufwandes, der nicht gegebenen Vollständigkeit^[147] sowie der anschließenden Löslichkeitsprobleme der Pentathiepine nicht in Betracht gezogen. Die Verwendung von Detergenzien, wie zum Beispiel Triton-X, respektive umweltfreundlicheren Alternativen, hätte zudem eine Aufbereitung mittels Festphasenextraktion erfordert, da die HPLC-Analytik durch diese Substanzen gestört würde. Eine Anwendung der Methode auf weniger lipophile Substanzen ist mit den gewählten Bedingungen wahrscheinlich nicht möglich.

3.3.2 Diskussion der Stabilitätsuntersuchungen der liposomalen Zubereitung

Für die Verwendung in biologischen Assays ist es von zentraler Bedeutung, die Stabilität der liposomalen Zubereitung unter Lagerbedingungen zu kennen. Während der Lagerung könnte zum Beispiel eine Konfluenz der Liposomen sowie Präzipitation von Pentathiepinen auftreten. Das ist bei den hier verwendeten Liposomen insbesondere zu beachten, da keine Oberflächenmodifikationen vorgenommen und neutrale, nach außen ungeladene Lipide verwendet wurden. Die Stabilität der liposomalen Zubereitung ist maßgeblich durch die Oberflächeneigenschaften und den Austritt des Pentathiepins aus dem Liposomen beeinflusst. Ein Standardparameter zur Charakterisierung von Oberflächen von Liposomen ist das Zetapotential. Es beschreibt die mittlere Potentialdifferenz zwischen der Partikeloberfläche und der Scherschicht. Gemessen wird diese Spannung durch Bewertung der Geschwindigkeit des Partikels in einem angelegten elektrischen Feld.^[80] Dabei bewegt sich nicht nur der Partikel, sondern auch die ihm aufgelagerte Ionendoppelschicht gegen die den Partikel umgebenden dispergierten Ionen. Die Grenze zwischen der Ionendoppelschicht und dem Dispersionsmedium wird Scherschicht genannt und beschreibt die äußere Grenze des gemessenen Partikels. Das Zetapotential wird dabei durch viele Faktoren beeinflusst, unter anderem: Zusammensetzung der Lipide, elektrische Ladung der Lipide, pH-Wert, Ionenstärke des Messmediums, Konzentration der Partikel sowie Oberflächenmodifikation.

Das Zetapotential der beladenen und unbeladenen Liposomen wurde zu $-8,0 \pm 0,4$ mV respektive $-12,6 \pm 1,43$ mV bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen damit den in der Literatur zu

findenden Zetapotentialen unter ähnlichen Messbedingungen.^[76, 148, 149] Die negativen Zahlenwerte zeigen an, dass die Gesamtladung des Partikels negativ ist. Sie gelten dennoch aufgrund der geringen Negativität als elektrisch ungeladene, neutrale Liposomen.^[76] Negative Ladungen sind positiven Ladungen vorzuziehen, da es aufgrund der Physiologie der Zellmembranen einerseits zu Adhäsion positiv geladener Partikel an der Zellmembran kommen kann, andererseits haben sich positiv geladene Liposomen als zytotoxisch gegenüber Immunzellen herausgestellt.^[78] Wobei die Bedeutung dieser Ergebnisse hinsichtlich der generellen *in-vivo* Toxizität schon lange diskutiert wird.^[150]

Obwohl das gemessene Zetapotential innerhalb des Bereiches von -30 mV bis $+30\text{ mV}$ liegt, welcher als Bereich relativer Instabilität liposomaler Suspensionen angesehen wird,^[151] konnte im dreiwöchigen Versuch keine Veränderung der Größenverteilung, Partikelzahl sowie Pentathiepinkonzentration bei Lagerung in wässrigem Puffer bei 4°C gemessen werden. Die hergestellte liposomale Suspension war demnach für die weitergehenden Versuche ausreichend stabil.

3.3.3 Diskussion der Stabilität sowie der Zytotoxizität des Pentathiepins 36 in Liposomen

Zwischen dem freien Pentathiepin und der Suspension aus Liposomen konnten einige Unterschiede in den UV-Vis-spektroskopischen Experimenten beobachtet werden. Zunächst wurde eine leichte hypsochrome Verschiebung der UV-Vis-Spektren des inkorporierten Pentathiepins **36** beobachtet (Abbildung 52, Seite 75), die sich auch in den Differenzspektren wiederfand:

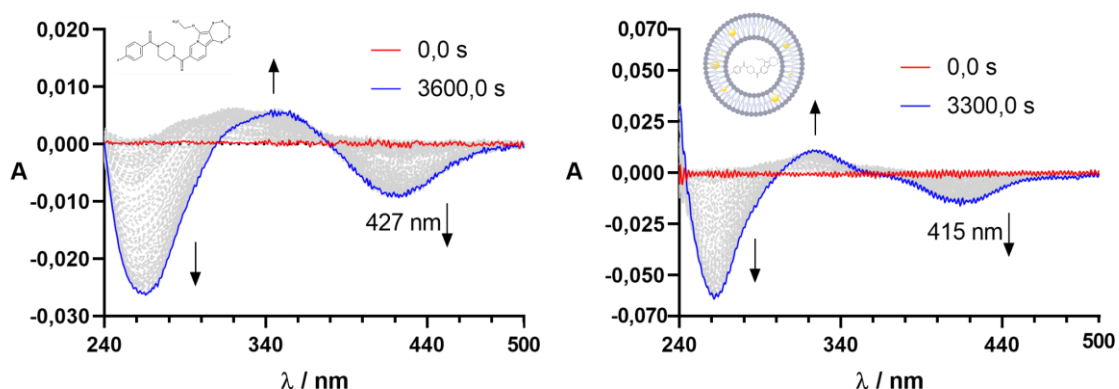


Abbildung 67: Vergleich der Differenzspektren des liposomalen sowie freien Pentathiepins **36**. links: Aufnahme Differenzspektren von $5\ \mu\text{M}$ IZ-1 (Pentathiepin **36**) in Gegenwart von $1\ \text{mM}$ GSH über $60\ \text{min}$.^[85] rechts: Aufnahme Differenzspektren von $5\ \mu\text{M}$ IZ-1 (Pentathiepin **36**) in Liposomen in Gegenwart von $10\ \text{mM}$ GSH über $55\ \text{min}$. $T = 23^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $d = 1\ \text{cm}$

Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf eine geänderte elektronische Umgebung des Pentathiepins im Liposomen zurückzuführen. UV-Vis-Spektren sind lösungsmittelabhängig und das Pentathiepin liegt wahrscheinlich in der Lipidphase verteilt vor, was dazu führt, dass höhere Energien zur Anregung der Elektronen benötigt wurden. Daher ist es nicht unerwartet, dass sich die Absorptionsspektren leicht unterscheiden. Da die Identität des im Liposomen vorliegenden Pentathiepins mittels RP-HPLC bestätigt wurde, wird davon ausgegangen, dass die kleine Änderung des UV-Vis-Spektrums die Ergebnisse der Analyse nicht beeinflusst.

Das Ergebnis der Stabilitätsuntersuchung für die liposomale Suspension zeigt eine Erhöhung der Stabilität gegenüber dem freien Pentathiepin um den Faktor 4 bei 23 °C (Abbildung 67). Das trifft sowohl auf die Gesamtreaktionsdauer, als auch auf die initiale Absorptionsabnahme zu. Dass bei 23 °C bei intrazellulär vorhandenen Glutathionkonzentrationen innerhalb einer Stunde ein kompletter Abbau trotz Liposomen geschieht, weist auf eine weiterhin bestehende relative Instabilität des Pentathiepins in Liposomen hin. Eine Möglichkeit zur Erklärung stellt die Diffusion des Pentathiepins aus dem Liposomen in die wässrige Phase dar, obwohl das angesichts des sehr hohen Verteilungskoeffizienten unplausibel erscheint. Eher sind kleine Mengen an GSH in der Lage in die Lipiddoppelschicht einzudringen.

Die Lipiddoppelmembran lässt sich prinzipiell hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und damit einhergehender Permeabilität, Immunogenität sowie Liposomenstabilität charakterisieren. Eine Typisierung anhand ihres Verhaltens bei Temperaturänderungen ist zusätzlich möglich. Dabei werden unter anderem geordnete, starre *gel-state* (L_{β}) und ungeordnete, fluide *liquid-crystalline* (L_{α}) Zustände von kristallinen *subgel* Phasen (L_c) unterschieden.^[81, 152] Der Übergang von der geordneten *gel-state* Phase zur ungeordneten *liquid-crystalline* Phase ist durch eine höhere Beweglichkeit und geringe Ordnung der Kohlenwasserstoffketten gekennzeichnet. Dessen Übergangstemperatur (T_c), wird durch die Länge der Kohlenwasserstoffketten der verwendeten Lipide, die Anzahl der Doppelbindungen, sowie den Zusatz von z.B. Cholesterol beeinflusst. Dabei steigt die Temperatur mit der Kettenlänge und abnehmendem Sättigungsgrad sowie abnehmender Größe der polaren Gruppe. Der Zusatz von Cholesterol kann die Temperatur sowohl erhöhen, als auch erniedrigen. Wird T_c überschritten, sind Wassermoleküle des Dispersionsmediums in der Lage die polaren Kopfgruppen der Liposomen stärker zu hydratisieren und in die Membran zu permeieren.^[72, 153] Die in dieser Arbeit untersuchten Liposomen bestehen ausschließlich aus DOPC, welches eine $T_c = -17^{\circ}\text{C}$ besitzt (Herstellerangabe).^[71] Das ermöglicht einerseits die Herstellung der

Liposomen bei Raumtemperatur^[81] andererseits befinden sich die Liposomen höchstwahrscheinlich in der *liquid-crystalline* Phase, welches ein Eindringen von Wassermolekülen in die Membran ermöglicht und so den Angriff von GSH am Pentathiepin beschleunigt, was den Abbau des Pentathiepins in Gegenwart von 10 mM GSH erklärt. Eine veränderte Zusammensetzung der Lipidmembran, zum Beispiel durch Hinzufügen weiterer Lipide, Cholesterol oder Oberflächenmodifikationen durch Polyethylenglykol könnte dazu führen, die Stabilität gegenüber Glutathion zu verbessern. Zukünftige Forschung soll diese Frage klären.

Das Resultat der Stabilitätsuntersuchungen sollte nicht ohne Zusammenhang zur antiproliferativen Wirkung gesehen werden. Im Kristallviolett-Zellproliferations-Assay konnte zwischen dem freien und liposomalen Pentathiepin kein Unterschied hinsichtlich der IC₅₀-Werte nach einer 96-stündigen Inkubationsdauer festgestellt werden. Das ist kein unerwartetes Ergebnis. Für das zugelassene liposomale Daunorubicin wurde zum Beispiel an akuter Leukämie die gleiche Wirksamkeit *in-vitro* gemessen, wie für das freie Daunorubicin.^[154] Für Docetaxel wurde zelllinienspezifisch eine identische oder um den Faktor 2 schwächere Zytotoxizität nach 48 h Inkubationszeit ermittelt.^[103] Damit konnte gezeigt werden, dass die Liposomen zwar zu einer Abschirmung vor GSH führen, die antiproliferativen Eigenschaften dabei jedoch nicht verloren gehen. Dennoch muss bei veränderter Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht (siehe oben) die Auswirkung auf die antiproliferativen Eigenschaften im Auge behalten werden. So führen zum Beispiel Oberflächenmodifikationen mit PEG unter Umständen zu einer geringeren Aktivität.^[103]

Die Analytik von Pentathiepin **36** in Liposomen lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Der Arbeitskreis von Prof. Mihaela Delcea stellte *small unilamellar vehicle* Liposomen aus DOPC mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von 100 nm zur Verfügung, welche mit Pentathiepin beladen waren. Grundlegend wurde die Größe der Liposomen sowie deren Größenverteilung mittels DLS bestimmt. Eine qualitative Aussage zum Beladungserfolg konnte mittels UV-Vis-Spektroskopie getroffen werden. Zur weiteren Analytik wurde eine Methode benötigt, die eine Konzentrationsbestimmung des Pentathiepins ermöglichte. In dieser Arbeit konnte eine RP-HPLC-Methode zur Konzentrationsbestimmung von Pentathiepin **36** in liposomaler Zubereitung entwickelt werden. Dabei wurden Matrix-Effekte insoweit ausgeschlossen, als dass sich eine Kalibration mittels Standard-Additions-Methode nicht von einer einfachen, externen Kalibration unterschied. Mithilfe dieser RP-HPLC-Methode war es möglich, die Herstellung der Liposomen hinsichtlich der enthaltenen Konzentration an Pentathiepin zu optimieren. Während in den

ersten Chargen nur sehr geringe Konzentrationen an Pentathiepin detektierbar waren, gelang es in den optimierten Chargen Konzentrationen von bis zu 400 μM zu erreichen. Verglichen mit der Löslichkeit des freien Pentathiepins handelt es sich dabei um eine Verbesserung um mehrere Größenordnungen. Die Liposomen besaßen eine Lagerstabilität, die ausreichend war, um mindestens drei Versuche mit einer Charge durchzuführen und zeigten eine 4-fach verbesserte Stabilität gegenüber physiologischen Konzentrationen Glutathion. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass die antiproliferative Effektivität der Pentathiepine nicht verloren ging.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Pentathiepine wurden als Substanzklasse mit vielfältigen biologischen Eigenschaften beschrieben (Kapitel 1). Sie besitzen unterschiedliche biologische Wirkungen, die möglicherweise auf die Aktivierung durch Thiole, wie zum Beispiel GSH, zurückzuführen sind. Dazu gehören die Erzeugung von ROS und die oxidative Fragmentierung von DNA. Pentathiepine zeigten sich als gelbe, schwer lösliche Feststoffe und sind in sauren Lösungen sehr stabil. In Lösungen, die Basen oder Nukleophile enthielten, nahm der Gehalt an Pentathiepinen jedoch sehr schnell ab. In dieser Arbeit sollte hauptsächlich untersucht werden, inwieweit sich die Stabilität auf die biologischen Eigenschaften auswirkt. Neben der Ermittlung der Verteilungskoeffizienten verschiedener Pentathiepine, wurden auch enzymbasierte Assays durchgeführt.

Dazu gehörte die Bestimmung der Reversibilität der Hemmung an boviner GPx-1 (Kapitel 2.5.1) sowie der Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die inhibitorische Wirkung (Kapitel 2.5.2–2.5.3). Dabei wurde für das untersuchte Pentathiepin mittels *jump dilution* keine irreversible Hemmung an boviner GPx-1 gefunden. Eine irreversible Inhibierung konnte jedoch für MSA gezeigt werden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen erlauben die Schlussfolgerung, dass der intakte Pentathiepinring wahrscheinlich nicht an der Hemmung der GPx-1 beteiligt ist, sondern die aus der Reaktion mit GSH gebildeten Abbauprodukte. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass der Pentathiepinring mindestens als „Schwefeltransporter“ benötigt wird. Die gebildeten Produkte der Reaktion von Pentathiepin und GSH reagieren ihrerseits schnell ab. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass H₂S eine geringe Hemmung der GPx-1 bei 104,73 µM (CI₉₅: 83,59–120,50 µM) zeigt, wogegen reaktive Schwefelspezies, wie zum Beispiel GSSH, eine relativ starke Hemmwirkung auf das Enzym besitzen: 12,12 µM (CI₉₅: 10,18–14,12 µM). Da bei der Reaktion mit Glutathion GSSG freigesetzt wird, welches die Messreaktion des verwendeten Assays beeinflusst, konnten diese Effekte nicht genauer untersucht werden. Zunächst wurde versucht, für enzymkinetische Untersuchungen die Glutathionkonzentration im Assay gering zu halten und die Versuche gegen veränderliche Konzentrationen *t*-BHO

durchzuführen. Dafür wurde der K_m -Wert für *t*-BHO bei 250 μM GSH zu $22,68 \pm 3,34 \mu\text{M}$ bestimmt. Die veränderte Reaktionskinetik führte jedoch nicht zu auswertbaren Ergebnissen in Bezug auf enzymkinetische Parameter. Der anschließende Versuch den Assay auf eine RP-HPLC-Methode zu übertragen, war für die Pentathiepine nicht geeignet und konnte nur für MSA angewendet werden. Für MSA konnte ein entsprechender IC_{50} -Wert zu 24,20 μM (CI_{95} : 18,34–30,05 μM) bestimmt werden. Es wurde jedoch keine Möglichkeit gefunden die Reaktion der Assaybestandteile mit Pentathiepinen während der Analysezeit im Autosampler ausreichend zu unterbinden. Aus diesem Grund konnten weitere Effekte von Pentathiepinen auf die GPx-1 mit dem RP-HPLC-Assay nicht untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden sechs Pentathiepine mit vier unterschiedlichen Grundgerüsten hinsichtlich ihrer Stabilität in Gegenwart von Glutathion untersucht. Zunächst wurde eine RP-HPLC-Methode entwickelt, um die Stabilität zu untersuchen. Aufgrund der Laufzeiten der HPLC ergab sich jedoch eine zu geringe Datendichte insbesondere für instabile Substanzen. Deshalb wurde das Experiment mittels Diodenarray-UV-Vis-Spektroskopie durchgeführt, wobei zunächst überprüft wurde, ob die Selektivität der gewählten untersuchten Wellenlängen ausreichte. Im Anschluss wurden für alle untersuchten Pentathiepine Differenzspektren bei unterschiedlichen GSH-Konzentrationen aufgenommen und die Abnahme in dem dem Pentathiepin zuzuordnenden Wellenlängenbereich quantifiziert. Dabei gab es hinsichtlich der Reaktivität der Pentathiepine sehr starke Unterschiede. Während das Pyrrolo-Pyrazin-Derivat bei 250 μM GSH eine geringe Halbwertszeit von 3 min zeigte, konnte kein Abbau für die Indolizin-Derivate beobachtet werden. Während bei 9 mM GSH die Halbwertszeit des Pyrrolo-Pyrazin-Derivates im Sekundenbereich lag, besaßen die Indolizin-Derivate noch Halbwertszeiten von mehreren Minuten. Trotz dieser großen Unterschiede konnten keine Unterschiede hinsichtlich der GPx-Hemmung und der antiproliferativen Eigenschaften beobachtet werden. Auch eine Absenkung der intrazellulären GSH-Konzentration durch Inkubation mit BSO in drei humanen Krebszelllinien mit unterschiedlichem Glutathiongehalt ergab keine Unterschiede zwischen den getesteten Substanzen. Sie waren durchgehend aktiver, als sie in vorinkubierten Zellen getestet wurden. Eine Besonderheit stellte das Indolizin-Derivat 3 (IZ-3) dar, welches auch in Gegenwart sehr hoher Konzentrationen an GSH einen sehr langsamen Abbau zeigte. Moleküldynamische Simulationen ergaben, dass es sich eventuell um Dimerbildung und dementsprechende Abschirmung des Pentathiepins aufgrund der sehr hohen Lipophilie der Substanz handelte.

Aufgrund der vergleichsweise hohen Reaktivität in Gegenwart von GSH sollte ein Pentathiepin in einem *proof of concept* in Liposomen formuliert werden. Diese Formulierung sollte einerseits das Pentathiepin vor Reaktionen mit Thiolen wie GSH schützen, andererseits die Wasserlöslichkeit erhöhen. Dabei ergab sich, dass die Wasserlöslichkeit der Pentathiepine durch Formulierung in DOPC-Liposomen von unter 3 μM auf über 400 μM erhöht werden konnte. In Hinsicht auf die Stabilität ergab sich eine erhöhte Stabilität des untersuchten Pentathiepins in Anwesenheit von 10 mM GSH um den Faktor 4 bezüglich der initialen Absorptionsabnahmen und der Zeit bis zum vollständigen Abbau. Hinsichtlich der anti-proliferativen Eigenschaften ergab sich keine Abnahme der Wirkung des Pentathiepins durch Formulierung in Liposomen. Das lässt den Schluss zu, dass Liposomen ein geeignetes Vehikel für die Stabilisierung sowie den Transport von Pentathiepinen sein können.

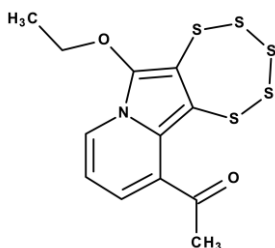
Weiterhin sind Experimente zur Aufklärung des intrazellulären Wirkmechanismus der Pentathiepine möglich. Zum Beispiel durch Überprüfung der Fähigkeit zur Komplexbildung mit mehrwertigen Kationen, wie zum Beispiel Zink. Des Weiteren ist die Quantifizierung der freigesetzten Menge H_2S aus Pentathiepinen in Gegenwart von GSH interessant, insbesondere, wenn man den Einfluss von H_2S hinsichtlich auf die durch Pentathiepine ausgelösten Effekte bedenkt. Insbesondere die Isolation und Charakterisierung der gebildeten Abbauprodukte, zum Beispiel mittels Massenspektrometrie, hinsichtlich deren Effekt auf die GPx-1 stehen aus. Zusätzlich bietet die Optimierung der Liposomen hinsichtlich der Zusammensetzung, Herstellung und Anwendbarkeit auf andere Pentathiepine interessante Forschungsmöglichkeiten.

5 Experimenteller Teil

5.1 Untersuchte Substanzen

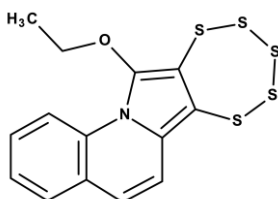
In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Pentathiepine aufgeführt und zur besseren Nachverfolgbarkeit mit Herkunft und Identifikationskürzel versehen. Die Substanzen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Carola Schulzke wurden auf Reinheit überprüft und sind zum Teil in BEHNISCH-CORNWELL *et al.* 2020^[42] sowie WOLFF *et al.* 2021^[43] publiziert. Die Synthese und Charakterisierung der Substanzen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Patrick J. Bednarski waren Teil einer Diplomarbeit von NAPIERKOWSKI 2016^[39] und sind zum Teil in BEHNISCH-CORNWELL *et al.* 2020^[42] publiziert.

Tabelle 28: In dieser Arbeit verwendete Pentathiepine. Links: Struktur. Rechts: Nummerierung, Herkunft, Kürzel



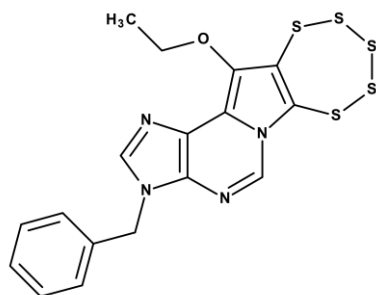
Struktur 1

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Hanna Marutz, B. Sc.
HN-01-04



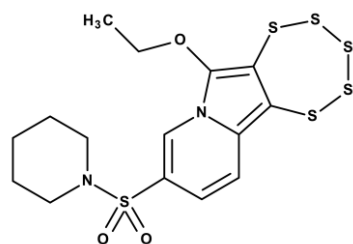
Struktur 2

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Hanna Marutz, B. Sc.
HN-01-06



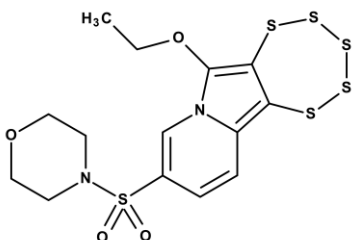
Struktur 3

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-08



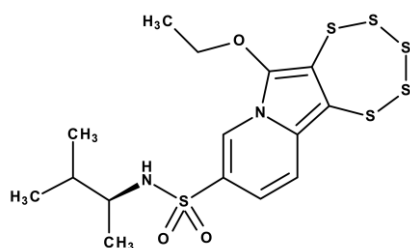
Struktur 4

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-15



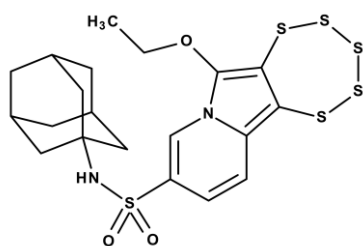
Struktur 5

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-16



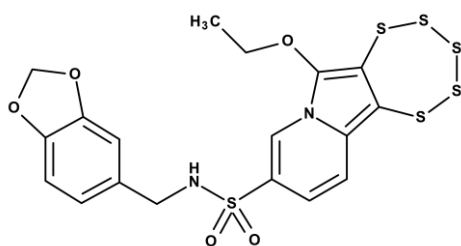
Struktur 6

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-20



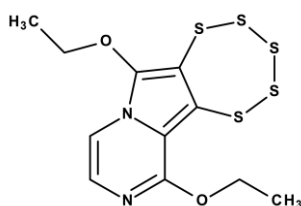
Struktur 7

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-25



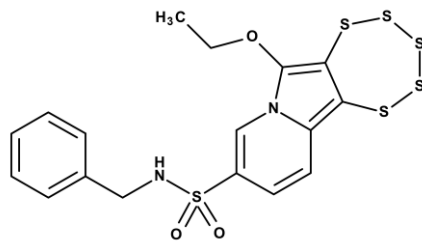
Struktur 8

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-28



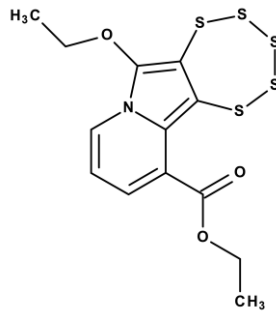
Struktur 9

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-30



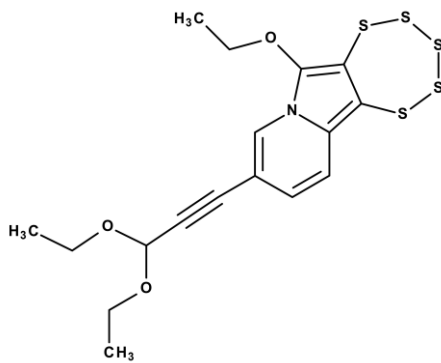
Struktur 10

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Jo Judernatz, M. Sc.
Jo-01-39



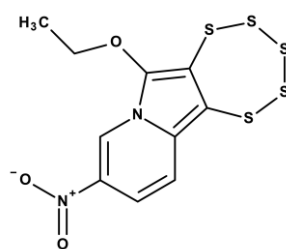
Struktur 11

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-14-1



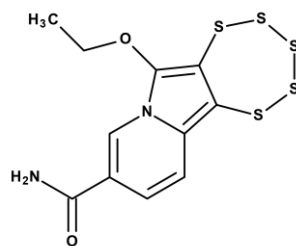
Struktur 12

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-15-1



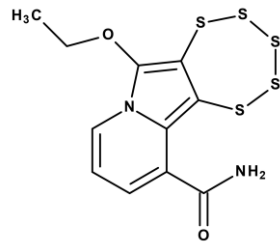
Struktur 13

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-19-1



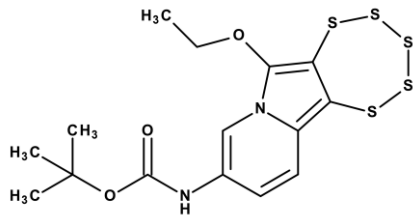
Struktur 14

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-23-1



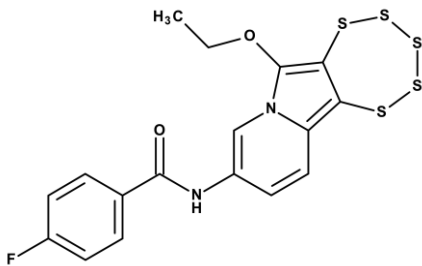
Struktur 15

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-25-1



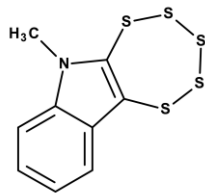
Struktur 16

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-28-2



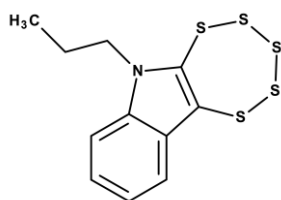
Struktur 17

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Lukas Jacobsen, M. Sc.
M-LJ-34-2



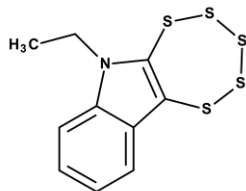
Struktur 18

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-1c



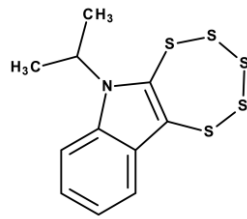
Struktur 19

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-31c



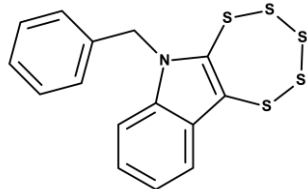
Struktur 20

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-33c



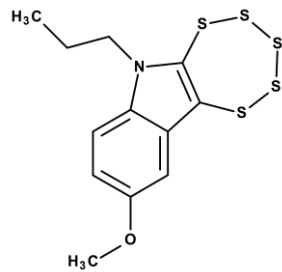
Struktur 21

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-35c



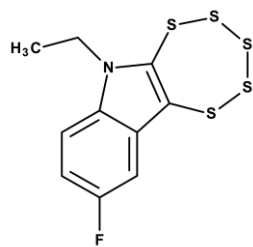
Struktur 22

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-37c



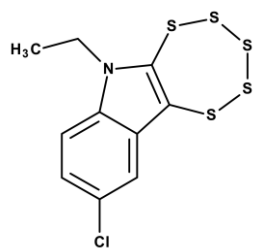
Struktur 23

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-57c



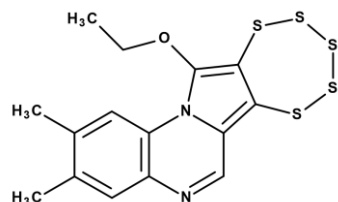
Struktur 24

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-65c



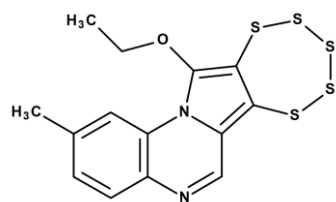
Struktur 25

AK Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
Dipl.-Pharm. Martin Napierkowski
MN-I-67c



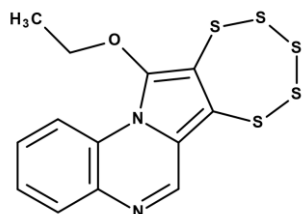
Struktur 26

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Muhammad Zubair
QME_2



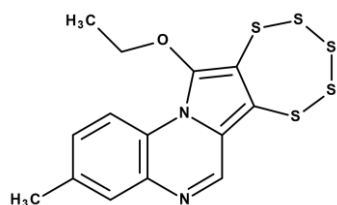
Struktur **27**

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Muhammad Zubair
ZZ-Me-Q-Pn



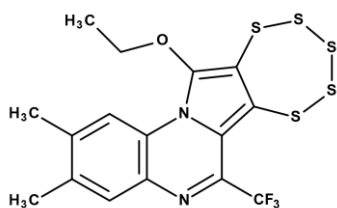
Struktur **28**

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Muhammad Zubair
ZZ-Q-Pn



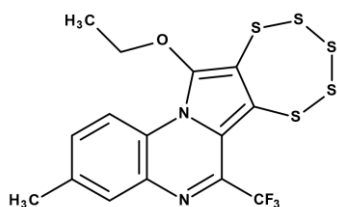
Struktur **29**

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-19



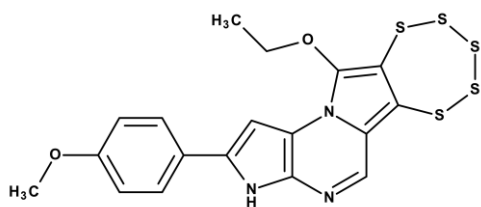
Struktur **30**

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-50



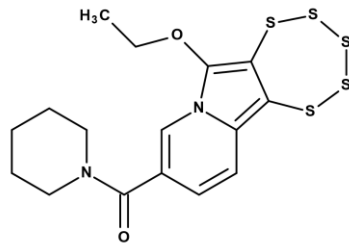
Struktur **31**

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-68



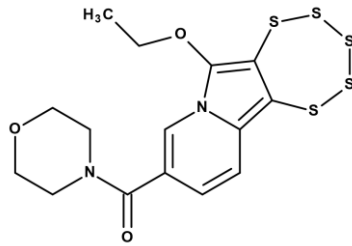
Struktur **32**

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-93



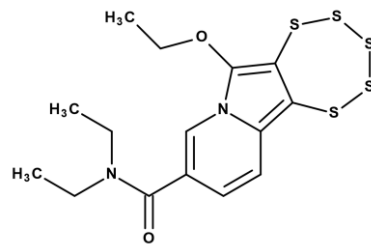
Struktur 33

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-154



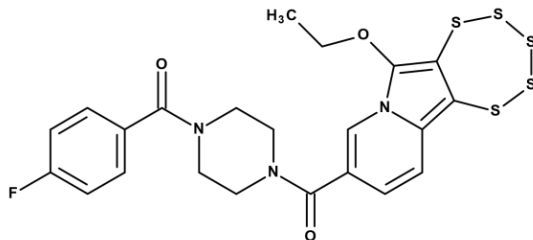
Struktur 34

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-176



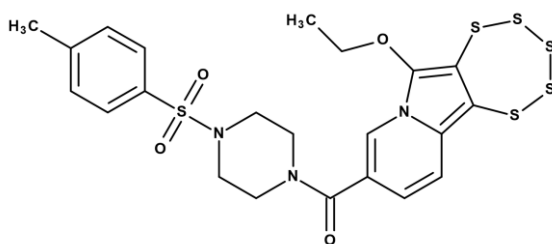
Struktur 35

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-183



Struktur 36

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-215



Struktur 37

AK Prof. Dr. Carola Schulzke
Dr. Siva Sankar Murthy Bandaru
SIV-01-217

5.2 Material

Alle Chemikalien wurden verwendet, wie vom Hersteller geliefert. Sind mehrere Geräte oder Systeme aufgeführt, ist bei der Methodenbeschreibung angegeben, welches verwendet wurde.

5.2.1 Verwendete Geräte

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HPLC-System-I (Merck-Hitachi, Darmstadt und San Jose, Deutschland-USA)
Interface D-7000; Entgaser L-7612; Pumpe L-7100; Autosampler L-7200; Detektor L-4500 DAD; Säulenofen L-7360; Software D-7000 HSM.

HPLC-System-II (Merck-Hitachi, Darmstadt und San Jose, Deutschland-USA)
Interface D-7000; Entgaser L-7612; Pumpe L-7100; Autosampler L-7200; Detektor L-7450 DAD; Säulenofen L-7350; Software D-7000 HSM.

pH-Meter

Mikroprozessor-pH-Meter pH 539 Wiss. Techn. Werkstätten GmbH, Weilheim,
Deutschland

Plattenlesegeräte

SpectraMax 384 plus	Molecular Devices, San Jose CA, USA
Tecan Sunrise	Tecan Austria GmbH, Groedig, Österreich

Software

Biovia Draw 21.1	Dassault Systems, Vélizy-Villacoublay, Frankreich
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc., La Jolla CA, USA
Magellan V 7.3	Tecan Austria GmbH, Groedig, Österreich
Microsoft Excel 2013	Microsoft, Redmond WA, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft, Redmond WA, USA
SoftMax Pro 6.4.1	Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA
WinASPECT 2.5.0.0	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland

UV-Vis-Spektroskopie

Spekol 1200	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Specord S 600	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Genesys 10S	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA

Waagen

MC1	Sartorius, Göttingen, Deutschland
PT310	Sartorius, Göttingen, Deutschland

ENTRIS64I-1S Sartorius, Göttingen, Deutschland

Wasseraufbereitung

Purelab Flex 3 Elga, Veolia, Paris, Frankreich

Zentrifugen

Heraeus Multifuge X1R Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA

Heraeus Primus R Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA

Galaxy Ministar VWR, Hannover, Deutschland

Weitere verwendete Materialien

15 mL Falcon Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, 62.554.502

96-well Mikrotiterplatten UV Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich, 655801

96-well-Mikrotiterplatten Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, 83.3924

T25-Zellkulturflaschen Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, 83.3910.002

UV-Vis-Makroküvette Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland, 100-10-K-40

Weitere Geräte

Brutschränke Heracell Heraeus, Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA

Coulter Counter Z2 Beckman-Coulter, Miami, USA

EVE™ automatic cell counter NanoEnTek, Pleasanton CA (USA)

Herasafe RS Laminar-Flow-Box Kendro, Hanau, Deutschland

Plattenrüttler MS3 digital IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland

Ultraschallbad Qualilab Merck, Darmstadt, Deutschland

Vortexer: LabDancer VWR, Hannover, Deutschland

Wasserbad Thermolab/GFL 1083 GFL, Burgwedel, Deutschland

5.2.2 Verwendete Chemikalien

Im Folgenden sind allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien aufgeführt. Im speziellen genutzte Chemikalien, wie zum Beispiel Chemikalien für biochemische Analysen oder die Qualität verwendeter Lösungsmittel für die HPLC, sind im entsprechenden Methodenteil verzeichnet.

1-Octanol Merck, Darmstadt, Deutschland, 293245

Benzophenon Hauschemikalie

Bibenzyl Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA, 106230250

Coulter Clenz	Beckman-Coulter, Miami, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.05099.1000
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Karlsruhe, A994.2
Diethylether	Hauschemikalie
Diphenylether	Hauschemikalie
EDTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, E5134
FBS Supreme	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland, P30-3031
Fe(NO ₃) ₃ ×9H ₂ O	Acros Organics, Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA, 38706500
Glutaraldehyd-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, 4995.1
Glutathion	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA, G4251
Glutathiondisulfid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, 6378.1
Glutathionperoxidase	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, G-6137-500UN
Glutathionreduktase	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, G-3664-500UN
Isoton	Beckman-Coulter, Miami, USA
Isoton II®	Beckmann-Coulter, Miami, USA, 8448011
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.04873.1000
Kristallviolett	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, C3886
Mercaptobernsteinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA, M618-2
MTT	Alfa Aesar, Haverhill, USA, L11939
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA, D4551
Na ₂ S	Acros Organics, Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA, 38706500
NaCN	Hauschemikalie
NADPH-Tetranatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, AE14.2
Natriumhydroxid	Hauschemikalie
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland, P06-07100
Phenylbenzoat	Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA, 162065000
RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland, P04-16500
<i>t</i> -Butylhydroperoxid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, 458139
Triphenylamin	Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA, A15939.06
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland, T8787
Trypsin-EDTA-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland, T3924-100ML
Uracil	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, 6378.1

5.3 RP-HPLC- und UV-Vis-Untersuchungen

5.3.1 RP-HPLC zur Reinheitsuntersuchung von Pentathiepinen

Für die Reinheitsuntersuchungen von Pentathiepinen wurde das HPLC-System-II von Merck-Hitachi verwendet. Als stationäre Phase kam eine Chromolith® SpeedRod RP18e 50-4,6 mm zum Einsatz. Die Verwendung dieser monolithischen Säule ermöglicht kurze Retentionszeiten für lipophile Substanzen bei geringen Rückdrücken und relativ hohen Flussraten. Als mobile Phase werden analytspezifisch Mischungen aus 70–80 % Acetonitril (Hi-PerSolv CHROMANORM®, Supergradienten-Qualität, VWR 83639.320) und 20–30 % Wasser (PureLab Flex 3 Wasseraufbereitung, Elga Viola) beziehungsweise Phosphatpuffer 10 mM mit analytspezifisch unterschiedlichen pH-Werten (2–7,4) verwendet. Die genauen Bedingungen sind im Ergebnisteil notiert. Die Flussrate der isokratischen Elution betrug $1,250 \text{ mL min}^{-1}$. Es wurden 10–40 μL der jeweiligen Probe injiziert. Die Detektion erfolgte mittels DAD bei $\lambda=240\text{--}260 \text{ nm}$ (integriert).

Die Totzeit des Systems wurde mit Uracil zu 0,72 min bestimmt. Gemäß allgemeiner Konvention wurde die Retentionszeit des Analyten durch Einstellung der mobilen Phase auf mindestens die doppelte Totzeit optimiert, um eine hinreichend genaue Quantifizierung zu ermöglichen.

Probenvorbereitung

Die Pentathiepine lagen als Feststoffe vor. Sie wurden nach Möglichkeit zu 200 μM in mobiler Phase unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades gelöst. Wenn sich der Analyt nicht in dieser Konzentration gelöst hatte, wurde so lange mit definierten Volumina mobiler Phase verdünnt, bis alle Feststoffteile vollständig gelöst waren.

Auswertung

Die Auswertung der Reinheit erfolgte gemäß prozentualer Flächenanteile des Substanzpeaks. Reinheiten von $\geq 95\%$ wurden als ausreichend für die biologische Testung erachtet.

5.3.2 RP-HPLC zur Abschätzung des *n*-Octanol-Wasser-Koeffizienten von Pentathiepinen

Der *n*-Octanol-Wasser-Koeffizient *P* beschreibt das Verhältnis der Massen beziehungsweise der Konzentrationen eines Stoffes nach Verteilung zwischen einer wässrigen und einer *n*-Octanol-Phase. Er ist ein wichtiger Faktor zur Abschätzung der Löslichkeit und Verteilung einer Substanz in physiologischen Medien und Zellen. Er beschreibt die

unterschiedliche Löslichkeit einer Substanz zwischen Wasser und *n*-Octanol und wird durch Bildung des dekadischen Logarithmus des Verteilungsverhältnisses der jeweiligen Substanz in beiden Medien ($\log P$) berechnet.

$$\log P = \log_{10} P = \log_{10} \left(\frac{C_{\text{Octanol}}}{C_{\text{Wasser}}} \right) \quad (5-18)$$

$C_{n\text{-Octanol}}$ = Konzentration in der Octanolphase nach Einstellung des Gleichgewichtes
 C_{Wasser} = Konzentration in der Wasserphase nach Einstellung des Gleichgewichtes

Durch Verwendung wässriger Puffer mit $\text{pH}=7,4$ kann auf das Verhalten insbesondere ionisierbarer Substanzen unter physiologischen pH -Bedingungen geschlossen werden.

$$\log D_{7,4} = \log_{10} \left(\frac{C_{\text{Octanol}}}{C_{\text{Puffer pH}=7,4}} \right) \quad (5-19)$$

$C_{n\text{-Octanol}}$ = Konzentration in der *n*-Octanolphase nach Einstellung des Gleichgewichtes
 $C_{\text{Puffer pH}=7,4}$ = Konzentration in der Pufferphase nach Einstellung des Gleichgewichtes

Idealerweise wird der Verteilungskoeffizient mit Hilfe der *shake flask* Methode bestimmt,^[84] doch ist diese Methode bei hohen $\log P$ -Werten meist nicht anwendbar, da die Konzentrationen in der wässrigen Phase zu gering werden. In diesen Fällen kann auf die Abschätzung mittels andere Methoden zurückgegriffen werden.

Für die Abschätzung des *n*-Octanol-Wasser-Koeffizienten P der Pentathiepine wurden zwei verschiedene Säulen am HPLC-System-I von Merck-Hitachi verwendet. Für beide Säulen unterschied sich das Vorgehen jedoch lediglich hinsichtlich der gewählten Flussrate der mobilen Phase.

Das Vorgehen in dieser Methode folgt den Empfehlungen der *United States Environmental Protection Agency* und ihrer *Product Test Guideline* OPPTS 8030.7570 *Partition Coefficient (n-Octanol/Water), Estimation By Liquid Chromatography*.^[155] Unter gewissen Bedingungen wird die Retentionszeit des Analyten auf einer *reversed phase* Säule mit unmodifizierten Ketten (zum Beispiel C18- oder C8-Material) zum großen Teil von Verteilungsprozessen zwischen der mit organischem Lösungsmittel gesättigtem lipophilen Flüssigkeitsschicht sowie der wässrigen Flüssigkeitsschicht beeinflusst. Voraussetzung ist, dass der Wasseranteil in der mobilen Phase hoch genug ist, um eine Phasengrenze zu erzeugen. Folgt man den Empfehlungen der *Guideline*, ist eine Abschätzung des Verteilungskoeffizienten in ausreichender Nähe zum mittels *shake-flask method* bestimmten Wert zu erreichen. Zur Abschätzung des Verteilungskoeffizienten mittels RP-HPLC ist das Erstellen einer Kalibrationsgerade mit

strukturell möglichst verwandten Substanzen erforderlich,^[155] deren Verteilungskoeffizienten, respektive deren $\log P$ -Werte, mit hoher Genauigkeit experimentell bestimmt wurden. Da für die Pentathiepine weder Vergleichswerte, noch strukturell ähnliche Referenzen vorliegen, musste die Auswahl aus einer vorgeschlagenen Liste mit Referenzen erfolgen.^[155]

Um den Vorgaben der Guideline zu folgen, wurde als mobile Phase 75 % Methanol (HiPerSolv Chromanorm VWR 20864.320) und 25 % Phosphatpuffer (10 mM, pH=7,4, 0,68 g KH_2PO_4 auf 0,5 L Wasser, pH eingestellt mit 1 M NaOH) gewählt. Die Elution erfolgte isokratisch. Für die stationäre Phase MN EC 150/4.6 Nucleosil 100-5 C18 HD betrug die Flussrate 1 mL min^{-1} , für die stationäre Phase Chromolith® SpeedRod RP18e 50-4,6 mm betrug die Flussrate $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Die Auswertung erfolgt bei $\lambda=254 \text{ nm}$. Bestimmt wird die Retentionszeit der Referenzen und Analyten. Tabelle 29 zeigt die gewählten Referenzen und die korrespondierenden $\log P$ -Werte.

Tabelle 29: Referenzen zur Abschätzung der Verteilungskoeffizienten

Substanz	$\log P$ -Wert
Uracil	Totzeitmarker
Benzophenon	3,2
Phenylbenzoat	3,6
Diphenylether	4,2
Dibenzyl	4,8
Triphenylamin	5,7

Als Referenz dient eine einzelne Lösung, in der alle Substanzen aus Tabelle 29 enthalten sind. Die Referenzen wurden folgendermaßen vorbereitet: 250 μL einer gesättigten Uracillösung in Methanol, 250 μL einer gesättigten Benzophenonlösung in Methanol sowie 1250 μL einer gesättigten Phenylbenzoatlösung werden mit 750 μL mobiler Phase versetzt. Nach Zugabe von je einer Spatelspitze Dibenzyl und Triphenylamin, sowie 15 μL Diphenylether wird der Ansatz für 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend durch einen MN Chromafil Spritzenvorsatzfilter PET 0,45 μm 15 mm P301.1 filtriert. Dies diente als Stammlösung für die Referenzen. Sie wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Messung wurde ein Aliquot aufgetaut und 1:5 in mobiler Phase verdünnt. 10 μL dieser Lösung werden in die HPLC injiziert.

Die Analyten werden nach Möglichkeit in mobiler Phase gelöst. Wenn das nicht möglich war, wurde auf Stammlösungen in Acetonitril oder Acetonitril-Wasser-Gemischen zurückgegriffen und eine hohe Verdünnung in mobiler Phase gewählt, um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen.

Aus den erhaltenen Retentionszeiten wird der Kapazitätsfaktor jeder Substanz berechnet.

$$k'_{\text{Analyt}} = \left(\frac{t_R(\text{Analyt}) - t_R(\text{Uracil})}{t_R(\text{Uracil})} \right) \quad (5-20)$$

k' = Kapazitätsfaktor

t_R = Retentionszeit der Substanz

Der dekadische Logarithmus des Kapazitätsfaktors der Referenzen wird gegen den literaturbekannten $\log P$ -Wert der Referenzen aufgetragen und ein linearer Zusammenhang hergestellt. Die erhaltene Regressionsgerade wird verwendet, um aus den Retentionszeiten der Analyten den geschätzten Verteilungskoeffizienten zu berechnen.

5.3.3 RP-HPLC zur Stabilitätsuntersuchung von Pentathiepinen

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde ebenfalls das in Kapitel 5.3.1 beschriebene System genutzt. Unterscheidungen gab es hinsichtlich der Probenvorbereitung und Auswertung.

5.3.3.1 Probenvorbereitung für Stabilitätsuntersuchungen bei pH=7,4

Stammlösungen der Substanzen in Acetonitril wurden so in GPx-Puffer (Lösung A, Kapitel 5.4.1) verdünnt, dass die Endkonzentration des Analyten $5 \mu\text{M}$ betrug. Für die Kontrolle wurden nun 0,1 Volumenäquivalente GPx-Puffer hinzugefügt. Alle 5–10 min wurden $20 \mu\text{L}$ dieser Lösung auf die Säule appliziert. Für die Untersuchungslösung wurde analog unter Verwendung einer $2,5 \text{ mM}$ Lösung aus Glutathion in GPx-Puffer verfahren. Das resultiert in einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ (Analyt) sowie $250 \mu\text{M}$ (GSH). Variationen hinsichtlich der Glutathionkonzentration sind im entsprechenden Teil der Arbeit notiert.

Auswertung

Die Fläche des Hauptpeaks der ersten Injektion der Kontrolllösung stellt den Referenzpeak dar, wobei die Fläche dieses Peaks einen Gehalt von 100% repräsentiert. Die Flächen des Hauptpeaks der Untersuchungslösung werden für jeden Zeitpunkt auf die Fläche des Referenzpeaks bezogen. Aus den Daten ergibt sich ein prozentualer Flächenanteil im Zeitverlauf, der die Stabilität des Analyten unter den gewählten Bedingungen darstellt.

Tabelle 30: Laufmittel und Retentionszeiten der mittels RP-HPLC auf Stabilität untersuchten Substanzen

Verbindung	Verhältnis ACN:H ₂ O	Retentionszeit / min	Kapazitätsfaktor k'
IN-1	80:20	4,3	5,3
IZ-1	70:30	2,2	2,2
IZ-2	70:30	4,9	6,2
IZ-3	80:20	4,9	6,2
PP-1	70:30	6,6	8,7
PC-1	80:20	3,9	4,7

5.3.3.2 Probenvorbereitung für Stabilitätsuntersuchungen bei pH=6,5

In einem HPLC-Vial wurden 890 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH=6,5) vorgelegt. Nach Zugabe von 10 μ L einer 500 μ M Lösung des Pentathiepins in Acetonitril sowie 100 μ L einer 2,5 mM Lösung von GSH im entsprechenden Phosphatpuffer wurde die Messung gestartet und über eine Stunde alle 10 min ein HPLC-Chromatogramm mit der in Kapitel 5.3.3 beschriebenen RP-HPLC-Methode aufgenommen. Die Peakflächen wurden über die Zeit ausgewertet.

5.3.4 UV-Vis-Spektroskopie zur Stabilitätsuntersuchung von Pentathiepinen

Die Stabilitätsuntersuchungen an Pentathiepinen und liposomalen Pentathiepinen wurden mit einem Specord S 600 durchgeführt. Die Software WinAspect diente zur Datenaufnahme und Parametereinstellung.

Probenvorbereitung

Stammlösungen der Substanzen in Acetonitril wurden so in GPx-Puffer (Lösung A, Kapitel 5.4.1) verdünnt, dass die Endkonzentration des Analyten 5 μ M betrug. Für die Kontrolle wurden nun 0,1 Volumenäquivalente GPx-Puffer hinzugefügt. Für die Untersuchungslösung wurde analog unter Verwendung einer 2,5–100 mM Lösung aus GSH in GPx-Puffer verfahren. Das resultiert in einer Endkonzentration von 5 μ M (Analyt) sowie 0,25–10 mM (GSH).

Messung

Die grundlegenden Parameter wurden, wie in Tabelle 31 aufgeführt, eingestellt. Zusätzlich wurden experimentenspezifische Einstellungen hinsichtlich der wiederholten Messung vorgenommen. Je nach Stabilität wurden unterschiedliche Zyklen eingestellt, um eine maximale Auflösung insbesondere zu Beginn der Messung zu erreichen.

Tabelle 31: Geräteparameter UV-Vis-Spektroskopie zur Stabilitätsuntersuchung Specord S600

Parameter	Einstellung
Lampenauswahl	D2E+HL
Integrationszeit	70 ms (variabel je nach Blankwert)
Akkumulationen	5
Dunkelstrom-Korrektur	ja
Anzeige	Absorption
Modus	Spektrum 240–600 nm
Spektrum mit Lampenseparation	Nein
Shutter immer offen	offen für Messintervalle <2 s geschlossen für Messintervalle ≥2 s
Temperatur in der Küvette	23 °C (peltierkontrolliert)
Küvette	Makro-Küvette Hellma 110-QS, 10 mm mit Stopfen
Rühren in der Küvette	ja, Rührfisch

Der GPx-Puffer wurde in der Küvette vorgelegt und im Peltierelement auf 23 °C temperiert. Die Temperatur wurde gewählt, um den Bedingungen des GPx-Enzym-Assays zu entsprechen. Nach Zugabe der Pentathiepinstammllösung konnte sich die Lösung für etwa eine Minute unter Rühren equilibrieren. Nach Zugabe der Glutathionlösung wurde die Messung für die Aufnahme von Absolutspektren unmittelbar gestartet – hier diente als Blank eine Lösung aus 250 µM Glutathion in GPx-Puffer mit einem entsprechenden Anteil an Acetonitril als Lösungsmittel. Für die Aufnahme der Differenzspektren wurde nach Hinzugabe der Glutathionlösung unmittelbar eine Referenzmessung durchgeführt und anschließend dieselbe Lösung in entsprechenden Intervallen vermessen. Die Messung wurde so lange fortgeführt, bis sich die Absorptionen der untersuchten Wellenlängen nicht mehr änderten.

Auswertung

Aus den Absolutspektren wurden Maxima und Minima entnommen. Zur Auswertung der Differenzspektren wurden die erhaltenen Spektren als ASCII exportiert und in GraphPad Prism 8 sowie Microsoft Excel 2013 importiert. Für die zeitabhängigen Aufnahmen wurde bei Bedarf eine Basislinienkorrektur mittels GraphPadPrism vorgenommen, indem von jeder Messreihe die Absorption im Bereich von 500–600 nm abgezogen wurde.

Aus den Differenzspektren wurde das Minimum höchster Wellenlänge genutzt, um die Halbwertszeit zu bestimmen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass diese Wellenlänge mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf den Pentathiepinring zurückzuführen ist.^[85] Die Messung wurde immer so lange durchgeführt, bis am untersuchten Minimum keine Absorptionsänderung mehr beobachtet werden konnte. Da mittels RP-HPLC-Versuchen festgestellt wurde, dass zu dem Zeitpunkt höchstwahrscheinlich kein Pentathiepin mehr vorhanden ist, wurde die Konzentration zu diesem Zeitpunkt als 0 µM angenommen. Zum

Zeitpunkt t_0 wurde die Konzentration als $5\ \mu\text{M}$ festgelegt. Aus diesen beiden Punkten konnte ein Konzentrations-Zeit-Verlauf ermittelt werden:

$$c_t = 5\ \mu\text{M} \cdot \left(\frac{\Delta A_t}{\Delta A_{\text{end}}} \right) \quad (5-21)$$

c_t	=	Konzentration zum Zeitpunkt t
ΔA_t	=	Absorptionsdifferenz (Absorption zum Zeitpunkt t – Endabsorption)
ΔA_{end}	=	Absorptionsdifferenz (Anfangsabsorption – Endabsorption)

Aus den erhaltenen Kurven konnten sowohl die Halbwertszeit, als auch die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt werden. Während die Halbwertszeit als Zeit bis $c = 2,5\ \mu\text{M}$ Penthiepin definiert ist, wurde die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt, indem die Konzentrationsabnahme am anfänglich linearen Abbau über die Zeit abgeleitet wurde.

5.3.5 UV-Vis-Spektroskopie zur GSSH-Detektion

Um die Bildung von GSSH mittels UV-Vis-Spektroskopie zu messen, wurde ein Protokoll von FRANCOLEON *et al.* 2011^[23] angewendet. Die Messung beruht auf der Reaktion von *in-situ* erzeugtem GSSH mit Thiocyanat-Ionen und anschließender Komplexbildung mit Eisen-III-Ionen. Die Messungen wurden in einem Spekol 1200 durchgeführt.

5.3.5.1 Freisetzung von GSSH aus GSSG durch Na_2S

Die benötigten Lösungen werden wie folgt in Reagenzgläsern mit Schliff vorbereitet:

- I. $750\ \mu\text{L}$ Na_2S $10\ \text{mM}$ in GPx-Puffer (siehe 5.4.1) werden mit $750\ \mu\text{L}$ GPx-Puffer versetzt (Kontrolle Na_2S)
- II. $750\ \mu\text{L}$ GSSG $10\ \text{mM}$ in GPx-Puffer werden mit $750\ \mu\text{L}$ GPx-Puffer versetzt (Kontrolle GSSG)
- III. $750\ \mu\text{L}$ GSSG $10\ \text{mM}$ in GPx-Puffer werden mit $750\ \mu\text{L}$ Na_2S $10\ \text{mM}$ in GPx-Puffer versetzt (Untersuchungslösung)

Die Lösungen I–III werden für $15\ \text{min}$ bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dabei läuft folgende Reaktion ab:



Nach Abschluss der Reaktionszeit werden $1,5\ \text{ml}$ einer $5\ \text{mM}$ Lösung NaCN in Wasser zu jeder der drei Lösungen hinzugefügt. Die Reaktionsgemische werden bei 70°C für $30\ \text{min}$ im Wasserbad inkubiert:



Nach Abschluss der Reaktionszeit werden 3 mL einer 2,5 mM Lösung $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ in 16 % HNO_3 hinzugegeben. Dabei kommt es zur Rotfärbung der Lösung:



Der so gebildete Eisen-III-Komplex zeigt eine tiefrote Farbe und besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=460\text{nm}$. Die Detektion des Komplexes erfolgt durch Auswertung eines Absorptionsspektrums im Bereich von 350–600 nm. Als Referenzwert wird eine entsprechende Verdünnung des GPx-Puffers und Wasser verwendet.

5.3.5.2 Freisetzung von GSSH aus Pentathiepinen durch GSH

Zur Testung, ob aus Pentathiepinen bei der Reaktion mit GSH GSSG freigesetzt wird, kommt ein analoges Experiment wie in 5.3.5.1 beschrieben zur Anwendung. Eine Änderung erfolgt in der Herstellung der Untersuchungslösungen:

- I. 750 μL GSH 20 mM in GPx-Puffer werden mit 750 μL GPx-Puffer versetzt (Kontrolle GSH)
- II. 1350 μL GPx-Puffer werden mit 150 μL einer 2 mM Lösung des untersuchten Pentathiepins in DMF versetzt (Kontrolle Pentathiepin)
- III. 750 μL GSH 20 mM in GPx-Puffer werden mit 600 μL GPx-Puffer sowie 150 μL einer 2 mM Lösung des untersuchten Pentathiepins in DMF versetzt (Untersuchungslösung)

5.3.6 RP-HPLC zur simultanen Detektion von GSH und GSSG

Für die Detektion von GSSG und GSH wurde das HPLC-System-II von Merck-Hitachi verwendet. Als stationäre Phase kam eine Machery Nagel EC 250/4 Nucleodur PolarTec, 5 μM zum Einsatz. Die Verwendung dieser sphärischen Säule ermöglicht die Verwendung von sehr hohen polaren Anteilen der mobilen Phase und erweitert die Interaktion des Analyten mit der stationären Phase um polare Wechselwirkungen. Als mobile Phase wurden 2 % Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM®, Supergradienten-Qualität, VWR 83639.320) und 98 % Phosphatpuffer 10 mM pH-Wert=3,0 verwendet. Die Flussrate der isokratischen Elution betrug 0,7 mL min^{-1} . Die Detektion erfolgte mittels DAD bei $\lambda=200-220\text{nm}$ (integriert). Die Totzeit des Systems wurde mit Thioharnstoff zu 3,0 min bestimmt.^[156]

5.3.6.1 Bestimmung der Freisetzung von GSSG aus einem Pentathiepin durch Reaktion mit GSH

50 μL einer 2 mM Lösung von **26** in DMF werden zu 900 μL des GPx-Phosphatpuffers (siehe Kapitel 5.4.1) pipettiert. Nach Zugabe von 50 μL einer 20 μM Lösung von GSH in ebenjenem Puffer wird der Reaktionsansatz für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das resultiert in 100 μM **26**, 1 mM GSH sowie 5 % DMF. 10 μL dieser Lösung werden gemäß der RP-HPLC Methode vermessen. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle unter gleichen Bedingungen in Abwesenheit von **26** durchgeführt. Die Retentionszeit von GSSG wurde mittels einer 125 μM Lösung aus GSSG in Wasser zu 13 min ermittelt.

5.3.7 RP-HPLC zur Detektion eines Pentathiepinabbauproduktes

Für die Detektion des Pentathiepins und seines Abbauproduktes wurde das HPLC-System-II von Merck-Hitachi verwendet. Als stationäre Phase kam eine Machery Nagel EC 250/4 Nucleodur PolarTec, 5 μM zum Einsatz. Die Verwendung dieser sphärischen Säule ermöglicht die Verwendung von sehr hohen polaren Anteilen der mobilen Phase und erweitert die Interaktion des Analyten mit der stationären Phase um polare Wechselwirkungen. Als mobile Phase 80 % Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM®, Supergradienten-Qualität, VWR 83639.320) und 20 % Wasser verwendet. Die Flussrate der isokratischen Elution betrug 1,0 mL min⁻¹. Die Detektion erfolgte mittels DAD bei einer analytspezifischen Wellenlänge. Die genauen Bedingungen sind im Ergebnisteil notiert.

5.3.8 RP-HPLC zur quantitativen Bestimmung von Pentathiepinen in Liposomen

Für die Detektion und Quantifizierung des Pentathiepins in Liposomen wurde ebenfalls auf das beschriebene RP-HPLC-System in Kapitel 5.3.1 zurückgegriffen. Unterschiede gab es hinsichtlich der Probenvorbereitung.

5.3.8.1 Extraktion der Pentathiepine aus der liposomalen Zubereitung

Vor der Vermessung mittels RP-HPLC musste das Pentathiepin aus den Liposomen extrahiert werden. Die Extraktion wurde in drei Schritten vorgenommen.^[103]

Desintegrierung

25–50 μL der Liposomenzubereitung wurden in einem 2 mL Eppendorfgefäß mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (60/40) auf 0,5 mL Volumen aufgefüllt und für 5 min ruhen gelassen.^[104]

Extraktion

1,0 mL Diethylether wurden der Mischung zugesetzt. Nach 1,0 min Vortexen wird das Zweiphasengemisch zur besseren Phasentrennung für 15 min bei 300×g und 23 °C zentrifugiert.

Schwierigkeiten ergaben sich beim Handling des Diethylethers. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit kam es zu Problemen beim Pipettieren. Diese konnten gelöst werden, indem vor dem eigentlichen Pipettiervorgang die verwendete Pipette mehrmals mit Diethylether aufgezogen wurde, um den Luftraum innerhalb der Pipette mit Diethylether zu sättigen. Dadurch konnte eine höhere Reproduzierbarkeit erzielt werden. Ein weiterer Punkt betraf die Entnahme der organischen Phase nach dem Zentrifugieren. Ein Teil des Acetonitrils ging in die organische Phase über, weshalb die Phasengrenze durch die Pipette möglichst nicht verletzt werden sollte. Um das zu verhindern wurden lediglich 75 % der eingesetzten organischen Phase entnommen und eingedampft. Dieser Anteil wurde entsprechend bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt.

Aufkonzentrierung

750 µL der Etherphase werden mittels einer 1000 µL Kolbenhubpipette entnommen und in ein 1,0 mL Glasröhrchen überführt sowie anschließend unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird – je nach erwarteter Konzentration – in 100–200 µL mobiler Phase aufgenommen. 40 µL dieser Lösung werden mittels HPLC unter den in Kapitel 5.3.1 angegebenen Bedingungen chromatographiert.

Berechnung der Konzentration in der liposomalen Zubereitung

Für die Berechnung der Konzentration ist der Verdünnungsfaktor zu ermitteln. Die mittels Kalibration ermittelte, gemessene Endkonzentration muss mit diesem multipliziert werden. Beispielhaft ist der Verdünnungsfaktor für eine verwendete Menge von 25 µL liposomaler Zubereitung und ein Volumen von 200 µL mobiler Phase zur Aufnahme des getrockneten Rückstandes gezeigt:

$$\frac{1 \text{ mL eingesetzter Diethylether}}{\text{verwendetes Volumen Diethylether in mL}} \cdot \frac{\text{Aufnahmevolumen in } \mu\text{L}}{\text{eingesetztes Volumen in } \mu\text{L}} = \text{VF} \quad (5-25)$$

$$\frac{1 \text{ mL}}{0,75 \text{ mL}} \cdot \frac{200 \mu\text{L}}{25 \mu\text{L}} = \text{VF}$$

$$\underline{\underline{\text{VF} = 10,6\bar{6}}}$$

5.3.8.2 Kalibration

Gewählt wurden folgende Standards: 3–10–20–30–40 μM . Die Standards wurden an jedem Analysentag chromatographiert und aus den erhaltenen Flächen konnte eine lineare Kalibrationsfunktion errechnet werden. Diese Kalibrationsfunktion wurde zu Quantifizierungszwecken genutzt.

5.3.9 RP-HPLC zur Löslichkeitsbestimmung von Pentathiepinen in Wasser

Zum Vergleich der Löslichkeit des freien Pentathiepins mit dem liposomalen Präparat wurde das Ausmaß, in dem sich Pentathiepin in PBS löst, nach der von FREERKS *et al.* 2022^[157] beschriebenen Methode mit Änderungen bestimmt. Etwa 2 mL des Mediums wurden in ein 5 mL Schott Fiolax®-Schraubhalsfläschchen gefüllt. Nach Zugabe eines Überschusses an Pentathiepin in jedes Fläschchen (ca. 0,5 mg) wurden die Fläschchen 24 h lang im Dunkeln bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Nach 24 h wurde sichergestellt, dass ein ungelöster Rückstand vorhanden war, und 1,5 mL der Lösung wurden in einem 2 mL-Eppendorf-Röhrchen 15 Minuten lang bei 500 \times g zentrifugiert. Etwa 1 mL des Überstandes wurde mit der unter 5.3.1 und 5.3.8.2 beschriebenen Methode analysiert. Der Versuch wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt.^[156]

5.4 Biochemische Untersuchungsmethoden

5.4.1 Glutathionperoxidase-Assay mittels Spektrophotometer

5.4.1.1 Standardprotokoll zur Durchführung des Glutathionperoxidase-Assays mittels Spektrophotometer

Die Hemmung der Glutathionperoxidase wird mittels GPx-Bioassay getestet. Vorgegangen wird im Prinzip nach PAGLIA UND VALENTINE 1967^[158]. Dabei wird sich der Katalysezyklus der GPx zu Nutze gemacht, wobei Glutathion oxidiert und im weiteren Verlauf durch die Glutathionreduktase reduziert wird, um erneuten Oxidationsvorgängen zur Verfügung zu stehen. Der Reduktionsvorgang läuft unter Verbrauch des Reduktionsäquivalents NADPH ab. Die abnehmende Konzentration von NADPH kann als Maß für die Enzymaktivität der Glutathionperoxidase herangezogen werden.

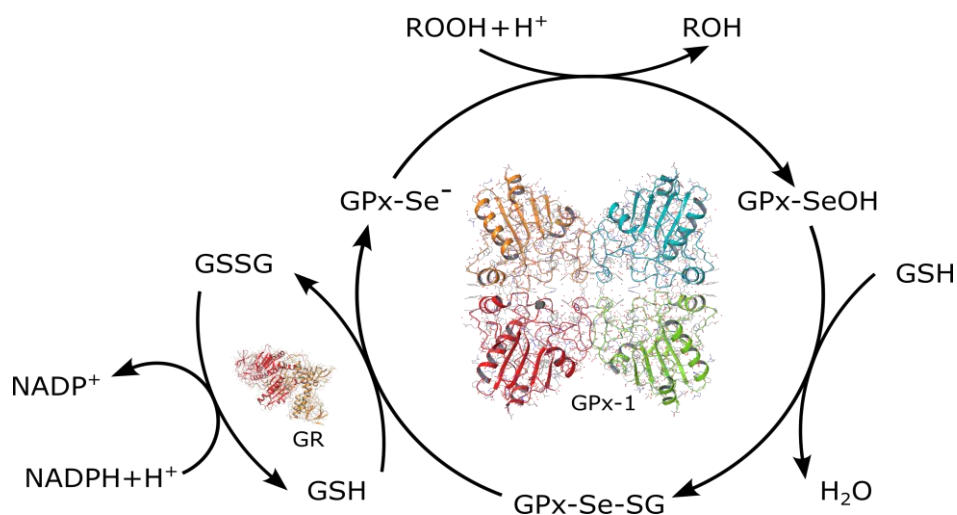


Abbildung 68: Katalysezyklus der Glutathionperoxidase. Peroxide, organisch oder anorganisch, oxidieren das selenocysteininhaltige, aktive Zentrum der GPx zur selenenigen Säure.^[91] Unter Verbrauch von zwei Äquivalenten Glutathion (GSH) kommt es zur Reduktion, wobei ein Äquivalent Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion, GSSG) gebildet wird. Die ebenfalls eingesetzte Glutathionreduktase (GR) reduziert das Disulfid unter Verbrauch von NADPH zu zwei Äquivalenten GSH. Die gemessene Abnahme der optischen Dichte bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ ist proportional Abnahme der NADPH-Konzentration und somit zur GPx-Aktivität

Der Einsatz der Glutathionreduktase stellt nicht nur Glutathion wieder zur Verfügung, sondern hält im Verlauf Assays die Glutathionkonzentration konstant. Dadurch ist es möglich eine kinetische Messung vorzunehmen, es muss nicht auf die Methode der Anfangsgeschwindigkeiten oder der Endpunktmethode zurückgegriffen werden.

Materialien

Mikrotiterplatten – Greiner Bio-One UV-Star® Microplatte, 96 well, COC, F-Boden (Kaminform), transparent (655801)

Lösung A: Kaliumphosphatpuffer; pH=7,4; Zusatz von 409 mg EDTA und 100 mg Triton X-100 je Liter

Lösung B: GPx-Aliquote in Puffer A, Aktivität 20 U mL⁻¹

Lösung C: GR + NADPH-Lösung in Puffer A, GR-Aktivität 2 U mL⁻¹, NADPH-Konzentration 2 mM

Lösung D: 2,5 mM GSH-Lösung aus L-GSH in Lösung A

Lösung E: 5 mM *t*-Butylhydroperoxidlösung in Wasser

Lösung F: Inhibitor Stammlösungen in DMF (Konzentration 10-fach zur Zielkonzentration im Well)

extra LM: Ausgleich des Lösungsmittels aus Lösung F

Die Lösungen werden in der in Tabelle 32 angegebenen Reihenfolge und Menge in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert.

Tabelle 32: GPx-Assay – Pipettierreihenfolge

	ohne GPx	ohne Inhibitor	Testsubstanzen
Lösung A	180 µL	160 µL	160 µL
Lösung B	0 µL	20 µL	20 µL
Lösung F	0 µL	0 µL	30 µL
extra LM	30 µL	30 µL	0 µL
Lösung D	30 µL	30 µL	30 µL
Lösung C	30 µL	30 µL	30 µL
Lösung E	30 µL	30 µL	30 µL

Das resultiert in finalen Konzentrationen in den einzelnen Wells entsprechend Tabelle 33:

Tabelle 33: GPx-Assay – Endkonzentrationen in den Kavitäten

Bestandteil	Konzentration / Aktivität
GPx	0,05 U mL ⁻¹
GR	0,02 U mL ⁻¹
GSH	250 µM
NADPH	200 µM
<i>t</i> -Butylhydroperoxid	500 µM
Inhibitoren	serielle Verdünnung

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340\text{nm}$ mit einem Messintervall von 15 s über einen Zeitraum von 30 min. Für die Auswertung wird der lineare Abschnitt der gemessenen Kurve genutzt.

Für jede Konzentration des Inhibitors wird auf jeder Platte eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Je drei Wells werden für den Leerwert (kein GPx, kein Inhibitor) zur Bestimmung des Hintergrundzerfalls von NADPH und die Kontrolle (kein Inhibitor) genutzt.

Die Mittelwerte jeder Dreifachbestimmung werden errechnet. Der Hintergrundzerfall wird vom zeitlich korrespondierenden Mittelwert jeder Messung abgezogen. Von den so für die einzelnen Konzentrationen erhaltenen Graphen wurde der mittlere Anstieg mittels Differenzbildung und Mittelwertbestimmung errechnet.

Die Berechnung der GPx-Restaktivität wurde mit dem bestimmten Anstiegswert über folgende Formel ermittelt:

$$\frac{U}{L} = \frac{-A \cdot 10^6}{\epsilon \cdot d} \quad (5-26)$$

A = Absorption

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient von NADPH [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] = 622

d = Höhe des Plattenbodens [mm] = 9

Die Restaktivität ergibt sich aus folgender Formel:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{\left(\frac{U}{L}\right)_{\text{Inhibitor}}}{\left(\frac{U}{L}\right)_{\text{Kontrolle}}} \quad (5-27)$$

v_i = *inhibited velocity* – Geschwindigkeit des inhibierten Enzyms

v_0 = *velocity without inhibition* – Geschwindigkeit des uninhibierten Enzyms

Die Restaktivitäten werden in GraphPad Prism 8 gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Die Daten werden auf mittels folgender Formel geplottet und für die Achsen-darstellung der dekadische Logarithmus gewählt:^[102]

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^h} \quad (5-28)$$

v_i = *inhibited velocity* – Geschwindigkeit des inhibierten Enzyms

v_0 = *velocity without inhibition* – Geschwindigkeit des uninhibierten Enzyms

[I] = Inhibitorkonzentration

IC_{50} = Inhibitorkonzentration bei 50%iger Zielenzymaktivität

h = *hill factor*

Das entspricht im Ergebnis einer Transformation $X = \log(X)$ und anschließender *non-linear regression log(inhibitor) vs. response – variable slope (four parameters)* mit den *constraints top*

sowie *bottom* auf 1 respektive 0 gesetzt. Aus dem erstellten Datenblatt werden die Daten für die IC_{50} -Werte entnommen.

Für alle getestete Substanzen werden mindestens drei Versuche durchgeführt, der geometrische Mittelwert sowie das 95 %-Vertrauensintervall berechnet.

5.4.1.2 Reversibilitätstestung mittels Dialyse

Enzymkinetische Berechnungen nach Michaelis-Menten sind, streng genommen, nur gültig, wenn es sich um eine vollständig reversible Inhibierung des Enzyms handelt, welche zusätzlich einen *steady state* erreicht, in dem die Desorption des Inhibitors vom Molekül im gleichen Maß abläuft, wie die Bindung. Zur Überprüfung der Reversibilität eines Inhibitors stehen mehrere Methoden zur Verfügung.^[102] Die Dialyse des Enzym-Inhibitor-Komplexes gegen einen inerten Puffer und anschließende Aktivitätsbestimmung ist als direkte Methode anderen Methoden vorzuziehen – eine ausreichende Stabilität des Enzyms und des Inhibitors vorausgesetzt. Für bovine Glutathionperoxidase ist ein Dialyseschlauch notwendig, der die Diffusion des 43,93 kDa großen Proteins^[159] verhindert und kleine Moleküle diffundieren lässt.

Materialien für die Dialyse

Dialysekammern Pur-A-Lyzer™ Maxi 6000 (Sigma-Aldrich, PURX60015-1KT)

- Lösung A: Kaliumphosphatpuffer; pH=7,4; Zusatz von 409 mg EDTA und 100 mg Triton X-100 je Liter
- Lösung B: GPx-Aliquote in Puffer A, Aktivität 0,75 U mL⁻¹
- Lösung C: GR + NADPH-Lösung in Puffer A, GR-Aktivität 2 U mL⁻¹, NADPH-Konzentration 2 mM
- Lösung D: 2,5 µM GSH-Lösung aus L-GSH in Lösung A
- Lösung E: 5 mM *t*-Butylhydroperoxidlösung in Wasser
- Lösung F: Inhibitor Stammlösungen in DMF (Konzentration 10-fach zur Zielkonzentration im Well)
- extra LM: Lösungsmittel für Wells ohne Inhibitor

Tabelle 34: Pipettierreihenfolge GPx-Reversibilitätsbestimmung Dialyse

	Kontrolle	w/o GSH	GSH
Lösung A	75 µL	75 µL	0 µL
Lösung B	1,275 mL	1,275 mL	1,200 mL
Lösung F	0 µL	150 µL	150 µL
extra LM	150 µL	0 µL	0 µL
Lösung D	0 µL	0 µL	150 µL

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Das entspricht der Durchführungszeit des GPx-Assays. Anschließend werden die Dialysekammern in ein großes, Lösung A enthaltendes Becherglas überführt, sodass der Dialyseschlauch vollständig und Luftblasenfrei von Lösung A benetzt ist. Der Ansatz wird langsam gerührt, sodass es zu keiner Luftblasenbildung kommt. Nach 24h bei 4 °C wird der GPx-Assay unter Verwendung von 180 µL der dialysierten Lösung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gemäß Kapitel 5.4.1 durchgeführt. Es wird die relative Enzymreaktivität, bezogen auf den Kontrollansatz, berechnet.

5.4.1.3 Reversibilitätstestung mittels *jump dilution*

In einigen Fällen ist die Reversibilitätstestung mittels Dialyse ungeeignet. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn das Zielenzym keine ausreichende Stabilität unter den Dialysebedingungen aufweist und die erhaltene Restaktivität keinen Aufschluss über den Bindungsmodus zulässt. Ein weiteres Problem stellt eine mögliche Instabilität des Inhibitors, respektive des Inhibitor-Enzym-Komplexes dar. Kommt es zu deren Abbau während des Dialysevorgangs, sind die Daten ebenfalls nicht auswertbar. Zur Untermauerung der Dialyseergebnisse, oder als ausschließliches Experiment, bietet sich in diesem Fall die *jump dilution* an^[102].

Dieses Experiment beruht auf der Annahme, dass normale (*hill factor* in etwa 1), reversible Inhibitoren während der Hemmung einem *steady state*, einem Gleichgewichtszustand, unterliegen, in dem die Desorption im gleichen Maß verläuft, wie die Bildung des Inhibitor-Enzym-Komplexes. In diesen Fällen lässt sich die prozentuale Enzymhemmung in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration darstellen als umgeformte Formel (5–29):^[102]

$$\frac{[I]}{IC_{50}} = \frac{\%I}{100 - \%I} \quad (5-29)$$

[I] = InhibitorKonzentration

IC₅₀ = InhibitorKonzentration bei 50%iger Zielenzymaktivität

%I = prozentuale Enzyminhibierung

Abbildung 69 stellt den Zusammenhang zwischen IC₅₀, InhibitorKonzentration und prozentualer Aktivität graphisch dar.

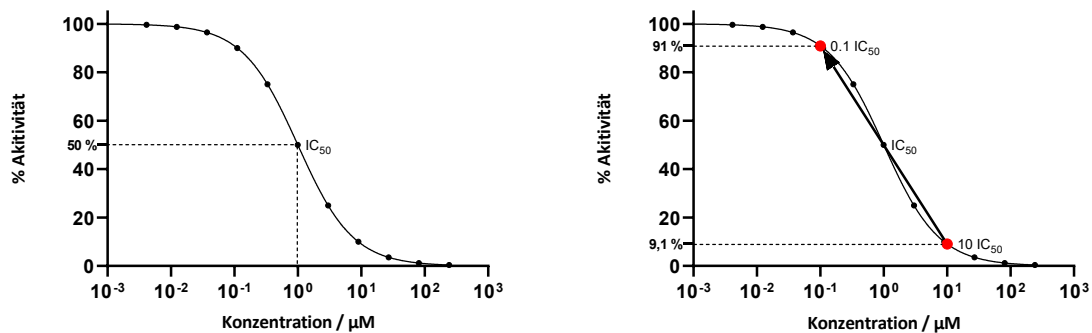


Abbildung 69: Prinzip der *jump dilution*. links: simulierte Konzentrations-Aktivitätskurve eines Inhibitors mit $IC_{50} = 1 \mu\text{M}$, $h = 1$. rechts: Veranschaulichung des Verdünnungsschrittes der *jump dilution* von der 10-fachen zur 0,1-fachen InhibitorKonzentration. Abbildungen nach COPELAND 2013^[102]

Für das Experiment wird das Enzym in 100-facher Assaykonzentration vorgelegt und mit der 10-fachen IC_{50} -Konzentration des Inhibitors inkubiert. Da für vollreversible Inhibitoren die Enzymkonzentration in der Regel um Vielfache niedriger ist, als die InhibitorKonzentration, spielt die Enzymkonzentration für den IC_{50} -Wert keine Rolle.^[102] Gemäß Abbildung 69 sowie Formel(5–29) kommt es so zu einer 91%igen Inhibierung des Enzyms. Nach 30 min Inkubationszeit wird dieser Ansatz 1:100 in einer 96-well-Platte verdünnt, sodass der Assay sofort gestartet werden kann. Für einen voll-reversiblen Inhibitor wird bei diesem anschließenden Assay eine Enzymaktivität von etwa 10% erwartet, da das Enzym nach dem Verdünnungsschritt in normaler Assaykonzentration vorliegt und der Inhibitor in einer Konzentration, die dem 0,1-fachen des IC_{50} -Wertes entspricht.

Materialien für das *jump dilution*-Experiment

96-Well-Platte – Saarstedt, TC plate 96 well, Standard F

Mikrotiterplatten – Greiner Bio-One UV-Star® Microplatte, 96 well, COC, F-Boden (Kaminform), transparent (655801)

Lösung A: Kaliumphosphatpuffer; pH=7,4; Zusatz von 409 mg EDTA und 100 mg Triton X-100 je Liter

Lösung B: GPx-Aliquote (Sigma, G6137) in Puffer A/Glycerol, Aktivität 20 U mL^{-1}

Lösung C: GR (Sigma, G3664) + NADPH-Lösung (Carl Roth, AE14, Tetranatriumsalz) in Puffer A, GR-Aktivität 2 U mL^{-1} , NADPH-Konzentration 2 mM

Lösung D: $2,5 \mu\text{M}$ GSH-Lösung aus L-GSH (Sigma, G4251 $M_r = 307,02$) in Lösung A

Lösung E: 5 mM *t*-Butylhydroperoxidlösung (Sigma, 458139 $M_r = 90,12$) in Wasser

Lösung F: Inhibitor Stammlösungen in einem geeigneten Lösungsmittel (Konzentration 100-fach zur Zielkonzentration im Well)

extra LM: Ausgleich des Lösungsmittels aus Lösung F

Da GPx mehrere Substrate besitzt, wurde die Reversibilitätstestung mittels *jump dilution* unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt: I) mit GSH und *t*-BHO II) mit GSH III) ohne GSH und ohne *t*-BHO. Jede Bedingung erhält eine eigene Kontrolle (ohne Inhibitor) sowie eine eigenen Leerwert (ohne GPx, mit Inhibitor). Der Leerwert dient der Kontrolle, ob die einzelnen Bestandteile miteinander reagieren und einen GPx-Inhibitor bilden.

Tabelle 35: Pipettierreihenfolge *jump dilution*-Experiment an boviner GPx-1 – Volumina in μL

	I		II			III			
	I _{Kontrolle}	I _{Leer}	w/o GSH		II _{Kontrolle}	II _{Leer}	w/o GSH w/o <i>t</i> -BHO	III _{Kontrolle}	III _{Leer}
Lösung A	162	162	237	192	192	267	222	222	297
Lösung B	75	75	0	75	75	0	75	75	0
Lösung F	3	0	3	3	0	3	3	0	3
extra LM	0	3	0	0	3	0	0	2	0
Lösung D	30	30	30	30	30	30	0	0	0
Lösung E	30	30	30	0	0	0	0	0	0

Nach 30 min werden 30 μL jedes Ansatzes gleichzeitig mittels einer 12-Kanal-Kolbenhubpipette entnommen und auf derselben Platte 1:10 in Lösung A verdünnt. 30 μL dieser Verdünnung werden im GPx-Assay eingesetzt, indem die Lösungen A, C sowie D so vorgelegt werden, dass die gleichen Bedingungen erhalten werden, wie im Kapitel 5.4.1 beschrieben. Für die jeweiligen Leerwerte war zusätzlich GPx in normaler Assaykonzentration vorgelegt. Die Auswertung erfolgte, indem für alle Gruppen die Enzymaktivität gemäß Kapitel 5.4.1 bestimmt und berechnet wurde. Verglichen wurden die Werte mit der jeweiligen Kontrolle sowie gleichzeitig durchgeführten Versuchen der 0,1-fachen- IC_{50} -Konzentration, respektive der 10-fachen- IC_{50} -Konzentration in einem normal durchgeführten GPx-Assay.

Handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor ist die GPx-Aktivität des Testansatzes geringer, als die der korrespondierenden Kontrolle. Sofern der Inhibitor irreversibel oder langsam bindet, ist das an einer verringerten GPx-Aktivität des Testansatzes im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle zu erkennen.

5.4.1.4 GPx-Assay in einer UV-Vis Makroküvette

Abweichend von der Vorschrift in Kapitel 5.4.1 wurde für die Überprüfung des Einflusses der Inkubationszeit von GSH mit Pentathiepin auf die Ergebnisse des GPx-Assays ein vereinfachter Assay in einer UV-Vis-Makroküvette durchgeführt. Dafür wurden die Lösungen

A, B sowie C in einer Küvette (Hellma Analytics, High Precision Cell, 100-10-K-40) in 2 mL und 1,25-facher Zielkonzentration vorgelegt.

In einem Eppendorfgesäß wurden 25 µM des Pentathiepins **26** mit 2,5 mM GSH inkubiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde als Inhibitor in einem Volumen von 250 µL zur vorbereiteten Mischung in der Küvette pipettiert. Nach Zugabe von 250 µL von Lösung E wurde die Absorption des NADPH bei $\lambda=340\text{nm}$ mit einem Messintervall von 10s mittels UV-Vis-Spektrometer (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer) gemessen.

Als Kontrolle wurde eine Lösung aus der entsprechenden Menge DMF und 2,5 mM GSH in Puffer in einem Eppendorfgesäß verwendet.

Die Auswertung erfolgte anhand der gemessenen Absorptionen entsprechend Kapitel 5.4.1.

5.4.1.5 Bestimmung K_i und Art der Hemmung

Die Grundlage für die Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i ist die Theorie der Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes:



- E = Enzym
- I = Inhibitor
- EI = Enzym-Inhibitor-Komplex
- k_3 = Bildungskonstante des EI
- k_{-3} = Zerfallskonstante des EI

Damit ergibt sich K_i zu:

$$K_i = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad (5-31)$$

Während der IC_{50} -Wert abhängig von den gewählten Assaybedingungen ist^[92] (siehe Abbildung 70, Seite 144) handelt es sich bei K_i um eine thermodynamische Konstante. Sie ist somit besser zum Vergleich verschiedener Inhibitoren desselben Enzyms, sowie zur Bestimmung der Bindungsmodalität geeignet. Unter Berücksichtigung von Abbildung 70 und Anwendung des in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Vorgehens wurde eine IC_{50} -Bestimmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen vorgenommen, wobei das jeweilige andere Substrat konstant gehalten wurde. Dabei reichte die zum K_m -Wert relative Substratkonzentration von 0,08–10,00.

Da die Glutathionperoxidase zwei Substrate (Peroxid und GSH) besitzt ist eine Bestimmung des K_m -Wertes immer an eine konstante Konzentration des jeweilig anderen Substrates gebunden und kann nicht isoliert betrachtet werden. Gleiches gilt für errechnete k_i -Werte.

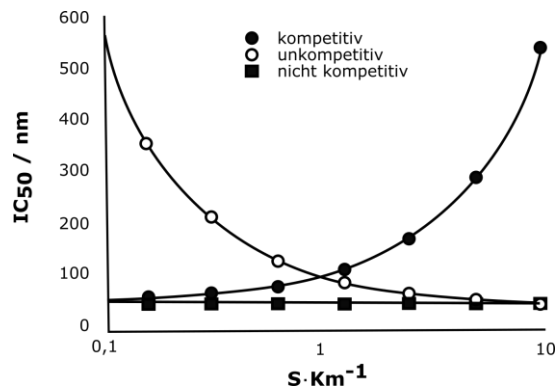


Abbildung 70: Abhängigkeit des IC₅₀-Wertes von den Assaybedingungen. Modifiziert nach COPELAND 2003^[92]. Dargestellt sind IC₅₀-Werte eines fiktiven Inhibitors exemplarisch für die verschiedenen Hemmartentypen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (dargestellt als Vielfaches des K_m -Wertes, Auftragung logarithmisch)

Der K_m -Wert von Glutathion an der GPx bei einer Konzentration von 500 μ M Peroxid wurde zu 4mM bestimmt.^[82]

Durch eine globale Regressionsanalyse und Linearisierung mittels doppelt reziproker Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration kann anhand der folgenden Formeln errechnet werden, welchen Wert k_i annimmt und um welche Art der Hemmung es sich handelt.^[102]

$$v_{\text{kompetitiv}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)} \quad (5-32)$$

$$v_{\text{nicht-kompetitiv}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (5-33)$$

$$v_{\text{unkompetitiv}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_m} \quad (5-34)$$

- v - Umsatzgeschwindigkeit
- V_{max} - Maximalumsatz
- $[S]$ - Substratkonzentration
- K_m - Michaelis-Menten-Konstante
- $[I]$ - Inhibitorkonzentration

α - Konstante, beschreibt Beeinflussung der Substrataffinität zum Enzym durch Inhibitor

5.4.1.6 Bestimmung des K_m -Wertes eines Substrates

Der K_m -Wert beschreibt die Konzentration eines Substrates, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bei sonst gleichen Bedingungen erreicht ist und beschreibt die Affinität eines Substrates zur Bindungsstelle am Enzym – genauer die Dissoziationsneigung des Enzym-Substrat-Komplexes. Für Mehrsubstratreaktionen gilt, dass wenn die Konzentrationen der Substrate außer einer konstant gehalten werden, für das Substrat mit veränderlicher Konzentration ein virtueller K_m -Wert erhalten wird. Dieser und V_{\max} sind veränderlich in Abhängigkeit von den Konzentrationen der anderen Substrate.^[160]

Die Bestimmung des K_m -Wertes erfolgt unter den in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Bedingungen und Berechnungen, bei veränderlichen Peroxidkonzentrationen von 8,67–500 μM . Dazu wird eine 500 μM Lösung des Peroxids hergestellt und 1,5-fach auf einer 96-well-Platte seriell verdünnt. Aus dieser 96-well-Platte wurde die Peroxidlösung nach Vorlage der restlichen Assaybestandteile mittels 12-Kanal-Pipette gleichzeitig pipettiert, um einen zeitgleichen Reaktionsstart sowie einen unmittelbaren Messbeginn zu ermöglichen.

Die so erhaltenen Messwerte wurden in Enzymaktivitäten umgerechnet und gegen die Peroxidkonzentrationen aufgetragen. Mittels GraphPad Prism 8 wurden die erhaltenen Daten gemäß folgender Formel geplottet und mittels nichtlinearer Regression gefittet:

$$v = \frac{(V_{\max} [S])}{(K_M [S])} \quad (5-35)$$

v - Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms
 V_{\max} - Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 $[S]$ - Substratkonzentration
 K_m - Michaelis-Menten-Konstante

Die aus diesen Berechnungen nach dreifacher Durchführung des Experimentes erhaltenen Werte für V_{\max} und K_m wurden gemittelt.

5.4.1.7 Bestimmung der Inhibierung durch reaktive Schwefelspezies

Die Bestimmung der Inhibierung durch reaktive Schwefelspezies erfolgt grundlegend nach dem beschriebenen Vorgehen und Verwendung der beschriebenen Konzentrationen in Kapitel 5.4.1.

Die Herstellung der Inhibitorlösungen erfolgte auf Grundlage von FRANCOLEON *et al.* 2011^[23] hinsichtlich benötigter Konzentrationen für die *in-situ* Produktion reaktiver Schwefelspezies.

1 mL einer 10 mM Lösung Na₂S in Puffer wird mit 1 mL einer 10 mM Lösung GSSG in Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wird 11-fach 1:2 (100 µL zu 200 µL) in einer 96-Well-Platte verdünnt. 30 µL dieser Lösungen werden als Inhibitorlösungen im GPx-Assay verwendet. Eine 10 mM Lösung Na₂S in GPx-Puffer wird 1:1 verdünnt und anschließend ebenfalls als Konzentrationsreihe hergestellt, wie oben beschrieben.

Die Auswertung erfolgt im linearen Bereich, indem die relativen Enzymgeschwindigkeiten auf Formel (5–28) angewendet wurden. Der IC₅₀-Wert wurde mittels nicht-linearer Regression bestimmt.

Durch den Einsatz von GSSG konnte nur ein Teil der Ergebnisse ausgewertet werden, da GSSG die Messreaktion des Assays beeinflusst. Um diesen Effekt zu korrigieren wurden *residual plots* erstellt, welche die Abweichung der Messwerte von der Regression anzeigen. War die Beeinflussung des Enzyms durch das eingesetzte GSSG ersichtlich, wurden die Werte für die Berechnung exkludiert.

5.4.2 Glutathionperoxidase-Assay mittels RP-HPLC

Der GPx-Assay wird in einem 15 mL Falcon (Sarstedt, 62.554.502) durchgeführt.

- Lösung A: Kaliumphosphatpuffer; pH=7,4; Zusatz von 409 mg EDTA und 100 mg Triton X-100 je Liter
- Lösung B: GPx-Aliquote in Puffer A/Glycerol, Aktivität 20 U mL⁻¹
- Lösung C: 17 mM GSH-Lösung aus L-GSH in Lösung A
- Lösung D: 2 mM *t*-Butylhydroperoxidlösung in Wasser
- Lösung E: Inhibitor Stammlösungen in einem geeigneten Lösungsmittel (Konzentration 10-fach zur Zielkonzentration im Well für in Puffer lösliche Substanzen; 1000-fach zur Zielkonzentration im Well für in organischen Lösungsmitteln lösliche Substanzen)
- extra LM: Ausgleich des Lösungsmittels aus Lösung F

Nach Zugabe des Reaktionsstarters Lösung D wird das Falcon mit dem Reaktionsansatz kurz geschwenkt, um eine Durchmischung zu ermöglichen. Nach 0,5, 1,0 sowie 1,5 min werden 900 µL der Lösung entnommen und in ein HPLC-Vial pipettiert, welches 100 µL einer 5 mM Lösung von Mercaptobernsteinsäure in GPx-Puffer enthält. Die resultierende

500 μM Lösung des GPx-Inhibitors soll eine weitere Enzymreaktion während der Standzeit im Autosampler unterbinden.

Tabelle 36: GPx-Assay – Pipettierreihenfolge für die HPLC. Beispiel für einen in Lösung A löslichen Inhibitor, zum Beispiel Mercaptobernsteinsäure

		ohne GPx	ohne Inhibitor	Testsubstanzen
Pipettierreihenfolge ↓	Lösung A	4000 μL	3497 μL	3497 μL
	Lösung B	0 μL	3 μL	3 μL
	Lösung C	500 μL	500 μL	500 μL
	Lösung E	0 μL	0 μL	500 μL
	extra LM	0 μL	500 μL	500 μL
	Lösung D	500 μL	500 μL	0 μL

Die so erhaltene Lösung wurde mittels der in Kapitel 5.3.2 beschriebenen RP-HPLC-Methode analysiert. Kalibriert wurde die GPx-Assay-Messung mit einer Verdünnung von GSSG in GPx-Puffer (9–150 μM). Für jeden Reaktionsansatz wurde die gemessene Konzentration GSSG in μM über der Zeit in Minuten dargestellt. Der Anstieg der erhaltenen Geraden entspricht dem Enzymumsatz:

$$\frac{U}{L} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{L min}} \quad (5-36)$$

Die Enzymaktivität der GPx-freien Kontrolle wurde von jedem errechneten Aktivitätswert abgezogen und anschließend die Restaktivität mittels der in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Formeln (5–27) sowie (5–28) berechnet und ausgewertet. Der Assay wurde mindestens in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt.

5.4.3 Glutathionreduktase-Assay

Eine Hemmung im GPx-Assay kann auch durch eine Hemmung der GR durch den verwendeten potentiellen Inhibitor hervorgerufen werden. Um das auszuschließen, wird der GR-Assay als abgewandelter GPx-Assay durchgeführt. Der Assay beruht auf der Reduktion von oxidiertem Glutathion durch die Reduktase unter Verwendung von NADPH. Die abnehmende Konzentration an NADPH wird als Maß für die Enzymaktivität genutzt.

Materialien

Mikrotiterplatten – Greiner Bio-One UV-Star® Microplatte, 96 well, COC, F-Boden (Kaminform), transparent (655801)

- Lösung A: Kaliumphosphatpuffer; pH=7,4; Zusatz von 409 mg EDTA und 100 mg Triton X-100 je Liter
- Lösung B: GR 0,2 U mL⁻¹
- Lösung C: 2 mM NADPH-Lösung in Lösung A
- Lösung D: 2,5 mM GSSG-Lösung aus L-GSH in Lösung A
- Lösung E: Inhibitor Stammlösungen in DMF (Konzentration 10-fach zur Zielkonzentration im Well)
- extra LM: Ausgleich des Lösungsmittels aus Lösung E

Die Lösungen werden in der in Tabelle 37 angegebenen Reihenfolge und Menge in die dafür vorgesehenen Kavitäten pipettiert, sodass die finalen Konzentrationen in den einzelnen Wells denen in Tabelle 38 entsprechen.

Tabelle 37: GR-Assay – Pipettierreihenfolge

Pipettierreihenfolge		ohne GPx	ohne Inhibitor	Testsubstanzen
	Lösung A	210 µL	180 µL	180 µL
	Lösung B	0 µL	30 µL	30 µL
	Lösung C	30 µL	30 µL	30 µL
	Lösung E	0 µL	0 µL	30 µL
	extra DMF	30 µL	30 µL	0 µL
	Lösung D	30 µL	30 µL	30 µL

Tabelle 38: GR-Assay – Endkonzentrationen in den Kavitäten

Bestandteil	Konzentration / Aktivität
GR	0,02 U mL ⁻¹
GSSG	250 µM
NADPH	200 µM
Inhibitoren	20 µM

Die Berechnung der Restaktivität erfolgt wie in 5.4.1 beschrieben mittels Tabellenkalkulation. Für den Glutathionreduktase-Assay wurde keine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt. Wenn die höchste im GPx-Assay verwendete Konzentration keine Hemmung der GR zeigte, wurde geschlossen, dass die beobachtete GPx-Hemmung nicht auf eine artifizielle Hemmung der GR zurückzuführen ist.

5.5 Zellkulturarbeiten

5.5.1 Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die verschiedenen Testungen wurden insgesamt fünf verschiedene Zelllinien verwendet. Zur Testung der antiproliferativen Eigenschaften von liposomalen Pentathiepinen kamen die adhärennten Zelllinien A2780 (*ovarian carcinoma*) sowie SiSo (*cervix adenocarcinoma*)

zum Einsatz. Für die viabilitätsmindernden Eigenschaften der Pentathiepine sowie die GSH-Depletion Experimente wurden KYSE-70 (*esophageal squamous cell carcinoma*, ACC 363), DanG (*pancreas carcinoma*, ACC 249) und LCLC-103H (*large cell lung carcinoma*, ACC 384) verwendet. Mit Ausnahme von A2780 wurden alle Zelllinien von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. A2780 wurde dem Arbeitskreis durch Julie Woods (Ninewells Hospital, University of Aberdeen, UK) überlassen. Mykoplasmenbefall wurde durch das MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza, LT07-703) ausgeschlossen

Alle Zelllinien werden in RPMI 1640 Medium nach Zusatz von 10 % bovinem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) sowie 30 mgL^{-1} Penicillin und 40 mgL^{-1} Streptomycin bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO_2 inkubiert.

Alle arbeiten an offenen Zelllinien finden in der Laminar-Flow-Box unter Einhaltung grundsätzlicher Hygieneregeln für keimarmes Arbeiten statt.

5.5.2 Auftauen der Zellen

Zur Langzeitlagerung sind die Zellen in DMSO suspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der Verwendung müssen die Zellen aufgetaut und in Kultur überführt werden.

Nach der Entnahme der Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wird das Kryo-Röhrchen mittels einer Pinzette im 37°C Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut. Mittels Pipette wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Tropfenweise werden 5-mal 1 mL Medium unter Schütteln hinzugegeben. Die langsame Hinzugabe dient der Vermeidung von Osmoseprozessen durch DMSO, welche ein Platzen der Zelle hervorrufen könnten. Nach Zugabe von 25 mL Medium wird die Suspension bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 5 mL Medium resuspendiert. Eine Menge 50000 Zellen entsprechend wird in eine Zellkulturflasche (T_{25}) überführt und mit 7,5 mL Medium versetzt. Die Inkubation findet unter den in Kapitel 5.5.1 beschriebenen Bedingungen statt.

5.5.3 Passagieren und Aussaat der Zellen

Um ein dauerhaft exponentielles Wachstum der Zellen zu gewährleisten, werden die Zellen bei Erreichen von etwa 90 % Konfluenz passagiert. Dafür wird eine entsprechende Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche überführt. Im selben Arbeitsschritt können Zellen für

die Experimente entnommen und in Zellkulturplatten überführt werden. Das Vorgehen des Passagierens und Aussäens ist für den Kristallviolett-Assay sowie den MTT-Assay identisch. Die verwendeten Zellzahlen sind im entsprechenden Kapitel notiert.

Das Medium wird aus der Kulturflasche abgesaugt und 2,5 mL einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung wird auf den Zellrasen pipettiert. Die Einwirkzeit bei 37 °C muss lang genug sein, um die Verbindungen der Zellen zur Kulturflaschenoberfläche zu lösen, eine zu lange Einwirkzeit kann jedoch schädigend auf die Zellen wirken. Die im Arbeitskreis etablierten, verwendeten Einwirkzeiten sind in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Eigenschaften und Bedingungen verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Zellzahl zur Passage	Einwirkzeit Trypsin	Größenbereich
A2780	20000	2 min	10–30 µM
DAN-G	50000	2 min	10–30 µM
KYSE-70	40000	4 min	10–30 µM
LCLC-103H	25000	2 min	15–35 µM
SiSo	50000	2 min	10–30 µM

Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das Ablösen der Zellen durch seitliches Klopfen auf die Zellkulturflasche unterstützt – wenn nötig kann ein Zellschaber eingesetzt werden. Nach Zugabe von 3 mL Medium, um die Trypsin-Reaktion zu stoppen, werden 0,5 mL der Zellsuspension in 20 mL Isoton II®-Lösung überführt und mittels Coulter Counter Z2 vermessen. Ein Volumen der Zellsuspension entsprechend der in Tabelle 39 aufgeführten Zellzahlen wird in eine neue T₂₅-Zellkulturflasche überführt und mit 7,5 mL Medium versetzt. Die angegebenen Zellzahlen sind im Arbeitskreis etabliert und führen zu einer Konfluenz von etwa 90 % nach sieben Tagen Inkubation.

Zur Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen wird an dieser Stelle die benötigte Menge Zellsuspension mit einer entsprechenden Menge Medium versetzt und zu 100 µL in die Wells der 96-Well-Zellkulturplatten pipettiert. Die benötigten Zellmengen sind in den Kapiteln der Zellkultur-Assays angegeben.

5.5.4 Proliferationsassay – Kristallviolett

5.5.4.1 Standardprotokoll zur Durchführung des Kristallviolett-Assays

Zur Bestimmung antiproliferativer Eigenschaften wird der Kristallviolett-Assay angewendet, welcher das Zellwachstum nach einem Inkubationszeitraum von 96 h bestimmt. Das Vorgehen beruht auf der Veröffentlichung BRACHT *et al.* 2006^[161]. Grundlage des Assays ist die Bindung des kationischen Triphenylmethanfarbstoffes Kristallviolett an die DNA. Dies

geschieht nur nach vorheriger Fixierung der Zellen. Die spektrophotometrische Absorption des nach Anfärben gelöstem Farbstoffes ist ein Maß für die vorhandene Zellzahl.^[162]

Nach dem Trypsinieren und Zählen der Zellen (siehe Kapitel 5.5.3) wird das benötigte Volumen für die entsprechende Zellzahl in einem Zellkultur-Boot vorgelegt und in der korrespondierenden Menge Medium verdünnt. Die exakten Volumina errechnen sich aus der Zellzahl und der benötigten Menge an Zellen pro Well, sowie der Anzahl benötigter Platten. Tabelle 40 beinhaltet die pro Well ausgesäten Zellzahlen für die verwendeten Zelllinien.

Tabelle 40: Zellzahlen zur Aussaat der verschiedenen Zelllinien – Kristallviolett-Assay

Zelllinie	Zellen pro Well
A2780	1000
SiSo	1000

Es wird eine Zellsuspension hergestellt, die der angegebenen Zellzahl in 100 μ L entspricht. Ein Volumen von 100 μ L Zellsuspension wird in jedes Well pipettiert. 24h nach Aussaat der Zellen wird eine Kontrollplatte (t_0) mit Glutaraldehyd fixiert.

Fixierung mit Glutaraldehyd

Das Medium wird aus den 96-Well-Platten entfernt und durch 100 μ L 1%ige Glutaraldehyd-Lösung in Dulbeccos-Puffer ersetzt. Nach 20min Fixierzeit wird die Fixierlösung entfernt und durch 100 μ L Dulbeccos Puffer ersetzt.

Ebenfalls 24h nach der Aussaat wird das Wachstum der Zellen in den Wells visuell mittels Lichtmikroskopie überprüft. Ist eine gleichmäßige Verteilung der ausgesäten Zellen erreicht, wird mit der Inkubation mit Testsubstanzen fortgefahren.

Inkubation mit Testsubstanzen

Die zu testenden Substanzen werden in 1000-facher Konzentration in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst (zum Beispiel DMF oder Dulbeccos-Puffer). Zur Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Kurven wird vor der Inkubation eine serielle Verdünnung im entsprechenden Lösungsmittel hergestellt. Diese Lösungen werden 1:500 in der benötigten Menge Zellkultur-Medium verdünnt. 100 μ L dieser Lösung werden in die entsprechenden Wells pipettiert. Das resultiert in einer maximalen Konzentration von 0,1 % Lösungsmittel. Nach weiteren 96h Inkubationszeit werden auch die Testplatten mit Glutaraldehyd fixiert.

Färbung mit Kristallviolett und Messung der Absorption

Nach Entfernen des Dulbecco-Puffers werden 100 μL einer wässrigen, 0,02%igen Kristallviolett-Lösung in die Wells pipettiert. Nach 30 min Einwirkzeit wird das Kristallviolett entfernt und die gesamte Platte für 15 min im Wasserbad gewaschen. Anschließend werden 100 μL 70%igen Ethanol in die Wells pipettiert. Nach zwei Stunden auf dem Schüttler können die Platten entweder gemessen oder im Kühlschrank gelagert werden. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ mittels SpectraMax 384 plus oder dem Tecan Sunrise

Die Berechnung des Zellwachstums und daraus folgend die Dosis/Wachstum-Kurven beruhen auf der Grundlage der korrigierten Wachstumswerte. Die optische Dichte (Absorption) wird als Maß für das Zellwachstum verwendet:

$$\left(\frac{T}{C}\right)_{\text{corr}} (\%) = \frac{A_T - A_{t_0}}{A_K - A_{t_0}} \cdot 100 \quad (5-37)$$

- T = Wachstum der getesteten Zellen
- C = Wachstum der Kontrolle
- A_T = mittlere Absorption der getesteten Zellreihe
- A_{t_0} = mittlere Absorption der Kontrollplatte
- A_K = mittlere Absorption der Kontrollreihen

Die außenliegenden Wells einer 96-Well-Platte werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Auf jeder Platte wird jede Kondition dreifach (je drei Wells) durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die korrigierten Wachstumswerte werden in GraphPad Prism 8 gegen die Konzentration aufgetragen. Nach Durchführung einer Transformation $X = \log(X)$ wird eine *non-linear regression log (inhibitor) vs. response – variable slope (four parameters)* angewendet. Aus dem erstellten Datenblatt werden die GI_{50} -Werte mittels Interpolation berechnet. Für alle getestete Substanzen werden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, der geometrische Mittelwert sowie das 95 %-Vertrauensintervall berechnet.

5.5.4.2 Proliferationsassay nach Umsatz des Pentathiepins mit Glutathion

Untersucht wurden die beiden Zelllinien A2780 und SiSo. Die ungefähren IC_{50} -Konzentrationen von Pentathiepin **36** wurden herangezogen. Für dieses Experiment wurde die Probenvorbereitung folgendermaßen angepasst und somit sichergestellt, dass ein Einfluss von GSH nicht für beobachtete Effekte alleine verantwortlich ist.

Lösung 1: 10 mM **36** in DMF

- Lösung 1A: 10 μL dieser Lösung auf 1 mL DMF \rightarrow 100 μM **36** (A2780)
- Lösung 1B: 40 μL dieser Lösung auf 1 mL DMF \rightarrow 400 μM **36** (SiSo)

Lösung 2: Mischung aus 100 μL DMF in einem Eppendorfgefäß mit 100 μL 100 mM GSH in Wasser (ELGA) und Inkubation bei 37°C im Wasserbad im Dunkeln für 2 h

- Lösung 2A: 20 μL dieser Lösung auf 1 mL DMF verdünnen \rightarrow 100 μM **36** und 1 mM GSH (A2780)
- Lösung 2B: 80 μL dieser Lösung auf 1 mL DMF verdünnen \rightarrow 400 μM **36** und 4 mM GSH (SiSo)

Lösung 3: Mischung aus 100 μL 10 mM **36** in einem Eppendorfgefäß mit 100 μL 100 mM GSH und inkubation bei 37°C im Wasserbad im Dunkeln für 2 h

- Lösung 3A: 20 μL dieser Lösung auf 1 mL DMF verdünnen \rightarrow 100 μM **36** und 1 mM GSH (A2780)
- Lösung 3B: 80 μL dieser Lösung auf 1 mL DMF verdünnen \rightarrow 400 μM **36** und 4 mM GSH (SiSo)

Aus diesen Lösungen wurden wie folgt Verdünnungen in 5 mL Medium hergestellt und anschließend in die korrespondierenden Reihen der 96-well Platte 1:2 zu den angegebenen Endkonzentrationen verdünnt:

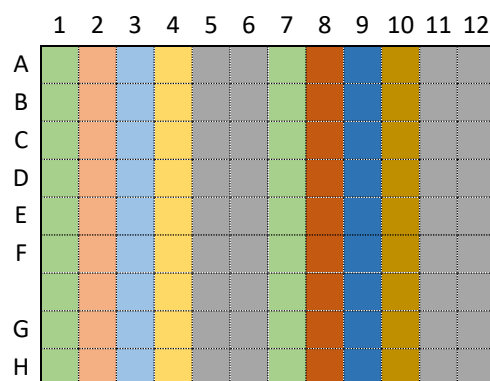


Abbildung 71: Plattenbelegung Proliferationsassay nach Umsetzung mit GSH

- Reihen 1&7: 10 μL DMF (Kontrolle)
 Reihe 2: 10 μL Lösung 1A (0,1 μM **36**)
 Reihe 3: 10 μL Lösung 2A (1 μM GSH)
 Reihe 4: 10 μL Lösung 3A (0,1 μM **36** und 1 μM GSH)
 Reihe 8: 10 μL Lösung 1B (0,4 μM **36**)
 Reihe 9: 10 μL Lösung 2B (4 μM GSH)
 Reihe 10: 10 μL Lösung 3B (0,4 μM **36** und 4 μM GSH)

5.5.5 MTT-Assay – Messung der zellulären, metabolischen Aktivität

5.5.5.1 Standardprotokoll des MTT-Assays

Die Messung der Viabilität von kultivierten Zellen beruht auf der enzymatischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). In viablen Zellen findet eine Reduktion durch mitochondriale Dehydrogenasen zum wasserunlöslichen Formazanäquivalent statt – eine Reaktion, zu der geschädigte Zellen nicht, oder nicht in dem Maße, fähig sind. Die Menge des während des Assays gebildeten Formazans korreliert positiv mit der metabolischen Aktivität sowie der Proliferation der untersuchten Zellen.

Nach dem Trypsinieren und Zählen der Zellen (siehe Kapitel 5.5.3) wird das benötigte Volumen für die entsprechende Zellzahl in einem Zellkultur-Boot vorgelegt und in der korrespondierenden Menge Medium verdünnt. Die exakten Volumina errechnen sich aus der Zellzahl und der benötigten Menge an Zellen pro Well, sowie der Anzahl benötigter Platten. Tabelle 41 beinhaltet die pro Well ausgesäten Zellzahlen für die verwendeten Zelllinien.

Tabelle 41: Zellzahlen zur Aussaat der verschiedenen Zelllinien – MTT-Assay

Zelllinie	Zellen pro Well
DAN-G	5000
KYSE-70	5000
LCLC-103H	5000

In die Wells einer 96-Well-Platte werden 100 μ L einer entsprechenden Zellsuspension pipettiert, wobei die äußersten Wells ausgelassen werden. Diese werden mit 100 μ L Dulbeccos-Puffer gefüllt. Zur Anheftung werden die ausgesäten Zellen für 24 h im Brutschrank unter Inkubationsbedingungen ruhen gelassen.

Inkubation mit Testsubstanzen

Die zu testenden Substanzen werden in 1000-facher Konzentration in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst (zum Beispiel DMF oder Dulbeccos-Puffer). Zur Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Kurven wird vor der Inkubation eine serielle Verdünnung im entsprechenden Lösungsmittel hergestellt. Diese Lösungen werden 1:500 in die benötigte Menge Zellkultur-Medium verdünnt. 100 μ L dieser Lösung werden in die entsprechenden Wells pipettiert. Das resultiert in einer maximalen Konzentration von 0,1 % Lösungsmittel. Die so behandelten Zellen werden für 24, respektive 48 h inkubiert.

MTT Färbung und Messung der Absorption

Nach Ende der Inkubationszeit werden 40 µL einer MTT-Lösung in Dulbeccos-Puffer (2,5 mg mL⁻¹) in jedes Well pipettiert. Nach weiteren 4h Inkubation im Brutschrank wird das gesamte Medium abgesaugt. Nach Zugabe von 50 µL DMSO pro Well, wobei die gebildeten Formazankristalle gelöst werden, wird jede Platte für wenige Minuten auf dem Rüttler geschüttelt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei $\lambda = 570\text{nm}$ mittels SpectraMax 384 plus beziehungsweise Tecan Sunrise.

Die Absorption einer Mediumkontrolle wird von allen gemessenen Werten abgezogen. Die Berechnung der relativen Viabilität erfolgt durch Bezug auf eine Lösungsmittelkontrolle nach folgender Formel:

$$\text{Viabilität (\%)} = \frac{A_T}{A_K} \cdot 100 \quad (5-38)$$

A_T = mittlere Absorption der getesteten Zellreihe

A_K = mittlere Absorption der Kontrollreihen

Auf jeder Platte wird jede Kondition dreifach (je drei Wells) durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die relativen Viabilitäten werden in GraphPad Prism 8 gegen die Konzentration aufgetragen. Nach Durchführung einer Transformation $X = \log(X)$ wird eine *non-linear regression log(inhibitor) vs. response – variable slope (four parameters)* angewendet. Aus dem erstellten Datenblatt werden die absoluten IC₅₀-Werte mittels Interpolation berechnet. Für alle getestete Substanzen werden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, der geometrische Mittelwert sowie das 95%-Vertrauensintervall berechnet.

5.5.5.2 MTT-Assay nach Vorinkubation mit DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin

Der in 5.5.5 beschriebene MTT-Assay wurde genutzt, um die Auswirkungen einer intrazellulären Beeinflussung des GSH-Spiegels zu testen.

Die Inkubation verschiedener Krebszelllinien mit dem Aminosäurederivat DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin führt zur Absenkung intrazellulärer Glutathionspiegel.^[86] Der Effekt wird durch irreversible Hemmung der γ -Glutamylcysteinsynthetase hervorgerufen und führt zur GSH-Spiegelsenkung innerhalb weniger Stunden.^[163]

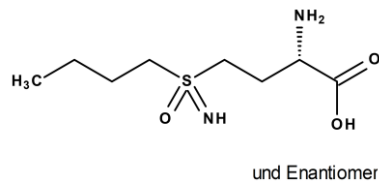


Abbildung 72: Struktur von DL-Buthionin-(*S,R*)-sulfoximin

Diese Eigenschaft von BSO – den intrazellulären Glutathionspiegel zu senken – wurde sich in einem veränderten Assaydesign zu Nutze gemacht. Abweichend von der Beschreibung des Assays in Kapitel 5.5.5 wurde nach der 24-stündigen Inkubation zum Adhären der Zellen zunächst eine Inkubation der Zellen mit 200 μM BSO vorgenommen. Dieses wurde dazu in PBS zu 400 μM gelöst und 100 μL dieser Lösung wurde auf die Hälfte der Wells pipettiert. Da es sich um eine relativ weitreichende Manipulation des biologischen Systems handelte, wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle in derselben Art und Weise durchgeführt auf derselben Platte, jedoch ohne BSO. Abbildung 73 zeigt das Pipettierschema für eine 96-Well-Platte.

Nach 6-stündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde das gesamte Medium aus den Wells B2:G11 abgesaugt und durch 200 μL Medium ersetzt, in welchem bereits die entsprechenden Testsubstanzen in der Zielkonzentration und einer maximalen Lösungsmittelkonzentration von 0,1 % gelöst waren. Die Platte wurde für weitere 42h im Brutschrank inkubiert. Das resultierte in einer Gesamtinkubationszeit von 48h. Nach Beendigung der Inkubation wird der Assay durchgeführt, wie in Kapitel 5.5.5 beschrieben.

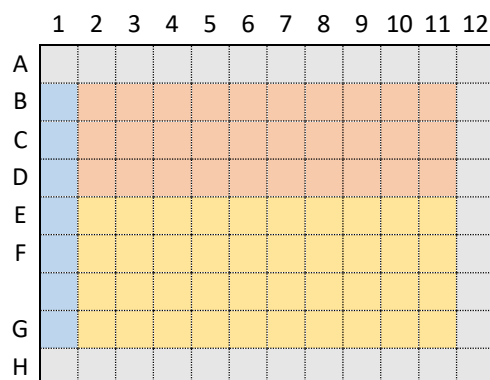


Abbildung 73: Pipettierschema MTT-Assay mit vorheriger BSO-Inkubation. grau: 100 μL Dulbeccos Puffer (ohne Zellen) – blau: Mediumkontrolle (ohne Zellen) – orange: 200 μM BSO – gelb: ohne BSO

5.6 Moleküldynamik-Simulation

Die Simulation der Moleküldynamik wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Standard Moleküldynamik-Simulation

Systembau: Maestro 2020-4

MD: Desmond 6.4 (GPU-Version)^[164]

Kraftfeld: OPLS3e^[165]

Box: kubisch, a=5 nm (TIP3P-Wassermoleküle)

Temperatur: T=300 K

Druck: 1 atm

Zeitschritt: t=2 fs

Thermostat: Langevin

Barostat: Langevin

kurzreichweitige nicht-bindende Interaktionen: Elektrostatik & van der Waals

Cutoff: 1 nm

Switching-Funktion 0,1 nm^[166]

langreichweitige elektrostatische Interaktionen: *Particle Mesh Ewald* (PME)

Snapshots alle 10 ps

Ablauf

Minimierung: 100 ps

Standard-Relaxationsprotokoll von Schrödinger: erste Äquilibrierung von Volumen und Temperatur

6 Literaturverzeichnis

1. Jacob, C., *A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms*. Natural Product Reports, **2006**. 23(6): S. 851, <https://doi.org/10.1039/B609523M>.
2. Filipovic, M.R., et al., *Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation*. Chemical Reviews, **2018**. 118(3): S. 1253, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>.
3. Fukuto, J.M., et al., *Biological hydropersulfides and related polysulfides - a new concept and perspective in redox biology*. FEBS letters, **2018**. 592(12): S. 2140, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13090>.
4. Agarwal, K.C., *Therapeutic actions of garlic constituents*. Medicinal Research Reviews, **1996**. 16(1): S. 111, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(199601\)16:1<111::AID-MED4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(199601)16:1<111::AID-MED4>3.0.CO;2-5).
5. Kouokam, J.C., Zapp, J., und Becker, H., *Oxygen-containing sulfur-rich compounds from the bark of the tropical garlic tree Scorodophloeus zenkeri Harms*. Phytochemistry, **2002**. 60(4): S. 403, [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00125-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00125-5).
6. Kouokam, J.C., Jahns, T., und Becker, H., *Antimicrobial Activity of the Essential Oil and Some Isolated Sulfur-Rich Compounds from Scorodophloeus zenkeri*. Planta Medica, **2002**. 68: S. 1082
7. Münchberg, U., et al., *Polysulfides as biologically active ingredients of garlic*. Organic & Biomolecular Chemistry, **2007**. 5(10): S. 1505, <https://doi.org/10.1039/B703832A>.
8. Cerella, C., et al., *Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al₂S₄)*. Apoptosis, **2009**. 14(5): S. 641, <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0328-8>.
9. Raimundo, K.F., et al., *Antifungal activity of Galesia integrifolia fruit essential oil*. Brazilian Journal of Microbiology, **2018**. 49 Suppl 1: S. 229, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.03.006>.

10. Steudel, R., *The Chemistry of Organic Polysulfanes R-S_n-R (n > 2)*. Chemical Reviews, **2002**. 102(11): S. 3905, <https://doi.org/10.1021/cr010127m>.
11. Silva, G.C.C., et al., *Cellular Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiproliferative Activities from the Flowers, Leaves and Fruits of Gallsia integrifolia Spreng Harms.* Molecules, **2023**. 28(14), <https://doi.org/10.3390/molecules28145406>.
12. Bortolucci, W.C., et al., *Cytotoxicity and anti-inflammatory activities of Gallsia integrifolia (Phytolaccaceae) fruit essential oil*. Natural Product Research, **2022**. 36(11): S. 2878, <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1925270>.
13. Chatterji, T., Keerthi, K., und Gates, K.S., *Generation of reactive oxygen species by a persulfide (BnSSH)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2005**. 15(17): S. 3921, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.05.110>.
14. Huber, R.E. und Criddle, R.S., *Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **1967**. 122(1): S. 164, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90136-1).
15. Lin, J., et al., *The Uptake and Release of Polysulfur Cysteine Species by Cells: Physiological and Toxicological Implications*. Chemical Research in Toxicology, **2019**. 32(3): S. 447, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00340>.
16. Miller, C.G. und Schmidt, E.E., *Sulfur Metabolism Under Stress*. Antioxidants & Redox Signaling, **2020**. 33(16): S. 1158, <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8151>.
17. Olson, K.R., *Hydrogen sulfide, reactive sulfur species and coping with reactive oxygen species*. Free Radical Biology & Medicine, **2019**. 140: S. 74, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.020>.
18. Olson, K.R., et al., *The Effects of Antioxidant Nutraceuticals on Cellular Sulfur Metabolism and Signaling*. Antioxidants & Redox Signaling, **2022**, <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0077>.
19. Szabo, C., *Hydrogen Sulfide, an Endogenous Stimulator of Mitochondrial Function in Cancer Cells*. Cells, **2021**. 10(2), <https://doi.org/10.3390/cells10020220>.
20. Mustafa, A.K., et al., *H₂S signals through protein S-sulfhydration*. Science Signaling, **2009**. 2(96): S. ra72, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>.
21. Fukuto, J.M., *The Biological/Physiological Utility of Hydropersulfides (RSSH) and Related Species: What Is Old Is New Again*. Antioxidants & Redox Signaling, **2022**. 36(4-6): S. 244, <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0096>.

22. Shimizu, T., et al., *Sulfide-responsive transcriptional repressor SqrR functions as a master regulator of sulfide-dependent photosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2017**. 114(9): S. 2355, <https://doi.org/10.1073/pnas.1614133114>.
23. Francoleon, N.E., Carrington, S.J., und Fukuto, J.M., *The reaction of H(2)S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H(2)S biology*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **2011**. 516(2): S. 146, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.09.015>.
24. Chenard, B.L., et al., *Synthesis, structure, and properties of pentathiepins*. Journal of the American Chemical Society, **1985**. 107(13): S. 3871, <https://doi.org/10.1021/ja00299a019>.
25. Brzostowska, E.M. und Greer, A., *The Role of Amine in the Mechanism of Pentathiepin (Polysulfur) Antitumor Agents*. Journal of the American Chemical Society, **2003**. 125(2): S. 396, <https://doi.org/10.1021/ja027416s>.
26. Mahendran, A., et al., *Synthesis and antiproliferative properties of a new ceramide analog of varacin*. Chemistry and Physics of Lipids, **2016**. 194: S. 165, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.023>.
27. Fehér, F. und Langer, M., *Contribution to the chemistry of sulfur, no. 104 Synthesis of pentathiepin and benzopentathiepin*. Tetrahedron Letters, **1971**. 12(24): S. 2125, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96798-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96798-X).
28. Litaudon, M. und Guyot, M., *Lissoclinotoxin A, an antibiotic 1,2,3-trithiane derivative from the tunicate Lissoclinum perforatum*. Tetrahedron Letters, **1991**. 32(7): S. 911, [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)92118-x](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)92118-x).
29. Makarieva, T.N., et al., *Varacin and three new marine antimicrobial polysulfides from the far-eastern ascidian Polycitor sp.* Journal of Natural Products, **1995**. 58(2): S. 254, <https://doi.org/10.1021/np50116a015>.
30. Davidson, B.S., et al., *Varacin: a novel benzopentathiepin from Lissoclinum vareau that is cytotoxic toward a human colon tumor*. Journal of the American Chemical Society, **1991**. 113(12): S. 4709, <https://doi.org/10.1021/ja00012a065>.
31. Litaudon, M., et al., *Lissoclinotoxins: Antibiotic polysulfur derivatives from the tunicate Lissoclinum perforatum. Revised structure of lissoclinotoxin A*. Tetrahedron, **1994**. 50(18): S. 5323, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80690-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80690-6).
32. Barrows, L.R., et al., *Characterization of revertants of the CHO EM9 mutant arising during DNA transfection*. Carcinogenesis, **1991**. 12(5): S. 805, <https://doi.org/10.1093/carcin/12.5.805>.

33. Ford, P.W. und Davidson, B.S., *Synthesis of varacin, a cytotoxic naturally occurring benzopentathiepin isolated from a marine ascidian*. The Journal of Organic Chemistry, **1993**. 58(17): S. 4522, <https://doi.org/10.1021/jo00069a006>.
34. Ford, P.W., et al., *Synthesis and Structural Properties of the Benzopentathiepins Varacin and Isolissoclinotoxin A*. The Journal of Organic Chemistry, **1994**. 59(20): S. 5955, <https://doi.org/10.1021/jo00099a026>.
35. Chatterji, T. und Gates, K.S., *DNA cleavage by 7-methylbenzopentathiepin: a simple analog of the antitumor antibiotic varacin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **1998**. 8(5): S. 535, [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(98\)00066-3](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(98)00066-3).
36. Lee, A.H., Chan, A.S., und Li, T., *Acid-accelerated DNA-cleaving activities of antitumor antibiotic varacin*. Chemical Communications, **2002**(18): S. 2112, <https://doi.org/10.1039/b204920c>.
37. Chatterji, T. und Gates, K.S., *Reaction of thiols with 7-methylbenzopentathiepin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2003**. 13(7): S. 1349, [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(03\)00103-3](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(03)00103-3).
38. Zubair, M., Ghosh, A.C., und Schulzke, C., *The unexpected and facile molybdenum mediated formation of tri- and tetracyclic pentathiepins from pyrazine-alkynes and sulfur*. Chemical Communications, **2013**. 49(39): S. 4343, <https://doi.org/10.1039/c2cc37025e>.
39. Napierkowski, M., *Synthese, Charakterisierung und Testung von Pentathiepinen als Glutathionperoxidasehemmer*. Diplomarbeit, Universität Greifswald, **2016**.
40. Behnisch, S., *Untersuchungen zu bekannten und neuartigen Inhibitoren der Glutathionperoxidase: Charakterisierung der Enzyminhibition durch Mercaptobernsteinsäure, Tiopronin und Pentathiepine sowie deren zellbiologischen Eigenschaften in Tumorzellen*. Dissertation, Universität Greifswald, **2017**.
41. Wolff, L., *A comprehensive evaluation of the biological effects exerted by pentathiepins in human cancer cell lines*. Dissertation, Universität Greifswald, **2021**.
42. Behnisch-Cornwell, S., et al., *Pentathiepins: A Novel Class of Glutathione Peroxidase 1 Inhibitors that Induce Oxidative Stress, Loss of Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis in Human Cancer Cells*. ChemMedChem, **2020**. 15(16): S. 1515, <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000160>.
43. Wolff, L., et al., *Comprehensive Evaluation of Biological Effects of Pentathiepins on Various Human Cancer Cell Lines and Insights into Their Mode of Action*. International Journal of Molecular Sciences, **2021**. 22(14): S. 7631, <https://doi.org/10.3390/ijms22147631>.

44. Asquith, C.R.M., et al., *Investigation of the Pentathiepin Functionality as an Inhibitor of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) via a Potential Zinc Ejection Mechanism, as a Model for HIV Infection*. ChemMedChem, **2019**. 14(4): S. 454, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800718>.
45. Compagnone, R.S., et al., *Pentathiepins and trithianes from two Lissoclinum species and a Eudistoma sp.: inhibitors of protein kinase C*. Tetrahedron, **1994**. 50(45): S. 12785, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81200-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81200-X).
46. Zakharenko, A., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2015**. 23(9): S. 2044, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.020>.
47. Novo, E. und Parola, M., *The role of redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis*. Fibrogenesis & Tissue Repair, **2012**. 5(1): S. S4, <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S4>.
48. Trachootham, D., Alexandre, J., und Huang, P., *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nature Reviews Drug Discovery, **2009**. 8(7): S. 579, <https://doi.org/10.1038/nrd2803>.
49. Kongara, S. und Karantza, V., *The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis*. Frontiers in Oncology, **2012**. 2: S. 171, <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00171>.
50. Holmgren, A. und Lu, J., *Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **2010**. 396(1): S. 120, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.083>.
51. Lo, Y.C., et al., *Terpyridine-platinum(II) complexes are effective inhibitors of mammalian topoisomerases and human thioredoxin reductase 1*. Journal of Inorganic Biochemistry, **2009**. 103(7): S. 1082, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.05.006>.
52. Lo, Y.C., et al., *Terpyridine-platinum(II) complexes are effective inhibitors of mammalian topoisomerases and human thioredoxin reductase 1*. **2009**, DOI: 10.2210/pdb2ZZ0/pdb.
53. Gorrini, C., Harris, I.S., und Mak, T.W., *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. Nature Reviews Drug Discovery, **2013**. 12(12): S. 931, <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.
54. Vasquez-Vivar, J., et al., *Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin*. Biochemistry, **1997**. 36(38): S. 11293, <https://doi.org/10.1021/bi971475e>.

55. Kotamraju, S., et al., *Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, **2002**. 277(19): S. 17179, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111604200>.
56. Griffith, O.W. und Meister, A., *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)*. Journal of Biological Chemistry, **1979**. 254(16): S. 7558, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35980-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35980-5).
57. Pelicano, H., Carney, D., und Huang, P., *ROS stress in cancer cells and therapeutic implications*. Drug Resistance Updates, **2004**. 7(2): S. 97, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.01.004>.
58. Schulz, R., et al., *Identification of a glutathione peroxidase inhibitor that reverses resistance to anticancer drugs in human B-cell lymphoma cell lines*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2012**. 22(21): S. 6712, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.091>.
59. Mills, G.C., *Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown*. Journal of Biological Chemistry, **1957**. 229(1): S. 189.
60. Takahashi, K., et al., *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **1987**. 256(2): S. 677, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90624-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90624-2).
61. Savaskan, N.E., et al., *Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function*. Biological Chemistry, **2007**. 388(10): S. 1007, <https://doi.org/10.1515/BC.2007.126>.
62. Epp, O., Ladenstein, R., und Wendel, A., *The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution*. **1983**, DOI: 10.2210/pdb1gp1/pdb.
63. Epp, O., Ladenstein, R., und Wendel, A., *The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution*. European Journal of Biochemistry, **1983**. 133(1): S. 51, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07429.x>.
64. Stoll, V.S., et al., *Glutathione reductase turned into trypanothione reductase: structural analysis of an engineered change in substrate specificity*. **1997**, DOI: 10.2210/pdb2GRT/pdb.
65. Stoll, V.S., et al., *Glutathione reductase turned into trypanothione reductase: structural analysis of an engineered change in substrate specificity*. Biochemistry, **1997**. 36(21): S. 6437, <https://doi.org/10.1021/bi963074p>.

66. Toppo, S., et al., *Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**. 1790(11): S. 1486, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>.
67. Flohe, L., et al., *Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism*. *Hoppe Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **1972**. 353(6): S. 987, <https://doi.org/10.1515/bchm2.1972.353.1.987>.
68. Zhao, Y., et al., *Glutathione Peroxidase GPX1 and Its Dichotomous Roles in Cancer*. *Cancers (Basel)*, **2022**. 14(10), <https://doi.org/10.3390/cancers14102560>.
69. Barenholz, Y., *Doxil®-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*. *Journal of Controlled Release*, **2012**. 160(2): S. 117, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
70. Liu, P., Chen, G., und Zhang, J., *A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives*. *Molecules*, **2022**. 27(4), <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.
71. Avanti Polar Lipids. *Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids*. 2023 [zuletzt abgerufen am: 27.06.2023]; Available from: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps>.
72. Kneidl, B., et al., *Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review*. *International Journal of Nanomedicine*, **2014**. 9: S. 4387, <https://doi.org/10.2147/IJN.S49297>.
73. Tagami, T., et al., *A thermosensitive liposome prepared with a Cu(2)(+) gradient demonstrates improved pharmacokinetics, drug delivery and antitumor efficacy*. *Journal of Controlled Release*, **2012**. 161(1): S. 142, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.023>.
74. Wu, Y., et al., *Epirubicin-encapsulated long-circulating thermosensitive liposome improves pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy in animals*. *Journal of Liposome Research*, **2011**. 21(3): S. 221, <https://doi.org/10.3109/08982104.2010.520273>.
75. Zhuang, L., et al., *HPLC method validation for the quantification of lomustine to study pharmacokinetics of thermosensitive liposome-encapsulated lomustine containing iohexol for CT imaging in C6 glioma rats*. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **2011**. 36(2): S. 61, <https://doi.org/10.1007/s13318-011-0030-4>.
76. Smith, M.C., et al., *Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2017**. 409(24): S. 5779, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>.

77. Tenchov, R., et al., *Lipid Nanoparticles —From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement*. *ACS Nano*, **2021**. 15(11): S. 16982, <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.
78. Inglut, C.T., et al., *Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes*. *Nanomaterials* (Basel), **2020**. 10(2), <https://doi.org/10.3390/nano10020190>.
79. Krasnici, S., et al., *Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels*. *International Journal of Cancer*, **2003**. 105(4): S. 561, <https://doi.org/10.1002/ijc.11108>.
80. Lin, P.-C., et al., *Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials*. *Biotechnology Advances*, **2014**. 32(4): S. 711, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>.
81. Mozafari, M.R., *Nanoliposomes: Preparation and Analysis*. In *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*, V. Weissig, Editor. Humana Press: Totowa, NJ. S. 29, **2010**.
82. Behnisch-Cornwell, S., Laubenstein, G., und Bednarski, P.J., *Studies of the inhibitory activities of tiopronin and mercaptosuccinic acid on glutathione peroxidase and their cytotoxic and antioxidant properties*. *Die Pharmazie*, **2019**. 74(9): S. 536, <https://doi.org/10.1691/ph.2019.9472>.
83. Brooke, D.N., Dobbs, A.J., und Williams, N., *Octanol:Water partition coefficients (P): Measurement, estimation, and interpretation, particularly for chemicals with $P > 10^5$* . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **1986**. 11(3): S. 251, [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(86\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0147-6513(86)90099-0).
84. Dearden, J.C. und Bresnen, G.M., *The Measurement of Partition-Coefficients. Quantitative Structure-Activity Relationships*, **1988**. 7(3): S. 133, [https://doi.org/DOI 10.1002/qsar.19880070304](https://doi.org/DOI%2010.1002/qsar.19880070304).
85. Schöne, T., *Untersuchung der Reaktion von Pentathiepinen mit Glutathion sowie der Wirkung von Buthioninsulfoximin auf die Zytotoxizität der Pentathiepine in verschiedenen Krebszelllinien*. Diplomarbeit, Universität Greifswald, **2022**.
86. Neumann, C., et al., *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-regenerating system coupled to a glutathione-reductase microtiter method for determination of total glutathione concentrations in adherent growing cancer cell lines*. *Analytical Biochemistry*, **2003**. 320(2): S. 170, [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00392-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00392-0).
87. Forman, H.J., Zhang, H., und Rinna, A., *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. *Molecular Aspects of Medicine*, **2009**. 30(1-2): S. 1, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.

88. Drew, R. und Miners, J.O., *The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation*. *Biochemical Pharmacology*, **1984**. 33(19): S. 2989, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90598-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90598-7).
89. Pendyala, L., et al., *Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line*. *Cancer Chemother Pharmacol*, **1997**. 40(1): S. 38, <https://doi.org/10.1007/s002800050622>.
90. Piwien-Pilipuk, G. und Galigniana, M.D., *Oxidative stress induced by L-buthionine-(S,R)-sulfoximine, a selective inhibitor of glutathione metabolism, abrogates mouse kidney mineralocorticoid receptor function*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**. 1495(3): S. 263, [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(99\)00166-4](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(99)00166-4).
91. Goto, K., et al., *The First Direct Oxidative Conversion of a Selenol to a Stable Selenenic Acid: Experimental Demonstration of Three Processes Included in the Catalytic Cycle of Glutathione Peroxidase*. *Organic letters*, **2001**. 3(22): S. 3569, <https://doi.org/10.1021/ol016682s>.
92. Copeland, R.A., *Mechanistic considerations in high-throughput screening*. *Analytical Biochemistry*, **2003**. 320(1): S. 1, [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00346-4](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00346-4).
93. Carsol, M.A., et al., *A new kinetic model for the mode of action of soluble and membrane-immobilized glutathione peroxidase from bovine erythrocytes--effects of selenium*. *European Journal of Biochemistry*, **1997**. 247(1): S. 248, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00248.x>.
94. Moutiez, M., et al., *Reduction of a Trisulfide Derivative of Glutathione by Glutathione Reductase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1994**. 202(3): S. 1380, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2083>.
95. Monostori, P., et al., *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review*. *Journal of Chromatography B*, **2009**. 877(28): S. 3331, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016>.
96. Jayatilleke, E. und Shaw, S., *A High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Reduced and Oxidized Glutathione in Biological Samples*. *Analytical Biochemistry*, **1993**. 214(2): S. 452, <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1522>.
97. Liu, S., et al., *A rapid HPLC method for the quantification of GSH and GSSG in ocular lens*. *Current Eye Research*, **1996**. 15(7): S. 726, <https://doi.org/10.3109/02713689609003455>.
98. Bayram, B., et al., *Rapid Method for Glutathione Quantitation Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014**. 62(2): S. 402, <https://doi.org/10.1021/jf403857h>.

99. Reed, D.J., et al., *High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides*. Analytical Biochemistry, **1980**. 106(1): S. 55, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90118-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90118-9).
100. Cereser, C., et al., *Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications and Life Sciences, **2001**. 752(1): S. 123, [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00534-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00534-x).
101. *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 2006, European Medicines Agency.
102. Copeland, R.A., *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. 2nd ed. 2013, New York: Wiley.
103. Immordino, M.L., et al., *Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel*. Journal of Controlled Release, **2003**. 91(3): S. 417, [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(03\)00271-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(03)00271-2).
104. Yoshida, K., et al., *Real-time observation of liposome bursting induced by acetonitrile*. ChemPhysChem, **2014**. 15(14): S. 2909, <https://doi.org/10.1002/cphc.201402333>.
105. Toh, M.-R. und Chiu, G.N.C., *Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, **2013**. 8(2): S. 88, <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.011>.
106. Greer, A., *On the Origin of Cytotoxicity of the Natural Product Varacin. A Novel Example of a Pentathiepin Reaction That Provides Evidence for a Triatomic Sulfur Intermediate*. Journal of the American Chemical Society, **2001**. 123(42): S. 10379, <https://doi.org/10.1021/ja016495p>.
107. Wilden, J.D., *The Sulfonamide Motif as a Synthetic Tool*. Journal of Chemical Research, **2010**. 34(10): S. 541, <https://doi.org/10.3184/030823410x12857514635822>.
108. Reich, H.J. und Hondal, R.J., *Why Nature Chose Selenium*. ACS Chemical Biology, **2016**. 11(4): S. 821, <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00031>.
109. Pearson, R.G., Sobel, H.R., und Songstad, J., *Nucleophilic reactivity constants toward methyl iodide and trans-dichlorodi(pyridine)platinum(II)*. Journal of the American Chemical Society, **1968**. 90(2): S. 319, <https://doi.org/10.1021/ja01004a021>.

110. Sato, R., Ohyama, T., und Ogawa, S., *Efficient Synthesis and Biological Properties of New Benzopentathiepins*. *Heterocycles*, **1995**. 41(5): S. 893, <https://doi.org/10.3987/com-95-7052>.
111. Prezioso, J.A., FitzGerald, G.B., und Wick, M.M., *Melanoma cytotoxicity of buthionine sulfoximine (BSO) alone and in combination with 3,4-dihydroxybenzylamine and melphalan*. *Journal of Investigative Dermatology*, **1992**. 99(3): S. 289, <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12616629>.
112. Anderson, C.P. und Reynolds, C.P., *Synergistic cytotoxicity of buthionine sulfoximine (BSO) and intensive melphalan (L-PAM) for neuroblastoma cell lines established at relapse after myeloablative therapy*. *Bone Marrow Transplantation*, **2002**. 30(3): S. 135, <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703605>.
113. Hall, M.D., et al., *Inhibition of glutathione peroxidase mediates the collateral sensitivity of multidrug-resistant cells to tiopronin*. *The Journal of Biological Chemistry*, **2014**. 289(31): S. 21473, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581702>.
114. Die Publikation wurde aufgrund von Mykoplasmenbefall der verwendeten Zelllinien zurückgezogen. Es wird durch die Autoren ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die biochemischen Untersuchungen weiterhin gültig bleiben. <https://doi.org/10.1074/jbc.AAC120.013256>
115. Hamad, A., et al., *Analytical methods for determination of glutathione and glutathione disulfide in pharmaceuticals and biological fluids*. *Reviews in Analytical Chemistry*, **2019**. 38(4), <https://doi.org/10.1515/revac-2019-0019>.
116. Kusmieriek, K. und Bald, E., *Reversed-phase liquid chromatography method for the determination of total plasma thiols after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide*. *Biomedical Chromatography*, **2009**. 23(7): S. 770, <https://doi.org/10.1002/bmc.1183>.
117. Kominkova, M., et al., *Optimization of the Glutathione Detection by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection in the Brain and Liver of Rats Fed with Taurine*. *International Journal of Electrochemical Science*, **2015**. 10(2): S. 1716.
118. Wang, X., et al., *Quantification of glutathione in plasma samples by HPLC using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a fluorescent labeling reagent*. *Journal of Chromatographic Science*, **2012**. 50(2): S. 119, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr039>.
119. Ferin, R., Pavao, M.L., und Baptista, J., *Methodology for a rapid and simultaneous determination of total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione in plasma by isocratic RP-HPLC*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications and Life Sciences*, **2012**. 911: S. 15, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.10.022>.

120. Cevasco, G., et al., *An improved method for simultaneous analysis of amino thiols in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, **2010**. 1217(14): S. 2158, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.012>.
121. Guo, X.F., et al., *Simultaneous analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a new probe, 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(4-iodoacetamido)difluoroboradiaza-s-indacene*. Journal of Chromatography A, **2009**. 1216(18): S. 3874, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.083>.
122. Gao, Y., et al., *Highly sensitive and selective detection of biothiols using graphene oxide-based "molecular beacon"-like fluorescent probe*. Analytica Chimica Acta, **2012**. 731: S. 68, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.020>.
123. Michaelsen, J.T., et al., *HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetyl-cysteine ethyl ester: evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications and Life Sciences, **2009**. 877(28): S. 3405, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.043>.
124. Wang, L., et al., *A fluorescent probe with high selectivity to glutathione over cysteine and homocysteine based on positive effect of carboxyl on nucleophilic substitution in CTAB*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2014**. 192: S. 708, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.11.039>.
125. Marchand, S. und de Revel, G., *A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine*. Analytica Chimica Acta, **2010**. 660(1-2): S. 158, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.042>.
126. Janes, L., Lisjak, K., und Vanzo, A., *Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Analytica Chimica Acta, **2010**. 674(2): S. 239, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.040>.
127. Robin, S., et al., *LC-MS determination of oxidized and reduced glutathione in human dermis: a microdialysis study*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications and Life Sciences, **2011**. 879(30): S. 3599, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.052>.
128. Moore, T., et al., *A new LC-MS/MS method for the clinical determination of reduced and oxidized glutathione from whole blood*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications and Life Sciences, **2013**. 929: S. 51, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.004>.
129. Squellerio, I., et al., *Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **2012**. 71: S. 111, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.013>.

130. Sun, X., et al., *Quantification and (13)C-Tracer analysis of total reduced glutathione by HPLC-QTOFMS/MS*. *Analytica Chimica Acta*, **2019**. 1080: S. 127, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.001>.
131. Giustarini, D., et al., *Detection of glutathione in whole blood after stabilization with N-ethylmaleimide*. *Analytical Biochemistry*, **2011**. 415(1): S. 81, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.013>.
132. Sutariya, V., Wehrung, D., und Geldenhuys, W.J., *Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione*. *Journal of Chromatographic Science*, **2012**. 50(3): S. 271, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>.
133. Zhang, W., et al., *Simultaneous determination of glutathione, cysteine, homocysteine, and cysteinylglycine in biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014**. 62(25): S. 5845, <https://doi.org/10.1021/jf5014007>.
134. Tsardaka, E.C., et al., *Determination of glutathione in baker's yeast by capillary electrophoresis using methyl propiolate as derivatizing reagent*. *Journal of Chromatography A*, **2013**. 1300: S. 204, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.005>.
135. Fracassetti, D., et al., *Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method*. *Food Chemistry*, **2011**. 128(4): S. 1136, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.001>.
136. Glowacki, R. und Bald, E., *Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection*. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2009**. 877(28): S. 3400, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.012>.
137. Khalikova, M.A., et al., *A high-performance liquid chromatography method with pre-column derivatization for the simultaneous determination of reduced glutathione, carnosine and taurine*. *Analytical Methods*, **2014**. 6(5), <https://doi.org/10.1039/c3ay42200c>.
138. Özyürek, M., et al., *Determination of biothiols by a novel on-line HPLC-DTNB assay with post-column detection*. *Analytica Chimica Acta*, **2012**. 750: S. 173, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.056>.
139. Kamińska, A., et al., *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC*. *Journal of Separation Science*, **2018**. 41(16): S. 3241, <https://doi.org/10.1002/jssc.201800381>.

140. Kono, Y., et al., *HPLC-fluorescence determination of thiol compounds in the serum of human male and female subjects using HILIC-mode column*. Biomedical Chromatography, **2014**. 28(5): S. 589, <https://doi.org/10.1002/bmc.3086>.
141. Haberhauer-Troyer, C., et al., *Accurate quantification of the redox-sensitive GSH/GSSG ratios in the yeast Pichia pastoris by HILIC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2013**. 405(6): S. 2031, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6620-4>.
142. Huang, Y.-Q., et al., *Use of isotope differential derivatization for simultaneous determination of thiols and oxidized thiols by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, **2011**. 416(2): S. 159, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.020>.
143. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., und Dolan, J.W., *Introduction to modern liquid chromatography*. 2011: John Wiley & Sons.
144. Savjani, K.T., Gajjar, A.K., und Savjani, J.K., *Drug solubility: importance and enhancement techniques*. ISRN Pharmaceutics, **2012**: S. 195727, <https://doi.org/10.5402/2012/195727>.
145. Danaei, M., et al., *Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. Pharmaceutics, **2018**. 10(2): S. 57, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
146. Jousma, H., et al., *Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers*. International Journal of Pharmaceutics, **1987**. 35(3): S. 263, [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(87\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(87)90139-6).
147. Pandur, Z., et al., *Liposome destruction by hydrodynamic cavitation in comparison to chemical, physical and mechanical treatments*. Ultrasonics Sonochemistry, **2020**. 61: S. 11, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104826>.
148. Chibowski, E. und Szcześ, A., *Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme*. Adsorption, **2016**. 22(4-6): S. 755, <https://doi.org/10.1007/s10450-016-9767-z>.
149. Kheoane, P.S., Enslin, G.M., und Tarirai, C., *Formulation and characterization of liposomes containing drug absorption enhancers for optimized anti-HIV and antimalarial drug delivery*. Drug Delivery and Translational Research, **2023**. 13(5): S. 1358, <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01264-w>.
150. Luyts, K., et al., *How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations*. Environmental Science: Processes & Impacts, **2013**. 15(1): S. 23, <https://doi.org/10.1039/c2em30237c>.

151. Manaia, E.B., et al., *Physicochemical characterization of drug nanocarriers*. International Journal of Nanomedicine, **2017**. 12: S. 4991, <https://doi.org/10.2147/IJN.S133832>.
152. Leonenko, Z.V., et al., *Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy*. Biophysical Journal, **2004**. 86(6): S. 3783, <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.036681>.
153. Danaei, M., et al., *Probing nanoliposomes using single particle analytical techniques: effect of excipients, solvents, phase transition and zeta potential*. Heliyon, **2018**. 4(12): S. e01088, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01088>.
154. Goemans, B.F., et al., *A comparison of the in vitro cytotoxicity of daunorubicin and liposomal daunorubicin in pediatric acute leukemia*. Haematologica, **2006**. 91(11): S. 1573.
155. *Product properties test guidelines : OPPTS 830.7570 : partition coefficient (n-octanol/water), estimation by liquid chromatography*. 1996, U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances.: Washington, DC.
156. Fini, O., Brusa, F., und Chiesa, L., *Bestimmung der Totzeit in der "Reversed-phase" Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*. Journal of Chromatography, **1981**. 210(2): S. 326, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)97843-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)97843-9).
157. Freerks, L., et al., *A Toolbox for Mimicking Gastrointestinal Conditions in Children: Simulated Paediatric Breakfast Media (SPBM) for Addressing the Variability of Gastric Contents After Typical Paediatric Breakfasts*. Journal of Pharmaceutical Sciences, **2022**. 111(1): S. 51, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.05.003>.
158. Paglia, D.E. und Valentine, W.N., *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, **1967**. 70(1): S. 158.
159. Global Protein Data Bank. *1GP1*. 1985 [zuletzt abgerufen am: 27.06.2023]; Available from: <https://www.rcsb.org/structure/1gp1>.
160. Cleland, W.W., *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory*. Biochimica et Biophysica Acta, **1963**. 67: S. 173, [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91815-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91815-8).
161. Bracht, K., et al., *Correlations between the activities of 19 anti-tumor agents and the intracellular glutathione concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: comparisons with the National Cancer Institute data*. Anti-Cancer Drugs, **2006**. 17(1): S. 41, <https://doi.org/10.1097/01.cad.0000190280.60005.05>.

162. Gillies, R.J., Didier, N., und Denton, M., *Determination of cell number in monolayer cultures*. Analytical Biochemistry, **1986**. 159(1): S. 109, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90314-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90314-3).
163. Meister, A., *Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy*. Pharmacology & Therapeutics, **1991**. 51(2): S. 155, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90076-x](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90076-x).
164. Bowers, K.J., et al., *Molecular dynamics - Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters*, in *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing - SC '06*. 2006, Association for Computing Machinery: Tampa, Florida. p. 84.
165. Roos, K., et al., *OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules*. Journal of Chemical Theory and Computation, **2019**. 15(3): S. 1863, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01026>.
166. Bhandarkar, M., et al. *Force Field Parameters: Non-Bonded Interactions*. NAMD User's Guide 2012 30.04.2012 [zuletzt abgerufen am: 09.06.2023]; 2.9:[Available from: <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/node23.html>].

Liste der Veröffentlichungen und anderer wissenschaftlicher Leistungen

Originalartikel:

Napierkowski, M., et al., *Liposomal formulation of model pentathiepin improves solubility and stability toward glutathione while preserving anticancer activity*. *Archiv der Pharmazie*, **2023**: S. e2300087, <https://doi.org/10.1002/ardp.202300087>.

Wolff, L., et al., *Comprehensive Evaluation of Biological Effects of Pentathiepins on Various Human Cancer Cell Lines and Insights into Their Mode of Action*. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**. 22(14): S. 7631, <https://doi.org/10.3390/ijms22147631>.

Behnisch-Cornwell, S., et al., *Pentathiepins: A Novel Class of Glutathione Peroxidase 1 Inhibitors that Induce Oxidative Stress, Loss of Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis in Human Cancer Cells*. *ChemMedChem*, **2020**. 15(16): S. 1515, <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000160>.

Betreute Diplomarbeiten

Schöne, T., *Untersuchung der Reaktion von Pentathiepinen mit Glutathion sowie der Wirkung von Buthioninsulfoximin auf die Zytotoxizität der Pentathiepine in verschiedenen Krebszelllinien*. Diplomarbeit, Universität Greifswald, **2022**.

Poster:

Napierkowski, M., Janke U., Rong A., Bandaru S. S. M., Delcea M., Schulzke C., Bednarski P., *Liposomal Formulation of a Pentathiepin*, DPhG-Doktorandentagung, Bonn, Deutschland, **2023**.