

University of Groningen

## Redox-active N4Py-metal complexes in human cell cultures

Geersing, Arjan

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Geersing, A. (2017). *Redox-active N4Py-metal complexes in human cell cultures*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# Samenvatting

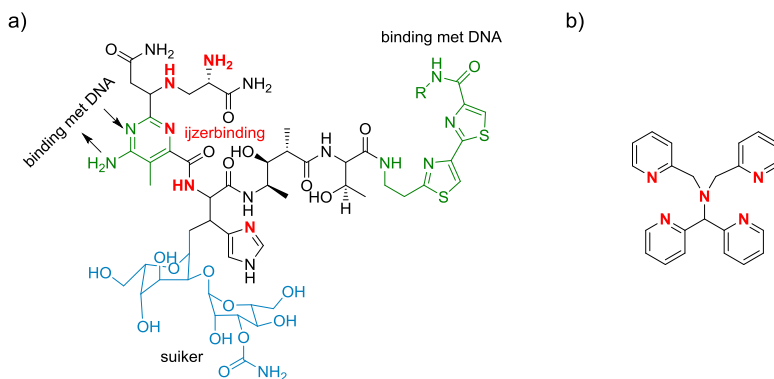
Redox-actieve N4Py-metaalcomplexen in humane cellen

## **Algemene Inleiding op N4Py: van Duur Wasmiddel tot Potentieel Medicijn?**

Al enige tijd geleden, in het jaar 1966, ontdekten Professor Umezawa en zijn medewerkers een molecuul, bleomycine genaamd, dat kon worden geïsoleerd uit een specifiek type bacterie (Figuur 1a).<sup>1,2</sup> Na intensief onderzoek bleek bleomycine een celremmend middel te zijn (cytostaticum) dat gebruikt kon worden als chemotherapie. In combinatie met andere medicijnen wordt bleomycine veel gebruikt bij behandeling van zaadbalkanker,<sup>3</sup> eierstokkanker<sup>4</sup> en de ziekte van non-Hodgkin.<sup>5</sup> Het heeft vele jaren geduurd voordat men een idee kreeg hoe het middel nu precies werkt. Inmiddels is bekend dat bleomycine een ijzer-ion kan binden; dit heet ook wel een ijzercomplex. Zo'n ijzercomplex is in staat om onder andere te reageren met zuurstofmoleculen. Dit is hetzelfde zuurstof dat men elke dag in- en uitademt uit de lucht. Op het moment dat dit gebeurt, zorgt een reactie tussen het ijzer-ion en zuurstof ervoor dat er 'radicalen' ontstaan. Deze 'radicalen' kunnen zeer snel reageren met alles wat zich in hun buurt bevindt. Aan de buitenkant van het bleomycine-molecuul zitten onderdelen die makkelijk DNA kunnen binden; DNA bevat erfelijke informatie en is nodig om een cel in leven te houden. Door de binding van bleomycine aan DNA kan via de 'radicalen' het DNA kapot gemaakt worden. Hierdoor is de (kanker)cel niet meer in staat om zich in leven te houden en sterft uiteindelijk. Aan bleomycine zit tevens een onderdeel (een suiker) die cellen energie kan geven. Kankercellen verbruiken veel meer energie en zullen dus veel meer bleomycine aantrekken. Daarom zullen gezonde cellen niet gauw kapot gemaakt worden door bleomycine. Eenmaal binnen in de kankercel kan het zich binden aan DNA en vervolgens het DNA knippen waardoor de kankercel uiteindelijk dood gaat.

Halverwege de jaren negentig van de vorige eeuw, maakte de groep van Professor Feringa in samenwerking met de groep van Professor Que een nieuw molecuul dat later N4Py zou worden genoemd (deze naam komt van de vier vrijwel gelijke zogenoemde pyridine-groepen die in het molecuul aanwezig zijn en worden afgekort met 'Py'). Dit molecuul bleek veel eigenschappen gemeen te hebben met bleomycine, maar verrassend genoeg werd N4Py in eerste instantie doorontwikkeld voor toepassing als bleekmiddel in waspoeder. De reactie van zuurstofmoleculen met het ijzer-ion die zorgt voor de vorming van 'radicalen' zou dan kunnen worden gebruikt voor het verwijderen van vlekken in kleding. Hiervoor zijn patenten aangevraagd en werd er onderzocht of N4Py op grote schaal kon worden gemaakt. Na enige tijd bleek echter dat het maken van N4Py voor massaproductie te duur zou zijn. Het onderzoek

werd daarna vooral toegespitst op de meer biologische eigenschappen van het molecuul, namelijk als optie naast, of alternatief van bleomycine. N4Py heeft als voordeel ten opzichte van bleomycine dat het veel eenvoudiger en sneller is te maken zoals zal blijken uit vergelijking van beide structuren (Figuur 1a en 1b). In eerste instantie werd gekeken naar hoe de 'radicaalvorming' van N4Py kon zorgen voor het knippen van geïsoleerd DNA uit een bacterie. Dit gebeurde in een reageerbuis, waarbij geen cellen aanwezig waren. De eerste resultaten waren veelbelovend en N4Py staat nog steeds bekend als een van de beste in een laboratorium gemaakte moleculen die DNA kunnen knippen. Een interessant verschil met bleomycine werd tijdens het onderzoek geconstateerd. DNA bestaat uit twee lange strengen die in de vorm van een dubbele helix met elkaar vervlochten zijn. N4Py knipt met name een van beide strengen door, terwijl bleomycine in een deel van de gevallen ook beide strengen tegelijk kan doorknippen. Door de relatieve eenvoud van de structuur van N4Py (Figuur 1b) kon deze later ook worden uitgebreid met een deel dat kan binden met DNA waardoor de activiteit van N4Py voor het knippen van DNA nog verder toenam.



**Figuur 1.** (a) De chemische structuur van een molecuul bleomycine. De rode delen geven aan waar een ijzer-ion kan binden, de groene delen kunnen binden met DNA en de blauwe delen zorgen voor opname in kankercellen. (b) De chemische structuur van N4Py. De rode delen geven aan waar een ijzer-ion kan binden. Het molecuul mist expliciete delen voor specifieke opname in kankercellen (blauw) en delen die interactie kunnen hebben met DNA (groen).

Aangezien voor het op de markt brengen van N4Py als molecuul in wasmiddel diverse tests waren gedaan om aan te tonen dat N4Py niet toxisch was voor de huid van de mens, werd voor lange tijd aangenomen dat het weinig zin had om N4Py net als bleomycine te testen als potentieel antikankermedicijn in levende kankercellen. Na aandringen van een oud-promovendus in onze groep werd dit uiteindelijk toch

geprobeerd en met een verrassend resultaat: N4Py bleek wel degelijk dodelijk te zijn voor kankercellen. Echter, waar bleomycine kankercellen doodt door het remmen van hun groei en celdeling, doodt N4Py kankercellen juist met name doordat het een toxische werking heeft op de cellen en een groot deel van de cellen dan 'zelfmoord' wil plegen (apoptose). Dit proefschrift beschrijft vorderingen in het verder begrijpen en optimaliseren van de werking van N4Py in kankercellen. De nu volgende paragrafen beschrijven de onderdelen van dit proefschrift in vogelvlucht en wellicht op iets gedetailleerder niveau.

### **Uitwisseling van Verschillende Metaalionen door N4Py in Cellulaire Systemen**

Van bleomycine is bekend dat het naast ijzer-ionen ook andere metaalionen kan binden zoals koper, zink, nikkel en kobalt.<sup>6,7</sup> In de meeste gevallen komt bleomycine ofwel als kopercomplex ofwel zonder metaal de cel binnen om vervolgens in de cel ijzer te binden of uit te wisselen met koper. Het ijzercomplex wordt gezien als het 'actieve' molecuul dat in staat is om schade aan te richten aan DNA en andere componenten in de cel, waardoor de cel niet meer kan delen. Hoofdstuk 2 van dit proefschrift beschrijft een studie waarin we vergelijkbare informatie wilden verzamelen voor N4Py. In de praktijk is het erg moeilijk om dit soort informatie over een molecuul in een cel te weten te komen. Hiervoor zijn de uitkomsten van diverse scheikundige experimenten met verschillende N4Py-metaalcomplexen zonder de aanwezigheid van cellen uiteindelijk gecombineerd met biologische experimenten met kankercellen waarin het effect van deze N4Py-metaalcomplexen op cellen werd bepaald. Hieruit blijkt dat N4Py in staat is om verschillende soorten metaal-ionen te kunnen binden en dat er waarschijnlijk een evenwicht bestaat tussen verschillende typen N4Py-metaalcomplexen binnen een cel, maar waarbij met name het ijzercomplex verantwoordelijk is voor het doden van de (kanker)cellen. Verder kan worden gesteld dat 'radicalen' betrokken zijn bij de toxische werking die N4Py heeft op de cel en dat, zoals eerder gesteld, N4Py via deze 'radicalen' zorgt voor schade aan onder andere het DNA van de cel.

### **Het Lokaliseren van N4Py in Cellen door het Synthetiseren van 'Lichtgevende' N4Py-derivaten**

Een cel bestaat uit veel verschillende componenten, ook wel organellen genoemd, die elk een andere functie hebben binnen de cel. Om het gedrag van N4Py binnen

een cel beter te begrijpen, werd ervoor gekozen om N4Py met behulp van een speciale microscoop zichtbaar te maken. Dit werd gedaan door speciale fluorescente moleculen aan N4Py vast te zetten, zogenaamde fluoroforen, om zo te kunnen bestuderen hoe deze 'lichtgevende' N4Py-derivaten de cel binnen komen en naar welk organel ze vervolgens toe gaan. Hiervoor zijn drie verschillende fluoroforen gebruikt die elk een andere kleur licht uitstralen, elk gekoppeld aan N4Py: fluoresceïn, rhodamine B en cyanine 5. De drie N4Py-derivaten bleken geheel ander gedrag te vertonen in een cel. N4Py-fluoresceïn kon de cel in zijn geheel niet binnenkomen. N4Py-rhodamine B en N4Py-cyanine 5 verspreiden zich wel de cel in maar elk op een andere manier. In het celmembraan van een cel zitten verschillende grote eiwitcomplexen die bepaalde moleculen de cel in transporteren. N4Py-rhodamine B bleek gebruik te maken van deze eiwitcomplexen om de cel in te komen, terwijl N4Py-Cy5 zonder hulp de cel in lijkt te komen. Dit eerste noemt men actief transport, het tweede geval heet passief transport. De manier van celmembraantransport lijkt ook gevolgen te hebben voor de lokalisatie in de cel. N4Py-rhodamine B blijft grotendeels 'gevangen' in zogenaamde lysosomen. Dit zijn een soort van kleine afvalbakjes die de gevaarlijke stoffen voor de cel afbreekt en onschadelijk maakt. N4Py-cyanine 5 lokaliseert zich juist in de mitochondria; dit zijn de energiefabrieken van de cel. Uit deze studie werd duidelijk dat het koppelen van fluoroforen aan N4Py grote consequenties had voor het transport van N4Py de cel, op de lokalisatie in de cel, als ook op de manier van het doden van de (kanker)cel. Dit is zeer waardevolle informatie voor het doorontwikkelen en beter begrijpen van het gedrag van N4Py in levende cellen.

### **Het Verkrijgen van Selectiviteit voor Folaatgevoelige Kankercellen**

Het molecuul N4Py zelf heeft geen noemenswaardige selectiviteit voor kankercellen in vergelijking tot gezonde cellen. Dit betekent dat het net zo goed gezonde als kwaadaardige cellen kan doden. Om N4Py te ontwikkelen als potentieel medicijn tegen kwaadaardige tumoren moet daarom een manier gevonden worden om wél deze selectiviteit te verkrijgen. Dit blijkt te realiseren door het verbinden van N4Py aan foliumzuur, een bekend voedingssupplement. Op een groot aantal type tumorcellen zijn zogenaamde folaatreceptoren aanwezig in het celmembraan. Dit zijn grote eiwitcomplexen die zeer selectief kunnen binden aan een molecuul foliumzuur. De werking hiervan kan worden gezien als een combinatie van een sleutel (foliumzuur) met een slot (folaatreceptor). Bij binding van foliumzuur aan de

folaatreceptor transporteert deze receptor het molecuul de cel in. Door N4Py aan foliumzuur te koppelen kan het dus ook de cel binnenkomen. Aangezien gezonde cellen over het algemeen over veel minder folaatreceptoren beschikken dan kankercellen is dit dus een zeer geschikte methode om selectief kankercellen te kunnen aanvallen. Door tevens tussen foliumzuur en N4Py een speciale fragiele moleculaire verbinding te maken, is het mogelijk om precies na binnenkomst van het gehele N4Py-foliumzuur molecuul in de cel de verbinding tussen N4Py en foliumzuur te verbreken. Hierdoor kan het vrije N4Py zeer waarschijnlijk een ijzer-ion binden in de kankercel waardoor het met behulp van 'radicalen' de kankercel kan doden.

### **Onderzoek naar de Mogelijkheden van Photo Dynamische Therapie met Behulp van N4Py**

Uit eerder onderzoek met N4Py is gebleken dat, in afwezigheid van levende cellen, het beschijnen van een oplossing van N4Py en DNA met intens laserlicht ervoor kan zorgen dat N4Py makkelijker en sneller DNA-moleculen kan knippen. Dit komt doordat het laserlicht zorgt voor de vorming van extra veel 'radicalen'. In ziekenhuizen wordt al regelmatig gebruik gemaakt van deze behandelmethode voor bijvoorbeeld slokdarm- en huidkanker.<sup>8,9</sup> Dit wordt ook wel Photo Dynamische Therapie (PDT) genoemd. Gezien de eerste succesvolle experimenten in een celvrije omgeving, zijn vergelijkbare experimenten uitgevoerd met borstkankercellen. De resultaten laten tot op heden nog geen significante verbeteringen in de mate van celdood zien alsook geen verbeteringen in de hoeveelheid geproduceerde 'radicalen'. Dit kan komen omdat de sterkte van de lichtbron nog moet worden geoptimaliseerd of omdat de fysische eigenschappen van N4Py niet optimaal zijn om te gebruiken in PDT.

Het onderzoek uit dit proefschrift laat duidelijke fundamentele vooruitgang zien in het begrijpen van de werking van N4Py in cellen en deze resultaten bieden weer veel mogelijkheden voor vervolgonderzoek. Ook al lijkt dit type onderzoek misschien niet direct toepasbaar, toch zijn dit soort projecten van groot belang voor het vinden van grote doorbraken in onder andere de medische wereld. Hopelijk kunnen de vindingen in dit proefschrift worden gebruikt voor nieuwe ideeën en toepassingen die het onderzoek naar kanker en andere ziektes verder vorm kunnen geven.

## Referenties

- (1) Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. *J. Antibiot.* **1966**, *19* (5), 200.
- (2) Umezawa, H.; Suhara, Y.; Takita, T.; Maeda, K. *J. Antibiot.* **1966**, *19* (5), 210.
- (3) Einhorn, L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (7), 4592.
- (4) Carlson, R. W.; Sikic, B. I.; Turbow, M. M.; Ballon, S. C. *J. Clin. Oncol.* **1983**, *1* (10), 645.
- (5) Bayer, R. A.; Gaynor, E. R.; Fisher, R. I. *Semin. Oncol.* **1992**, *19* (2 Suppl 5), 46.
- (6) Sugiura, Y.; Ishizu, K.; Miyoshi, K. *J. Antibiot.* **1979**, *32* (5), 453.
- (7) Rao, E. A.; Saryan, L. A.; Antholine, W. E.; Petering, D. H. *J. Med. Chem.* **1980**, *23* (12), 1310.
- (8) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380.
- (9) Choudhary, S.; Nouri, K.; Elsaie, M. L. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24* (6), 971.