

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Präklinische Evaluation von Titanocenverbindungen
als potentielle Zytostatika

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Selig

aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
2. Prof. Dr. med. S. Corbacioglu
3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Westermann

Datum der Promotion: 22.März 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1. Tumorphathologie	11
1.1.1. Therapie maligner Erkrankungen	12
1.1.2. Chemotherapie	13
1.2. Apoptose	14
1.2.1. Entdeckung der Apoptose.....	14
1.2.2. Bedeutung der Apoptose für den Organismus	15
Embryonale Entwicklung	15
Rolle der Apoptose im Immunsystem des Menschen	15
1.2.3. Fehlgesteuerte Apoptose.....	16
1.2.4. Apoptose bei malignen Erkrankungen	17
1.2.5. Molekulare Mechanismen der Apoptose	17
1.2.5.1. Caspasen: Initiatoren und Exekutoren der Apoptose.....	18
1.2.5.2. Caspasensubstrate	20
1.2.5.3. Signaltransduktionswege der Apoptose	21
1.2.5.3.1. Extrinsischer Aktivierungsweg	21
1.2.5.3.2. Intrinsischer Aktivierungsweg	23
1.2.5.3.3.ROS	25
1.2.6. Regulationsmechanismen	26
1.2.6.1. Bcl-2-Proteine	26
1.2.6.2. „Inhibitor of apoptosis“-Proteine	29
1.2.7. Apoptose vs. Nekrose	31
1.2.8. Apoptose in der Therapie maligner Erkrankungen	33
1.2.8.1. Therapieresistenz	33
1.3. Titanocene	35
1.3.1. Darstellung	35
1.3.2. Verwendung in der Chemie.....	36
1.3.3. Titanocene in der Krebstherapie.....	36
1.3.4. Mögliche Wirkmechanismen.....	36
2. Ziel der Arbeit	38
3. Material und Methoden	39
3.1. Material	39
3.1.1. Geräte	39
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	40
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien	40
3.1.3. Zytostatika.....	42
Herkömmliche Zytostatika	42
3.1.4. Antioxidantien.....	42
3.1.5. Nährmedien	42
3.1.6. Zellen.....	43
3.1.6.1. Zelllinien	43
Suspensionszellen	43
Adhärente Zellen.....	44
3.1.6.2. Primäre Zellen.....	45

3.1.7. Kommerzielle Kits	45
3.1.8. Puffer	45
Isolierung mononukleärer Zellen.....	45
Proteinpräparation	45
SDS-Page	46
Western Blot.....	46
3.1.9. Antikörper	47
Primäre Antikörper	47
Sekundäre Antikörper	47
3.2. Methoden	48
3.2.1. Zellbiologische Methoden	48
Allgemeine zellbiologische Bedingungen.....	48
Isolierung mononukleärer Zellen.....	48
Zellzahlbestimmung.....	49
Kryokonservierung.....	50
3.2.2. Apoptose- und Zytotoxizitätsassay	51
Laktat-Dehydrogenase-Release-Assay.....	51
Durchflusszytometrie	51
Modifizierte Zellzyklusanalyse	53
AnnexinV-Propidiumiodid-Doppelfärbung	53
Mitochondriale Membranpotential-Analyse	54
3.2.3. Biochemische Methoden	55
Proteinpräparation	55
Proteinkonzentrationsbestimmung	55
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
Western Blot.....	56
Membranfärbung mit Ponceau	57
Immundetektion	57
β -Actin Abgleich.....	58
3.2.4. <i>In vivo</i> -Untersuchung	59
3.2.5. Datenauswertung und Statistik	59
4. Ergebnisse	60
4.1. Biologische Aktivität der Titanocenverbindungen	60
4.2. Titanocen Ti 8	62
4.3. Allgemeine Zytotoxizität	63
4.4. Proliferationshemmung	63
4.5. Apoptoseinduktion <i>in vitro</i>	64
4.6. Apoptoseinduktion <i>ex vivo</i>	69
4.7. Mechanistische Untersuchungen	74
4.8. Apoptose oder Nekrose	74
4.9. Identifizierung des Apoptosesignalweges	78
4.10. Untersuchung weiterer Apoptosefaktoren	82
4.11. Bedeutung der "ROS" für die Ti8-induzierte Apoptose	83
4.12. <i>In vivo</i> -Untersuchungen	85
4.13. Weitere Substanzeigenschaften	86
5. Diskussion	88
5.1. Quantifizierung der Aktivität	88
5.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von Ti 8	91
5.2.1. LC50-Bestimmung.....	91
5.2.2. Proliferationsinhibition	92

5.2.3. <i>In vitro</i> -Apoptoseinduktion	93
5.2.4. <i>Ex vivo</i> -Apoptoseinduktion	94
5.3. Mechanismen des Ti 8-induzierten Zelltodes	98
5.3.1. Charakterisierung des Zelltodes	98
5.3.2. Apoptosesignalweg	100
5.3.3. Weitere mechanistische Untersuchungen	101
5.4. <i>In vivo</i> -Untersuchungen	104
5.5. Weitere Substanzeigenschaften	104
6. Zusammenfassung	1066
7. Ausblick	107
8. Literaturverzeichnis	108
9. Eidesstattliche Erklärung	120
10. Lebenslauf	121
11. Publikationsliste	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AICD	Activation Induced Cell Death
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Ala	Alanin
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ANT	Adenin Nukleotide Translokator
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BH	Bcl-2 Homology Domain
Bid	BH3-Interacting-Domain Death Agonist
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BJAB	Burkitt Lymphom Zelllinie
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Caspase (Cystein-Aspartat-Protease)
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CD95	Cluster of Differentation Nr. 95 = Fas / APO1
Ced	Identifizierte Gene des Fadenwurms
CML	Chronische myeloische Leukämie
Cyt C	Cytochrom C
CrmA	Cytokine response modifier A
(d)ATP	Desoxyribo-Adenosintriphosphat
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFF45	DNA Fragmentation Factor (45 kDa) = ICAD Humaner Inhibitor von CAD

Abkürzung	Bedeutung
DISC	Death-Inducing Signalling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Death Receptor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FACS	Fluorescent-Activated Cell Sorting
FADD	Fas Associated Death Domain
FITC	Fluorescein-iso-thiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLICE	FADD-like ICE
HRP	Horseradish Peroxidase
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
Ile	Isoleucin
ICAD	Inhibitor von CAD (Caspase Activated DNase) = DFF45
ICE	Interleukin-1 β -Converting Enzyme
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaniniodide
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
NAC	N-Acetyl-Cystein
NIAP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
M	Morbus (lat.: Erkrankung)
MDR	Multiple Drug Resistance
MRD	Minimal Residual Disease
MRP	Multiple Drug Resistance Protein

Abkürzung	Bedeutung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Programmed Cell Death
PI	Propidiumiodid
Pro	Prolin
PT	Permeability Transition
PTP	Permeability Transition Pore
Puma	p53-upregulated Modulator of Apoptosis
R	Rest; Substituent in einem Molekül
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	1640 Roswell Park Memorial Institute
RZF	RING-Zink-Finger
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
tBid	truncated Bid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAMP	TNF-Receptor-related Apoptosis-mediated Protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tunel	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling
Val	Valin
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
ZVAD-FMK	Caspase-Inhibitor (Carbobenzoxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone)
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales inneres Transmembranpotential

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1	Aktivierung von Caspasen durch limitierte Proteolyse
Abb. 2	Aktivierung von Caspasen und Caspasensubstraten
Abb. 3	Extrinsischer Pathway
Abb. 4	Intrinsischer Pathway
Abb. 5	ROS-Schema
Abb. 6	Struktur der Proteine der Bcl-2-Familie
Abb. 7	Die IAP-Familie
Abb. 8	Morphologie der Apoptose und Nekrose
Abb. 9	Übersicht möglicher zellulärer Resistenzmechanismen
Abb. 10	Allgemeine Strukturformel der Titanocene
Abb. 11	Isolierung mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation
Abb. 12	FACS-Messparameter
Abb. 13	Gelelektrophorese und Western Blot
Abb. 14	Prinzip der Immundetektion
Abb. 15	Methoden zur Bestimmung der biologischen Aktivität der Titanocenderivate
Abb. 16	Zytotoxizität von Ti 8
Abb. 17	Proliferationshemmung in BJAB-Zellen
Abb. 18	Morphologische Merkmale der Apoptose
Abb. 19	Messparameter der modifizierten Zellzyklusanalyse
Abb. 20	Apoptoserate in BJAB-Zellen induziert durch Ti 8
Abb. 21	Evaluation des Wirkspektrums von Ti 8
Abb. 22	Evaluation des Wirkspektrums von Ti 4
Abb. 23	Detektion der Apoptoseraten induziert durch Ti 26
Abb. 24	Evaluation des Wirkspektrums von Ti 34
Abb. 25	Apoptoseinduktion <i>ex vivo</i> (Ti 8)
Abb. 26	Apoptoseinduktion <i>ex vivo</i> (Ti 4, Ti 26, Ti 34)
Abb. 27	Untersuchung auf Selektivität der Wirkungen von Ti 8
Abb. 28	Ausschluss unspezifischer Toxizität durch Ti 8
Abb. 29	AnnexinV/PI-Doppelfärbung
Abb. 30	Nachweis der prozessierten Caspase-3 im Western Blot Verfahren

Abb. 31	Nachweis der PARP-Prozessierung mittels Western Blot Technik
Abb. 32	Untersuchung der FADD-Abhängigkeit
Abb. 33	Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Ti 8)
Abb. 34	Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Ti 4, Ti 26)
Abb. 35	Nachweis der prozessierten Caspase-9 mittels Western Blot Technik
Abb. 36	Untersuchung der Ti 8-Wirkung hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Bcl-2
Abb. 37	Untersuchung der Wirkung von Ti 8 hinsichtlich ihrer Smac-Abhängigkeit
Abb. 38	Bedeutung der ROS-Moleküle für die Wirksamkeit von Ti 8
Abb. 39	Verlauf des Tumorzvolumens <i>in vivo</i>
Abb. 40	Verlauf des Körpergewichtes
Abb. 41	Untersuchungen zur Proteinbindung
Abb. 42	Untersuchung der chemischen Stabilität von Ti 8
Abb. 43	Allgemeine Struktur der Titanocenamid- und Titanocencarboxylverbindung
Abb. 44	Strukturvergleich
Abb. 45	Übersicht zur Apoptoseinduktion

Tabellen

Tab. 1	Überblick über die ermittelte biologische Aktivität der zur Verfügung gestellten Titanocenderivate
Tab. 2	Ausschluss unspezifischer Toxizität

1. Einleitung

1.1. Tumorpathologie

Als maligne Zellen werden in der Medizin bösartig entartete Zellen (Krebszellen) bezeichnet, die sich in ihrem Verhalten wesentlich von anderen, benignen Zellen unterscheiden [1]. Zu den charakterisierenden Eigenschaften einer malignen Zelle zählen unkontrollierte Proliferation der Zelle mit meist hohen Teilungsraten, Entdifferenzierung mit konsekutivem Verlust der gewebetypischen Zellfunktion, invasives, infiltrierendes und destruierendes Wachstum und die Fähigkeit zur Tumorzellabsiedlung (Metastasierung) [2]. Die maligne Transformation ist das Resultat eines in mehreren Schritten verlaufenden Prozesses, der im Tiermodell durch chemische, physikalische oder virale Noxen mit mutagener Wirkung ausgelöst werden kann und sich bei menschlichen Tumoren anhand molekular- und zytogenetischer Untersuchungen nachvollziehen lässt [1], [3]. An der Tumorentstehung sind jene Faktoren beteiligt, die auch bei der Embryogenese und der Regeneration den Proliferations- und Differenzierungsstoffwechsel steuern. Zu diesen Faktoren gehören Proliferationsregulatoren, Differenzierungsfaktoren, Kommunikationsfaktoren sowie immunologische Faktoren [4], [5].

Als Proliferationsfaktoren wirken gewebeabhängig Hormone (v.a. Geschlechtshormone), Vitamine (A, B₁₂, Folsäure), Wachstumsfaktoren und Protoonkogene. Wachstumsfaktoren sind Peptidhormone mit mitogener Wirkung auf die sezernierende Zelle selbst (autokrine Sekretion), sowie auf benachbarte Zellen (parakrine Sekretion). Die Wachstumsfaktoren stehen in enger Beziehung zu den Protoonkogenen. Diese physiologisch vorkommenden Gensequenzen (c-onc) codieren für sogenannte Onkoproteine, welche die Signalaufnahme im Bereich der Zellmembran, die Signalübermittlung im Zytoplasma und Signalumsetzung im Zellkern steuern. Die Wechselwirkung mit den Wachstumsfaktoren wird umso deutlicher, wenn man sich vor Augen führt, dass Protoonkogene für Wachstumsfaktoren ebenso wie für ihre Rezeptoren codieren. So wird eine rasche und effiziente Zellproliferation gewährleistet. Durch Mutation, Vermehrung oder Dysregulation werden Protoonkogene zu Krebsgenen, die man als Onkogene bezeichnet. Eine quantitativ oder qualitativ abnorme Rezeptorbestückung und/oder abnorme Wachstumsfaktorbildung führen zu einem Signaldauerbeschuss der transformierten Zelle mit enromer wachstumsfördernder Wirkung [3].

Proliferationsinhibitoren dämpfen als Gegenspieler die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Protoonkogenen und werden daher als Anti-Onkogene (Tumorsuppressoren) bezeichnet. Sie

fungieren als Differenzierungsfaktoren und fördern damit die Ausreifung der Zellen nach der Proliferation [5].

Schon 1914 postulierte Boveri, dass eine entartete Zelle mit abnormer Proliferation infolge einer somatischen Mutation entstehen kann, sodass Krebs als genetische Erkrankung anzusehen ist [6]. Nach der „Two-Hit-Theorie“ von Knudson [7] müssen für die Entstehung einer entarteten Zelle, für die sogenannte maligne Transformation, beide Allele eines Gens mit Beteiligung an der Zellzyklusregulation durch zufällige somatische Mutation verändert werden [8]. In diesem Prozess spielen zum einen die unkontrollierte Aktivierung von wachstumsinduzierenden Genen (Onkogenen) und zum anderen der Verlust bzw. die Inaktivierung in wachstumshemmenden Genen (Tumorsuppressorgene) eine entscheidende Rolle [9]. Zusätzlich wird das Zellwachstum durch interzelluläre Kommunikationsmechanismen limitiert. *In vitro* stellen frei wachsende normale Zellen ihre mitotische Aktivität ein, sobald sie mit Nachbarzellen in Kontakt kommen, heften sich mit ihren Adhäsionsmolekülen an die Nachbarzellen und kommunizieren mit ihnen über die Haftorganellen (Kontaktinhibition) [10]. Mit zunehmender Entdifferenzierung im Laufe der Tumorgenese verlieren maligne Zellen diese Adhäsionsmoleküle und zelltypische Gewebemuster, sodass die interzelluläre Kommunikation aufgehoben wird. Dadurch können sie sich, von Nachbarzellen unbehelligt, weiter teilen, sind in der Lage sich aus dem Zellverband zu lösen („Soil-and-seed“-Theorie), an entfernten Stellen im Organismus aufzutreten und umliegendes Gewebe zu verdrängen [11].

1.1.1. Therapie maligner Erkrankungen

Eine der großen medizinischen Herausforderungen unserer Zeit ist die Therapie maligner Tumore. Dabei stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Während bei lokalisierten Tumoren die chirurgische Entfernung und Strahlentherapie im Mittelpunkt stehen, ist bei disseminierten Tumoren, bei Metastasen und ausgedehnten Rezidiven die Tumorchemotherapie von besonderer Bedeutung. Auch eine Kombination der Therapieverfahren wird abhängig von Tumorentität und -ausdehnung angewandt. Bei der Leukämie stützt sich die Therapie neben der Knochenmarkstransplantation vorwiegend auf die Chemotherapie [3]. In den folgenden Ausführungen werde ich mich vor allem auf Chemotherapie beziehen.

1.1.2. Chemotherapie

Der Begriff der Chemotherapie bezeichnet eine medikamentöse Behandlung, mit dem Ziel Krebszellen abzutöten bzw. deren unkontrolliertes Wachstum unter Kontrolle zu bringen. Sie wird auch mit dem Begriff Zytostatikatherapie gleichgesetzt. Die eingesetzten Medikamente werden Zytostatika genannt. Sie sind meist Substanzen pflanzlicher oder mikrobieller Herkunft mit sehr starker Wirkung auf zellulärer Ebene. Mit einer Chemotherapie können verschiedene therapeutische Ansätze verfolgt werden. Beim *kurativen Ansatz* ist das Ziel die „Heilung“, d.h. die Beseitigung aller entarteten Tumorzellen. Beim *adjuvanten Therapieansatz* wird die Chemotherapie ergänzend zu weiteren Therapieoptionen eingesetzt. Zum Beispiel präoperativ zur Tumorverkleinerung, um eine anschließende chirurgische Tumorextraktion zu ermöglichen (neoadjuvant) oder postoperativ zur Bekämpfung von Mikrometastasen und konsekutiv zur Verringerung des Rezidivrisikos. Der *palliative Ansatz* wird in Fällen eingesetzt, bei denen keine Heilung erreicht werden kann, zum Beispiel bei ungünstiger Tumorlokalisation oder weit fortgeschrittenem Tumorleiden. Dann dient die Chemotherapie der Verbesserung der Lebensqualität und der Verlängerung der Überlebenszeit [12].

Die Chemotherapie ist eine relativ junge Behandlungsmethode. Die erste erfolgreiche Pharmakochemotherapie wurde 1941 bei der Behandlung des Prostatakarzinoms mit dem synthetischen Estrogen Diethylstilbestrol durchgeführt. 1948 wurde zur Therapie einer akuten lymphatischen Leukämie beim Kind zum ersten Mal der Folsäure-Antagonisten Aminopterin verwendet. Heutzutage werden meist verschiedene Typen von Zytostatika als Kombination in Form einer Polychemotherapie verwendet. Dies hat den Vorteil, dass durch die verschiedenen Wirkmechanismen der Medikamente das Wirkungsprofil verbessert, Nebenwirkungen und Resistenzraten reduziert werden können [12].

1.2. Apoptose

Der Begriff der Apoptose bezeichnet den sogenannten programmierten Zelltod. Es ist eine besondere Form des Zellunterganges, die mit typischen molekularen und morphologischen Prozessen einhergeht und zur kontrollierten zellulären Selbstzerstörung führt. Es ist ein aktives, eingebautes „Selbstmordprogramm“ biologischer Zellen, das von der Zelle selbst oder durch benachbarte Zellen initiiert werden kann [13]. Nachdem das Selbstmordprogramm der Zelle gestartet wurde, durchläuft die Zelle eine definierte Abfolge von Prozessen, die zu den typischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle führt. Morphologisch zeigt sich frühzeitig die Schrumpfung der Zelle, wodurch sie den Kontakt zu benachbarten Zellen verliert. Es kommt zu Ausstülpungen der Zellmembran, dem sogenannten „blebbing“ oder „budding“, das schließlich mit der Fragmentierung der gesamten Zelle mit der Bildung membranumhüllter Vesikel, der „apoptotic bodies“ endet [1], [14]. Diese werden rasch von benachbarten Zellen und spezialisierten Fresszellen beseitigt ohne eine reaktive Begleitentzündung hervorzurufen. Biochemische Charakteristika der Apoptose sind die Aktivierung der Caspasenkaskade, die Kondensation des intranukleären Chromatins und die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen [15]. Durch die Expression prophagozytischer Signale werden Fresszellen angelockt und benachbarte Zellen gewarnt.

1.2.1. Entdeckung der Apoptose

1972 wurde anhand der typischen morphologischen Veränderungen, die bei sterbenden Zellen beobachtet wurden, der "programmierte Zelltod" erstmalig beschrieben. Wird das intrazelluläre Todesprogramm aktiviert, geht die Zelle kontrolliert und aktiv reguliert zugrunde. Die Existenz der Apoptose wurde lange Zeit geleugnet [16]. So hatte die Apoptose unter Wissenschaftlern anfangs einen ähnlichen Stellenwert, wie die Aromatherapie unter Physikern. Sie galt als interessantes und amüsantes Konzept, dekorativ, aber ohne weitere Bedeutung [15]. Die Akzeptanz der Apoptose setzte langsam ein, nachdem bei Untersuchungen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* Gene identifiziert wurden, die die Apoptose kontrollieren [17]. Drei grundlegende Gene des Todesprogrammes (Ced-Gene) wurden identifiziert: **Ced-9**, das hemmend auf den Selbstmordmechanismus wirkt, sowie **Ced-3** und **Ced-4**, die proapoptotisch wirken [18], [18]. Das Ced-3-Gen codiert für ein Protein, das funktionell wie strukturell einem humanen Protein, dem Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE), sehr ähnelt [19]. ICE ist ein intrazelluläres, proteinspaltendes Enzym, eine Protease. Aus einem Precursor-Protein spaltet es Interleukin-1, ein wichtiges Signalmolekül bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Die

Entdeckung der Homologien zwischen dem Ced-3-Gen des Fadenwurms und einem humanen Gen waren ein erster Hinweis darauf, dass bei der Apoptosesignalkaskade die Proteolyse, also die Aktivierung von Proteinen durch Spaltung aus einem Precursor-Protein durch Proteasen, eine wichtige Rolle spielt [20], [21]. Dadurch wandelte sich das Interesse an der Apoptose von Ignoranz zu Euphorie [22].

1.2.2. Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Bei vielen biologischen Prozessen spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. Die Apoptose ist ein weit verbreitetes Phänomen, deren mechanistische Bestandteile durch die Evolution hinweg hochgradig konserviert sind. Man findet den programmierten Zelltod bei Säugetieren, ebenso wie bei Insekten [23] und Würmern [18]. Bei Hefen und auch bei Pflanzen [24] wurde Apoptose während der Entwicklung und als Reaktion auf Beschädigung beobachtet. Sogar bei einzelligen Eukaryoten und Prokaryoten findet man ein Selbstmordprogramm [25], [26]. Desweiteren ist der programmierte Zelltod bei einer Vielzahl verschiedener physiologischer Prozesse zu finden.

Embryonale Entwicklung

Eine ganz wesentliche Rolle spielt der programmierte Selbstmord bei der embryonalen Entwicklung. Dabei lassen sich im Wesentlichen fünf Hauptfunktionen unterscheiden [27], [28].

(A) Der gezielte Zelltod ermöglicht die Formung des Körpers, zum Beispiel bei der Trennung der Finger und der Ausbildung von Körperhöhlen [29].

(B) Strukturen, die zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung eine Funktion erfüllten, diese aber verloren haben, werden durch Apoptose eliminiert. Ein Beispiel dafür ist der Schwanz der Kaulquappe, der für den Frosch nicht mehr von Nutzen ist [22]. Bei Wirbeltierembryonen finden sich Anlagen für die weiblichen (Müllerscher Gang), ebenso wie für die männlichen Geschlechtsorgane (Wolffscher Gang). Im Laufe der embryonalen Entwicklung kommt es zur Ausprägung und Weiterentwicklung nur einer der Anlagen, während die andere mithilfe des programmierten Zelltodes eliminiert wird [30].

(C) Auch bei der Produktion differenzierter Zellen ohne Zellorganellen nutzt der Organismus den Mechanismus der Apoptose [31], [32].

(D) Es gibt verschiedene vom Organismus unerwünschte Zellen, die gezielt eliminiert werden: Zellen, die ihre Funktion verloren haben [33], die den Organismus schädigen können [33], die genetisch stark verändert sind oder Zelltypen, die im falschen Organ oder Gewebe auftreten [5].

(E) Auch die hormoninduzierte Gewebeatrophie, wie bei der zyklischen Endometrium-

abstoßung wird durch Apoptose bewerkstelligt [5]. Im entwickelten, multizellulären Organismus ist die Apoptose essentiell für die Wahrung der Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod. So sterben in einem Erwachsenen Menschen jede Minute Millionen von Zellen, um dieses empfindliche Gleichgewicht aufrechtzuerhalten [14].

Rolle der Apoptose im Immunsystem des Menschen

Enorme Bedeutung hat die Apoptose auch bei der Entwicklung des menschlichen Immunsystems. Die Antigenrezeptoren der Lymphozyten werden von segmentierten Genen codiert. Durch somatische Rekombination dieser Gene wird eine immense Vielfalt an Rezeptoren erzielt, sodass das Immunsystem für möglichst viele Erreger gewappnet ist. Infolge dieser zufälligen Ausstattung mit Antigenrezeptoren entstehen aber auch Lymphozyten, die sich gegen körpereigene Strukturen richten und gesunde Körperzellen zerstören würden. Genauso finden sich Lymphozyten mit fehlerhaften Rezeptoren ohne Funktion. Durch negative Selektion der autoreaktiven und defekten Lymphozyten während der Lymphozytenreifung werden ca. 90% der heranreifenden Lymphozyten apoptotisch eliminiert [33]. Wird das ausgebildete Immunsystem infolge einer spezifischen Antigenpräsentation aktiviert, kommt es zur extensiven klonalen Expansion von aktivierten Lymphozyten. Haben die Lymphozyten ihre Funktion bei der Infektabwehr erfüllt, ist die Eliminierung aktiver Lymphozyten zur Beendigung der Immunantwort unabdingbar. Bewerkstelligt wird dies durch den programmierten Zelltod, der in diesem Fall als „Activation Induced Cell Death“ (AICD) bezeichnet wird [34]. Den Selbstmordmechanismus nutzen auch zytotoxische T-Lymphozyten, die virusinfizierte Körperzellen erkennen und in diesen Apoptose induzieren, um eine weitere Replikation und Ausbreitung der Viren zu verhindern [22].

1.2.3. Fehlgesteuerte Apoptose

Wie wichtig der kontrollierte Zelltod ist, wird besonders deutlich, wenn Defekte in der Apoptosemaschinerie auftreten. Apoptosedysfunktionen, die mit exzessiven Apoptoseraten einhergehen findet man bei AIDS [35], ischämiebedingten Zellschädigungen, zum Beispiel infolge einer Myokardischämie oder eines Apoplexes [36], bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson [37] und M. Huntington. Ursache von Erkrankungen kann aber nicht nur eine gesteigerte, sondern auch eine reduzierte Apoptose sein. Zu den Erkrankungen, bei denen Apoptosedefekte die Ausführung der Apoptose verhindern, zählen Autoimmunerkrankungen und verschiedene Karzinomentitäten [38], [39].

1.2.4. Apoptose bei malignen Erkrankungen

Bei malignen Erkrankungen spielt die Apoptose gleich in mehrfacher Hinsicht eine wichtige Rolle. Sie ist relevant für die Entstehung, Progression und Metastasierung. Wie bereits beschrieben, liegt die Bedeutung der Apoptose unter anderem darin, die Zellzahl eines Organismus zu kontrollieren und fehlerhafte Zellen zu eliminieren. Dementsprechend würden Zellen mit DNA-Schäden oder exzessiv proliferativem Verhalten zum Schutz des Organismus durch Apoptose beseitigt werden. In Krebszellen können häufig Defekte in der Apoptosemaschinerie nachgewiesen werden, die wahrscheinlich durch zufällige Mutationen entstanden sind und eine Apoptoseresistenz der malignen Zellen erzeugen. Dies kann zum einen durch eine verminderte Expression oder Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine, sogenannter Tumorsuppressoren, wie p53 [40], Bax oder Bak [41] erzielt werden. Zum anderen wird dies durch eine Überexpression oder übermäßige Aktivierung von Apoptoseinhibitoren, wie beispielsweise Bcl-2, ermöglicht [42]. Die entstandene Apoptoseresistenz ermöglicht das Überleben der Zelle nach einer DNA-Schädigung, die verstärkte Proliferation und Selektion der Tumorzellen. Mit fortschreitendem, ungebremstem Tumorwachstum kommt es zur Akkumulation von Mutationen mit einer Zunahme der Malignität.

Eine ganz wesentliche Rolle spielt die Apoptose aber auch in der Tumorthherapie. Hier stützt man sich auf Medikamente, sogenannte Chemotherapeutika, die durch eine Induktion der Apoptose in den Krebszellen, trotz eventueller Apoptosedefekte, ihre Wirkung erzielen [43], [12].

1.2.5. Molekulare Mechanismen der Apoptose

Die Apoptose ist ein komplexes, hoch effizientes Selbstmordprogramm, für dessen Ablauf die Interaktion einer Vielzahl verschiedener Faktoren nötig ist. Die Hauptsignalwege und wichtigsten beteiligten Moleküle sollen im folgenden Abschnitt erläutert werden.

Die Ausführung des Todesprogrammes folgt charakteristischen Signalwegen, von denen zwei gut untersucht wurden: der extrinsische und der intrinsische Pathway. Signale von außen wie Ligandenbindung an Oberflächenrezeptoren, das Auftreten von Todessignalen oder das Fehlen von Wachstumssignalen triggern den extrinsischen Signatransduktionsweg [44]. Intrazelluläre Signale wie DNA-Schäden, verursacht durch Strahlung, Zytostatika oder DNA-Reparaturdefekte, führen zur Aktivierung des intrinsischen Pathway [45]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf weitere Aktivierungswege, unter anderem einen mit Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums [46], die jedoch im Folgenden nicht eingehender behandelt werden. Den verschiedenen Aktivierungswegen ist gemeinsam, dass sie alle in der Aktivierung

der Caspasenkaskade münden. Diese führt letztendlich via limitierter Proteolyse zu den typischen morphologischen Veränderungen und biochemischen Prozessen innerhalb der apoptotischen Zelle.

1.2.5.1. Caspasen: Initiatoren und Exekutoren der Apoptose

Die Entdeckung der Analogien zwischen dem Ced-3-Genprodukt und der humanen Protease ICE führte zu der Vermutung, dass die Proteolyse eine wichtige Rolle innerhalb der Apoptosesignalkaskade spielt [20]. Bald wurden neue Mitglieder der Ced-3/ICE-Proteasenfamilie entdeckt, die während der Apoptose aktiviert werden und diese anfängliche Vermutung bestätigten. Diesen Proteasen ist gemein, dass sie in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein besitzen und ihre Zielproteine an spezifischen Prädilektionsstellen benachbart der Aminosäure Aspartat spalten. Aus diesem Grund werden sie **Caspasen** (Cystein-Aspartat-Proteasen) genannt [47]. Studien konnten belegen, dass die Caspasen nicht so sehr auf Aspartat angewiesen sind, wie anfangs angenommen wurde. Auch Glutamat kann demzufolge als Prädilektionsstelle zur Spaltung fungieren [48]. Die am stärksten präferierte Aminosäuresequenz scheint jedoch X-Glu-X-Asp zu sein [49].

Im humanen Genom codiert konnten elf verschiedene Caspasen nachgewiesen werden, von denen sieben eine entscheidende Rolle im Ablauf der Apoptose zugeordnet wird [50]. Mittlerweile gelten die Caspasen als zentrales Element der Apoptosemaschinerie. Sie werden kontinuierlich synthetisiert und liegen intrazellulär als inaktive Zymogene (Procaspasen) vor. Strukturell bestehen diese Procaspasen allgemein aus einer N-terminalen Prodomäne und zwei Untereinheiten, die bei einigen Caspasen durch ein Verbindungspeptid voneinander getrennt werden (Abb.1A). Durch proteolytische Spaltung an einem spezifischen Aspartatrest entsteht das aktive Enzym in Form eines heterotetrameren Komplexes [51]. Dieser Komplex setzt sich zusammen aus zwei kleinen und aus zwei großen Untereinheiten, die das aktive Zentrum der Protease bilden (Abb. 1D) [52]. Die aktivierende Spaltung kann entweder durch eine andere Caspase oder autokatalytisch durch die Procaspase selbst durchgeführt werden. Für die autokatalytische Aktivierung wird zum Teil ein stabilisierender Komplex benötigt: beispielweise der DISC zur Aktivierung der Caspase-8 und das Apoptosom zur Caspase-9-Prozessierung [53]. Anhand morphologischer und funktioneller Aspekte werden die Caspasen in zwei Subgruppen unterteilt: die Initiatorcaspasen (Caspasen-2, -8, -9, und -10) und die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7).

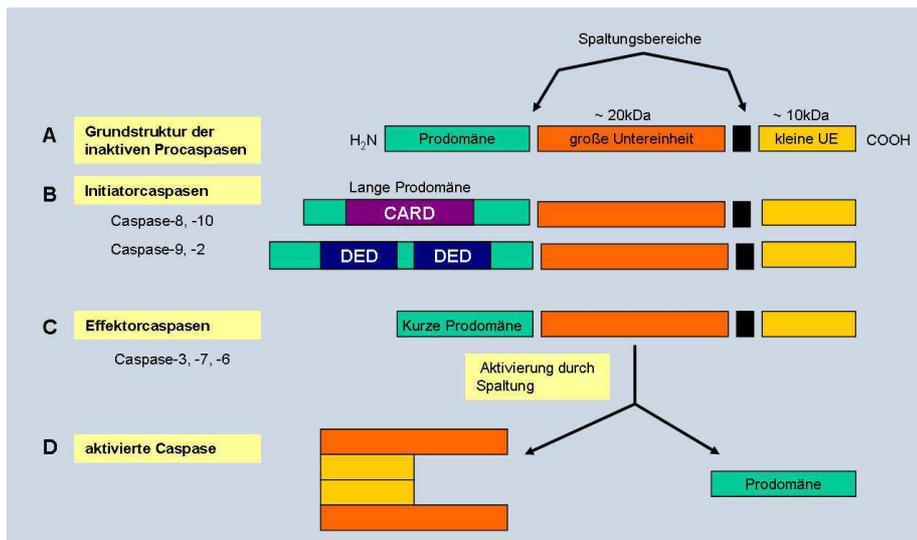


Abbildung 1: **Aktivierung von Caspasen durch limitierte Proteolyse.** A) zeigt die allgemeine Grundstruktur der Procaspasen, die als inaktives Vorläufer-Protein (Procaspase) synthetisiert werden. Sie bestehen aus Prodomäne (grün), großer Untereinheit von ca. 20 kDa-Größe (rot), kleiner Untereinheit (10 kDa) (gelb), sowie einem Verbindungspeptid (schwarz). Initiatorcaspasen (B) verfügen über eine lange Prodomäne mit CARD- oder DED-Sequenzmotiv, Effektorcaspasen über eine kurze Prodomäne (C). Nach Spaltung der Procaspase an zwei Stellen bei der Aminosäure Aspartat entsteht die aktive Caspase als tetramerer Komplex bestehend aus je 2 kleinen und 2 großen Untereinheiten (D).

(Modifiziert nach [22], [54] & [50].)

Die Initiatorcaspasen besitzen N-terminal eine längere Prodomäne, die mehr als 90 Aminosäuren umfasst und entweder das Strukturmotiv CARD („Caspase Recruitment Domain“) oder DED („Death Effector Domain“) beinhaltet (Abb. 1B). Diese Motive ermöglichen eine Interaktion mit Proteinen, beispielsweise Adapterproteinen oder anderen Initiatorcaspasen, die ebenfalls diese Sequenzen in ihrer Struktur aufweisen und begünstigen deren proteolytische Aktivierung [54]. Durch die aktivierende Spaltung weiterer Caspasen (Effektorcaspasen) bilden die innerhalb der Signaltransduktionskaskade eher upstream lokalisierten Initiatorcaspasen die Nahtstelle zwischen Triggerung und Exekution der Apoptosemaschinerie. Die verschiedenen Caspasen werden so nach der Auslösung des Selbstmordprogramms nacheinander in einer sich selbst amplifizierenden, proteolytischen Kaskade aktiviert [22]. Die Effektorcaspasen verfügen über eine kurze Prodomäne von 20 bis 30 Aminosäuren (Abb. 1D). Nach ihrer Aktivierung spalten sie, neben weiteren Procaspasen, spezifisch eine Reihe verschiedener zellulärer Proteine (Abb.2) [55], was schließlich zu den charakteristischen Veränderungen der Zelle unter der Apoptose führt [56].

1.2.5.2. Caspasensubstrate

Inzwischen wurden über 100 verschiedene Substrate der Effektorcaspasen identifiziert und die Zahl steigt weiter an. Zu den bereits identifizierten Substraten zählen Proteine des Zytoskeletts, wie Aktin [57] und das Aktin-assoziierte Protein Fodrin [58], deren Spaltung für die apoptose-typische Zellschrumpfung, das „Blebbing“ und die Formung der „Apoptotic Bodies“ verantwortlich gemacht wird. Eine weitere Funktion des Aktins, die in der Inhibition der DNase-I besteht, wird ebenfalls durch die Spaltung aufgehoben [59]. Weitere DNA-spaltende Proteine werden proteolytisch aktiviert. Die „Caspasen-Aktivierte Desoxyribonuklease“ CAD liegt intrazellulär als Komplex an seinen spezifischen Inhibitor DFF45/ICAD gebunden vor. Nach der Aktivierung von Caspase-3 wird ICAD gespalten, sodass CAD in den Zellkern gelangt und aufgrund seiner DNase-Aktivität die DNA fragmentiert [60]. Um die apoptose-typische DNA-Fragmentierung überhaupt erst zu ermöglichen, werden DNA-stabilisierende Proteine, wie Laminin B und Histon H1 gespalten [61]. Die Spaltung von Laminin führt durch den Verlust von Befestigungspunkten in der nukleären Matrix zum Kollaps des Chromatins [62], [63], [64].

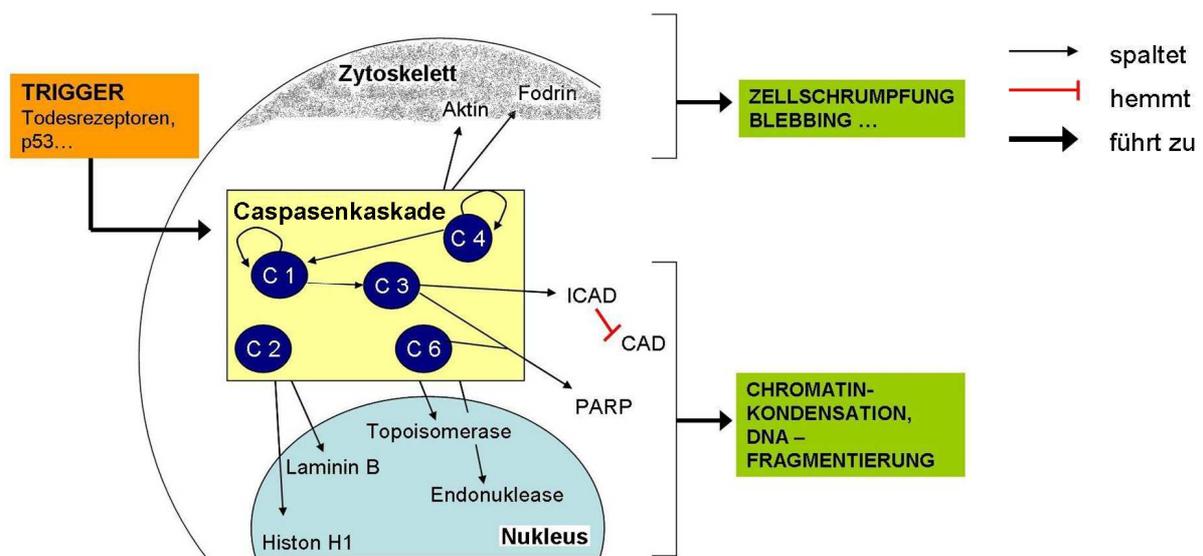


Abbildung 2: **Aktivierung von Caspasen und Caspasensubstraten.** Verschiedene Stimuli (p53, Ligandenbindung an Todesrezeptoren) führen zur Induktion der Apoptose über verschiedene Signalwege. Diese münden in der Aktivierung verschiedener Caspasen (C), die weitere Caspasen und verschiedene zelluläre Proteine spalten. Die Spaltung von Strukturproteinen, wie Aktin und Fodrin, führt zu Zellschrumpfung und Blebbing, Spaltung nukleärer Proteine, wie Endonukleasen und Topoisomerasen führen zu Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung.

(Modifiziert nach [65].)

Auch DNA-Reparaturmechanismen werden ausgeschaltet. PARP, die „Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase“, hat eine Größe von 116 kDa und wird während der Apoptose in Fragmente von

24kDa und 89 kDa gespalten. Es ist eines, der am besten untersuchten Substrate der Caspasen und wird oft als Indikator der induzierten Apoptose verwendet [66]. Die Funktion von PARP ist jedoch unklar, da auch PARP-negative Mäuse eine normale Entwicklung zeigen [67]. Mögliche apoptosefördernde Wirkungen der PARP-Spaltung könnten zum einen in der Dezimierung von NAD⁺-Vorräten, oder zum anderen in dem Verlust seiner Funktion bei der DNA-Reparatur liegen [68].

1.2.5.3. Signaltransduktionswege der Apoptose

Procaspasen werden kontinuierlich von allen gesunden Zellen produziert. Das Selbstmordprogramm ist dadurch zu jeder Zeit einsatzbereit, alles was fehlt ist ein adäquater Trigger zur Programmaktivierung [69].

1.2.5.3.1. Extrinsischer Aktivierungsweg

Im multizellulären Organismus dient die Apoptose unter anderem der Aufrechterhaltung der Homöostase. Zu diesem Zweck müssen extrazelluläre Signale, wie bestimmte Todessignale oder das Fehlen von Wachstumssignalen, ins Zellinnere übertragen werden und dort das Selbstmordprogramm initiieren können. Die Signaltransduktion ermöglichen spezielle Rezeptoren, die nach dem ersten entdeckten Rezeptor zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor(TNFR)-Superfamilie gezählt werden [70], [71], [72]. Einige Vertreter dieser Familie sind bereits gut untersucht (TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1/Fas), DR3 (APO-3, TRAMP), TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2), und DR6) [73]. Dabei ist der CD95-vermittelte Signalweg der am besten charakterisierte. Alle Rezeptoren der TNFR-Superfamilie verfügen extrazellulär über eine cysteinreiche Domäne. Intrazellulär besitzen sie eine ca. 80 Aminosäuren umfassende Sequenz, die als Todesdomäne ("Death Domain", kurz DD) bezeichnet wird [71]. Die Todesdomäne ermöglicht die Oligomerisierung der Rezeptoren nach Bindung des entsprechenden Liganden [74]. Dies führt zur Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle, die ebenfalls über eine Sequenz analog der Todesdomäne verfügen und darüber in der Lage sind mit den Rezeptoraggregaten zu interagieren. Beim CD95-Signalweg bindet das Fas-assoziierte Protein (FADD) an das Rezeptoraggregat. Das Rezeptor-interagierende Protein RIP ist in der Lage mit FADD und anderen Adapterproteinen zu interagieren, wodurch Quervernetzungen ermöglicht werden [75]. Dadurch gewährleisten die Adaptermoleküle zum einen die eigentliche Signaltransduktion, führen zum anderen aber auch zu einer Verstärkung des apoptotischen Signals [75]. Deletionsanalysen mit dominant-negativen Mutanten von FADD, denen die Todes-Effektordomäne (DED) fehlt, zeigten, dass die Todesdomäne (DD) zur Assoziation mit CD95

nötig ist, nicht aber um die Apoptose auszulösen. Dafür verantwortlich ist ein weiteres N-terminales Areal, die „Death effector domain“ DED [76]. Getriggert durch die Rezeptoroligomerisierung führt die Rekrutierung und Interaktion der verschiedenen Adapterproteine schließlich zur Bildung eines multimolekularen Komplexes, dem „Death-inducing signaling complex“, kurz DISC, einem ausschlaggebenden Ereignis der rezeptorvermittelten Signaltransduktion [77], [78], [79], [80]. Neben den Rezeptoraggregaten und Adaptermolekülen befindet sich in diesem Komplex ein weiteres entscheidendes Protein. Dieses Protein besitzt N-terminal eine Domäne homolog zur „Death Effector Domain“ (DED) von FADD, sowie eine C-terminale Domäne analog der ICE-Proteasen-Struktur. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde es FLICE (FADD-like ICE, von anderen Arbeitsgruppen MACH bzw. Mch5) genannt [81], [82]. Später identifizierte man dieses Protein als Caspase-8 [47] und fand somit das verbindende Element zwischen der Rezeptoraktivierung und der Initiierung der Caspasenkaskade [83].

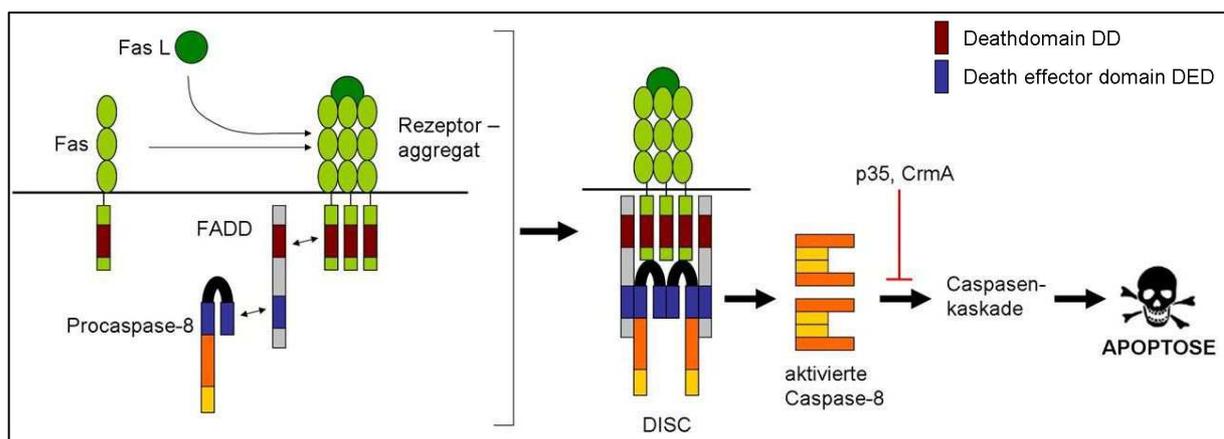


Abbildung 3: **Extrinsischer Pathway.** Nach Bindung des Liganden FasL an den Rezeptor CD95 (APO1/Fas) kommt es zur Oligomerisierung des Rezeptors, zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine (FADD) und über Protein-Protein-Wechselwirkungen via DD und DED zur Bildung des DISC. Die dadurch ermöglichte autokatalytische Aktivierung der Caspase-8 bringt die Caspasenkaskade in Gang und führt zum Tod der Zelle. (Modifiziert nach [55], [84] & [73].)

Die Bindung von Caspase-8 innerhalb des DISC führt vermutlich zu Strukturveränderungen, welche die autokatalytische Spaltung der Caspase-8 begünstigen [85]. Auch die Konzentration an Caspasen fördert ihre autokatalytische Aktivität. *In vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, dass Caspase-8 direkt die Caspasen-3, -4, -7, -9 und -10 spaltet, während Caspase-2 und -6 indirekt aktiviert werden [86]. Die Abbildung 3 gibt einen schematischen Überblick über die beschriebenen Vorgänge und beteiligten Moleküle des extrinsischen Signalweges. Die

eigentliche Exekution der Apoptose wird beim extrinsischen Signalweg, wie bereits erläutert, nach Aktivierung der Caspasenkaskade [44] durch die Effektorcaspasen vermittelt [87].

1.2.5.3.2. Intrinsischer Aktivierungsweg

Ein zweiter, gut charakterisierter Aktivierungsweg ist der sogenannte intrinsische Signalweg. Die präformiert vorliegenden Procaspasen werden dabei unabhängig von Signalen von der Zelloberfläche infolge von intrazellulärem Stress oder zellulärer Schädigung aktiviert. Zusätzlich dient er der Verstärkung des extrinsischen Signalweges. Im Mittelpunkt dieses Signaltransduktionsweges stehen die Mitochondrien, die als universelle, intrazelluläre Stress-Sensoren wirken und den Tod der Zelle über verschiedene Mechanismen begünstigen. Zu diesen Mechanismen zählen die Unterbrechung der mitochondrialen Energiegewinnung (1), die Freisetzung proapoptotischer Faktoren (2) und die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (3) [88], [89].

Das mitochondriale Membranpotential, aufrechterhalten durch einen kontinuierlichen, energieverbrauchenden Elektronentransport, ist unerlässlich für die Funktion der Mitochondrien als Energiekraftwerke der Zelle [89]. Darüber hinaus dient es in der Kaskade der biochemischen Ereignisse, die zur Apoptose führen als zentraler Kontrollpunkt. Bei einer Vielzahl apoptotischer Szenarien, wie auch bei verschiedenen Erkrankungen, wie AIDS [90], septischem Schock [91] oder Leukämien, wurde eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) nachgewiesen [92], [35], [93]. Daher wird die Detektion der Potentialänderung vielfach als Surrogatparameter für den Nachweis von Zelltod *ex vivo* verwendet [5], [94], [95]. Im Ablauf der Apoptose erklärt man sich den Zusammenbruch des Membranpotentials mit der Bildung transmembranärer Poren, die als „Permeability Transition Pore“ (PTP) bezeichnet werden. Diese Kanäle formen sich aus einem inneren Membranprotein, wie dem „Adenin Nukleotid Translokator“ (ANT), und einem äußeren Membranprotein, wie dem „Voltage-dependent Anion Channel“ (VDAC) [45] und ermöglichen die Passage von Molekülen $\leq 1,5$ kDa [96]. Infolgedessen kommt es zum Ionenausgleich, zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Entkopplung der Atmungskette mit konsekutivem ATP-Abfall. Durch die intramitochondriale Hyperosmolarität kommt es zum Wassereinstrom mit anschließendem Schwellen des Mitochondriums und zur Ruptur der mitochondrialen Membran. Es konnten verschiedene Stimuli identifiziert werden, die zur PTP-Bildung führen: darunter das Bcl-2-Protein Bax [97], eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration [98], ROS [99], Sphingolipide [100], sowie genotoxischer Stress. Auch Caspasen und andere Proteasen induzieren die PTP-Formung und ermöglichen so eine sich amplifizierende feed-forward

Schleife [88]. Infolge der PTP-Formung gelangen spätestens zum Zeitpunkt der Membranruptur proapoptische, mitochondriale Faktoren ins Zytoplasma, die sowohl caspasenabhängige als auch caspasenunabhängige katabole Prozesse initiieren. Einer dieser Faktoren ist Cytochrom c. Dieses Protein ist im intermembranären Raum der Mitochondrien lokalisiert und dort maßgeblich für den Aufbau des Elektronengradienten verantwortlich. Gemeinsam mit einem weiteren wichtigen Cofaktor, (d)ATP, gelangt Cytochrom c ins Zytoplasma und bindet dort das Protein Apaf-1 (“Apoptotic Protease-Activating Factor 1”). Bei Apaf-1, dem humanen Äquivalent des Ced-4-Genproduktes des Fadenwurms *C. elegans* [101], demaskiert sich unter Anwesenheit von ATP und Cytochrom c infolge einer Konformationsänderung eine N-terminal lokalisierte CARD-Sequenz [102], die zur Rekrutierung und Bindung der Procaspase-9 führt [103]. Apaf-1, Cytochrom c, (d)ATP und Procaspase-9 formen unter ATP-Verbrauch einen heptameren Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird [104], [105].

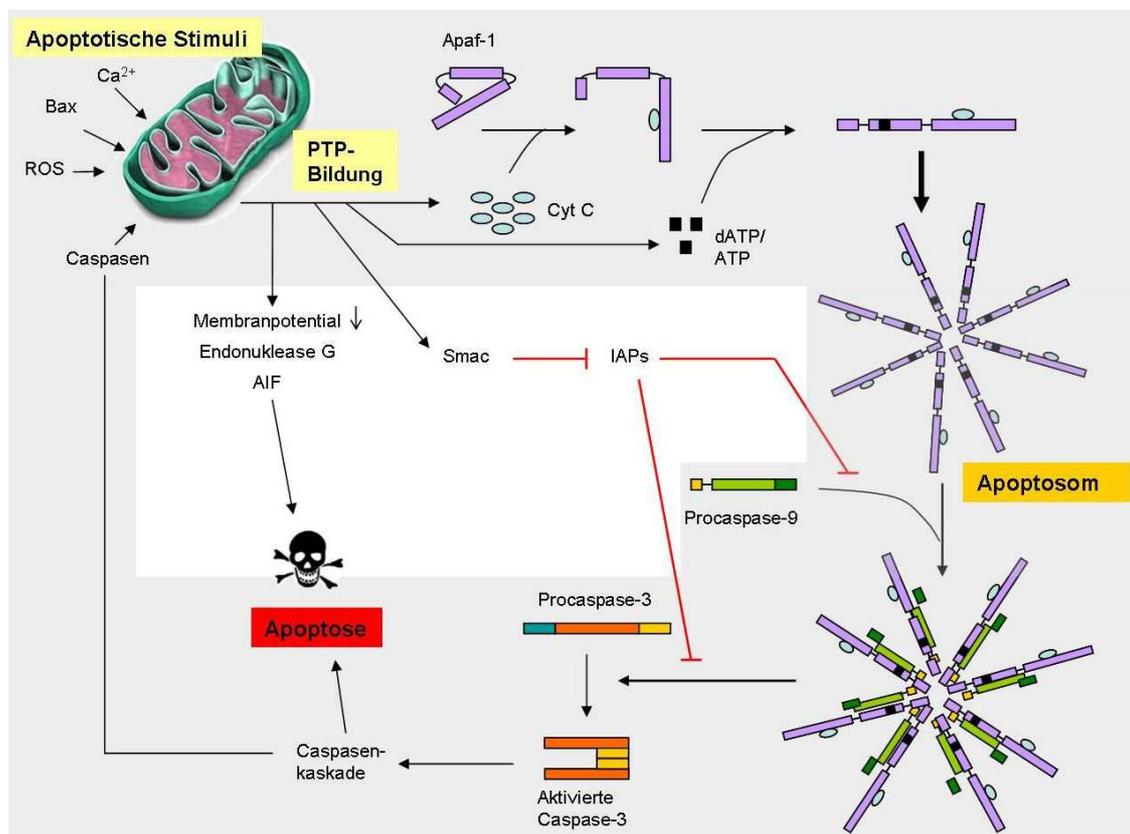


Abbildung 4: **Intrinsischer Pathway**. Schematische Darstellung des mitochondrialen Signaltransduktionsweges (grau unterlegt). Apoptotische Stimuli, wie Bax, ROS, eine erhöhte Calciumkonzentration oder Caspasen, führen über die Bildung von Poren (PTP) zur Freisetzung von Cytochrom c und ATP, die durch Bindung an Apaf-1 das Apoptosom formen. Nach Rekrutierung und Aktivierung der Procaspase-9 durch das Apoptosom wird infolge einer Caspase-3-Spaltung die Caspasenkaskade in Gang gesetzt, die zur Apoptose führt. Weitere aus den Mitochondrien freigesetzte Moleküle, die proapoptotisch wirken sind Endonuklease G, AIF und Smac.

(Modifiziert nach [106].)

Die primäre Funktion des Apotosoms liegt in der Rekrutierung der Procaspase-9 und ihrer autokatalytischen Spaltung zur katalytisch aktiven Caspase [103]. Darüber hinaus wird durch die Komplexierung der Procaspase im Apotosom die Aktivität der Caspase-9 um das 1000-fache gesteigert. Man geht davon aus, dass Caspase-9 und Apaf-1 eine Art Holoenzym bilden, bei dem die Caspase als katalytische Untereinheit und Apaf-1 als allosterischer Regulator fungieren [107]. Der Cytochrom c-Release erzielt neben der Aktivierung gleichzeitig eine Amplifizierung der Caspasenkaskade, so dass die Geschwindigkeit und die Effizienz der Apoptoseinduktion erhöht werden [22].

Ein weiterer apoptosefördernder Faktor, der aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, ist das 25 kDa große Protein Smac (DIABLO). Durch die Abspaltung einer N-terminalen Prodomäne kommt ein Strukturmotiv zum Vorschein (Ala-Val-Pro-Ile), das Wechselwirkungen mit Apoptoseinhibitoren ermöglicht und dadurch fördernd auf den Fortgang der Apoptose wirkt [108], [109]. Diese Interaktion wird genauer im Abschnitt der IAP-Proteine (Abschnitt 1.2.6.2.) besprochen. AIF, der „Apoptosis Inducing Factor“, ist ein 57 kDa großes Flavoprotein, das ebenfalls im intermembranären Spalt lokalisiert ist. Aus dem Mitochondrium freigesetzt gelangt es in den Nukleus und bewirkt caspasenunabhängig eine Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung [110]. Die Endonuklease G, eine Nuklease relevant für die mitochondriale DNA-Replikation wird ebenfalls ins Zytoplasma ausgeschüttet und führt unanhängig von Caspasen zur DNA-Fragmentierung [111].

Die Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über die beschriebenen Vorgänge und beteiligten Moleküle des intrinsischen Signalweges.

1.2.5.3.3. ROS

Eine weitere, wichtige Gruppe von Molekülen, die im Verlauf der Apoptose vermehrt auftreten und die Apoptosedurchführung zu begünstigen scheinen, sind die reaktiven Sauerstoffradikale, auch kurz ROS („Reactive Oxygen Species“) genannt [112]. Im Zuge des aeroben Zellstoffwechsels kommt es kontinuierlich zur Produktion dieser reaktiven Sauerstoffmetabolite. Besonders intramitochondrial entstehen bei der Energiegewinnung durch den Elektronentransfer Superoxide. ROS-Moleküle verfügen meist über ein oder mehrere ungepaarte (freie) Elektronen, aufgrund derer sie die starke Tendenz haben einem potenziellen Reaktionspartner ein zweites Elektron zu entziehen, um eine höhere chemische Stabilität zu erreichen. Dadurch sind sie sehr reaktionsfreudig und verfügen über ein enormes destruktives Potential. In Abbildung 5 wird eine Übersicht über die ROS-Moleküle dargestellt.

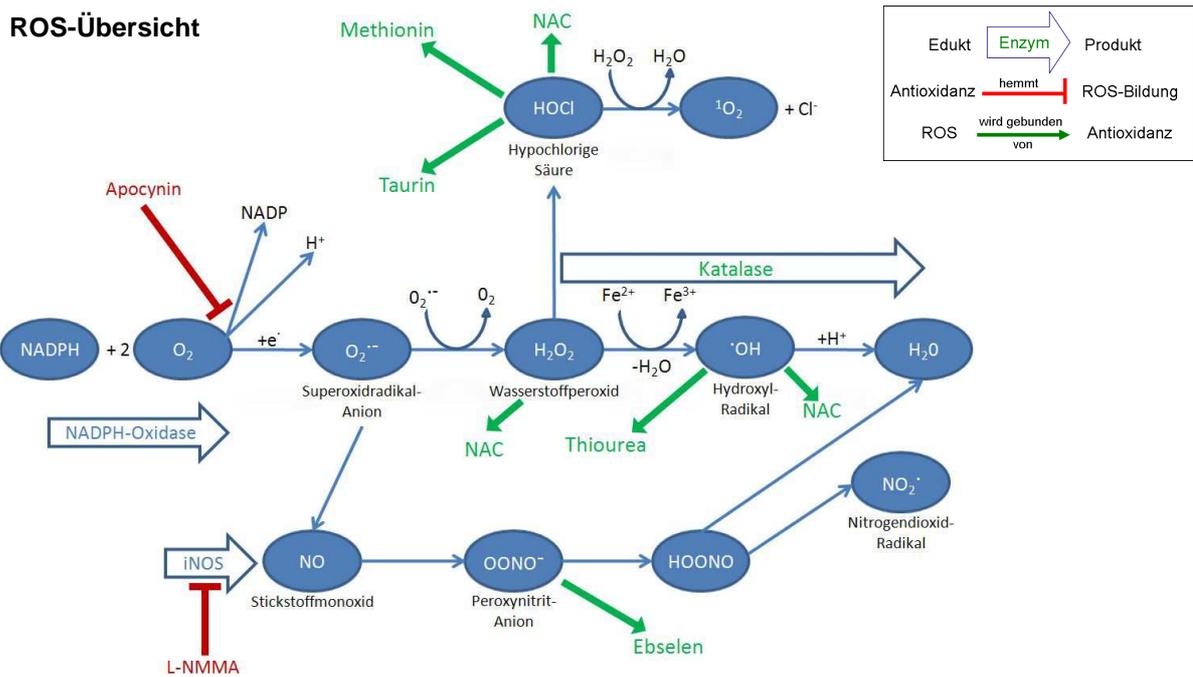


Abbildung 5: **ROS-Schema.** Dargestellt sind Moleküle der ROS mit entsprechenden Antioxidantien (zur Verfügung gestellt von Laura Wagner, Charité, Berlin).

Um der schädigenden Wirkung der Sauerstoffradikale entgegenzuwirken ist die Zelle mit einem umfangreichen antioxidativem Verteidigungssystem ausgestattet. Beispielfhaft seien die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD), Glutathion-peroxidase und Katalase genannt.

Entstehen trotz der enzymatischen Schutzmechanismen ROS-Moleküle in einem Übermaß erzeugen sie durch ihre destruktive Reaktionsfreude oxidativen Stress, der zur Auslösung des programmierten Selbstmordprogrammes führen kann. In der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie AIDS, Morbus Huntington, Parkinson oder Alzheimer, wird dem oxidativen Stress eine wichtige Rolle zugeschrieben [99], [113].

1.2.6. Regulationsmechanismen

Das Selbstmordprogramm ist ein wichtiger Bestandteil der Homöostase des Organismus und ein unabdingbarer Bestandteil seiner Lebensfähigkeit. Dennoch darf sie nicht leichtfertig ausgeführt werden. Zur Kontrolle der Apoptoseaktivität gibt es eine Reihe komplexer Kontrollmechanismen.

1.2.6.1. Bcl-2-Proteine

Eine Hauptklasse von apoptoseregulierenden Molekülen bilden die Proteine der Bcl-2-Familie [114]. Diese Proteinfamilie findet sich durch die Evolution hinweg hochgradig konserviert vom

Wurm bis zum Menschen: das Genprodukt von Ced-9 des *C. elegans* entspricht dem humanen Protein Bcl-2 [115], [116]. Unter den Bcl-2-Proteinen befinden sich sowohl apoptosehemmende Vertreter, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, ebenso wie proapoptotisch wirksame Mitglieder, wie Bax, Bad und Bid [117]. In ihrer Sequenz verfügen alle Proteine der Bcl-2-Familie über mindestens eine von vier konservierten Motiven, die als „Bcl-2-homologe Domänen“ (BH1 – BH4) bezeichnet werden. Apoptoseinhibierende Vertreter besitzen zumeist, wie Bcl-2, alle vier Sequenzen (BH1-BH4), mindestens jedoch die Domänen BH1 und BH2. Darüber hinaus werden zwei proapoptotisch wirkende Subfamilien hinsichtlich ihrer Funktion und der enthaltenen BH-Domänen unterschieden. Die Proteine Bax, Bak, und Bok (auch Mtd genannt) enthalten die Domänen BH1, BH2 und BH3, ähneln Bcl-2 also noch weitestgehend, und werden auch als Multidomänen- oder Effektorproteine bezeichnet [118]. In der zweiten Subgruppe finden sich Vertreter, die lediglich die BH3-Domäne in ihrer Struktur aufweisen und daher als „BH3-only“-Proteine bezeichnet werden [119]. Diese Subgruppe kann weiter in „Aktivatoren“ und „Sensibilisatoren“ unterschieden werden [120]. Die BH3-only Proteine fungieren unter anderem upstream als Wachposten zellulärer Schädigungen [118]. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der Unterteilung der Bcl-2-Proteine.

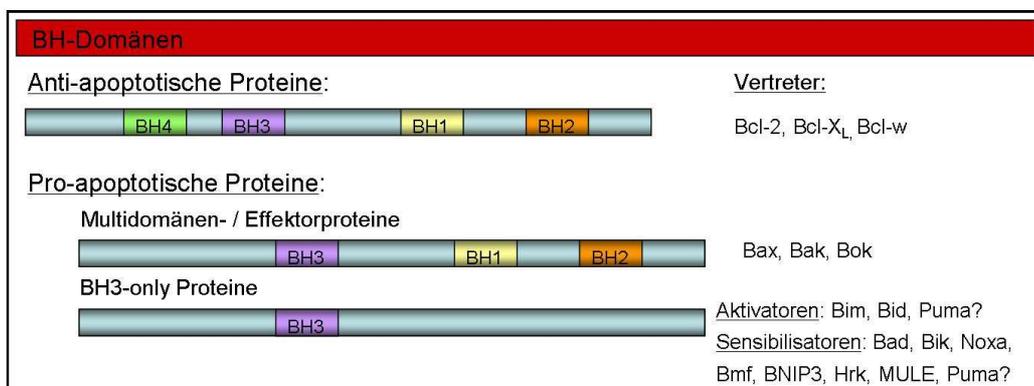


Abbildung 6: **Struktur der Proteine der Bcl-2-Familie.** Alle Mitglieder der Bcl-2-Familie besitzen mindestens eine von vier „Bcl-2-homologe Domänen“ (BH-Domänen 1-4). Antiapoptotisch wirkende Vertreter besitzen meist alle 4 Domänen (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w), mindestens BH1 und BH2. Proapoptotisch wirksame Proteine verfügen entweder über die Domänen BH1-BH3, oder nur die BH3-Domäne. Letztere lassen sich weiter in Sensibilisatoren und Aktivatoren unterteilen.

(Modifiziert nach [118]).

Die Mechanismen der Apoptoseregulation durch Bcl-2-Proteine sind vielfältig und komplex [121], [115]. Eine wichtige Rolle kommt dabei zweifelsohne der Protein-Protein-Wechselwirkung zu. Über die BH-Domänen können die verschiedenen Bcl-2-Proteine

miteinander interagieren, Komplexe aus Homo- und Heterodimeren bilden und sich so wechselseitig in ihrer Funktionsausübung beeinflussen [122], [123], [124]. Dabei gibt es relativ einfache Mechanismen, bei denen infolge der Bindung eines Bcl-2-Proteins an ein anderes, sei es ein Apoptosuppressor oder -promotor, das gebundene Protein in seiner Funktionsausübung inhibiert wird. Antiapoptotisch wirkende Proteine, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w und Bfl-1, binden und hemmen proapoptotische Proteine, wie die BH3-only Aktivatorproteine, Bax und Bak, mit einer hohen Affinität [118]. Andersherum treten BH3-only-Proteine in Wechselwirkung mit antiapoptotischen Vertretern und wirken durch die verhinderte Inhibierung der proapoptotischer Proteine letztendlich proapoptotisch. So bindet Bad selektiv Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w. Bim, Bid und Puma sind dagegen in der Lage alle antiapoptotischen Vertreter durch Bindung zu hemmen [118]. Es gibt aber auch komplexere Mechanismen der Molekülinteraktion. Es konnten Komplexe aus Suppressoren und Promotoren nachgewiesen werden, die ihre jeweiligen Funktionen inhibieren, sodass die entstehende Suppressor-Promotor-Relation die Empfindlichkeit der Zelle zur Apoptoseinduktion determiniert [125], [121]. Auch andere zelluläre Moleküle werden durch Bcl-2-Proteine gebunden, dadurch an der Interaktion mit ihrem entsprechenden Target gehindert und so in ihrer Funktionalität inhibiert. Durch Bindung an Apaf-1 blockiert Bcl-X_L die Bindung der Procaspase-9 an Apaf-1. Auf diese Weise wird die Bildung des Apoptosoms und konsekutiv die Aktivierung der Caspasen verhindert, wodurch Bcl-X_L antiapoptotisch wirkt [126]. Ein weiterer Wirkmechanismus der Bcl-2-Proteine liegt in der Modulation der Freisetzung proapoptotisch wirkender Faktoren. Bcl-2 konnte an der äußeren Membran von Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und der nukleären Membran lokalisiert werden. Dort ist es in der Lage Schäden in dem jeweiligen Kompartiment zu registrieren und die Freisetzung apoptosefördernder Faktoren, wie den Apoptose-induzierenden Faktor AIF, zu fördern [117], [127], [128]. Nach Aktivierung von Bax und Bak kommt es zur Bildung von Homo-Oligomeren und zur Formung der bereits beschriebenen PTP [129], durch welche proapoptotische Moleküle, wie Smac und Cytochrom c, ins Zytoplasma gelangen. Darüber hinaus scheinen antiapoptotisch wirkende Vertreter die Bildung mitochondrialer Sauerstoffintermediate zu verhindern und die Calciumhomöostase zu modifizieren [115].

Die Aktivität der Bcl-2-Proteine wird durch die bereits beschriebenen Wechselwirkungen untereinander reguliert. Das Verhältnis von Apoptoseinhibitoren zu -promotoren bestimmt die Sensibilität der Zelle zur Apoptoseinduktion. Eine verstärkte oder verminderte Transkription der kodierenden Gensequenzen verlagert das Inhibitor-Promotor-Gleichgewicht auf die eine oder andere Seite. Unter dem Einfluss von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Überlebenssignalen verschiedener Level wird die Transkription überlebensfördernder Gene

hochreguliert [130], [131]. Desweiteren wird die Aktivität der Bcl-2-Proteine auch posttranslational modifiziert. Bad wird so zum Beispiel durch seine Dephosphorylierung aktiviert [132]. Auch Caspasen sind an der Aktivierung der Bcl-2-Proteine beteiligt. Wird der im Zytoplasma lokalisierte Apoptosepromotor Bid (BH3-Interacting-Domain Death Agonist) proteolytisch von Caspase-8 gespalten, entsteht das aktive Fragment tBid (truncated Bid), das den Cytochrom c-Release triggert und dadurch proapoptotisch wirkt. Die Spaltung von Bid stellt eine Verbindung von extrinsischem und intrinsischem Signalweg dar. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass auch andere Moleküle die Fähigkeit der Bid-Aktivierung besitzen: andere Caspasen, wie Caspase-3, andere Proteasen, wie Granzym B und lysosomale Proteasen [133], [134], [135]. Bid dient demnach generell als Integrator und Verstärker verschiedener apoptotischer Stimuli. Infolge der proteolytischen Spaltung von Bcl-2 durch Caspasen wird dagegen seine apoptosehemmende Funktion aufgehoben. Auf diese Weise kommt es zu einer Verschiebung des Bcl-2-Gleichgewichtes zugunsten der Apoptose. Dadurch wird die Apoptose überhaupt erst ermöglicht und zusätzlich in ihrer Ausführung verstärkt.

1.2.6.2. „Inhibitor of apoptosis“-Proteine

Die IAP, „Inhibitor of Apoptosis“-Proteine, sind eine wichtige Familie von Proteinen, die als intrinsische Regulatoren vor allem die Aktivität der Caspasen maßgeblich beeinflussen [136]. IAPs sind in der Lage den Zelltod auch nach Aktivierung der Caspasenkaskade zu verhindern, unabhängig davon, ob er durch extrinsische oder intrinsische Trigger induziert wurde [137], [138], [73]. Die IAPs sind die einzigen endogenen Proteine, die es vermögen sowohl Initiatorcaspasen (Caspase-9), als auch Effektorcaspasen (Caspase-3 und -7) zu hemmen.

Neben der Caspaseninhibition umfassen die Funktionen der IAP-Proteine die Regulation des Zellzyklus sowie die Modulation der rezeptorvermittelten Signaltransduktion. Nach ihrer erstmaligen Entdeckung beim Baculovirus [73] wurden inzwischen acht humane Mitglieder der IAP-Familie identifiziert: NIAP (BIRC1/NLRB), c-IAP1 (human IAP2/BIRC2), c-IAP2 (human IAP1/BIRC3), X-linked IAP (X-IAP/BIRC4), Survivin (BIRC5), Livin (melanoma-IAP/BIRC7/KIAP), Testis-spezifisches IAP (Ts-IAP/hILP-2/BIRC8) und Apollon (baculoviral IAP repeat (BIR)-containing ubiquitin-conjugating enzyme /BIRC6) [139], [140], [141], [142], [143], [144]. Abbildung 7 gibt einen Überblick über die Vertreter der IAP-Familie mit ihren Sequenzmotiven und Funktionalitäten.

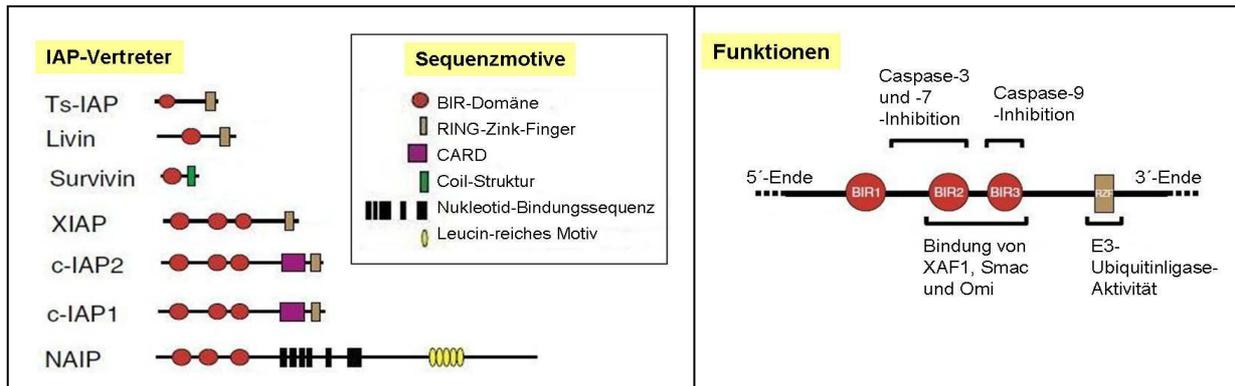


Abbildung 7: **Die IAP-Familie.** Acht humane IAP-Familienmitglieder wurden identifiziert: NIAP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, Survivin, Livin, Testis-spezifisches IAP (Ts-IAP) und Apollon (hier nicht dargestellt). Die jeweiligen Proteine weisen in ihrer Struktur verschiedene Sequenzmotive auf, die den Proteinen unterschiedliche Wechselwirkungen ermöglichen. Über die BIR-Domäne, die die Familienzugehörigkeit definiert, werden die Caspaseninhibition und die Bindung proapoptotischer Faktoren, wie XAF1, Smac und Omi, ermöglicht. Die zweite wichtige Funktion der Ubiquitinierung wird durch die RING-Zink-Finger-Struktur vermittelt. Weitere Struktur motive sind: die CARD-Sequenz, Coil-Struktur, Nukleotid-Bindungssequenz, sowie eine Leucin-reiche Domäne.
(Modifiziert nach [147].)

Für die Familienzugehörigkeit definierend ist die Existenz einer 70-80 Aminosäuren umfassenden Domäne, der „Baculovirus IAP Repeat“ (BIR)-Domäne. Die BIR-Domäne besteht aus einer charakteristischen Cystein- und Histidinreichen Sequenz, die im gefalteten Protein mit Zinkionen Komplexe bildet. Die humanen IAP-Vertreter besitzen mindestens eine (Survivin, Livin, Apollon Ts-IAP), maximal drei BIR-Domänen (NIAP, cIAP1, cIAP2, XIAP). Diesem Strukturmotiv wird die Fähigkeit zur direkten Interaktion mit den Caspasen zugeordnet, wobei sich die Inhibitionsmechanismen abhängig von den Caspasen und BIR-Domänen noch weiter unterscheiden [145], [146], [147]. Die BIR2-Domäne ist in der Lage die Effektorcaspasen Caspase-3 und -7 zu hemmen. Dabei scheint eine proximal der BIR2-Domäne gelegene „Linker“-Domäne ebenso relevant wie die eigentliche BIR-Domäne [148], [149], [150]. Im BIR2-C3-C7-Komplex erstreckt sich die Linker-Domäne über die aktiven Zentren der Caspasen und verhindert so die Substratbindung infolge sterischer Behinderung. Zur Hemmung der Aktivität der Caspase-3 scheint dies zu genügen. Für die Inhibition der Caspase-7 bedarf es zusätzlich der BIR2-Domäne, um eine ausreichende Stabilisierung der Interaktion zu gewährleisten [151]. Die BIR3-Domäne von XIAP, c-IAP1, c-IAP2 [152], [153] und die single-BIR-Domänen von Livin [154] und Ts-IAP [155] vermitteln die Caspase-9-Inhibition. Dabei

vermag die BIR3-Domäne sowohl die ungebundene, inaktive, als auch die bereits im Apoptosom gebundene Caspase-9 zu inhibieren [156].

Zusätzlich zur BIR-Domäne weisen alle IAP-Proteine, außer Survivin, weitere funktionelle Domänen in ihrer Struktur auf. Einige IAPs besitzen eine “Caspase Activating and Recruitment Domain” (CARD), die Protein-Protein-Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen mit Relevanz für die Zellzyklusregulation ermöglicht [157]. Die C-terminal lokalisierte RING-Zink-Finger-Struktur (RZF) dient als Adaptermolekül zur Bindung von Targetproteinen in einem Multikomponentenkomplex und besitzt E3-Ubiquitinligaseaktivität [147]. Dadurch können Caspasen [158] und sekundäre, mitochondriale Caspasenaktivatoren, wie Omi oder Smac/Diablo [159], [160] durch Bindung von Ubiquitin markiert und anschließend im Proteasom abgebaut werden [161].

1.2.7. Apoptose vs. Nekrose

Der Zelltod kann auf verschiedene Art und Weise eintreten. Dabei werden in der Literatur vor allem 2 Formen gegenübergestellt: Apoptose und Nekrose [162].

Die Apoptose wird als zellulärer Prozess aktiv von der betreffenden Zelle selbst durchgeführt. Ultrastrukturell ist sie gekennzeichnet von Zytoplasmaschrumpfung, Erhalt der Membranintegrität, Abwesenheit einer Entzündungsreaktion, kondensiertem, randständigen Chromatin im Zellkern, oligonukleosomaler DNA-Fragmentation sowie finaler Zelldesintegration durch Zytoplasmafragmente (Apoptotic bodies) [38] (Abb. 8).

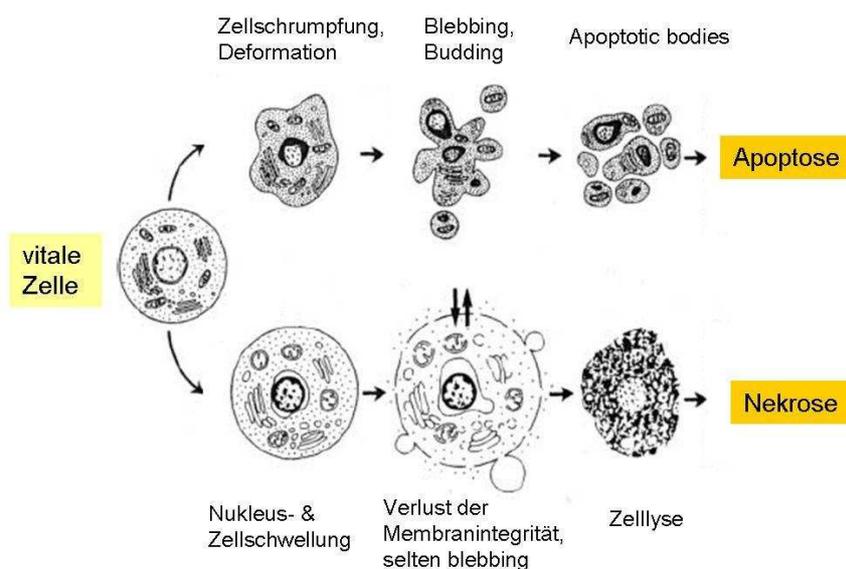


Abbildung 8: **Morphologie der Apoptose und Nekrose.**

Modifiziert nach [28], [163].

Die Nekrose wird dagegen als relativ unkontrollierter Prozess betrachtet, der unspezifisch auf eine Zellschädigung von außen, beispielsweise durch traumatische Beschädigung oder nach Exposition hoher Konzentrationen toxischer Substanzen, ausgelöst wird. Irreversible Schädigung der Plasmamembran mit Verlust der Membranintegrität, mitochondriale Dysfunktion und Zellyse charakterisieren den nekrotischen Zelltod (Abb. 8). Die Nekrose geht mit einer inflammatorischen Begleitreaktion einher, da infolge der Zellschwellung die Plasmamembran rupturiert und Zytoplasma sowie Zellorganellen in den Extrazellulärraum gelangen, die durch freigesetzte Zytokine zu einer lokalen Entzündungsreaktion führen [164].

Im Vergleich zur Apoptose scheint die Nekrose weniger durch biochemische Prozesse kontrolliert und reguliert zu sein. Dennoch werden auch für den nekrotischen Zelltod zunehmend Aktivierungs- und Regulationsmechanismen ebenso wie Verknüpfungen zwischen beiden Zelltodesformen identifiziert. Abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle kann ein Stimulus entweder Apoptose oder Nekrose induzieren. Die Aktivierung von Todesrezeptoren führt meist zum Tod durch Apoptose, kann aber auch in den nekrotischen Zelltod münden [73]. Bei beiden Formen des Zelltodes zeigt sich ein dramatischer Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), was darauf hindeutet, dass das Mitochondrium bei beiden Mechanismen eine entscheidende Rolle spielt. Auch ein Wechsel von einer Form des Zelltodes zur anderen ist möglich. Dafür entscheidende Faktoren scheinen das ATP-Level sowie die Anzahl verfügbarer Caspasen zu sein. Einige Autoren gehen davon aus, dass nach einer ausreichenden zytotoxischen Schädigung jeglicher Art zunächst das apoptotische Selbstmordprogramm eingeleitet wird. Ist die Schädigung jedoch zu groß oder die zelluläre Energieversorgung unzureichend geht die Zelle nekrotisch zugrunde [4].

Im Vergleich zur Nekrose ist die Apoptose die häufigere Form des Zelltods. Neben der Apoptose und Nekrose gibt es noch eine Reihe weiterer Zelltodesarten: Onkose, Pyroptose [165], Seneszenz, Autophagie und die mitotische Katastrophe [28]. Auch der Begriff der „Nekroptose“ existiert inzwischen als Bezeichnung für die regulierte Nekrose [166].

Im Rahmen dieser Arbeit wird vereinfacht jeder Zelltod, der nicht durch Apoptose erfolgt als Nekrose betrachtet.

1.2.8. Apoptose in der Therapie maligner Erkrankungen

Chemotherapeutika sind Wirkstoffe mit verschiedenen Angriffspunkten auf zellulärer Ebene. Meist führen sie durch Eingriffe in den Zellzyklus der Tumorzelle zum Zelltod durch Induktion der Apoptose [167]. Chemotherapiesensitive Tumore zeichnen sich häufig durch schnelles Wachstum aus. Beim Burkitt-Lymphom, mit einer Tumorverdopplungszeit von ca. 1 bis 1,5 Tagen, zeigt sich so ein deutlich besseres Chemotherapieansprechen als beispielsweise bei einem Bronchialkarzinom, das mit einer Tumorverdopplungszeit von ca. 80 bis 90 Tagen kaum durch Chemotherapie heilbar ist. Dies weist darauf hin, dass wachstumskinetische Aspekte der Tumorzellen für die Tumorchemotherapie, die in den Ablauf des Zellzyklus vor allem proliferierender Zellen eingreift, von großer Bedeutung sind [12]. Auch die Apoptosesensibilität des gesunden Gewebes, dem der Tumor entstammt, korreliert mit der Chemotherapiesensibilität des Tumors. Knochenmarkszellen, die zu den Erneuerungsgeweben mit hohem Proliferationsumsatz gehören, reagieren sensibel auf eine Apoptoseinduktion, sodass bei hämatologischen Krebserkrankungen der Apoptoseinduktion für den Therapieerfolg eine große Bedeutung zukommt [168]. Gleichzeitig ist gerade aufgrund dieser ausgeprägten Apoptosesensibilität die chemotherapieinduzierte Knochenmarksdepression häufig der limitierende Faktor in der Therapie anderer Tumore. Mit wachsendem Verständnis der molekularen Grundlagen der „Fehlfunktionen der Tumorzelle“ können spezifische Angriffspunkte für neue Zytostatika identifiziert werden. So hofft man durch den Angriff auf definierte molekulare Angriffspunkte (z.B. abnorme Signalproteine) eine höhere Selektivität der Zytostatika zu erzielen, um dadurch Nebenwirkungen zu mindern und Resistenzen zu umgehen [169], [170], [171].

1.2.8.1. Therapieresistenz

Es gibt verschiedene Ursachen, die zu einem Wirkungsverlust eines Zytostatikums und damit zu einer Chemotherapieresistenz führen können. Der Wirkungsverlust kann auftreten, wenn die optimale Dosis aufgrund zu starker unerwünschter Wirkungen nicht gegeben werden kann. Auch wenn das Zytostatikum das Körperkompartiment, in dem sich der Tumor befindet, nicht erreichen kann, ist als Folge die Ausbildung einer pharmakokinetischen Resistenz möglich. Spezifische zelluläre Resistenzmechanismen können infolge von Mutation und Selektion von resistenten Tumorzellen unter der Therapie entstehen. Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über mögliche Ursachen zellulärer Resistenz [12].

Spezielle Transmembranproteine verhindern durch aktives Ausschleusen verschiedener Zytostatika aus der Krebszelle heraus, dass die Chemotherapeutika an ihre Targets im Zellinneren binden können. Zu diesen sogenannten "Multiple Drug Resistance" (MDR)-Proteinen, die Resistenzen gegen viele Medikamente verursachen können, gehören das Glykoprotein P-170, ein "ATP-binding cassette" (ABC)-Transporter und die MDR assoziierten Proteine (MRP) [172], [173], [174].

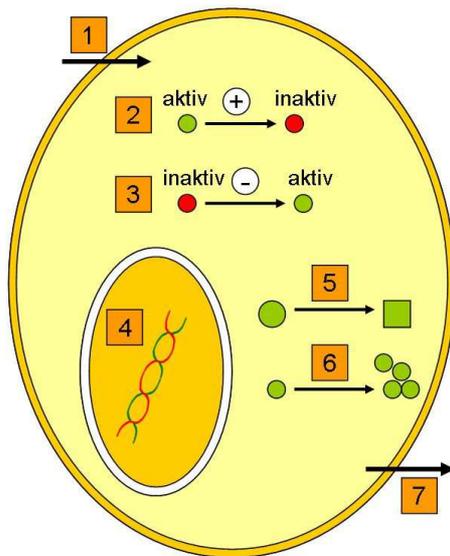


Abbildung 9: **Übersicht möglicher zellulärer Resistenzmechanismen.** Eine Zytostatikaresistenz kann erzielt werden durch: (1) verminderte Zytostatika-aufnahme (z.B. durch den Folattransporter bei Methotrexat), (2) verstärkte Inaktivierung des Zytostatikums (z.B. bei Überexpression der Bleomycin-Hydrolase), (3) verminderte Aktivierung des Zytostatikums (v.a. bei Antimetaboliten), (4) verstärkte DNA-Reparatur (z.B. bei Alkylantien), (5) Hemmung der Bindung des Zytostatikums durch Veränderung des Zielsubstrats, (6) Überexpression des Zielproteins oder (7) einen verstärkten Auswärtstransport des Zytostatikums aus der Zelle.

(Adaptiert nach [12].)

Defekte in der Apoptosekaskade spielen nicht nur bei der Tumorgenese, sondern auch bei der Therapieresistenz eine maßgebliche Rolle. Häufig konnte in resistenten Tumorzellen ein erhöhtes Bcl-2-Level beobachtet werden. In diesen Fällen kann ein Chemotherapeutikum nur dann signifikant Apoptose in den Tumorzellen induzieren, wenn der Apoptoseweg unabhängig diesem betroffenen Apoptosefaktor durchlaufen wird.

1.3. Titanocene

Nach der Entdeckung der antitumorellen Eigenschaften von *cis*-Diammindichlorplatin(II), bekannt als *cis*-Platin, Ende der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden viele weitere organo-metallische Verbindungen hinsichtlich ihres antikanzerogenen Potentials untersucht [175]. Zu dieser Gruppe der Metallocene gehören die Titanocene. Titanocene sind Komplexverbindungen bestehend aus zwei Cyclopentadienylringen auf gegenüberliegenden Seiten eines zentralen Titanatoms (Abbildung 10). Diese Art der Verbindungen werden als Sandwichverbindungen bezeichnet und haben die allgemeine Form: $M(Cp)_2$.

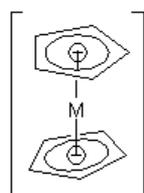


Abbildung 10: Allgemeine Strukturformel der Titanocene.

Titanocen-Dichlorid ist das am besten untersuchte Metallocen. Die vielversprechende *in vitro*-Wirkung konnte jedoch in durchgeführten Phase I und II-Studien nicht bestätigt werden, sodass versucht wurde durch Modifikation der Molekülstruktur die Wirksamkeit noch zu verbessern [176], [177], [178]. Chemiker der Arbeitsgruppe um Professor Gansäuer vom Kekulé-Institut für Chemie und Biochemie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn synthetisierten eine neuartige Gruppe von Titanocenen mit außerordentlichen biologischen Eigenschaften. Darüber hinaus entwickelten sie eine neuartige Synthesestrategie zur Darstellung verschiedener Titanocenester- und Titanocenamid-Verbindungen durch den Einsatz kombinatorischer Chemie. Zur Untersuchung des zytotoxischen Potentials dieser Verbindungen stellten sie mir eine Reihe verschiedener Titanocenderivate zur Verfügung.

1.3.1. Darstellung

Als Ausgangssubstanz für die Herstellung der Titanocen-Derivate dient Titan-tetrachlorid, eine reaktive Verbindung, die als starke Lewis-Säure wirkt. Nach Substitution der Chloridliganden durch Cyclopentadienylanionen erhält man Titanocene. Durch weitere Variation der Substituenten am Cyclopentadienylligand können die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Titanocene zusätzlich modifiziert werden [179].

1.3.2. Verwendung in der Chemie

Titanocene finden eine breite Verwendung in der Chemie: Sie haben eine katalysatorische Funktionen bei einer Vielzahl von Reaktionen. So, beispielsweise, bei der Öffnung von Epoxiden mittels Titanocenen durch einen Ein-Elektronen-Transfer, der Olefinpolymerisation nach Ziegler [180] oder der Tebbe-Reaktion, bei der Carbonylen und Carboxylen zu terminalen Alkenen umgesetzt werden. Auch bei der Radikalerzeugung werden zum Teil niedervalente Titanocene verwendet. Cholesterinsubstituiertes Titanocen dient als Gelator organischer Lösungsmittel [179].

1.3.3. Titanocene in der Krebstherapie

Nach dem erfolgreichen Einsatz von Cisplatin als Zytostatikum in einem breiten Spektrum von Tumorerkrankungen wurden in den folgenden Jahren verschiedene organometallische Verbindungen auf ihre Aktivitäten gegenüber Tumoren untersucht. Getestet wurden Vanadium, Niob, Molybdän und Eisenverbindungen, aber auch Hauptgruppen-Metallocene von Zinn und Germanium [181], [182]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Komplexe eine Aktivität in einem breiten Spektrum besitzen, wie z. B. gegen spezielle Melanome, Karzinome und Tumore, gegen Lungen-, Darm- und Brustkrebs [183]. Von allen getesteten Metallocenen ist das Titanocendichlorid das aktivste. Außerdem zeigt dieser Komplex im Gegensatz zu Cisplatin keine Nephrotoxizität oder Myelotoxizität im Tierversuch.

1.3.4. Mögliche Wirkmechanismen

Über den Wirkmechanismus besteht nach wie vor Unklarheit. Möglicherweise kommt der Hydrolyse von Titanocenen im wässrigen Medium, die deutlich schneller als die von Cisplatin verläuft, eine Schlüsselrolle zu. Nachgewiesen sind die Wechselwirkung mit der DNS bzw. DNS-verarbeitenden Enzymen und die Anreicherung der Titankomplexe in nukleinsäurereichen Regionen des Tumors [184]. Die Untersuchung einer Mischung aus 5'-AMP und 5'-TMP mit Titanocendichlorid zeigt, dass der Komplex die Wasserstoffbrückenbindungen des A-T-Basenpaares spaltet. Dies könnte einen Teil der antineoplastischen Aktivität ausmachen [182]. Auch andere Angriffspunkte wurden für die Metallocene diskutiert. Experimente zeigten, dass Titanocene Enzyme, wie die Proteinkinase C [185], ein Zellwachstum regulierendes Enzym, ebenso wie die Topoisomerase II, ein Enzym mit bedeutender Rolle bei der DNS-Replikation, inhibieren können [186]. Eine weitere Hypothese ist, dass Transferrin, das Transportprotein für Eisen(III), als Träger für Titanocene fungiert. Ähnlich wie bei Eisen wird bei hohen pH-Werten (Blut) Titanocen gebunden und bei niedrigen pH-Werten (Zelle) wieder freigesetzt. Somit

könnte Transferrin eine wichtige Bedeutung als Transportmolekül von Titanocen oder Titan zu den Tumorzellen zukommen [187]. Eine weitere Wirkung ist die Reduktion von Angiogenese und Biosynthese von Kollagenproteinen nachgewiesen *in vivo* bei chorioallantoider Membran von Hühnerembryonen. Wobei genauere Mechanismen und die Relevanz für die Antitumor-Aktivität noch unbekannt sind [176]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Titanocendichlorid eine Wirkung gegen Tumore zeigt, die gegen Cisplatin resistent sind und dass Titanocendichlorid neben der zytostatischen Wirkung auch eine antivirale Wirkung besitzt [188].

2. Ziel der Arbeit

Die erfolgreiche Therapie von malignen Erkrankungen stellt für die moderne Medizin eine große Herausforderung dar. Trotz verbesserter Therapien stehen Krebserkrankungen, nach Herz-Kreislauferkrankungen, auf dem zweiten Platz der häufigsten Todesursachen der westlichen Welt. Eine deutliche Verschlechterung der Prognose tritt ein, wenn bei den maligne transformierten Zellen Resistenzen gegen herkömmliche Chemotherapeutika aufgetreten sind. Daher liegt ein Hauptaugenmerk der Forschung in der Entwicklung neuer Substanzklassen, die in der Lage sind Zytostatikaresistenzen zu überwinden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkstoffklasse der Titanocene hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität und ihres zytotoxischen Potentials in malignen Zellen untersucht werden. Dazu sollen die Fähigkeit zur Wachstumshemmung, zur Apoptoseinduktion und der allgemeine Zelltod detektiert werden. Die Bedeutung von Nekrose und Apoptose für die Wirkung dieser Substanzen soll differenziert werden. Unter Verwendung geeigneter Experimente sollen Signale und Prozesse aus verschiedenen Phasen der Apoptose nachgewiesen werden, um eindeutige Aussagen über den Mechanismus des induzierten Zelltodes treffen zu können. Die Apoptosemessungen sollen mit verschiedenartigen Suspensionszelllinien und adhärenen Zelllinien erfolgen, um eine erste grobe Einschätzung des Wirkspektrums treffen zu können. Speziell soll die Wirksamkeit der Derivate auf primäre Zellen von Patienten mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) im Kindesalter im Vergleich mit herkömmlichen Zytostatika untersucht werden. Auch *in vivo* soll die Wirksamkeit getestet werden. Darüberhinaus soll der Mechanismus der titanoceninduzierten Apoptose charakterisiert werden, um eine Einordnung in den entsprechenden Apoptosepathway vornehmen zu können. Dabei soll auch der Einfluss von anti- und proapoptotischen Faktoren auf den Apoptosemechanismus untersucht werden. Für die vorliegenden Titanocenderivate soll eine Strukturwirkungsbeziehung erstellt werden um beurteilen zu können, mit welchen Modifikationen eine Wirkungssteigerung erreicht werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Bei den Untersuchungen wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Sterile Werkbank LaminAir Model 1.2	Holten, Allerød, DK
Sterile Werkbank LaminAir Model HBB 2448	Heraus, Hanau, DE
CO ₂ -Brutschrank HERAcell® 150	Thermo, Waltham, USA
Inversmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena, DE
Waage CP 32025	Sartorius, Göttingen, DE
Feinwaage BL 210S	Sartorius, Göttingen, DE
CASY® CellCounter & Analysesystem	Innovatis, Bielefeld, DE
Photometer Multiskan Ascent; mit Ascent Software Version 2.6	Thermo, Waltham, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad, München, DE
Power Pac HC	Biorad, München, DE
ChemiGenius 2 Bio-Imaging Systems; mit GeneTools Match Software	Syngene, Cambridge, UK
FACS Calibur; mit CellQest-Software	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Vortexer 7-2020	Neolab, Heidelberg, DE
Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen, DE
Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Ruhberg, DE
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn, DE
Pipettierhilfe Accu jet	Brand, Wertheim, DE
Pipetten Eppendorf Research; in Größen: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bei den Untersuchungen wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet:

Material	Hersteller
Serologische Einmal-Pipetten; in Größen 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Pipettenspitzen epT.I.P.S.	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Transfer-Pipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen 25, 75, 150 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zellkulturplatten mit 6, 12 und 96 Vertiefungen; Flachboden	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen; Rundboden	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen mit V-Boden	Sarstedt, Technology Park, AUS
Kryoröhrchen 1 ml	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
CASY® Cups	Innovatis, Bielefeld, DE
Rundbodenröhrchen 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Bioscience Inc, Dassel, DE
Spacer-Platten: 1,5 mm, 0,75 mm	Biorad, München, DE

3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bicoll Separating Solution	Biochrome AG, Berlin, DE
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Saint Louis, USA
CASY®ton-Messlösung	Innovatis, Bielefeld, DE
Complete Protease Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostik, Mannheim, DE

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
DNA-Molecular Wight Marker (Rainbow, full range)	Amersham Biosciences, Freiburg, DE
DNA-Molecular Wight Marker (wide range)	Sigma, Saint Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, DE
ECL Western Blotting Detection	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
EDTA	Serva, Heidelberg, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogene, Karlsruhe, DE
Ficoll	Serva, Heidelberg, DE
Formaldehyd $\geq 37\%$	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Serva, Heidelberg, DE
JC-1	Moleculare Probes, Invitrogene, Karlsruhe, DE
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, DE
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE
PBS	Merck, Darmstadt, DE
Penicillin (1000 U/ml) / Streptomycins (1000 $\mu\text{g/ml}$)	Biochrom AG, Berlin, DE
Ponceau-Rot	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Propidiumiodid	Serva, Heidelberg, DE
RNAase A	Qiagen, Hilden, DE
SDS	Serva, Heidelberg, DE
Super Signal West Pico ECL-Substrate	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Merck, Darmstadt, DE
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tween 20	Merck, Darmstadt, DE

3.1.3. Zytostatika

Zwölf verschiedene Derivate der neuen Wirkstoffklasse der Titanocenverbindungen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Gansäuer, vom Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität synthetisiert und zur Untersuchung bereitgestellt. Es handelt sich um die Wirkstoffe mit den Namen: Ti 2, Ti 3, Ti 4, Ti 6, Ti 7, Ti 8, Ti 9, Ti 19, Ti 25, Ti 26, Ti 29 und Ti 34

Herkömmliche Zytostatika

Zytostatikum	Zytostatikaklasse	Herkunft
Daunorubicin	Anthracyclin	Pfizer Pharma, Berlin, DE
Doxorubicin	Anthracyclin	Cell pharm, Bad Vilbel, DE
Idarubicin	Anthracyclin	Pharmacia, Berlin, DE
Cytarabin	Nukleosidanalogen	Cell pharm, Bad Vilbel, DE
Vincristin	Mitosehemmer	Cell pharm, Bad Vilbel, DE

3.1.4. Antioxidantien

Antioxidanz	Hersteller
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma-Aldrich, München, DE
Thiouria	Sigma-Aldrich, München, DE
Katalase	Sigma-Aldrich, München, DE

3.1.5. Nährmedien

Medium	Hersteller
RPMI 1640	supplementiert mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin
DMEM	supplementiert mit 10 % FKS, 0,4 mg/ml Geneticin
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO, 90 % (v/v) FKS
	hergestellt im Labor der AG Prokop

3.1.6. Zellen

3.1.6.1. Zelllinien

Suspensionszellen

Suspensionszellen wachsen nicht-adhärenz als Einzelzellen oder in Form von Kolonien in Suspension. Sie stammen meist von Zellen des Immunsystems oder deren Vorläufern ab. Sie wurden in komplettiertem RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) kultiviert.

BJAB

Diese Zelllinie wurde von einem humanen Burkitt-Lymphom kultiviert und als Zelllinienpaar BJAB-Mock und BJAB FADD^{-/-} verwendet. Die BJAB FADD^{-/-} Zellen sind mit pcDNA3-FADD^{-/-} transfiziert worden. Sie exprimieren eine dominant-negative FADD-Mutante, der die N-terminale DED-Domäne fehlt [189], so dass der CD95-vermittelte Apoptosesignaltransduktionsweg komplett blockiert wird. Die BJAB-Mock Zellen wurden mit einem pcDNA3-Primer ohne FADD^{dn}-Gen transfiziert. Die Expression des funktionalen FADD ist hier unverändert [190]. Unter bestimmten Bedingungen können diese Suspensionszellen auch adhärenz werden. Im Organismus können sie solide Tumore ausbilden.

Nalm6

Bei Nalm6-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus humanen leukämischen B-Vorläuferzellen [191]. Die Zellen stammen von einem Patienten mit einem ALL-Rezidiv. Es sind Suspensionszellen mit einer Verdopplungszeit von ca. 36 Stunden.

Reh

Aus humanen B-Vorläufer-Leukämiezellen wurde die Reh-Zelllinie etabliert. Die Zellen wurden aus peripherem Blut einer Patientin mit dem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie kultiviert. Die Zellen wachsen in Suspension als Einzelzellen oder als Kolonie. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 50-70 Stunden.

Jurkat

Bei Jurkat-Zellen handelt es sich um eine humane, leukämische T-Zelllinie. Sie wurde aus dem peripheren Blut eines Patienten mit dem ersten Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) etabliert [192]. Die Zellen wachsen als Einzelzellen oder in Zellverbänden in Suspension. Ihre Verdopplungszeit beträgt 25-35 Stunden. Es wurde das Zelllinienpaar Jurkat neo / SMAC verwendet. Durch Transfektion eines Plasmids mit entsprechender Gensequenz

wird in der Jurkat SMAC-Zelllinie das proapoptotische SMAC-Protein überexprimiert. Die Jurkat neo-Zellen wurden mit einem leeren Plasmid transfiziert.

HL60

Die HL60-Zelllinie wurde aus humanen AML-Zellen etabliert. Diese runden Suspensionszellen besitzen das Enzym Myeloperoxidase, welches bei der Apoptoseinduktion durch ROS eine Rolle spielt [193].

Adhärente Zellen

Adhärente Zellen heften sich an Plastikoberflächen von Zellkulturflaschen und wachsen als zusammenhängende Zelllage in Form von Mono- oder Multilayern. Sie zeigen eine dichteabhängige Proliferationshemmung, die als Kontaktinhibition bezeichnet wird. Adhärente Zelllinien leiten sich von Geweben ab, wie beispielsweise Muskeln, Haut, Leber oder Niere. Die adhärenen Zelllinien werden in komplettiertem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kultiviert.

MelHO

MelHO-Zellen stammen von einem primären humanen Melanom (Hautkrebs). Es handelt sich um epithelähnliche adhäre Zellen mit langen schmalen, oft verzweigten Zellkörpern [194]. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 24 Stunden. Die MelHO-Zellen wurden mit dem Vektor pIRES (MelHO pIres) und mit dem Bcl-2 Gen in pIres (MelHO bcl-2) stabil transfiziert. Die MelHO bcl-2 Zellen zeigen eine starke Überexpression des Bcl-2 gegenüber den MelHO pIres Zellen.

MCF-7

Von einem humanen Mammakarzinom (Adenoakanthom) stammen die MCF-7-Zellen. Sie wurden aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom nach Radio- und Hormontherapie kultiviert [195]. Sie zeigen ein einschichtig adhärentes Wachstum mit einer epithelähnlichen Zellform. Die MCF-7-Zellen sind Caspase-3-defizient, das bedeutet ihnen fehlen funktionelle Caspase-3-Moleküle. Daraus resultiert ein Apoptosedefekt, der diese Zelllinie sehr resistent gegenüber Chemotherapeutika macht. Die Zellen verfügen über zytoplasmatische Östrogen-Rezeptoren und haben eine Verdopplungszeit von ca. 50 Stunden.

HepG2

Die Etablierung der HepG2-Zellen erfolgte aus einem humanen hepatozellulären Karzinom (Lebertumor) [196]. Die epithelähnlich einschichtig wachsenden, adhärenen Zellen enthalten kein B-Virus-Genom. Sie produzieren verschiedene lebertypische Proteine. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 50-60 Stunden.

3.1.6.2. Primäre Zellen

Im Rahmen der "ALL-Rez-BFM 2002-Studie" wurden primäre Zellen von Kindern mit einer ALL-Ersterkrankung und mit dem Rezidiv einer ALL untersucht. Die Zellen wurden aus Knochenmarkaspiraten oder aus dem Blut von Venenpunktionen isoliert. Die Proben stammen von Patienten, die in der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie der Charité Berlin behandelt werden oder wurden. Die Diagnose wurde durch Immunphänotypisierung der Leukämiezellen entsprechend Bene et al. gestellt [197], [198].

3.1.7. Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit	Roche, Mannheim, DE
BCA Protein Assay Kit	PIERCE, Illinois, USA
Phosphatidylserine Detection Kit	IQ Products, Groningen, NL

3.1.8. Puffer

Isolierung mononukleärer Zellen

Erythrozytenlysepuffer (10x)	1,5 M Ammoniumchlorid 0,1 M K-HCO ₃ 1,27 mM EDTA mit dH ₂ O
------------------------------	---

Proteinpräparation

Lysepuffer	0,1 mM Tris/HCL 0,4 % (v/v) EDTA 0,1 % (w/v) Triton X-100 1 Tablette/50ml Complete Protease Inhibitor-Cocktail
------------	--

SDS-Page

Sammelgel (5 %)	5 % Acrylamid 0,1875 M Tris 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
Trenngel (16 %)	16 % Acrylamid 0,375 M Tris 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,04 % TEMED
Probenpuffer (5x)	260mM Tris/ HCL, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerin 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 400 mM DTT 0,004 % (w/v) Bromphenolblau 2 % (w/v) SDS
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris (Base) 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS

Western Blot

Transferpuffer	480 mM Tris (Base) 300 mM Glycine
Waschpuffer (1x PBST)	1x PBS 0,05% Tween 20
Blockierpuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver 1x PBST 0,001 % (w/v) NaN ₃

Ponceau-Rot-Lösung	0,5 % (w/v) Ponceau-Rot 1 % (v/v) Essigsäure
Strippuffer	0,1 M β -Mercaptoethanol 0,2 M Glycin 0,05 % (v/v) Tween 20

3.1.9. Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Herkunft
Anti-Caspase-3	1:500	Sigma, Saint Louis, USA
Anti-Caspase-9	1:2000	R & D, Wiesbaden-Nordenstadt, DE
Anti-PARP	1:2000	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti- β -Actin	1:5000	Sigma, Saint Louis, USA
Anti-Porin (VDAC)	9 μ g/ml	Bender MedSystems, Wien, AT

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Herkunft
Anti-Mouse IgG HRP	1:2500	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Rabbit IgG HRP	1:2000	Promega, Minneapolis, USA
Anti-Goat IgG HRP	1:3000	Calbiochem, Merck, Darmstadt, DE

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

Allgemeine zellbiologische Bedingungen

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten Materialien und sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt. Geräte wurden vor Gebrauch an der Werkbank mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Zum Ausschluss einer Mykoplasmen-Kontamination wurden die Zellkulturen regelmäßig getestet. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen oder Zellen mit adhärentem Wachstum. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchte. Zellpassagierungen wurden dreimal pro Woche durchgeführt. Zur Verwendung der adhärennten Zellen wurden sie durch Behandlung mit Trypsin/EDTA für 3-5 min bei 37 °C vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Suspensionszellen auf eine einheitliche Zellzahl von 4×10^5 Zellen/ml eingestellt, um standardisierte Wachstumsbedingungen zu erreichen. Für die Apoptoseassays wurden die Zellen vor der Substanzzugabe auf 1×10^5 Zellen/ml verdünnt.

Isolierung mononukleärer Zellen

Von der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie der Charité Berlin wurden der Arbeitsgruppe Knochenmarkaspirate und Blut aus Venenpunktionen von Patienten der Klinik zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Aus diesen Proben wurden die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Durch die Zentrifugation mit Ficoll, einem nichtionischen, synthetischen Polymer aus Sucrose, wandern Zellen hoher Dichte, wie Erythrozyten und Granulozyten zum Röhrchenboden. Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten sammeln sich dagegen aufgrund ihrer niedrigen Dichte im Buffycoat an (Abb. 11).

Für die Versuchsdurchführung wurden die Vollblutproben oder Knochenmarkpunktate mit RPMI 1640 auf ein durch fünf teilbares Volumen verdünnt. Je 5 ml des verdünnten Patientenmaterials wurden dann in einem Redcap-Röhrchen vorsichtig über 4 ml Ficoll überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 18 min bei 657 g, 20 °C und folgenden Zentrifugeneinstellungen: Beschleunigung = 4/5 und Bremse = 0. Der entstandene Buffycoat wurde mit einer Pasteurpipette entfernt, in ein neues Röhrchen überführt und mit RPMI1640 gewaschen. Bei

rötlich gefärbtem Buffycoat wurde nach zweimaligem Waschen mit RPMI1640 eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 3 ml Erythrozytenlysepuffer für 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 20ml Medium wurde die Lysereaktion gestoppt. Nach nochmaligem Waschen mit RPMI1640 wurde die Zellzahl mit Hilfe des CASY[®] Cellcounters bestimmt.

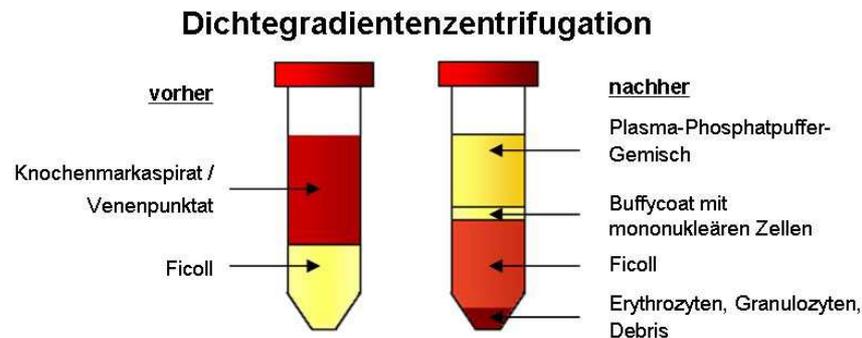


Abbildung 11: **Isolierung mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation.**

Der Zentrifugation vorangehend wird Ficoll mit verdünntem Knochenmarkspirat oder Venenpunktat überschichtet. Nach der Zentrifugation scheiden sich die mononukleären Zellen aufgrund der Dichteunterschiede zwischen den verschiedenen Blutzellen im Buffy coat ab.

Für die Durchführung der modifizierten Zellzyklusanalyse wurden die isolierten mononukleären Zellen auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Nach 60 h Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen im Brutschrank wurde die durchflusszytometrische Messung nach Propidiumiodidfärbung im FACSscan durchgeführt.

Zellzahlbestimmung

Zellzahl, Zellgröße und Vitalität der Zellen wurden mit Hilfe des CASY[®] Cellcounters ermittelt. Nach mikroskopischer Beurteilung der Zellen, wurden je 100 μ l der Zellsuspension in 10 ml CASY[®]ton, einer isotonischen Elektrolyt-Pufferlösung, resuspendiert und in CASY[®]Cups überführt. Danach erfolgte die Detektion im CASY[®] Cellcounter. Das Messprinzip beruht auf der Pulsflächenanalyse. Die resuspendierten Zellen werden dabei durch eine Messkapillare definierter Größe mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit aspiriert. Durch zwei Platinelektroden wird ein niederfrequentes, elektrisches Feld über der Kapillare angelegt. Die kapilläre Passage der Zellen führt zu einer Widerstandsänderung, die hinsichtlich ihrer Amplitude, Impulsbreite und Zeitverlaufes analysiert wird. Auf diese Weise werden die Partikelzahl/Volumen-Verhältnisse, sowie charakteristische Änderungen der elektrischen

Eigenschaften der Zellmembran detektiert. Dadurch wird der Anteil des Debris, der toten Zellen und der vitalen Zellen ermittelt. Bei zu hohen Zellzahlen erfolgte eine Verdünnung der Proben. Vereinzelt wurde die Bestimmung der Vitalzellzahl mikroskopisch nach Trypanblaufärbung durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Bei toten Zellen dringt das Trypanblau durch die defekte Zellmembran ein und färbt ihr Cytosol blau an. Lebende Zellen schleusen den Farbstoff wieder aus und erscheinen farblos. Die zu testende Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,4% Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Vier geeichte Großquadrate wurden ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

$$Z = N \cdot 2 \cdot 10^4$$

Z = Zelldichte [Zellen/ml], N = Quersumme der Großquadrate,
2 = Trypanblau-Verdünnungsfaktor, 10^4 = Kammerfaktor

Kryokonservierung

Alle im Labor verwendeten Zelllinien wurden zur dauerhaften Aufbewahrung vital eingefroren (Kryokonservierung). Dafür wurden die adhärennten Zellen wie zum Passagieren vom Boden der Kulturschale abtrypsiniert, die Suspensionszellen resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch 5-minütige Zentrifugation bei 300 g und 4 °C pelletiert. Je 10^7 Zellen wurden dann langsam in 1ml vorgekühltem Einfriermedium in einem Kryoröhrchen aufgenommen und für eine Stunde auf -20 °C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung wurden die Zellen bei -80°C gelagert, bei längeren Lagerungszeiten wurden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Für den Auftauprozess wurden die Kryoröhrchen zügig in ein vorgewärmtes Wasserbad gegeben und bei 37 °C vollständig aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension tropfenweise zu 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem Medium hinzugegeben. Um Reste des Einfriermediums möglichst komplett zu entfernen, wurden die Zellen zweimalig mit dem entsprechenden Medium gewaschen, bevor sie in Zellkulturflaschen überführt wurden. Die so aufgetauten Zellen wurden dann nach der fünften Passage für Versuche verwendet.

3.2.2. Apoptose- und Zytotoxizitätsassay

Laktat-Dehydrogenase-Release-Assay

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Die Freisetzung dieses Enzyms in den Zellüberstand infolge unspezifischer Membranschädigung diente als Messparameter zur Bestimmung der unspezifischen Zytotoxizität. Unter Verwendung eines gekoppelt enzymatischen Tests wurde die Aktivität der LDH nachgewiesen. Während der LDH-katalysierten Reaktion von Laktat zu Pyruvat wird NAD^+ zu NADH reduziert. Anschließend überträgt der Katalysator Diaphorase ein Wasserstoffproton auf das schwach gelb gefärbte Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium-chlorid. Das dabei entstehende rot gefärbte Formazansalz wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch detektiert. Für diese Methode wurde das "Cytotoxicity Detection Kit" verwendet und nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt: Nach Inkubation mit einem Wirkstoff wurden die Zellen 5 min mit 370 g bei 4 °C zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden 20 μl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte zu je 80 μl vorgelegtem PBS pipettiert. Anschließend wurden 100 μl Reaktionsgemisch dazugegeben, 5 min in Dunkelheit inkubiert und photometrisch bei 492 nm detektiert. Der maximal mögliche LDH-Ausstoß der Zellen wurde durch Lyse der Zellen mit 0,1 % Triton X-100 ermittelt und als 100 % Zytotoxizität definiert. Durch den Vergleich zu mitgeführten Kontrollkulturen wurde unter Verwendung folgender Formel die Zytotoxizität in Prozent berechnet:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{(S - M) - (K_o - M)}{(\text{Max} - M) - (K_o - M)} \times 100$$

S = Messwert einer Probe (Sample);

Ko = Kontrolle, zellfreier Überstand einer unbehandelten Zellsuspension;

M = Nährmediumkontrolle, enthält nur Medium ohne Zellen;

Max = Maximalwert, entspricht einer Kontrollprobe, die durch Triton X-100 lysiert wurde.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, die auch als "Fluorescence-Activated Cell Sorting" (FACS) bezeichnet wird, ermöglicht die Analyse bestimmter Zelleigenschaften auf Einzelzellniveau.

Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen aus der Zellsuspension wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Argonlaserstrahl vorbeigeführt. Anhand der Ablenkung und Streuung des Laserlichtes können folgende Parameter detektiert werden: Der "Forward Scatter", ein Parameter für den Anteil des absorbierten Lichts, dient der Berechnung der Zellgröße. Der "Side Scatter" ist ein Parameter für reflektiertes oder gebrochenes Licht. Er erlaubt Rückschlüsse auf die relative optische Dichte der Zelle und ist proportional ihrer Granularität. Als dritter Parameter kann eine Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 12). Durch Kontakt mit dem Laserstrahl bei einer bestimmten Wellenlänge können Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Unter Energieabgabe fallen sie auf ihr Ausgangsniveau zurück. Das dabei emittierte Licht wird als Fluoreszenz gemessen. In drei Fluoreszenzkanälen (FL1 = 537 nm, FL2 = 597 nm, FL3 = 650 nm) können die unterschiedlichen Emissionsspektren der verschiedenen verwendbaren Fluoreszenzfarbstoffe durch Bandpassfilter detektiert werden.

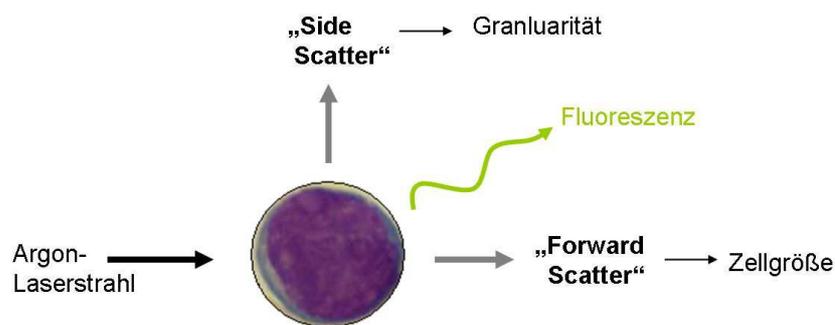


Abbildung 12.: **FACS-Messparameter.** Nach Einwirkung eines Argonlaserstrahls können auf Einzelzellniveau durch Detektion des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter) Aussagen über die Zellgröße getroffen und durch das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) Rückschlüsse auf die zelluläre Granularität gezogen werden. Als dritter Parameter kann eine emittierte Fluoreszenz quantifiziert werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACS-CaliburTM verwendet, der mit einem Rechner zur Datenakquisition und -analyse verbunden war. Bei jeder Probe wurden die Daten von mindestens 10.000 Zellen aufgenommen und mit der CellQuestTM-Software ausgewertet. Die Messdaten werden in Form von Histogrammen und Punktwolken-diagrammen (Dotplots) ausgegeben. In Histogrammen wird die Lichtintensität (x-Achse) in Abhängigkeit zur Zellzahl (y-Achse) dargestellt. Bei der Darstellung in Form von Dotplots entsprechen die Punkte der x- und y-Achse jeweils einem Lichtsignal-Parameter, so dass jeder Punkt im Diagramm eine Zelle repräsentiert.

Modifizierte Zellzyklusanalyse

Die Fragmentierung der DNA stellt ein entscheidendes Ereignis in der Endphase der Apoptose dar. Durch Nukleasen wird die DNA zwischen den Histonproteinen zerschnitten, so dass Bruchstücke mit einer Größe von 180 Basenpaaren oder einem Vielfachen davon entstehen. Infolge der Permeabilisierung der Zellmembran in der Endphase der Apoptose gehen DNA-Fragmente verloren. Dadurch stellen sich apoptotische Zellen bei einer DNA-Färbung im Vergleich zu einer Zelle in der G₀/G₁-Phase mit einem verminderten DNA-Gehalt (Hypodiploidie) dar und werden als SubG₁-Zellen bezeichnet. Die durchflusszytometrische Detektion der hypodiploiden Zellen wurde, wie von Nicoletti beschrieben, nach Propidiumiodidfärbung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml ausplattiert und mit den zu testenden Substanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 300 g und 4 °C geerntet, danach mit kaltem PBS gewaschen und mit PBS/2 % (vol/vol) Formaldehyde auf Eis für 30 min fixiert. Nach anschließender DNA-Fällung durch 15 min Inkubation mit Ethanol/PBS (2:1, vol/vol) wurden die Zellen pelletiert, anschließend in 40mg/ml RNase A enthaltendem PBS resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden die Proben in 200 µl PBS aufgenommen, welches 50 mg/ml Propidiumiodid enthielt. Die Messungen erfolgten an einem FACScan mit CellQuest-Auswertungssoftware. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Apoptoserate ausgegeben, welche der gemessenen Hypodiploidie (Sub-G₁) entspricht.

AnnexinV-Propidiumiodid-Doppelfärbung

Eine frühe Veränderung der apoptotischen Zelle ist die Translokation negativ geladener Phospholipidmoleküle (Phosphatidylserin) von der inneren zur äußeren Oberfläche der Zellmembran. Dies führt zu einer Markierung der sterbenden Zelle, so dass diese schnell von benachbarten Zellen als solche identifiziert und beseitigt werden kann. An der Zelloberfläche kann sich AnnexinV, ein ca. 35 kDa großes Protein, calciumabhängig mit hoher Affinität an Phosphatidylserin binden. Durch die Konjugation von Annexin V mit dem Fluoreszenzfarbstoff "Fluorescein-isothiocyanat" (FITC) wird die durchflusszytometrische Detektion der frühapoptotischen Zellen ermöglicht. Der interkalierende Farbstoff Propidiumiodid kann eine Zelle nur dann anfärben, wenn infolge nekrotischer Vorgänge die Membranintegrität zerstört wurde, oder in der Spätphase der Apoptose die Membranpermeabilität erhöht ist. Demzufolge kann durch die Doppelfärbung der Zellen mit AnnexinV und Propidiumiodid zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden.

Man definiert Zellen mit signifikantem FITC-AnnexinV Fluoreszenzsignal als Annexin positiv (An+), Zellen ohne diese Fluoreszenz als AnnexinV negativ (An-) und entsprechend Propidiumiodid positive (PI+) und Propidiumiodid negative (PI-) Zellen. An+/PI- Zellen repräsentieren demzufolge frühapoptotische Zellen, An+/PI+Zellen nekrotische oder spätapoptotische Zellen.

Für die Durchführung des Versuches wurden die behandelten Zellen 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert, in 200 μ l 1x Calcium-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 μ l FITC-Annexin 30 min auf Eis in Dunkelheit inkubiert. Zu allen Proben wurde 4 ml 1x Calcium-Puffer hinzupipettiert. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets in 200 μ l 1x Calcium-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von 10 μ l Propidiumiodid (1 μ g/ml) gefärbt. Innerhalb einer Stunde wurden die Proben durchflusszytometrisch an einem FACScan gemessen.

Mitochondriale Membranpotential-Analyse

Im Verlauf der Apoptosesignaltransduktion kommt es zur Aktivierung der Mitochondrien in Verbindung mit einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials. Unter Verwendung des kationischen Fluoreszenzfarbstoffs 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) wird diese Potentialänderung durchflusszytometrisch messbar. Abhängig vom mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) akkumuliert der JC-1-Farbstoff in der Matrix der Mitochondrien. Dabei nimmt die Akkumulation des Farbstoffes mit der Höhe des Membranpotentials zu und zeigt eine Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (590 nm). Bei einer Membrandepolarisierung verringert sich die Konzentration des akkumulierten JC-1 und die Fluoreszenz verschiebt sich durch die Bildung von JC-1-Monomeren vom roten in den grünen Wellenlängenbereich (525 nm). Diese Fluoreszenzverschiebung wird durchflusszytometrisch als Abnahme der Fluoreszenz 2 (rot) in einem FACScan quantifiziert.

Für die Versuchsdurchführung wurden die behandelten Zellen nach 48-stündiger Inkubation 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 500 μ l Phenolrot-freiem und FKS-freiem RPMI-Medium aufgenommen und nach Zugabe des JC-1-Farbstoffes in einer Konzentration von 2,5 mg/ml für 30 min bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 300 g und 4°C wurden die Pellets mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem die Pellets in 200 μ l eiskaltem PBS aufgenommen wurden erfolgte die durchflusszytometrische Messung unmittelbar innerhalb einer Stunde.

3.2.3. Biochemische Methoden

Proteinpräparation

Proteine machen quantitativ den bedeutendsten Anteil der organischen Makromoleküle der Zellen aus. Zum Proteinnachweis mit der Western Blot-Technik, wurde eine Proteinsuspension hergestellt, die weitestgehend von Zellmembranen und anderen zellulären Bestandteilen befreit ist. Dafür wurden mindestens 5×10^6 Zellen geerntet, einmalig mit PBS gewaschen, und bei 300 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Lysepuffer resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde die Suspension gelegentlich mittels Vortex durchmischt. Anschließend wurde das Zelllysate für 30 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Bei dem entstandenen Überstand handelte es sich um die Proteinlösung des Totallysates der Zellen.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration im Zelllysate wurde mittels BCA-Protein-Assay-Kit bestimmt. Diesem Verfahren liegt die Biuret-Reaktion zugrunde. Dabei werden in einem ersten Reaktionsschritt durch die Proteine Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen reduziert. In einer zweiten Reaktion bildet das Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) bei alkalischem pH einen Komplex mit Cu^+ -Ionen im Verhältnis 2:1. Es entsteht ein stabiler Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

10 μ l des zuvor hergestellten Proteinextraktes wurden dafür mit 200 μ l der Reaktionslösung (Reagenz A/Reagenz B: 50/1) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Extinktionsmessung mit dem Multiskan Ascent bei einer Wellenlänge von 620 nm. Als Standardreihe diente eine Konzentrationsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA), angesetzt mit Lysepuffer in Konzentrationen von 0,5, 1, 2 und 4 mg/ml. Reiner Lysepuffer diente als Leerwert. Der Leerwert und die BSA-Standard-Konzentrationsreihe wurden im Dreifachansatz detektiert. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen wurden anhand der aus dem BSA-Standard abgeleiteten Eichgeraden ermittelt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine zeigen abhängig von ihrer Nettoladung, ihrer molekularen Masse und ihrer Konformation unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Dies macht man sich bei der Gelelektrophorese zur Trennung komplexer Proteingemische zunutze. Durch

die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikal zu Acrylamid wird eine Kettenreaktion gestartet, die von TEMED (Tetramethylethyldiamin) katalysiert wird und zur Polymerisation zu Polyacrylamid führt. Es entsteht eine gelartige Matrix, die als Molekularsieb wirkt und die zu trennenden Moleküle etwa proportional zu ihrer molekularen Masse bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld verlangsamt. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS = Sodium Dodecyl Sulfate) lagert sich an die Proteine und denaturiert diese. Es bilden sich unabhängig von der Eigenladung der Proteine negativ geladene Komplexe. Dadurch werden im Proteingemisch Ladungs- und Konformationsunterschiede zwischen den Proteinen ausgeglichen, sodass die Proteine lediglich abhängig ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5 mm Trenngele, mit einem Anteil von 16 %, und Sammelgele, mit einem Anteil von 5 % Polyacrylamid verwendet. Für den PARP-Nachweis wurde ein 0,75 mm dickes 5 %iges Sammelgel und ein 8 %iges Trenngel genutzt. Das Proteingemisch wurde in Probenpuffer für 5 min bei 95°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert, um eine vollständige Denaturierung und Entfaltung der Proteine zu gewährleisten. Nach anschließender Abkühlung wurden 30 µg Protein in pro Geltasche aufgetragen. Nicht benötigte Geltaschen wurden mit Probenpuffer beladen. Die Proteinauftrennung erfolgte durch Anlegen des elektrischen Feldes für 10 min bei 120 V, anschließend für ca. 60 min bei 160 V. Die Molekulargewichte konnten durch Vergleich der Wanderungstrecke der mitgeführten Standardproteine ("DNA-Molecular Weight Marker" oder „stained SDS-Protein-Marker“) ermittelt werden.

Western Blot

Mit der Technik des Western Blot im Semidry-Blotting-Verfahren wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden von der Trägermatrix (SDS-Page) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Oberfläche der Nitrocellulosemembran haften. Dafür wurde in der Blotting-Apparatur ein Sandwich von der Anode zur Kathode folgendermaßen aufgebaut: zwei Schichten Whatman Filterpapier, die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und zwei Lagen Whatman Filterpapier. Vor dem Aufbau des Sandwichs wurde das Whatman Filterpapier und die Membran für 10 min in 1x Transferpuffer getränkt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit der Stromstärke 1 mA/cm² Membran für 60 min wanderten die Moleküle aus dem SDS-Gel auf die Oberfläche der Membran.

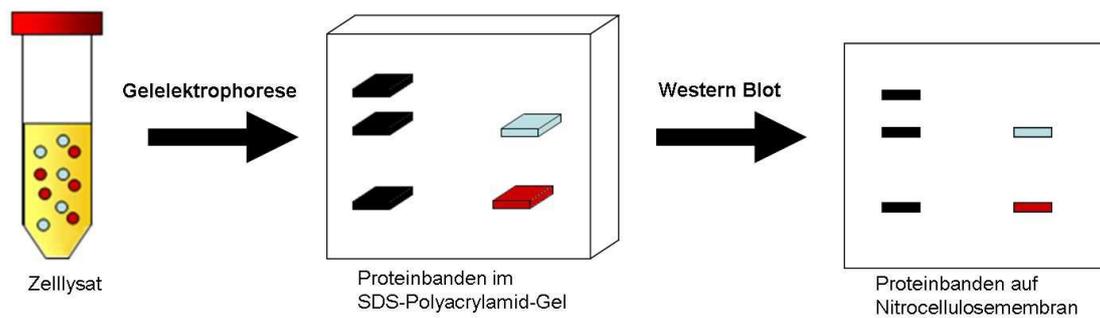


Abbildung 13: **Gelelektrophorese und Western Blot.** Die Proteine des Zellysates werden durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend im Semidry-Blotting-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Membranfärbung mit Ponceau

Eine Lösung des Azofarbstoffes Ponceau S wurde zur Kontrolle des Blot-Vorganges verwendet. Durch die Ponceau-Lösung wurden Proteine reversibel angefärbt, sodass eine erste Einschätzung darüber möglich wird, welche Proteinmengen wo auf der Membran lokalisiert sind. Für die Ponceau-Färbung wurden die Membranen unter leichtem Schütteln für 3 min mit der Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend mit zweifach destilliertem Wasser bei leichtem Schütteln solange gewaschen, bis keine rötliche Färbung des Wassers mehr auftrat. Nach der fotografischen Dokumentation wurde die Membran durch 10 minütige Inkubation in Waschpuffer (PBST) entfärbt.

Immundetektion

Die anschließend durchgeführte Immundetektion beruht auf dem Prinzip der zweifachen Antigen-Antikörperbindung. Ein erster Antikörper (Primärantikörper) bindet spezifisch an das nachzuweisende Zielprotein auf der Nitrocellulosemembran. Ein zweiter, mit Meerrettichperoxidase konjugierter Antikörper bindet an das F_c -Fragment des Primärantikörpers. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und Luminol, Substraten der Peroxidase, kommt es zur Lumineszenz, welche detektiert wird.

Bei der Versuchsdurchführung wurde die Nitrocellulosemembran vor der eigentlichen Immundetektion mit einer Blocklösung (5%-iger Magermilch in PBST) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper unter leichtem Schütteln, je nach Herstellerangaben, 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für 10 min unter leichtem Schütteln wurden ungebundene

Primärantikörpermoleküle entfernt. Der Sekundärantikörper wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ungebundene Antikörper erneut durch dreimaliges Waschen entfernt. Nun erfolgte die Zugabe von 2 ml ECL pro Membran und die Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur. Alternativ wurde " Super Signaling" ECL verwendet, dabei wurden die Membranen mit 3 ml der Lösung für 3 min inkubiert. Anschließend wurden die Lumineszenzsignale mit einem Chemigenius-2-Bio-Imaging-System, bestehend aus einer Dunkelkammer, einer hochauflösenden Digitalkamera und speziellen Lichtfiltern, detektiert.

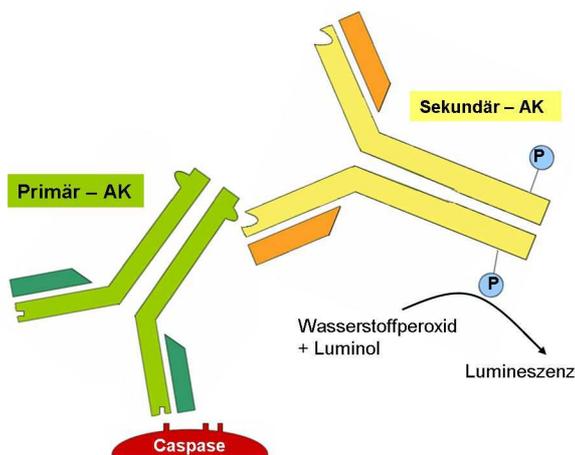


Abb. 14: **Prinzip der Immundetektion.**

Nach Bindung des Primärantikörpers an das nachzuweisende Protein bindet der Sekundärantikörper an das F_c-Fragment des primären. Die an den Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase führt nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und Luminol zur Lumineszenzreaktion.

***β*-Actin Abgleich**

Zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung der Geltaschen mit Proteinen wurde der β -Actin-Abgleich durchgeführt. Antikörperzugabe und Detektion erfolgten wie zuvor beschrieben. Als Primärantikörper wurde ein Anti- β -Actin-Antikörper verwendet, als Sekundärantikörper entsprechend ein Anti-Mouse-Antikörper.

3.2.4. *In vivo*-Untersuchung

Zur Einschätzung der Toxizität von Ti 8 wurde das NOD/SCID-Mausmodell verwendet. Die NOD/SCID-Mäuse sind durch ein angeborenes Defizit der T- und B-Lymphozytenfunktion charakterisiert. Aufgrund dieses schweren kombinierten Immundefektes können sie Xenotransplantate nicht abstoßen. Die untersuchten SCID-Mäuse hatten ein durchschnittliches Gewicht von 26 g. Ihnen wurden 1×10^7 BJAB-Zellen subkutan injiziert. An Tag 14 wurde, nachdem der injizierte Tumor eine palpable Größe aufwies, mit der oralen Gabe von Ti 8 in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht begonnen. Ti 8 wurde durch Mikrokristall-Suspension (nach Ultraschallbehandlung über 5 min.) in medizinischem Olivenöl gelöst. An den Tagen 14-18, sowie 23-27 wurde es appliziert. Eine Kontrollgruppe von 8 SCID-Mäusen erhielt Olivenöl im gleichen Intervall. Das Körpergewicht der Mäuse, Tumorzellen und relative Tumorzellen wurden im Verlauf beobachtet. Die Mäuse wurden aufmerksam auf mögliche Symptome einer Toxizität hin untersucht. Der Verlauf des durchschnittlichen Körpergewichtes und des Allgemeinzustandes dienten als Parameter der Toxizität.

3.2.5. Datenauswertung und Statistik

Die in den Diagrammen und Tabellen dieser Arbeit dargestellten Daten wurden als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren ihre jeweilige Standardabweichung. Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen, unabhängigen Student's T-Test berechnet. Die T-Test Ergebnisse wurden bei "probability"-Werten (p-Werten) kleiner 0,05 als signifikant, kleiner 0,01 als sehr signifikant und kleiner 0,001 als hoch signifikant bezeichnet. Für die Datenauswertung und Statistikberechnungen wurde Microsoft Excel 2003 eingesetzt. Alle Versuche wurden mindestens zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Ausnahmen von diesen allgemeinen Richtlinien werden direkt in der entsprechenden Abbildung deklariert. Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte mit der Cellquest Pro Software. Bei der modifizierten Zellzyklusanalyse wurde die "Area under the curve" aus den Histogrammen und bei der Membranpotentialanalyse und AnnexinV/PI-Doppelfärbung die Zellverteilung in den Quadranten der Dotplots zur Auswertung herangezogen. Bei den Western Blot-Daten werden repräsentative Membranen gezeigt. Mindestens ein Wiederholungsversuch zeigte ähnliche Banden. Die statistische Auswertung der *in vivo*-Daten erfolgte mittels Man-Whitney U-Test.

4. Ergebnisse

4.1. Biologische Aktivität der Titanocenderivate

Zur Evaluation ihrer biologischen Aktivität in malignen Zellen standen zwölf verschiedene carbonylsubstituierte Titanocenderivate (Carboxyl- und Amidderivate) zur Verfügung. Neun dieser Verbindungen konnten in DMSO gelöst werden und wurden jeweils als Stocklösung mit einer Konzentration von 40 mM angesetzt. Die cholesterinsubstituierten Titanocene Ti 3, Ti 25 und Ti 29 konnten aufgrund ihrer mangelnden Löslichkeit in DMSO nicht untersucht werden. Die übrigen neun gelösten Verbindungen wurden im Hinblick auf ihr Potential als Vertreter einer möglichen neuen Wirkstoffklasse der Tumorchemotherapeutika getestet.

Das Ziel der Tumorchemotherapie ist es, die maligne transformierten Zellen durch gezielte Apoptoseinduktion zu eliminieren, ohne schwere Nebenwirkungen zu verursachen. Entscheidende Kriterien zur Beurteilung der Wirksamkeit von Zytostatika sind zum einen die Fähigkeit zur Proliferationshemmung und zum anderen das Potential zur Apoptoseinduktion. Dementsprechend wurde für eine Konzentrationsreihe jeder Verbindung die Proliferationshemmung mittels Casy®CellCounter und mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse die Apoptoseinduktionsrate detektiert. Zusätzlich wurde zum Ausschluss des nekrotischen Zelltodes nach 2 h Inkubation eine Zytotoxizitätstestung via LDH-Release-Assay durchgeführt. Die Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse dieser drei Versuche exemplarisch für die Verbindung Ti 26.

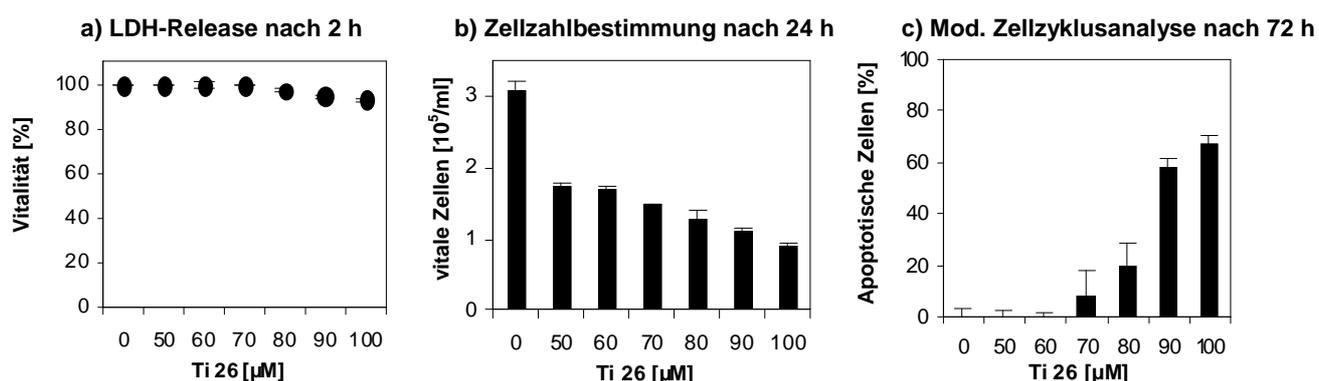


Abbildung 15: **Methoden zur Bestimmung der biologischen Aktivität der Titanocenderivate** in malignen Zellen, beispielhaft dargestellt für Ti 26 in BJAB-Zellen: Bestimmung der nekrotischen Zytotoxizität mittels LDH-Release-Assay nach 2 h (a), der Proliferationshemmung mit CASY®CellCounter nach 24 h (b) und der Apoptoseinduktion via modifizierte Zellzyklusanalyse nach 72 h Inkubation (c). Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Anhand der Ergebnisse dieser Versuche wird eine erste Einschätzung über wichtige Aspekte eines geeigneten Wirkstoffes möglich. Der entscheidende Faktor ist die Apoptoseinduktionsrate. Denn das Ziel der Therapie ist die Remission, die nur durch den Zelltod der malignen Zellen erreicht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit werden Verbindungen mit einer induzierten Apoptoserate von mindestens 50 % in BJAB Zellen als biologisch aktiv definiert. Die Wirkstoffkonzentration, bei der 50 % der Zellen nach 72 h Inkubationszeit als apoptotisch detektiert wurden, wird als AC_{50} bezeichnet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle zur Verfügung gestellten Verbindungen.

DERIVAT	VERBINDUNG	STRUKTURFORMEL	AC_{50} [μM]	WACHSTUMS-INHIBITION BEI AC_{50} [%]	NEKROSE BEI AC_{50} [%]
WIRKSAME					
Ti 4	Carboxyl-substituiert		50-100	63 - 100	2,4 – 7,7
Ti 8	Amid		50 – 60	25 - 52	1,72 – 1,75
Ti 26	Amid		80 – 90	82 - 92	4,8 – 5,2
Ti 34	Amid		60 – 80	100	1,3 – 7,1
UNWIRKSAME					
Ti 2	Carboxylat		-	-	-
Ti 6	Carboxyl-substituiert		-	-	-
Ti 7	Binukleares Titanocen		-	-	-
Ti 9	Amid		-	-	-
Ti 19	Amid		> 100 μM	-	-

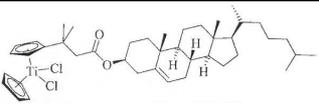
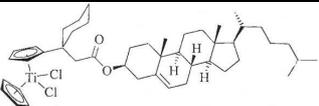
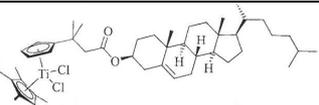
UNLÖSLICHE			
Ti 3	Cholesterin-substituiertes Carboxylat		Nicht löslich
Ti 25	Cholesterin-substituiertes Carboxylat		Nicht löslich
Ti 29	Cholesterin-substituiertes Carboxylat		Nicht löslich

Tabelle 1: **Überblick über die ermittelte biologische Aktivität der zur Verfügung gestellten Titanocenderivate.** Dargestellt sind die Derivate mit ihrer Strukturformel, der jeweiligen AC_{50} ermittelt durch modifizierte Zellzyklusanalyse nach 72-stündiger Inkubation, die Wachstumsinhibition bei der AC_{50} gemessen mit Casy@CellCounter nach 24 h Inkubation und die unspezifische Nekrose nach 2 h Inkubation, detektiert mittels LDH-Release-Assay.

Die Titanocencarboxylverbindung Ti 4 und die Amidverbindungen Ti 8, Ti 26 und Ti 34 zeigten eine AC_{50} kleiner oder gleich $100 \mu\text{M}$ und gelten als biologisch aktiv. Für die Verbindungen Ti 2, Ti 6, und Ti 7 (Carboxylate), sowie die Amide Ti 9 und Ti 19 konnte bei Konzentrationen bis zu $100 \mu\text{M}$ keine Apoptoserate von 50 % in BJAB-Zellen nachgewiesen werden. Die cholesterinhaltigen Titanocene Ti 3, Ti 25 und Ti 29 konnten, wie bereits erwähnt, aufgrund mangelnder Löslichkeit nicht für die Versuche verwendet werden. Neben der Apoptoseinduktion zeigten die aktiven Verbindungen die Fähigkeit zur Proliferationsinhibition. Diese lag bei der AC_{50} in einem Bereich zwischen 25 und 100%. Der mithilfe des LDH-Release-Assay detektierte unspezifische nekrotische Zelltod lag bei allen biologisch aktiven Derivaten bei der AC_{50} unter 10%.

4.2. Titanocen Ti 8

Die weiterführenden Untersuchungen zur Identifikation der Apoptosemechanismen und des Zytotoxizitätspotentials konnte nicht mit allen Derivaten in gleichem Umfang durchgeführt werden, da nicht alle Verbindungen in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. In den Voruntersuchungen zeigte das Derivat Ti 8 gute Ergebnisse mit guter Reproduzierbarkeit bezüglich der Apoptoseinduktionsrate, ebenso wie der Wachstumsinhibition. Zudem war dieses Derivat eines der ersten synthetisierten Verbindungen und stand in ausreichender Menge für die Testung zur Verfügung. Daher richtete sich das Hauptaugenmerk der Untersuchungen auf die Verbindung Ti 8. Die mit diesem Derivat erhobenen Daten werden in den folgenden Abschnitten

exemplarisch für die Substanzklasse dargestellt. Ergänzend werden auch Untersuchungsergebnisse anderer Derivate im Vergleich zu Ti 8 abgebildet.

4.3. Allgemeine Zytotoxizität

Die LC_{50} ist definitionsgemäß, diejenige Konzentration eines Wirkstoffes, die eine Abnahme der Vitalität um 50 % im Vergleich zur Kontrollpopulation bewirkt, unabhängig von der Art des Zelltodes. Sie dient als Grundlage für Einschätzung des zytotoxischen Potentials einer Substanz und wurde mithilfe der Annexin/Propidiumiodidfärbung detektiert. Für die Testsubstanz Ti 8 wurde die LC_{50} in einem Konzentrationsbereich von 40 – 60 μM detektiert (Abb. 16). Verglichen mit anderen, therapeutisch eingesetzten Zytostatika ist dieser LC_{50} -Wert als relativ hoch einzuschätzen.

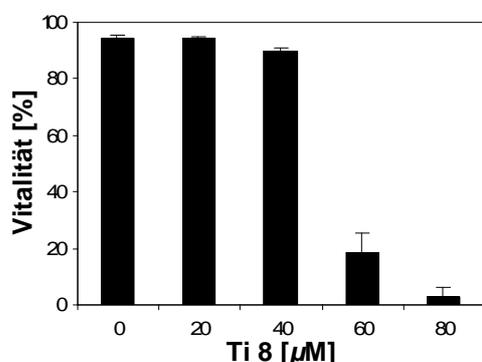


Abb.16: **Zytotoxizität von Ti 8.** Zur Ermittlung der LC_{50} wurden BJAB-Zellen 48 h mit einer Konzentrationsreihe von Ti 8 inkubiert und mit der Methode der AnnexinV/PI-Doppelfärbung der Anteil der vitalen Zellen detektiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

4.4. Proliferationshemmung

Durch die Behandlung mit Ti 8 konnte eine Reduktion der Zahl vitaler Zellen bei BJAB-Zellen bereits ab einer Konzentration von 5 μM signifikant nachgewiesen werden. Konzentrationsabhängig nimmt die Wachstumsinhibition weiter zu und erreicht bei einer Konzentration von 90 μM etwa 100%. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von 100 μM unterschreitet die Vitalzellzahl die eingesetzte Zellzahl von $1 \times 10^5/\text{ml}$, was für einen zusätzlichen Ti 8-induzierten Zelltod spricht (Abb. 17 (a)).

Auch die anderen Titanocenderivate zeigen eine ähnliche konzentrationsabhängige Wirksamkeit hinsichtlich der Proliferationsminderung (Abb. 17 (b-d)). Während bei den Derivaten Ti 8, Ti 4 und Ti 26 im Bereich der Maximalkonzentration von 100 μM eine Reduktion der Vitalzellzahl von etwa 100% nachweisbar ist, erreicht Ti 34 diesen Prozentsatz bereits in einem Konzentrationsbereich zwischen 40 bis 60 μM und erzielt damit die stärkste Wirkung auf die Zellzahl (Abb. 17 (d)). Unter der Behandlung mit 100 μM Ti34 wurden zusätzlich in ca. 20% der Zellen Zelltod induziert.

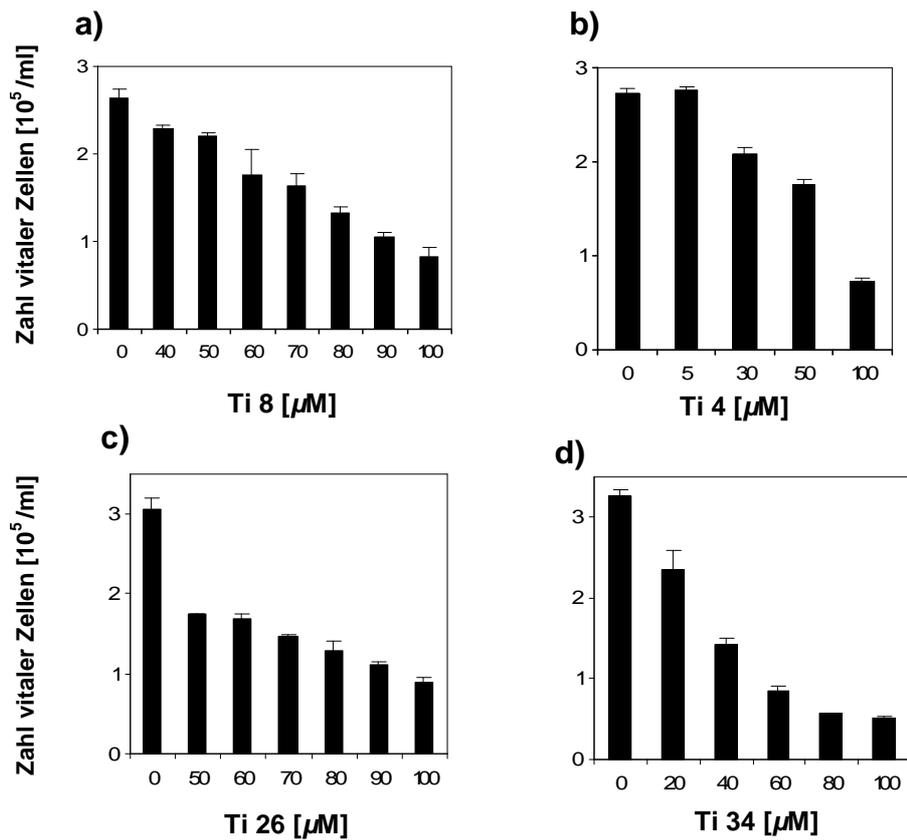


Abbildung 17: **Proliferationshemmung in BJAB-Zellen** nach 24 h durch Ti 8 (a), sowie durch andere Titanocenderivate: Ti 4 (b), Ti 26 (c) und Ti 34 (d), detektiert mittels Casy@CellCounter. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

4.5. Apoptoseinduktion *in vitro*

Entdeckt wurde die Apoptose durch die mikroskopische Beobachtung charakteristischer, morphologischer Veränderungen apoptotischer Zellen *in vitro*. Infolge einer Behandlung von BJAB-Zellen mit Ti 8 waren bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden diese Apoptose-typischen Veränderungen mit Zell-Schrumpfung, Verlust der Zellform, „blebbing“ und der Bildung von „apoptotic bodies“ mikroskopisch sichtbar (Abb. 18).

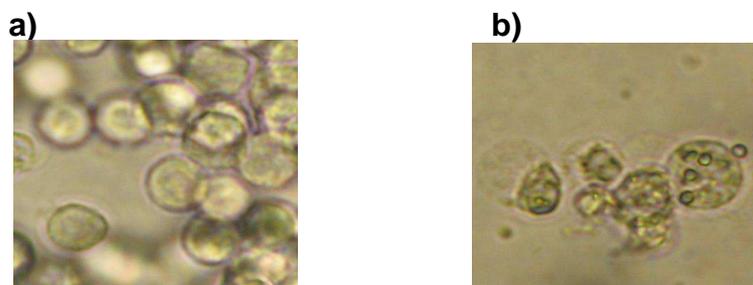


Abbildung 18: **Morphologische Merkmale der Apoptose.** Die Abbildung zeigt unbehandelte (a) und mit 80 μM Ti 8 behandelte (b) BJAB-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Es handelt sich um lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung.

Die modifizierte Zellzyklusanalyse ist eine quantitative Nachweismethode zur Detektion der Apoptose auf Einzelzellniveau. Mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse werden die Zellgröße und die Granularität einer jeden Zelle ermittelt. Diese beiden Parameter werden gegeneinander aufgetragen in Form eines Punktwolkendiagramms (Dotplot) ausgegeben (Abb. 19 (a)). Jeder Punkt entspricht demzufolge genau einer Zelle definierter Größe und Granularität. Im Zuge der Apoptose kommt es zur charakteristischen Veränderung dieser Parameter. Infolge der Zellschrumpfung verringert sich die Zellgröße und durch intrazelluläre Fragmentierung und Vakuolisierung steigt der Grad der Granularität. Es resultiert eine entsprechende Verschiebung der Punktwolke. Diese charakteristischen Veränderungen traten auch infolge der Behandlung mit Ti 8 auf (Abb. 19 (c)). Darüber hinaus kann im Durchflusszytometer die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes Propidiumiodid detektiert werden (Abb. 19 (b)). Im Zuge der Apoptose kommt es zur Fragmentierung der DNA und einer Reduktion des DNA-Gehaltes (Hypoploidie), was sich in einer Abnahme der Propidiumiodid (P.I.)-Fluoreszenz widerspiegelt (Abb. 19 (d)). Dieser Parameter wurde bei der modifizierten Zellzyklusanalyse zur Evaluation der Apoptoseinduktionsraten der Titanocenderivate verwendet.

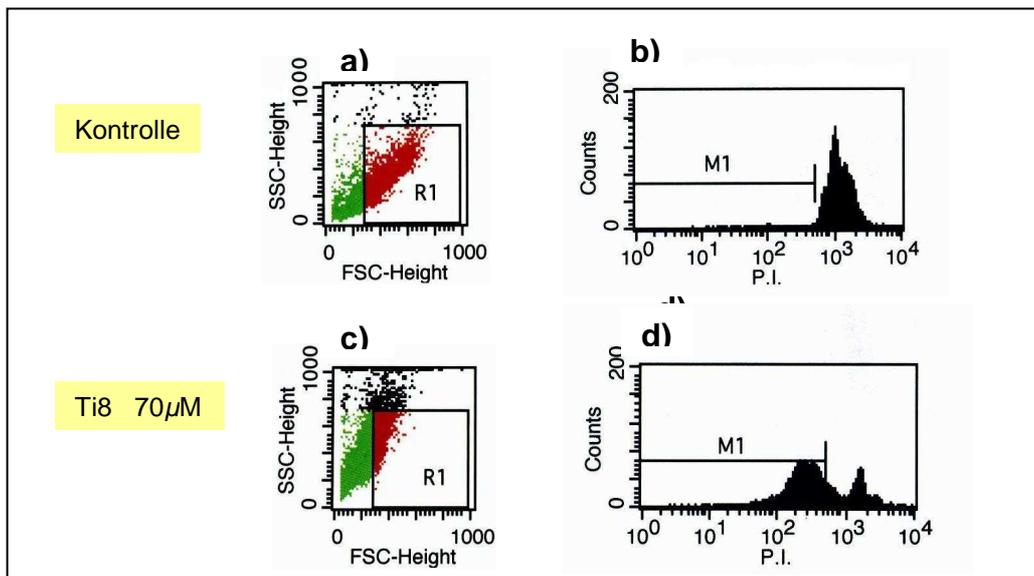


Abbildung 19: **Messparameter der modifizierten Zellzyklusanalyse.** In Form von Dotplots werden die im FACSscan im „Forward Scatter“ (FSC) ermittelte Zellgröße und im „Side Scatter“ (SSC) detektierte Granularität einer Zelle dargestellt (a,c). Die detektierte Propidiumiodid-Fluoreszenz ist in b) und d) abgebildet. Die dargestellten Daten wurden nach 72-stündiger Inkubation ohne Zusatz von Ti 8 (Nullkontrolle) (a,b) und nach Behandlung mit 70 μ M Ti 8 (c,d) erhoben.

In der verwendeten Referenzzelllinie BJAB zeigte sich eine signifikante Apoptoseinduktion durch eine Behandlung mit Ti 8 nach 72-stündiger Inkubation ab einer eingesetzten

Konzentration von 50 μM . Bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 100 μM konnte eine Apoptoserate von 84 % erzielt werden (Abb. 20).

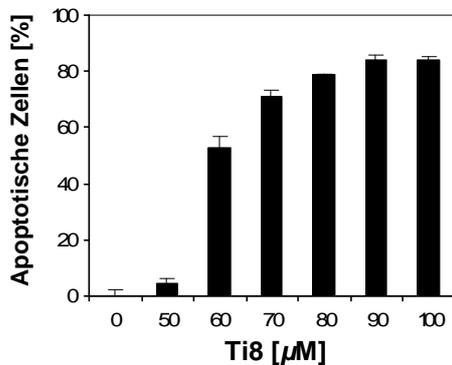


Abbildung 20: **Apoptoserate in BJAB-Zellen induziert durch Ti 8** nach 72h Inkubation. Die Daten wurden durch modifizierte Zellzyklusanalyse anhand der Veränderung der PI-Fluoreszenz ermittelt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, von denen jeweils die Apoptoserate der Kontrollproben subtrahiert wurde (korrigierte Apoptose).

Zur Evaluation des Wirkspektrums von Ti 8 wurde unter Verwendung der modifizierten Zellzyklusanalyse in verschiedenen Zelllinien die Apoptoserate ermittelt (Abb. 21). Bei der Untersuchung verschiedener Leukämie-Zelllinien konnte in allen eine signifikante Apoptoserate durch Ti 8 nachgewiesen werden: Bei der Zelllinie HL60 konnten bereits ab einer Konzentration von 30 μM apoptotische Zellen signifikant detektiert werden (Abb. 21 (a)). Bei der Zelllinie Reh wurde ab einer Konzentration von 40 μM (Abb. 21 (b)), bei Nalm 6 ab 60 μM (Abb. 21 (c)) eine signifikante Apoptoseinduktion ermittelt. In allen B-Zelllinien wurde in der Maximalkonzentration von 100 μM eine Apoptoserate von über 50 % erreicht: in HL60-Zellen wurde bei einer Konzentration von 50 μM in über 60 % der Zellen Apoptose induziert, in Reh- und Nalm 6- Zellen sogar bis zu 80 % bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μM . Ähnliche Ergebnisse konnten in der Leukämie-Zelllinie Jurkat detektiert werden (Abb. 21 (d)), bei der eine Apoptoserate von 87 % unter einer Substanzkonzentration von 100 μM gemessen wurde. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit von Ti 8 auch in adhären Zellen untersucht. In der humanen Melanomzelllinie MelHO wurde eine signifikante Apoptoserate von 56 % nach 72 Stunden Inkubation mit Ti 8-Konzentrationen von 80 und 100 μM erzielt (Abb. 21 (e)). Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 ist aufgrund ihrer Caspase-3-Defizienz zum Teil Zytostatika-resistent. Ab einer Substanzkonzentration von 50 μM war auch hier eine signifikante Rate apoptotischer Zellen nachweisbar (Abb. 21 (f)), es konnte jedoch keine Apoptoserate über 50 % erzielt werden. Maximal wurde bei einer Konzentration von 75 μM Ti 8 in ca. 26 % der Zellen eine Apoptoseinduktion detektiert. Auch bei einer auf 100 μM gesteigerten Substanzkonzentration konnte die Apoptoserate nicht erhöht werden.

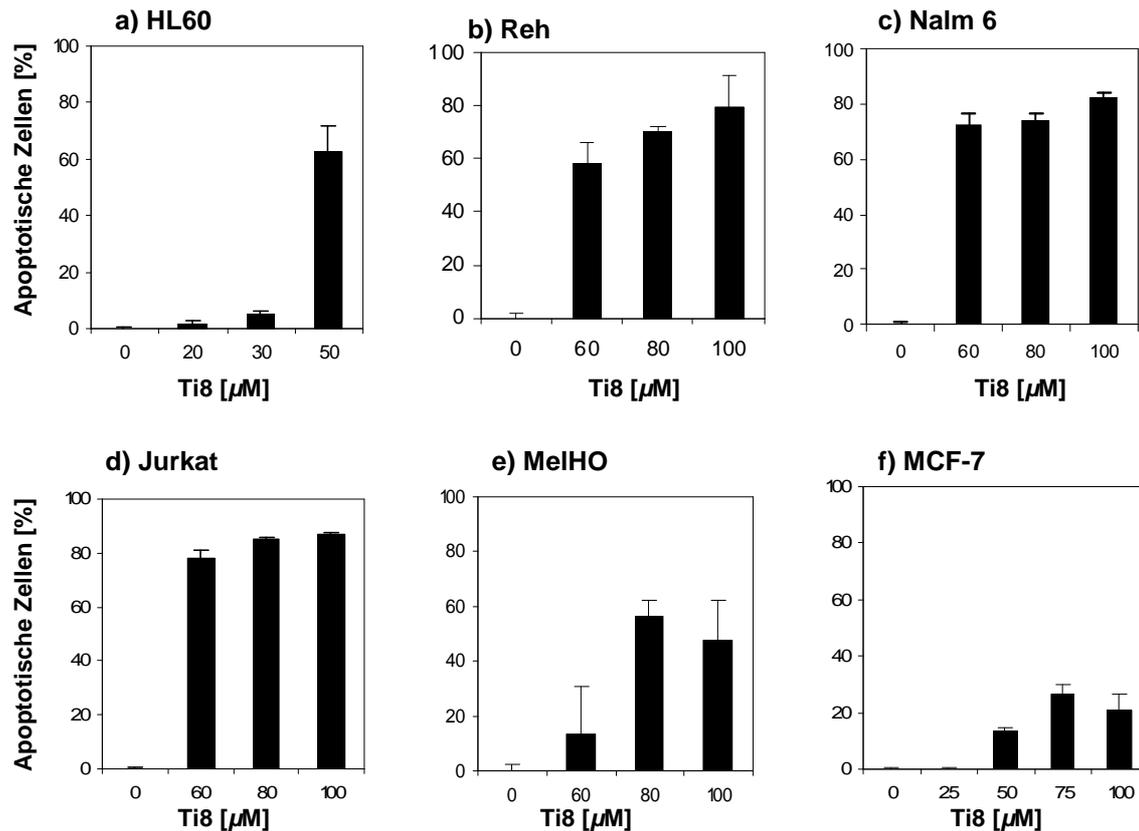


Abbildung 21: **Evaluation des Wirkspektrums von Ti 8** durch Detektion der Apoptoseraten mittels modifizierter Zellzyklusanalyse nach 72 h Inkubation in verschiedenen Zelllinien: HL60 (a), Reh (b), Nalm 6 (c), Jurkat (d), MelHO (e) und MCF-7 (f). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, von denen jeweils die Apoptoserate der Kontrollproben subtrahiert wurde (korrigierte Apoptose).

Auf dieselbe Art und Weise wurden auch die Wirkspektren der anderen biologisch aktiven Titanocenderivate evaluiert. Das Derivat Ti 4 zeigte eine ähnliche Wirksamkeit. Hier wird nur eine Auswahl der ermittelten Daten gezeigt (Abb. 22). Bei der Burkitt-like Lymphomzelllinie BJAB zeigte Ti 4 eine signifikante Apoptoseinduktion ab einer eingesetzten Konzentration von 30 μM , die bei einer Maximalkonzentration von 100 μM 73 % betrug (Abb. 22 (a)). In Nalm 6- (Abb. 22(b)) und Jurkat-Zellen (Daten hier nicht gezeigt) waren ab einer Konzentration von 60 μM signifikante Apoptoseraten detektierbar, die maximal 66 % (bei Nalm 6) bzw. 71% (Jurkat) erreichten. In den adhärennten Zelllinien HepG2 (Abb. 22 (c)), MelHO und MCF-7 (Abb. 22 (d)) konnte zwar eine signifikante Apoptoseinduktion durch Ti4 nachgewiesen werden, diese erzielte jedoch in keiner der Zelllinien einen Wert über 50 %. Bei einer eingesetzten maximalen Substanzkonzentration von 100 μM wurde in HepG2-Zellen eine Apoptoserate von 49 %, in MelHO-Zellen von 14 % und in den resistenten MCF-7-Zellen von 11 % erzielt. Verglichen mit Ti 8 ist die Wirkung von Ti 4 vor allem bei adhärennten Zelllinien geringer.

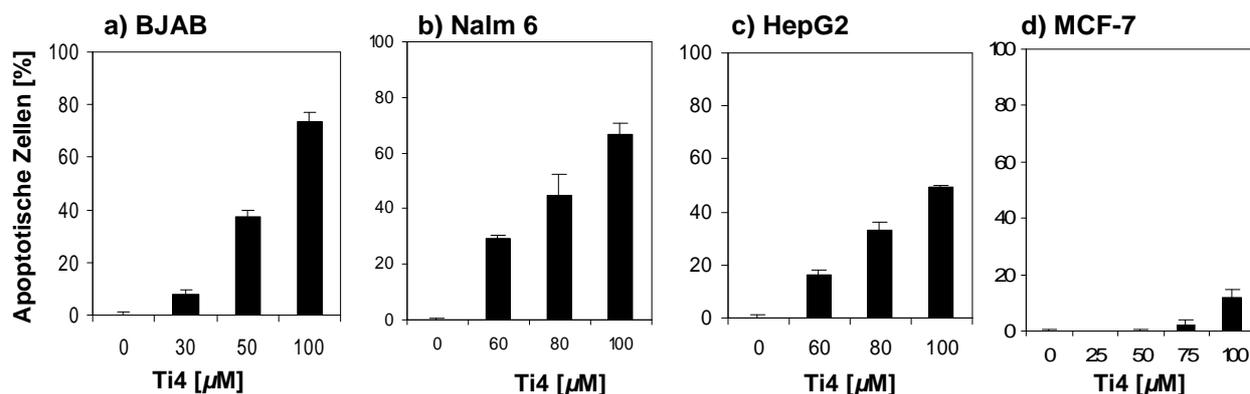


Abbildung 22: **Evaluation des Wirkspektrums von Ti 4** durch Detektion der Apoptoseraten mittels modifizierter Zellzyklusanalyse nach 72 h Inkubation in verschiedenen Zelllinien: BJAB (a), Nalm 6 (b), HepG2 (c) und MCF-7 (d). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, von denen jeweils die Apoptoserate der Kontrollproben subtrahiert wurde (korrigierte

Das Derivat Ti 26 war die erste untersuchte Verbindung, für die eine biologische Aktivität in malignen Zellen nachgewiesen werden konnte. Leider waren nur geringe Substanzmengen vorhanden, sodass nur eine geringe Zahl von Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Auch für Ti 26 konnte eine gute Wirksamkeit in den Suspensionszelllinien BJAB (Abb. 23 (a)) und Jurkat (Abb. 23 (b)) gezeigt werden. Die Apoptoseraten erreichten bei der Maximalkonzentration von 100 μM in BJAB-Zellen 67 %, in Jurkat-Zellen 79%.

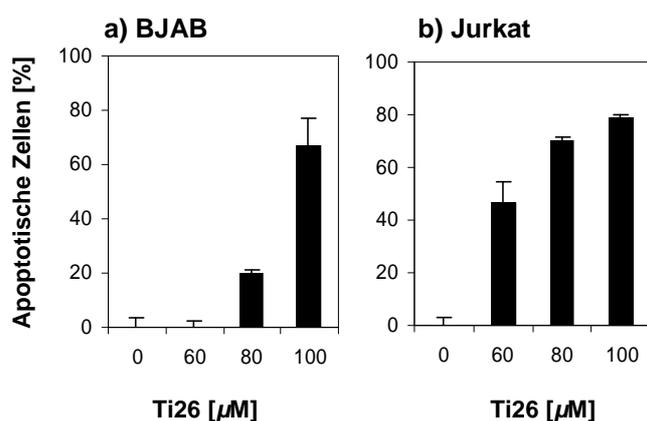


Abbildung 23: **Detektion der Apoptoseraten induziert durch Ti 26** in den Zelllinien BJAB (a) und Jurkat (b). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, von denen jeweils die Apoptoserate der Kontrollproben subtrahiert wurde.

Auch die Verbindung Ti 34 erzielte signifikante Apoptoseraten in verschiedenen Zelllinien (Abb. 24). Bei BJAB- (Abb. 24 (a)) und Nalm 6-Zellen (Abb. 24 (b)) wurde bereits bei einer Konzentration von 80 μM die maximale Apoptoserate von 50 % (BJAB) bzw. von 81 % (Nalm 6) erreicht und konnte auch durch eine Steigerung der eingesetzten Konzentration nicht erhöht werden. Bei der Leukämiezelllinie Reh wurde die maximale Apoptoserate bereits bei einer Konzentration von 20 μM erreicht (Abb. 24 (c)). Der Anteil apoptotischer Zellen zeigt keine

signifikanten Unterschiede bei höheren Konzentrationen von Ti 34. Gleiches erwies sich bei der adhären, Caspase-3-defizienten Zelllinie MCF-7 (Abb. 24 (d)), bei der ab einer eingesetzten Konzentration von 60 μM die Rate apoptotischer Zellen nicht signifikant unterschiedlich im Bereich zwischen ca. 20 bis 34 % lagen.

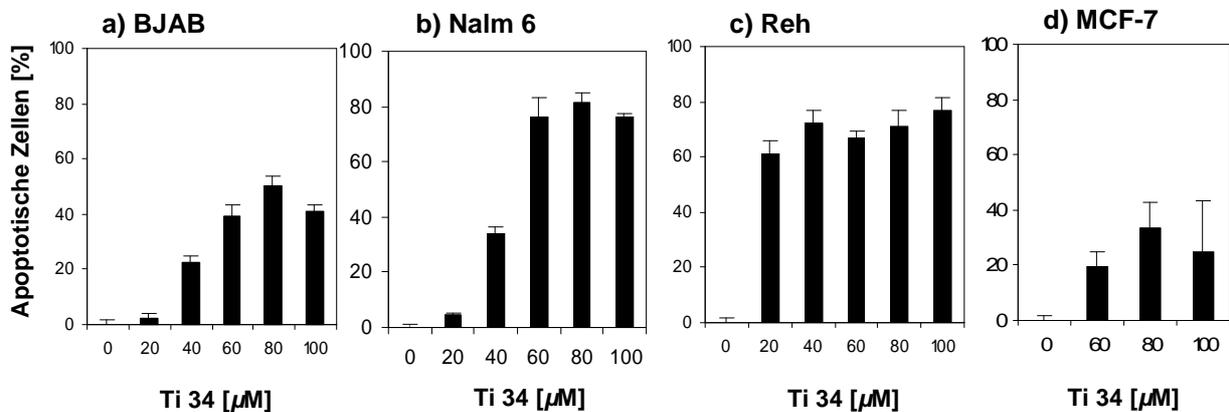


Abbildung 24: **Evaluation des Wirkspektrums von Ti 34** durch Detektion der Apoptoseraten im FACSscan nach 72 h Inkubation in verschiedenen Zelllinien: BJAB (a), Nalm 6 (b), Reh (c) und MCF-7 (d). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, von denen jeweils die Apoptoserate der Kontrollproben subtrahiert wurde.

4.6. Apoptoseinduktion *ex vivo*

Die Untersuchung verschiedener Zelllinien gibt einen wichtigen Überblick über das Wirkspektrum eines potentiellen neuen Wirkstoffes. Infolge der Kultivierung und Passagierung kommt es innerhalb der Zelllinien zu Mutationen und genetischen Veränderungen der Zellen, sodass eine Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf Zellen in einem Organismus nur bedingt möglich. Aussagekräftiger sind Daten von Untersuchungen an primären Zellen (*ex vivo*), die direkt vom Menschen entnommen und unmittelbar verwendet werden. Diese Zellen sind genetisch unverändert und dadurch als Testmodell realistischer. Dennoch können auch *ex vivo*-Versuche die Bedingungen in einem Organismus nicht ausreichend reflektieren.

Für die *ex vivo*-Versuche wurden mononukleäre Zellen durch Dichtezentrifugation aus dem Knochenmark oder Blut von Patienten mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter gewonnen. Nach Aufbereitung der mononukleären Zellen wurden sie unmittelbar mit Ti 8 und mit Zytostatika behandelt, die in der Leukämietherapie verwendet werden. Bei den verwendeten Zytostatika handelt es sich um die Anthracycline Daunorubicin (Dauno 8,9 μM), Doxorubicin (Doxo 8,6 μM), Idarubicin (Ida 1,9 μM), den Mitosehemmer Vincristin (Vcr 0,54 μM) und das Nukleosidanalogen Cytarabinosid (AraC 20,5 μM). Die eingesetzten

Konzentrationen entsprechen der jeweiligen LC_{50} der *in vitro*-Ergebnisse mit BJAB-Zellen. Nach 60 Stunden Inkubation wurden mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse die Apoptoseraten ermittelt. Die Abbildung 25 zeigt die auf diese Weise erhobenen Daten von primären Leukämiezellen von 25 Kindern mit der Erstdiagnose einer ALL. Dargestellt sind diejenigen Zytostatika, die parallel mit Ti 8 und in einer ähnlichen Fallzahl ($n = 22 - 25$) verwendet wurden.

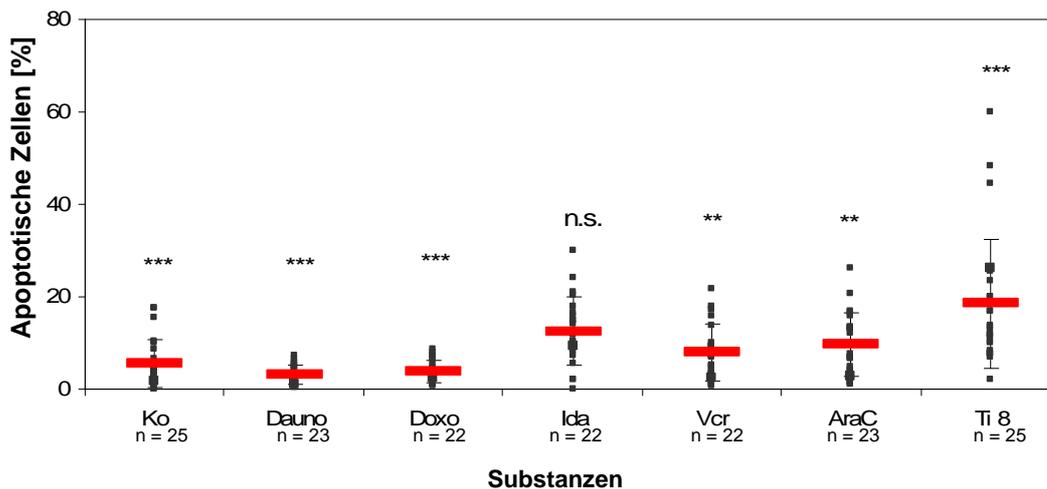


Abbildung 25: **Apoptoseinduktion *ex vivo***. Rate der Apoptoseinduktion in primären Zellen von 25 ALL-Patienten nach 60 h Inkubation mit Daunorubicin (Dauno 8,9 μM), Doxorubicin (Doxo 8,6 μM), Idarubicin (Ida 1,9 μM), Vincristin (Vcr 0,54 μM), Cytarabinosid (AraC 20,5 μM) und Ti 8 (70 μM) mit der Häufigkeit n. Die Messungen erfolgten mit der modifizierten Zellzyklusanalyse. Die Einzelpunkte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Messungen einer Substanz eines einzelnen Patienten. Die roten Balken stellen die Mittelwerte aller untersuchten Patienten dar, die Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanz wurde mit dem 2-seitigen T-Test ermittelt (n.s. = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$).

Bei den Ti 8-Proben konnte im Mittel eine Apoptoseinduktionsrate von 18,5% in den primären Zellen nachgewiesen werden. Idarubicin erreichte eine mittlere Induktionsrate von 12,5%. Für die übrigen herkömmlichen Chemotherapeutika, deren Apoptoserate im Bereich von 3 bis 9,5 % lagen, konnte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Apoptoseinduktion erzielen. Für diese Substanzen scheint in den untersuchten Zellen eine Zytostatika-Resistenz vorzuliegen, die durch Idarubicin und Ti 8 überwunden werden konnte. Die Unterschiede zwischen den Apoptoseraten der Substanzen zu der von Ti 8 sind, bis auf Idarubicin ($p = 0,070$), sehr ($p < 0,01$) bis hochsignifikant ($p < 0,001$). Ermittelt wurden die Werte unter Verwendung des 2-seitigen, unabhängigen T-Testes.

Auch die anderen biologisch aktiven Titanocenderivate wurden *ex vivo* an primären Zellen von Kindern mit einer ALL getestet (Abb. 26).

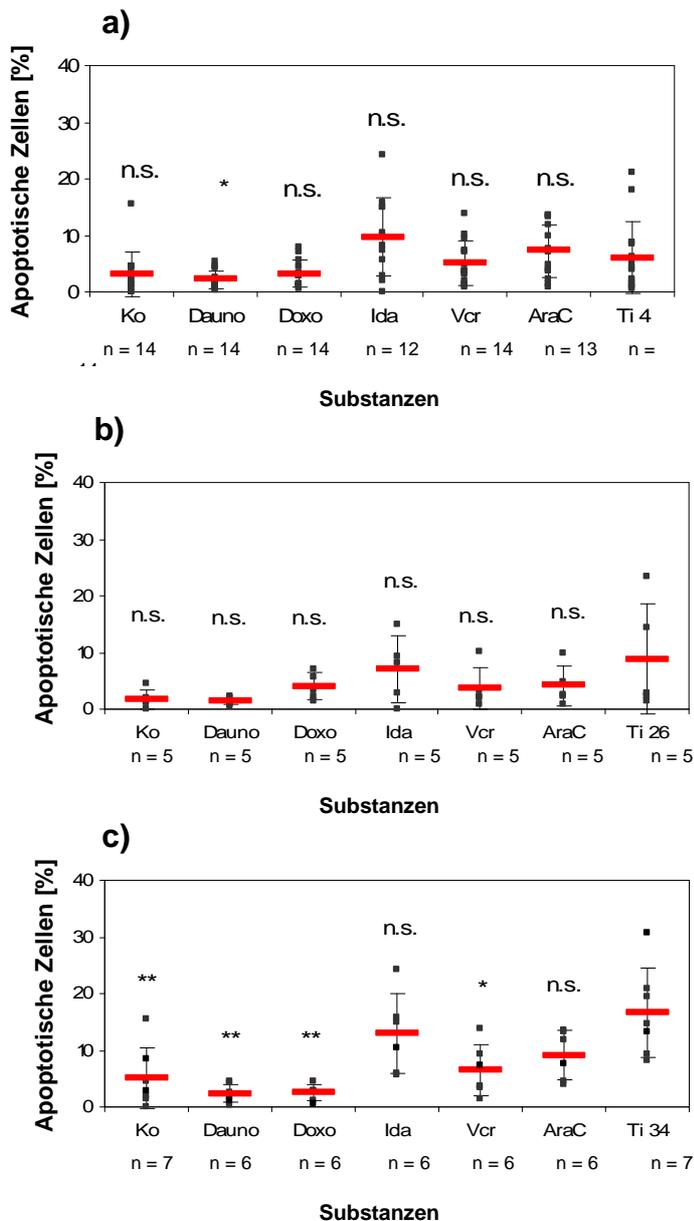


Abbildung 26: **Apoptoseinduktion *ex vivo*.**

Rate der Apoptoseinduktion in primären Zellen von Kindern mit der Erstdiagnose einer ALL nach 60 h Inkubation mit Daunorubicin (Dauno 8,9 μM), Doxorubicin (Doxo 8,6 μM), Idarubicin (Ida 1,9 μM), Vincristin (Vcr 0,54 μM), Cytarabinosid (AraC 20,5 μM) und den Titanocenderivaten Ti 4 (70 μM) (a), Ti 26 (70 μM) (b), Ti 34 (70 μM) (c). Die Daten wurden unter Verwendung der modifizierten Zellzyklusanalyse erhoben.

Die Einzelpunkte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten einer Substanz eines einzelnen Patienten.

Die roten Balken stellen die Mittelwerte aller untersuchten Patienten dar, die Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen.

Mit n wird die Fallzahl angegeben, mit der jedes Zytostatikum angewendet wurde.

Prüfung auf Signifikanz zum jeweiligen Titanocenderivat wurde mit dem 2-seitigen T-Test durchgeführt. (n.s. = nicht signifikant,

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

Dabei zeigten sich jedoch geringere Unterschiede in ihrem Vermögen zur Apoptoseinduktion verglichen mit den herkömmlichen Zytostatika. Das Derivat Ti 4, getestet an 14 verschiedenen Patienten (Abb. 26 (a)), erzielte im Mittel eine Apoptoserate von ca. 6 % und war damit den Zytostatika Idarubicin, mit einer mittleren Induktionsrate von ca. 10 %, und Cytarabin, mit ca. 7 %, unterlegen. Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Auch für das Derivat Ti 26, das an primären Zellen von 5 Leukämie-Patienten untersucht wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede der Apoptoseinduktion detektiert werden (Abb. 26 (b)). Mit einer mittleren Apoptoserate von 16 % zeigte Ti 34 eine signifikant stärkere

Apoptoseinduktion gegenüber den Zytostatika Daunorubicin, Doxorubicin und Vincristin, die den programmierten Selbstmord bei ca. 2 % bis 6,5 % der Zellen initiierten. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich dagegen im Vergleich zu Idarubicin (ca. 13 % Induktionsrate) und Cytarabin (ca. 9 % apoptotische Zellen) (Abb. 26 (c)).

Ex vivo wurde auch die Wirkung von Ti 8 auf mononukleäre Zellen gesunder Probanden untersucht, um Aussagen über die Selektivität der Ti 8-induzierten Wirkung treffen zu können. Vorbereitend wurde das dem Probanden entnommene periphere Blut, analog zur Behandlung der Patientenzellen, durch Dichtezentrifugation aufgereinigt und anschließend parallel zu Nalm 6- und BJAB-Zellen mit Ti 8 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde mithilfe des Casy®Counters die Zahl der vitalen Zellen bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit der erhobenen Daten wurde die Vitalzellzahl der Zelllinien bzw. der primären Zellen in Relation zu ihrer jeweiligen Kontrolle gesetzt (Kontrolle = 100 % vitale Zellen) und die so berechnete Viabilität graphisch dargestellt (Abb. 27 (a)).

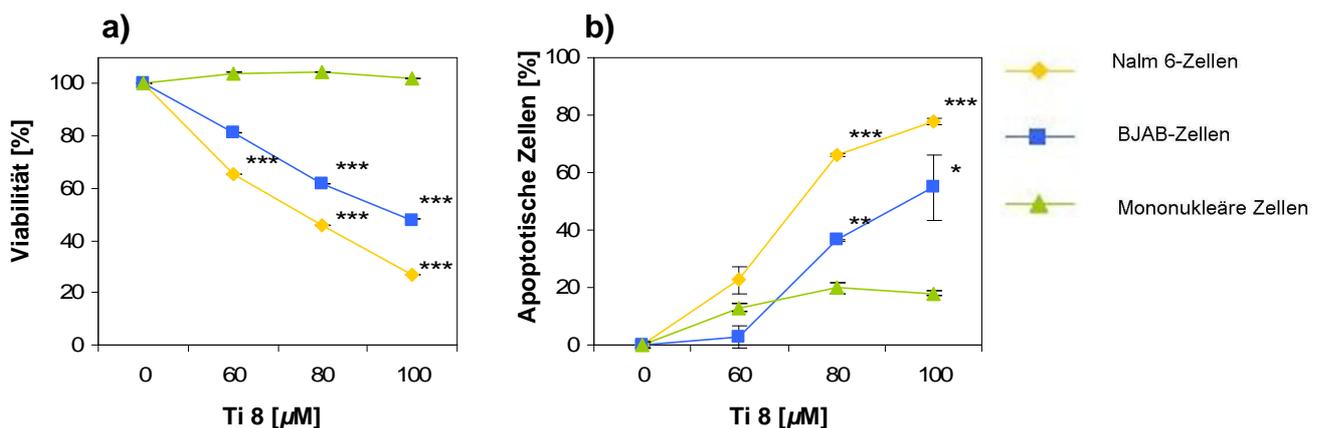


Abbildung 27: **Untersuchung auf Selektivität der Wirkungen von Ti 8.** Nalm 6-, BJAB- und primäre, mononukleäre Zellen eines gesunden Probanden wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Ti 8 behandelt. Dargestellt in a) ist die berechnete Viabilität der Zellen nach 24 h Inkubation. Die Viabilität wurde aus der mittels Casy®Counter ermittelten Vitalzellzahl berechnet. B) zeigt die jeweilige Apoptoserate, durchflusszytometrisch detektiert nach modifizierter Zellzyklusanalyse nach 72 h Inkubation. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem 2-seitigen T-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die Zahl der vitalen Zellen blieb bei den primären mononukleären Zellen unter der Behandlung mit Ti 8 in etwa konstant. Auch bei der Maximalkonzentration von $100\mu\text{M}$ Ti 8 entsprach die Zahl der vitalen Zellen annähernd der, der Negativkontrolle, die Viabilität betrug 100 %. In BJAB- und Nalm 6-Zellen führte Ti 8 konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von $100\mu\text{M}$ betrug die Viabilität der

BJAB-Zellen ca. 48 %, die der Nalm 6-Zellen sogar nur 27 %. Es konnte somit eine Selektivität bei der Reduktion der Vitalzellzahl von Ti 8 nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien und den primären Zellen waren deutlich signifikant ($p < 0,001$).

Nach 72 Stunden Inkubation wurde die Apoptoseinduktion in den verschiedenen Zellen mit der modifizierten Zellzyklusanalyse quantifiziert. Dabei konnte bei allen untersuchten Zellen eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Abb. 27 (b)). Während bei einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ Ti 8 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen festgestellt werden konnten, variierte das Ausmaß der induzierten Apoptose mit steigender Konzentration zunehmend. Auch in den primären Zellen wurde eine Apoptoserate von ca. 20% detektiert. Apoptoseraten von 55 % wurden bei $100 \mu\text{M}$ Ti 8 in BJAB-Zellen nachgewiesen, bei Nalm 6-Zellen betrug die Rate apoptotischer Zellen bei $100 \mu\text{M}$ Ti 8 sogar 78 %. Hinsichtlich der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion zeigt Ti 8 keine 100%ige Selektivität gegenüber malignen Zellen. Auch in gesunden mononukleären Zellen wird zum Teil das Selbstmordprogramm initialisiert, wenn auch in signifikant geringerem Maße als in malignen Zelllinien.

4.7. Mechanistische Untersuchungen

Zur Identifizierung des Mechanismus der Titanocen-induzierten Apoptose wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden Abschnitt dargestellt werden. Unter anderem wurde eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose vorgenommen, der Apoptosepathways identifiziert und verschiedene Apoptosefaktoren und Mechanismen untersucht.

4.8. Apoptose oder Nekrose

Die Fragmentierung der DNA wird als typisches Ereignis der Endphase der Apoptose betrachtet. In dieser Arbeit wurde die DNA-Fragmentierung mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse detektiert und zum Nachweis der induzierten Apoptose verwendet. Eine internukleosomale DNA-Spaltung wurde aber auch bei anderen Formen des Zelltodes, wie der Onkose und der Nekrose, beobachtet. Um gesicherte Aussagen über eine Apoptoseinduktion treffen zu können, ist die Detektion der DNA-Fragmentierung als alleiniger Apoptosenachweis daher nicht ausreichend. Vielmehr bedarf es weiterer Testverfahren zum Nachweis anderer biochemischer und morphologischer Veränderungen der Zellen im Sinne der Apoptose. Bei dem Testverfahren des LDH-Assay wird der Austritt des intrazellulären Enzyms Laktatdehydrogenase als Parameter einer allgemeinen Zytotoxizität infolge einer Membranschädigung detektiert. Anhand des zeitlichen Verlaufes der Membranschädigung kann diese Methode jedoch auch zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose verwendet werden. Während bei der langsam und kontrolliert ablaufenden Apoptose die Membranintegrität relativ lang erhalten bleibt, kommt es bei der Nekrose schnell zu einer Zellyse mit entsprechender LDH-Freisetzung. Abhängig von der Art des Zelltodes findet man demzufolge eine zeitliche Differenz im LDH-Release. Daher wurde der LDH-Assay nach nur 2-stündiger Inkubation durchgeführt, zu einem Zeitpunkt an dem infolge der schneller ablaufenden Nekrose bereits LDH freigesetzt wird, während nach Apoptoseinduktion die Membran noch intakt ist. Auf diese Weise verwendet, dient der LDH-Assay als eine Methode zur Quantifizierung des nekrotischen Zelltodes. Zur besseren Interpretierbarkeit erfolgte eine Umrechnung und Darstellung der Ergebnisse des LDH-Assay als Vitalität der Zellen in Prozent (Abb. 28). Durch die Behandlung mit Ti 8 wird die Vitalität nach 2 Stunden Inkubation kaum vermindert. Bei einer Maximalkonzentration von 100 μM Ti 8 beträgt die Vitalität der Zellen noch 94,5 %. Daher kann der Zelltod durch primäre Nekrose ausgeschlossen werden.

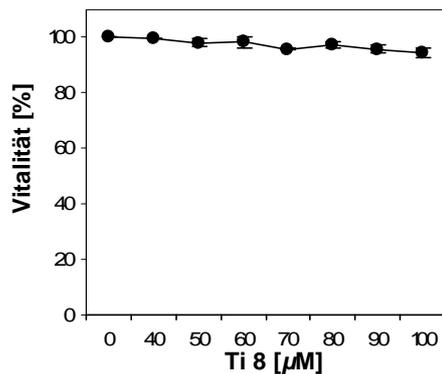


Abbildung 28: **Ausschluss unspezifischer Toxizität durch Ti 8.** Dargestellt ist die Vitalität der BJAB Zellen nach 2 h Inkubation mit verschiedenen Ti 8-Konzentrationen. Die Daten wurden mit dem LDH-Release-Assay ermittelt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Im Vergleich zu den anderen, biologisch aktiven Titanocenderivaten konnte für Ti 8 die geringste Vitalitätsminderung nachgewiesen werden. Aber auch bei den anderen Derivaten ist die Beteiligung der primären Nekrose allenfalls als gering zu bewerten. Den stärksten Grad der Vitalitätsminderung mit ca. 10,9 % zeigte Ti 34 bei der Maximalkonzentration von 100 μM (Tab. 2).

Kon- zentration \ Derivat	Ti 8	Ti 4	Ti 26	Ti 34
60 μM	98,28 %	97,61 %	100 %	98,71 %
80 μM	97,34 %	92,56 %	94,78 %	92,91 %
100 μM	94,51 %	92,28 %	90,79 %	89,13 %

Tabelle 2: **Ausschluss unspezifischer Toxizität.** Dargestellt ist die Vitalität der BJAB-Zellen nach 2 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ti 8, Ti 4, Ti 26 und Ti 34 in Prozent. Bei den aufgeführten Daten handelt es sich um die Mittelwerte drei unabhängiger Messungen unter Anwendung des LDH-Release-Assay.

Eine weitere, wissenschaftlich anerkannte Methode zum Nachweis der Apoptose ist die Annexin V-Propidiumiodid-Doppelfärbung. Das Messprinzip dieses Verfahrens beruht zum einen auf der durchflusszytometrischen Detektion von Phosphatidylserin, das in der Frühphase der Apoptose von der Innenseite zur Außenseite der Zellmembran transloziert und der Propidiumiodid-Fluoreszenz zum anderen. Die Ergebnisse der AnnexinV/PI-Doppelfärbung werden in Form von Dotplots dargestellt, wobei jeder Punkt im Diagramm eine Zelle repräsentiert. Zur Datenauswertung werden die Dotplots mittels eines Markers in Quadranten unterteilt (Abb. 29 (a)). Im Quadranten unten links befinden sich Zellen ohne AnnexinV- und Propidiumiodid-Färbung (An-/PI-). Diese Zellen gelten als vital. Im Quadranten unten rechts finden sich solche

Zellen, bei denen das Phospholipid Phosphatidylserin durch AnnexinV an der Außenmembran angefärbt (An+) wurde, bei gleichzeitig intakter Membran (PI-). Diese Zellen (An+/PI-) werden als frühapoptotisch bezeichnet. Zellen im oberen, rechten Quadranten zeigen eine positive AnnexinV- und Propidiumiodid-Färbung (An+/PI+) und gelten als spätapoptotisch. Zellen im oberen, linken Sektor (An-/PI+) sind als nekrotisch anzusehen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Ergebnisse der Doppelfärbung in Form von Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 29 (b)). Die Summe der Prozentsätze der einzelnen Balken ergibt 100 %.

Nach 48 h Inkubation mit Ti 8 zeigte sich eine deutliche Reduktion der vitalen BJAB-Zellen von 94 % auf 3 % bei einer Konzentration von 80 μM (Abb. 29). Der Anteil frühapoptotischer Zellen blieb bei allen Konzentrationen gering und erreichte das Maximum mit einer Rate von ca. 10 % bei einer Konzentration von 60 μM . Diametral zur Abnahme der vitalen Zellen stieg der Anteil der spätapoptotischen Zellen konzentrationsabhängig bis auf 94 % an. Die Rate der nekrotischen Zellen lag bei der Kontrolle, ebenso wie bei allen Konzentrationen von Ti 8 unter 4 %.

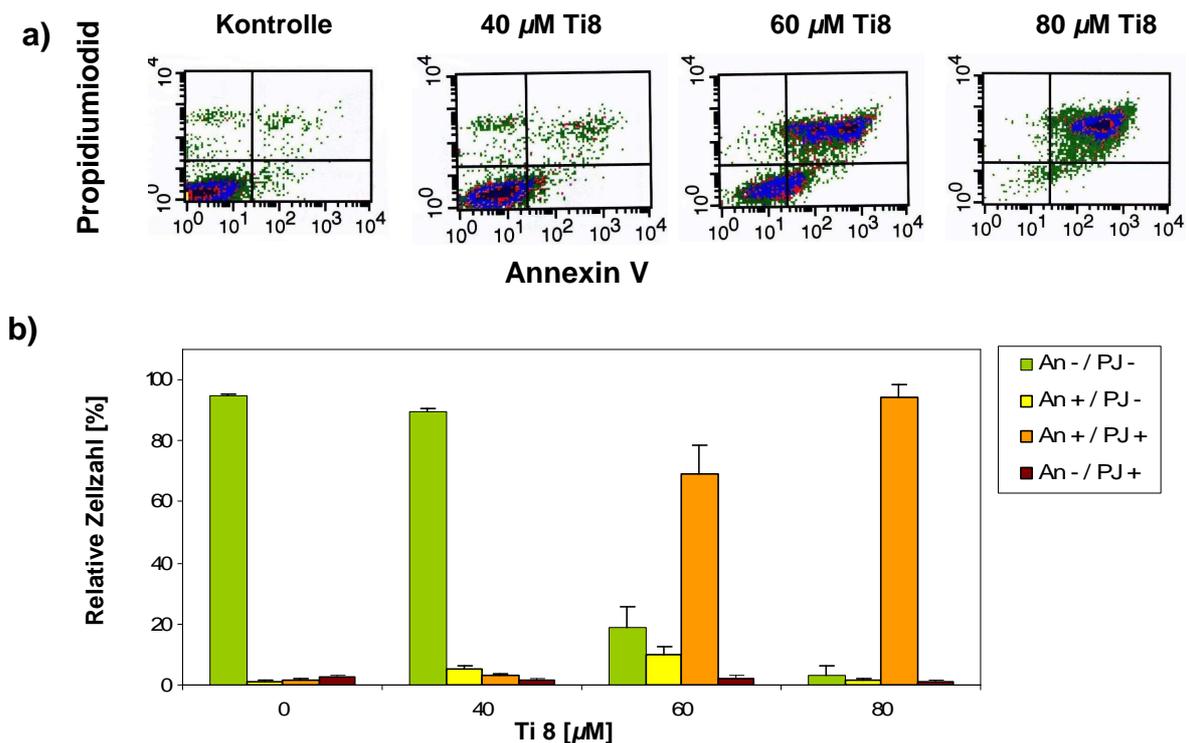


Abbildung 29: **AnnexinV/PI-Doppelfärbung.** a) zeigt repräsentative Dotplots der durchflusszytometrischen Messungen nach 48 h Inkubation mit Ti 8 in BJAB-Zellen. B) stellt die Messergebnisse in Balkendiagrammen dar. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit der AnnexinV/PI-Doppelfärbung ermittelt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Sowohl die modifizierte Zellzyklusanalyse, als auch die AnnexinV/PI-Doppelfärbung sind Testverfahren, bei denen die Daten unter Verwendung der Durchflusszytometrie erhoben werden. Die Western Blot-Technik stellt eine Methode zum Nachweis der Apoptose, unabhängig der Durchflusszytometrie, dar. Das Messprinzip beruht auf dem Nachweis von Proteinen auf zellulärer Ebene. Zum Nachweis der Apoptose werden vorrangig aktivierte Mitglieder der Caspasenkaskade und Caspasensubstrate detektiert. Die Caspase-3 ist die wichtigste Effektorcaspase der Apoptose. Zum Caspase-3-Nachweis wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch an die kleine Untereinheit (p17) der prozessierten Caspase-3 bindet. Die präformiert in der Zelle vorliegende Procaspase kann mit diesem Antikörper nicht detektiert werden. Die Abbildung 30 (a) zeigt einen Ausschnitt der Nitrozellulosemembran mit den Spaltungsbanden der prozessierten Caspase-3. Bei unbehandelten Zellen (Abbildung 30 (a), Spalte 1) findet sich keine Bande, da dort keine Prozessierung stattgefunden hat. Bei den behandelten Zellen werden die Spaltungsbanden deutlich sichtbar (Abbildung 30 (a), Spalten 2 bis 6). Ebenso wird offenbar, dass mit einer Erhöhung der Wirkstoffkonzentration die Prozessierung der Caspase-3 verstärkt werden kann (Abbildung 30 (a), vergleiche Spalte 3 und 4 bzw. 5 und 6).

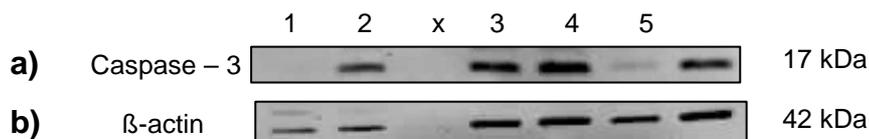


Abbildung 30: **Nachweis der prozessierten Caspase-3 im Western Blot Verfahren.** Die Gele wurden mit dem Totalzelllysat von BJAB-Zellen beladen, die nach 48 h Inkubation mit Ti 34 in den Konzentrationen 60 μM (Spalte 3) und 80 μM (4) und Ti 8 in den Konzentrationen 60 μM (5) und 80 μM (6) geerntet wurden. Als Negativkontrolle diente das Totallysat von BJAB-Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO (Spalte 1), als Positivkontrolle Zelllysat nach 48-stündiger Inkubation mit Epirubicin 5 μM (2). Spalte x ist eine Leerspalte, gefüllt mit Probenpuffer. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde eine β -Actin-Kontrolle durchgeführt (b).

Das DNA-Reparaturenzym PARP ist ein wichtiges Substrat der Effektorcaspasen, das in der Endphase der Apoptose prozessiert wird. Im aktiven Zustand hat das Enzym eine Größe von 116 kDa. Im Verlauf der Apoptose wird es infolge seiner Spaltung durch die Caspasen deaktiviert. Es verbleibt ein inaktives, 85 kDa großes Fragment. Gleichmaßen wie Caspasen kann auch das Caspasensubstrat PARP mittels Western Blot Technik sehr spezifisch nachgewiesen werden. Mithilfe des verwendeten Antikörpers kann sowohl das 85 kDa große Fragment, als auch das native Protein detektiert werden. In der Abbildung 31 ist ein Ausschnitt der Nitrozellulosemembran nach PARP-Detektion dargestellt. Dabei wird die PARP-Prozessierung

infolge einer Behandlung der BJAB-Zellen mit Epirubicin (Abb. 31, Spalte 2), Ti 8 (Abb. 31, Spalte 3 und 4) und Ti 34 (Abb. 31, Spalte 5 und 6) deutlich sichtbar.

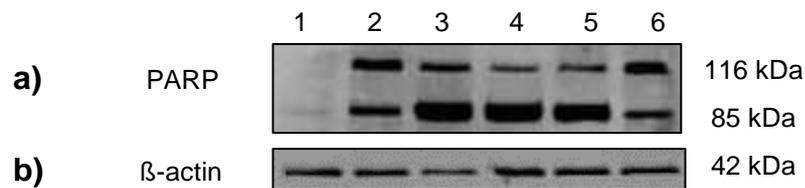


Abbildung 31: **Nachweis der PARP-Prozessierung mittels Western Blot Technik.** Die Gele wurden beladen mit dem Totalzelllysat von BJAB-Zellen, geerntet nach 48 h Inkubation mit Ti 8 in den Konzentrationen 60 μM (Spalte 3) und 80 μM (4) und Ti 34 in den Konzentrationen 60 μM (5) und 80 μM (6). Als Negativkontrolle diente das Totallysat von BJAB-Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO (Spalte 1), als Positivkontrolle das Zelllysat nach 48-stündiger Inkubation mit 5 μM Epirubicin (2). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde eine β -Actin-Kontrolle durchgeführt (b).

Um sicherzustellen, dass die Gesamtproteinmengen gleichmäßig aufgetragen wurden, wurde β -Actin, ein Strukturprotein, das sich in der Regel in allen Zellen konstant und gleich verteilt findet, nachgewiesen. Bei beiden Zellulosemembranen konnten β -Actinbanden nachgewiesen werden (Abb. 30, sowie Abb. 31 (b)). Auch wenn die Ausprägung der Banden auf der Membran zur Caspase-3-Detektion bei der Negativkontrolle und bei der Positivkontrolle verglichen mit den anderen β -Actin-Banden geringer ist, sind die Banden insgesamt dennoch annähernd vergleichbar, so dass von einer ausreichend einheitlichen Proteinbeladung ausgegangen werden kann.

4.9. Identifizierung des Apoptosesignalweges

Wie bereits diskutiert wurde, kann die Apoptose auf verschiedenen Wegen ins Rollen gebracht werden. Die Zytostatika-induzierte Apoptose wird hauptsächlich über den extrinsischen oder den intrinsischen Signalweg vermittelt. Im nun folgenden Abschnitt soll der Signaltransduktionsweg der Titanocen-induzierten Apoptose identifiziert und charakterisiert werden.

Der extrinsische Signalweg ist abhängig von Todesrezeptoren, wie CD95, und assoziierten Adaptermolekülen mit Todesdomänen, wie FADD, welche die Übertragung extrazellulärer Todessignale ins Zellinnere ermöglichen. Um zu untersuchen, ob die Titanocen-induzierte Apoptose über diesen Signaltransduktionsweg vermittelt wird, wurde ein besonderes Zellmodell der Burkitt-like-Lymphom-Zelllinie BJAB verwendet. Bei diesem Testmodell ist eine Zelllinie eine doppelt negative Mutante für FADD (BJAB FADD^{-/-}), eine zweite Zelllinie (BJAB mock) zeigt dagegen ein normales Expressionsmuster für FADD. Beide Zelllinien wurden parallel mit

verschiedenen Konzentrationen von Ti 8 behandelt und die Unterschiede bei der Proliferationsinhibition (Abb. 32 (a)) und Apoptoseinduktion (Abb. 32 (b)) untersucht.

Wie in der Abbildung 32 (a) dargestellt, zeigte Ti 8 eine deutliche konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition in BJAB mock-Zellen, ebenso wie in BJAB FADD $-/-$ Zellen. Die Unterschiede zwischen den Zelllinienpaaren mock und FADD $-/-$ waren nicht signifikant (zweiseitiger, unabhängiger Student's T-Test, $p > 0,05$). Auch bei der Apoptoseinduktionsrate durch Ti 8 waren größtenteils keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien nachweisbar (Abbildung 32 (b)). Lediglich bei einer Konzentration von 25 μM Ti 8 war das Ausmaß der Apoptoseinduktion signifikant unterschiedlich ($p = 0,008$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der rezeptorvermittelte Signaltransduktionsweg bei der Wirkung von Ti 8 keine Rolle spielt. Wäre die Apoptoseinduktion abhängig von FADD, müsste die Apoptose bei nicht vorhandenem funktionellem FADD stark inhibiert werden. Dies konnte anhand der Versuche jedoch nicht gezeigt werden. Die Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion verläuft unabhängig von FADD.

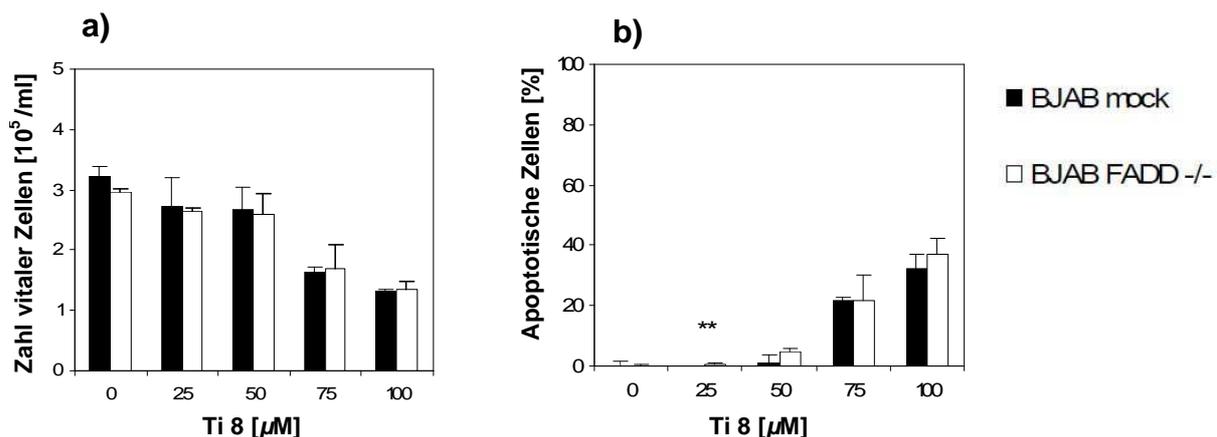


Abbildung 32: **Untersuchung der FADD-Abhängigkeit.** Die parallel verwendeten Zelllinienpaare BJAB mock und BJAB FADD $-/-$ wurden mit dem Derivat Ti 8 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde bei beiden Zellpaaren mittels Casy@Counter die Zahl der vitalen Zellen bestimmt (a), nach 72 h Inkubationszeit mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse der Anteil apoptotischer Zellen detektiert (b). Die Ergebnisse beider Zelllinien sind in einem vergleichenden Balkendiagramm dargestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden durch den 2-seitigen T-Test ermittelt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Der intrinsische Pathway geht einher mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und der Prozessierung der Caspase-9. Mithilfe der JC-1-Färbung kann die apoptotische Verringerung des Membranpotentials durchflusszytometrisch detektiert werden. Der kationische

Fluoreszenzfarbstoff JC-1 akkumuliert abhängig vom mitochondrialen Membranpotential in der Matrix der Mitochondrien. Eine Reduktion des Membranpotentials korreliert mit der Abnahme der Intensität der Fluoreszenz 2 (590nm), welche im FACSscan gemessen wird.

In der Abbildung 33 (a) wird die Fluoreszenzreduktion anhand der Verschiebung der Punktwolke in Richtung der x-Achse sichtbar. In Abbildung 33 b werden die Daten veranschaulichend in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Den vorliegenden Ergebnissen zu Folge führt Ti 8 konzentrationsabhängig zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Bei einer Maximalkonzentration von $100 \mu\text{M}$ wiesen 73% der Zellen ein reduziertes Membranpotential auf. Zusammen mit der nachgewiesenen FADD-Unabhängigkeit ist dies ein Hinweis darauf, dass die Ti 8-induzierte Apoptose über den intrinsischen Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

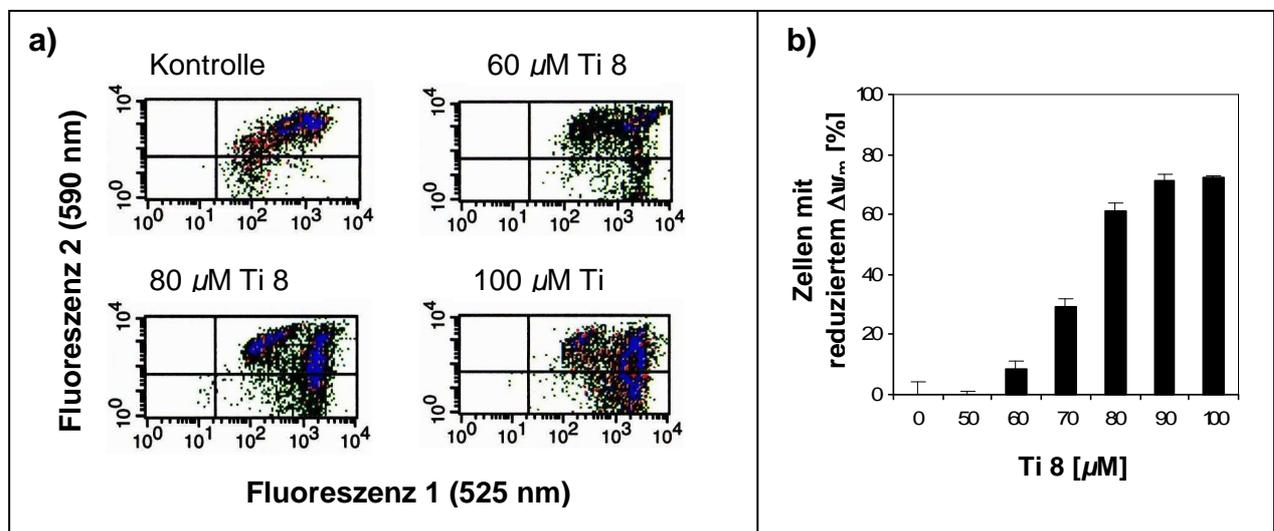


Abbildung 33: **Abfall des mitochondrialen Membranpotentials** nach Behandlung mit Ti 8 in verschiedenen Konzentrationen: (a) zeigt repräsentative Dotplots der durchflusszytometrisch gemessenen JC-1 Färbung nach 48 h Inkubation in BJAB-Zellen. (b) stellt die Messwerte in Balkendiagrammen gegenüber. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Ebenso wie für Ti 8 konnte auch für die Titanocenderivate Ti 4 und Ti 26 eine derartige Potentialänderung in einem hohen Prozentsatz nachgewiesen werden (Abb. 34). Bei einer maximal eingesetzten Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zeigten 83 % der BJAB-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Ti 4 einen deutlichen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 34 (a)). Nach 48 Stunden Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ Ti 26 war in 73 % der BJAB-Zellen ein reduziertes Membranpotential detektierbar (Abb. 34 (b)).

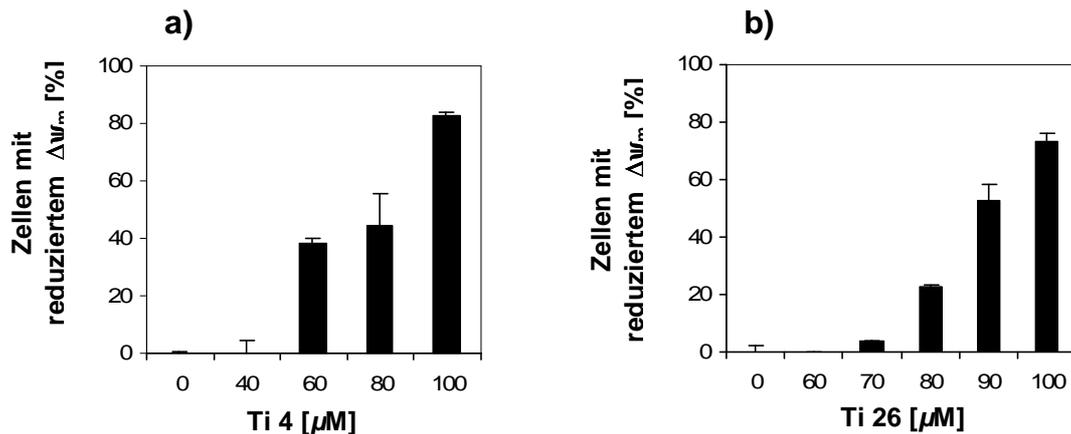


Abbildung 34: **Abfall des mitochondrialen Membranpotentials** in BJAB-Zellen infolge einer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Ti 4 (a) und Ti 26 (b) nach 48 h Inkubation unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 im FACSscan. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Im weiteren Verlauf des intrinsischen Signalweges kommt es aufgrund der gesteigerten mitochondrialen Permeabilität zur Freisetzung proapoptotischer Moleküle, wie Cytochrom C. Die Cytochrom C-Freisetzung führt zur Bildung eines Apoptosom-Komplexes, der entscheidend für diesen Signalweg ist. Der Apoptosomkomplex führt zur Aktivierung der Effektorcaspase-9, die weitere Caspasensubstrate spaltet und so maßgeblich an der Exekution der Apoptose beteiligt ist. Mithilfe der Western Blot Technik konnte die Prozessierung der Caspase-9 nach 48-stündiger Inkubation mit Ti 8 (Abb. 35 (a), Spalte 3 und 4) und Ti 34 (Abb. 35 (a), Spalte 5 und 6) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde eine β -Actin-Kontrolle durchgeführt, dargestellt in Abb. 35 (b).

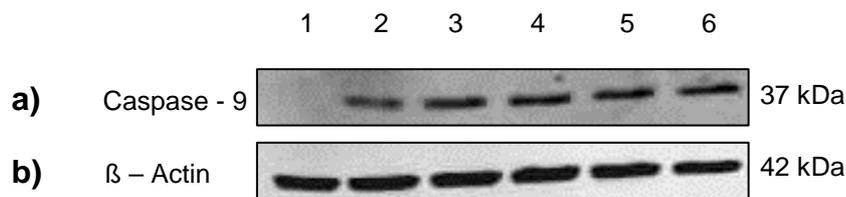


Abbildung 35: **Nachweis der prozessierten Caspase-9 mittels Western Blot Technik.** Die Gele wurden beladen mit dem Totalzelllysat von BJAB-Zellen, geerntet nach 48 h Inkubation mit Ti 8 in den Konzentrationen $60 \mu\text{M}$ (Spalte 3) und $80 \mu\text{M}$ (4) und Ti 34 in den Konzentrationen $60 \mu\text{M}$ (5) und $80 \mu\text{M}$ (6). Als Negativkontrolle diente das Totallysat von BJAB-Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO (Spalte 1), als Positivkontrolle das Zelllysat nach 48-stündiger Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ Epirubicin (2). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde eine β -Actin-Kontrolle durchgeführt (b).

4.10. Untersuchung weiterer Apoptosefaktoren

Neben den Hauptsignalwegen gibt es weitere Faktoren, die einen modulierenden Einfluss auf den Ablauf der Apoptose ausüben. Eines der bekanntesten antiapoptotisch wirkenden Proteine des intrinsischen Signalweges ist Bcl-2. Mithilfe eines Modellsystems bestehend aus einem MelHO-Zelllinienpaar wurde die Bedeutung des Bcl-2-Proteins für die Ti 8-induzierte Apoptose untersucht. Eine Zelllinie des Paares wurde mit einem leeren pIRES Plasmid (MelHO pIRES), die zweite Zelllinie mit dem Bcl-2-Gen enthaltenden pIRES Plasmid (MelHO Bcl-2) transfiziert. Dadurch findet sich in der zweiten Zelllinie das Bcl-2-Protein verglichen mit der Kontrollzelllinie um ein Vielfaches überexprimiert. Beide Zelllinien wurden dann parallel mit verschiedenen Konzentrationen von Ti 8 behandelt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinienpaaren bei der Proliferationsinhibition (Abb. 36 (a)) und Apoptoseinduktion (Abb. 36 (b)). Daher ist davon auszugehen, dass diese Prozesse unabhängig von der Bcl-2-Expression ablaufen.

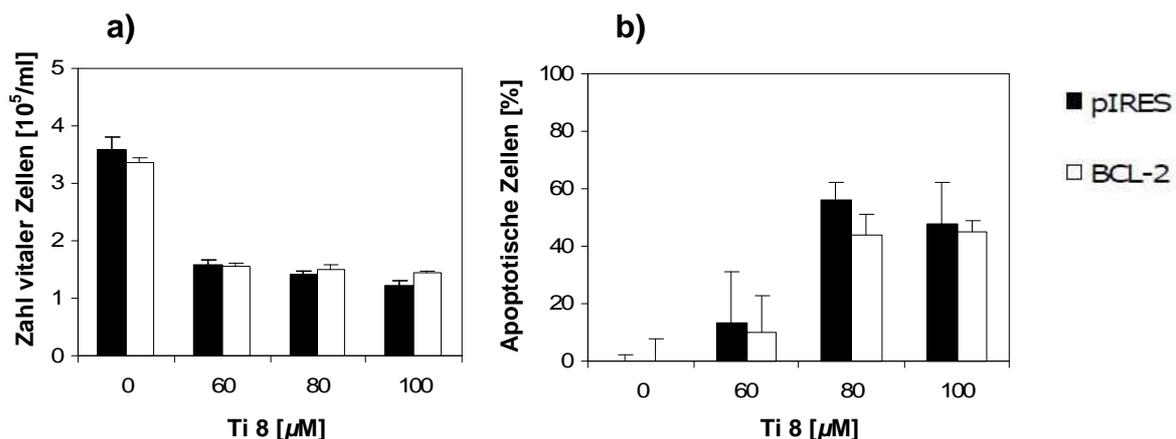


Abbildung 36: **Untersuchung der Ti 8-Wirkung hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Bcl-2.** (a) zeigt die Zahl der vitalen MelHO-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ti 8 im Vergleich, ermittelt mittels Casy®Counter. Dargestellt in (b) sind die Apoptoseraten des Zelllinienpaares MelHO pIRES und MelHO Bcl-2 nach 72 h Inkubation mit Ti 8. Die Daten wurden durchflusszytometrisch mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse bestimmt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Mittels 2-seitigem T-Test wurde auf Signifikanz geprüft.

Der Faktor Smac wirkt proapoptotisch, indem er die Casapase-inhibierende Wirkung der IAPs unterbinden kann. Die Untersuchung dieses Faktors wurde nach gleichem Vorgehen wie bei dem Faktor Bcl-2 vorgenommen. Dabei wurde ein Jurkat-Zelllinienpaar verwendet. Die Zelllinien unterscheiden sich durch eine Smac-Überexpression (Jurkat smac) und eine unveränderte Smac-Expression (Jurkat neo). Es konnte gezeigt werden, dass die

Proliferationsinhibition ebenso wie die Apoptoseinduktion durch Ti 8 größtenteils unabhängig vom Smac-Level der Zelle abläuft (Abb. 37). Lediglich bei einer Konzentration von 60 μM Ti8 waren signifikante Unterschiede zwischen dem Zelllinienpaar nachweisbar.

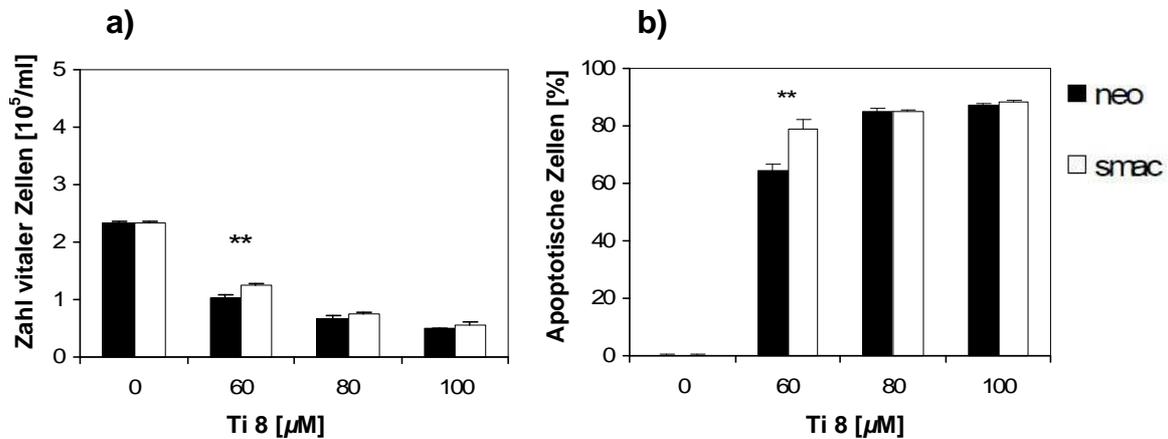
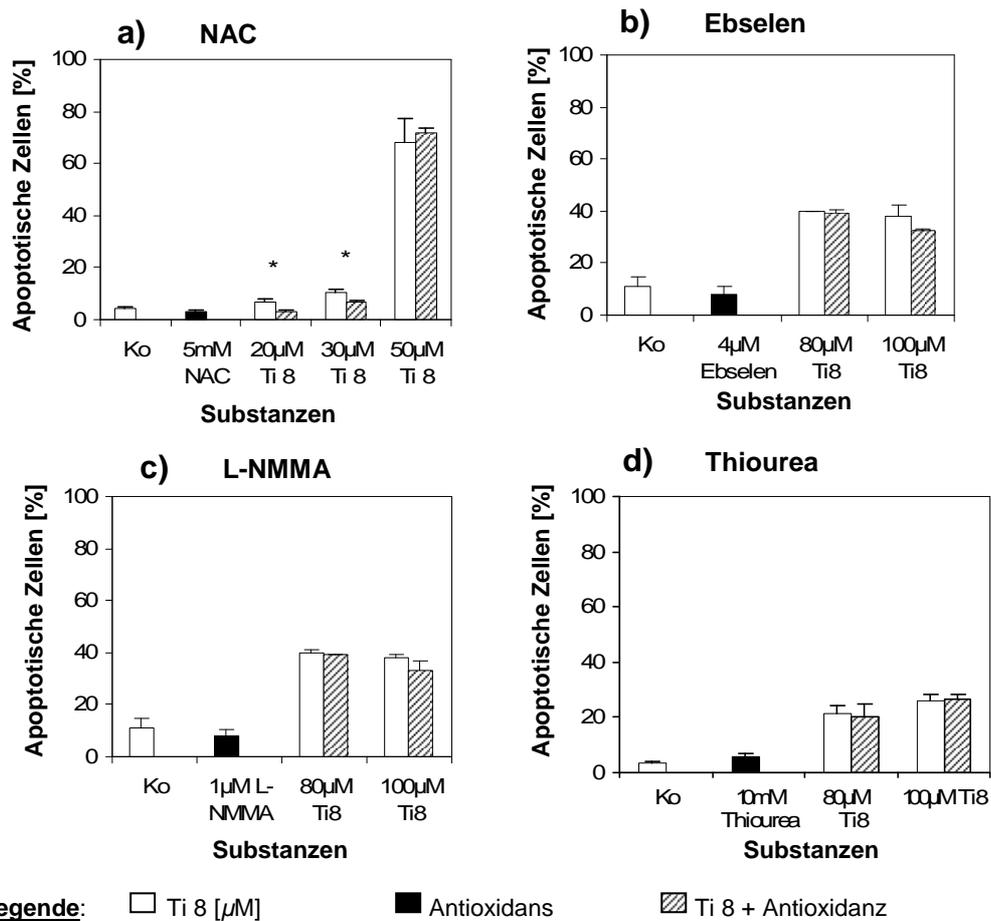


Abbildung 37: **Untersuchung der Wirkung von Ti8 hinsichtlich ihrer Smac-Abhängigkeit.** (a) zeigt die Zahl der vitalen Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ti 8 ermittelt mittels Casy@Counter. Dargestellt in (b) sind die Apoptoseraten des Zelllinienpaares Jurkat neo und smac nach 72 h Inkubation mit Ti 8. Die Daten wurden durchflusszytometrisch mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse bestimmt. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden durch den 2-seitigen T-Test ermittelt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4.11. Bedeutung der „ROS“ für die Ti 8-induzierte Apoptose

Moleküle der "Reactive Oxygen Species" (ROS) können bekanntermaßen Apoptose induzieren. Um ihre Relevanz für die Ti 8-induzierte Apoptose zu ermitteln, wurden Versuche mit verschiedenen Antioxidantien durchgeführt. N-Acetyl-L-Cystein (NAC) fungiert als allgemeiner Radikalfänger, Ebselen imitiert die Glutathionperoxidase, die Wasserstoffperoxid reduziert, N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) blockiert die endogene Stickstoffmonoxid-Synthese und Thioharnstoff (Thio) bindet Hydroxyl ($\text{OH}\cdot$)-Radikale. Nach einstündiger Vorinkubation mit den Antioxidantien wurde die Ti 8-induzierte Apoptose mittels modifizierter Zellzyklusanalyse detektiert (Abb. 38).



Antioxidantien: **NAC** = N-Acetyl-Cystein; allgemeines Antioxidans

Ebselen = Glutathion-Peroxidase

L-NMMA = N-Monomethyl-L-Arginin; Blockade der endogenen Stickstoffmonoxid-Synthese

Thio = Thiourea; Hydroxyl(OH-) – Radikal-Antioxidans

Abbildung 38: **Bedeutung der ROS-Moleküle für die Wirksamkeit von Ti 8.** HL60- (a) bzw. BJAB-Zellen (b-d) wurden mit den Antioxidantien (a) NAC, (b) Ebselen, (c) L-NMMA und (d) Thiourea jeweils 1 h vorinkubiert und anschließend mit Ti 8 behandelt. Nach 72 h Inkubation wurde die Rate apoptotischer Zellen mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse durchflusszytometrisch ermittelt. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden durch den 2-seitigen T-Test ermittelt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Lediglich bei der Verwendung von NAC mit geringen Konzentrationen (20 µM und 30 µM) von Ti 8 zeigte sich eine signifikant verminderte Apoptoseinduktion ($p < 0,05$). Bei einer Ti8-Konzentration von 50 µM konnten bereits keine Unterschiede in den Apoptoseraten nachgewiesen werden (Abb. 38 (a)). Bei den anderen eingesetzten Antioxidantien zeigten sich keine Auswirkungen auf die Ti 8-induzierte Apoptose (Abb. 38 (b-d)). ROS-Moleküle können daher nur in geringem Maße bei der Apoptoseinduktion durch Ti 8 eine Rolle spielen.

4.12. *In vivo*-Untersuchungen

Zur Untersuchung der Wirksamkeit *in vivo* und zur Einschätzung der Toxizität von Ti 8 wurde das NOD/SCID-Mausmodell verwendet. An Tag 14 wurde, nachdem der injizierte Tumor aus BJAB-Zellen eine palpable Größe aufwies, mit der oralen Gabe von 50 mg/kg Körpergewicht Ti 8 begonnen, eine Kontrollgruppe von SCID-Mäusen erhielt analog Olivenöl im gleichen Intervall. Das Körpergewicht (KG) der Mäuse, das Tumorumfang (TV) und das relative Tumorumfang wurden im Verlauf beobachtet. Es zeigte sich ein therapeutischer Effekt infolge der oralen Behandlung mit Ti 8 in Form einer signifikanten Reduktion der Tumorumfang im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 39).

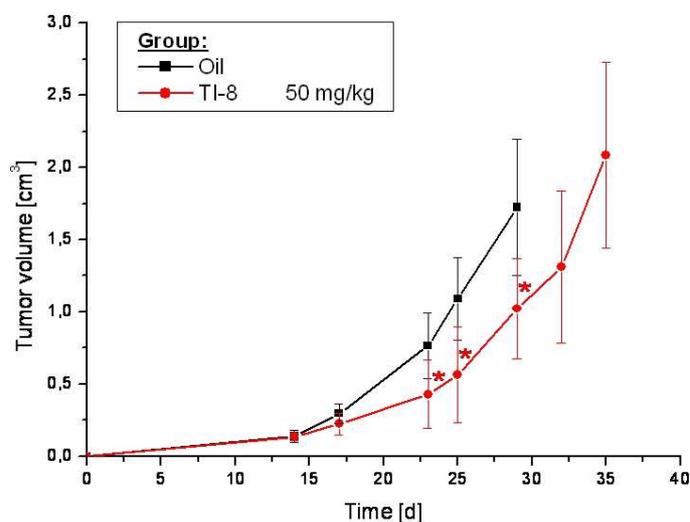


Abbildung 39: **Verlauf des Tumorumfangs *in vivo*.**

Sechs der Versuchstiere erhielten ab Tag 14 oral 50 mg/kg KG Ti 8, die Kontrollgruppe (8 Tiere) erhielt Olivenöl im gleichen Intervall. Dargestellt ist der Verlauf des ermittelten Tumorumfangs. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Berechnung signifikanter Unterschiede erfolgte mittels Man-Whitney U-Test (* = $p < 0,05$).

Der Verlauf des durchschnittlichen Körpergewichtes diente als Parameter der Toxizität. Die untersuchten SCID-Mäuse hatten anfänglich ein durchschnittliches Gewicht von 26 g. Unter der Gabe von Ti 8 zeigte sich eine leichte Gewichtsabnahme auf maximal 21 g (86 % des Ausgangsgewichtes). Die Gewichtsreduktion unterschied sich zu allen Messpunkten (Tag 14, 17, 23, 25, 29) signifikant von der Kontrollgruppe (Abb.40).

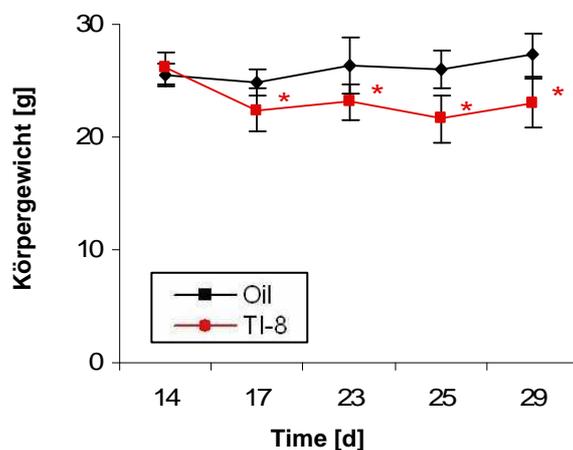


Abbildung 40: **Verlauf des Körpergewichtes** der Versuchstiere. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Berechnung signifikanter Unterschiede erfolgte mittels Man-Whitney U-Test (* = $p < 0,05$).

Im Versuchsverlauf wurde in der Kontrollgruppe der Tod von zwei Versuchstieren (Tag 21 und 25), in der Gruppe der Ti 8-behandelten Mäuse der Tod eines Tieres (Tag 21) beobachtet. Die genaue Todesursache konnte nicht geklärt werden. Bei insgesamt guter Tolerabilität der Ti 8-Gabe sind die Gewichtsreduktion und das Versterben eines Versuchstieres deutliche Anzeichen einer gewissen Toxizität des Wirkstoffes. Zeichen einer höhergradigen Toxizität zeigten sich während der Behandlung nicht.

4.13. Weitere Substanzeigenschaften

Für die Verwendung einer Substanz als Wirkstoff sind neben der Fähigkeit zur Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion auch andere „allgemeine“ Substanzeigenschaften von Bedeutung. Eine solche Eigenschaft mit Relevanz für den therapeutischen Einsatz ist die, der Proteinbindung. Um zu überprüfen inwiefern die Wirkung von Ti 8 von der Proteinbindung abhängig ist, wurden Versuche mit Zellkulturmedien durchgeführt, bei denen die Konzentration des zugesetzten fetalen Kälberserums (FCS) variiert wurde.

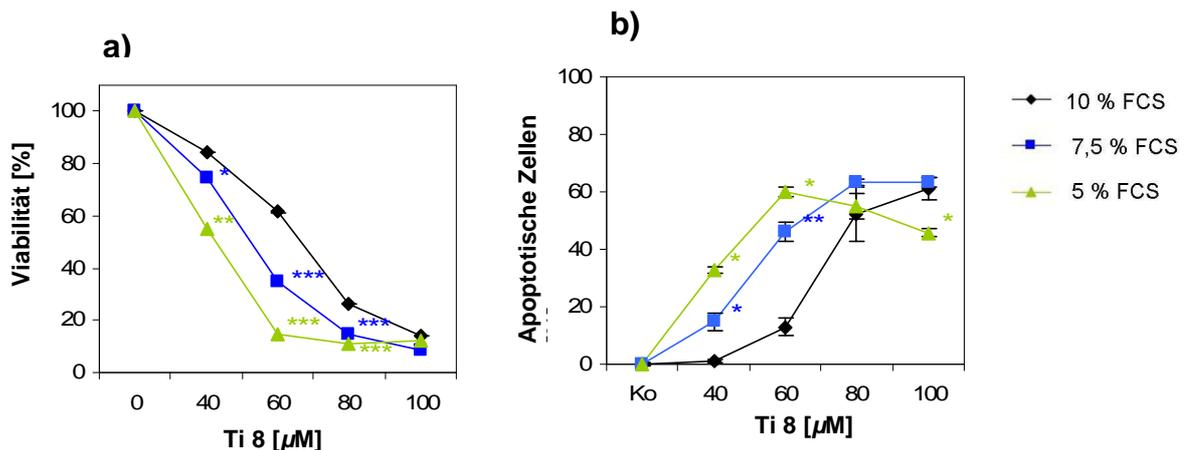


Abbildung 41: **Untersuchungen zur Proteinbindung.** BJAB-Zellen wurden in Zellkulturmedien mit variierendem Gehalt an FCS (5%, 7,5% und 10%) kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Vitalzellzahl mittels Casy@Counter detektiert, in Relation zur jeweiligen Kontrolle daraus die Viabilität berechnet und in (a) dargestellt. Abgebildet in (b) sind die Werte der Apoptoseinduktion, ermittelt mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse nach 72 Stunden Inkubation. Die Unterschiede zum Medium mit 10 % FCS-Gehalt wurden unter Verwendung des 2-seitigen T-Testes für unabhängige Variablen auf Signifikanz geprüft. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt; gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Wie vermutet, trat die proliferationsinhibierende Wirkung von Ti 8 bei geringeren Konzentrationen FCS im Zellkulturmedium im mittleren Konzentrationsbereich deutlicher hervor, als dies bei der üblichen Konzentration von 10% FCS der Fall war (Abb. 41 (a)). Bereits bei 40 µM Ti 8 konnte bei 7,5% FCS eine Reduktion der Viabilität der BJAB-Zellen auf 75 %,

bei 5 % FCS sogar auf 55 % nachgewiesen werden, während die Viabilität der Zellen bei 10 % FCS noch 84 % betrug. Auch bei Konzentrationen von 60 μM und 80 μM Ti 8 bestätigte sich, dass die Proliferation umso stärker gehemmt wurde, je geringer der FCS-Gehalt und damit der Proteingehalt des Mediums war. Mit steigender Konzentration Ti 8 nahmen die Unterschiede im Ausmaß der Proliferationsinhibition jedoch ab, bis bei der maximalen Konzentration von 100 μM keine signifikanten Unterschiede mehr detektiert werden konnten.

Die Untersuchungen zur Apoptoseinduktion unter verschiedenen Konzentrationen FCS erbrachten ein ähnliches Ergebnis (Abb. 41 (b)). Nach Inkubation mit 40 μM Ti 8 zeigte sich mit 33 % die höchste Rate an apoptotischen Zellen bei 5 % FCS. Auch bei 7,5% FCS lag die Apoptoserate mit 15% signifikant über der Induktionsrate bei Medium mit dem üblichen 10 % FCS-Gehalt (1%). Ab einer Konzentration von 80 μM Ti 8 konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr nachgewiesen werden.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden zum Teil Schwankungen bei der Wirksamkeit von Ti 8 beobachtet. Die Beobachtung des Wirkungsverlustes mit zunehmender Lagerungszeit der angesetzten Stocklösung führte zu der Vermutung, dass die in DMSO gelöste Wirksubstanz zerfällt und nur noch teilweise wirksam ist. Zur Überprüfung dieser These wurde die Ti 8-induzierte Apoptose einer Ti 8-Stocklösung, die unmittelbar vor dem Versuch angesetzt wurde („neu“) mit einer sieben Tage zuvor vorbereiteten Stocklösung („alt“) verglichen (Abb.42).

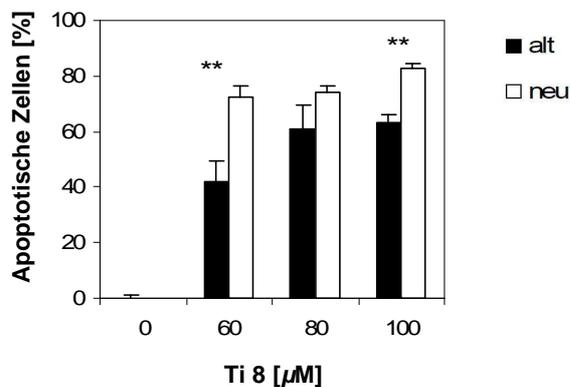


Abbildung 42: **Untersuchung der chemischen Stabilität von Ti8.** Vergleichend dargestellt sind die Apoptoseraten in Nalm 6-Zellen nach 72 h Inkubation mit 7 Tage alter („alt“) und frisch angesetzter („neu“) Ti 8-Lösung, ermittelt mittels modifizierte Zellzyklusanalyse. Abgebildet sind die Mittelwerte von Dreifachmessungen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden durch den 2-seitigen T-Test ermittelt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Potential zur Apoptoseinduktion zwischen „alter“ und „neu“ angesetzter Stocklösung mit einer Unterlegenheit der „alten“ Stocklösung. Die Unterschiede wiesen bei den Konzentrationen von 60 μM und 100 μM eine deutliche Signifikanz auf. Bei der Konzentration von 80 μM war aufgrund der großen Standardabweichung kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

5. Diskussion

Maligne Tumorerkrankungen sind ein Bereich intensiver Forschungstätigkeit. Die wissenschaftliche Forschung hat zu einem besseren Verständnis für die Entstehung der Erkrankungen und auch zu einer Verbesserung der Therapien geführt. Dennoch bilden Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Dies hat verschiedene Ursachen. Ein Grund dafür sind die starken Nebenwirkungen der Zytostatika, ein anderer die Resistenzmechanismen der Tumorzellen, die die Wirkung der Chemotherapien reduziert. Daher bleibt die Erforschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe ein wichtiges Ziel derzeitiger Forschung. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden Verbindungen der Wirkstoffklasse der Titanocene hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in malignen Zellen untersucht und charakterisiert. Dabei kann die Arbeit in zwei Abschnitte unterteilt werden. In einem ersten Abschnitt wurde die Aktivität der verschiedenen Derivate quantifiziert. In einem zweiten Abschnitt wurde der Wirkmechanismus genauer untersucht. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf das Derivat Ti 8, dessen Wirkspektrum *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* evaluiert wurde. Weitere biologisch aktive Derivate wurden vergleichend dazu betrachtet.

5.1. Quantifizierung der Aktivität

Um einen ersten Überblick über die Aktivität der Titanocenderivate zu erhalten wurden drei, für einen antitumoralen Wirkstoff wichtige Aspekte untersucht: das Potential zur Wachstumshemmung und spezifischen Zytotoxizität unter Ausschluss der ungerichteten Nekrose. Drei der Derivate waren für die Versuchszwecke nicht ausreichend in DMSO löslich. Diese unlöslichen Derivate (Ti 3, Ti 25 und Ti 29) zählen zu den cholesterin-substituierten Titanverbindungen, die durch Acylierung des Titanocencarboxylates mit Cholesterin entstehen. Derartige Verbindungen finden in der Chemie Verwendung als Gelatoren organischer Lösungsmittel. Die übrigen Verbindungen wurden in einer Konzentrationsreihe bis zu einer Maximalkonzentration von 100 μM auf der humanen Burkitt-like-Lymphom Zelllinie BJAB getestet. Verbindungen, die unter Verwendung der modifizierten Zellzyklusanalyse eine Apoptoseinduktionsrate von 50% erzielen konnten, wurden als biologisch aktiv definiert. Die Carboxylatverbindungen Ti 2, Ti 6, und Ti 7, sowie die Amide Ti 9 und Ti 19 konnten entsprechende Apoptoseraten mit der eingesetzten Maximalkonzentration von 100 μM nicht erreichen und gelten definitionsgemäß als unwirksam. Für vier der insgesamt zwölf Derivate (Ti 4, Ti 8, Ti 26 und Ti 34) konnte in mehr als 50% der Zellen die apoptosetypische DNA-Fragmentierung nach Behandlung über 72 h nachgewiesen werden, sodass diese vier

Verbindungen als biologisch aktiv angesehen werden. Die Konzentration, bei der eine Apoptoserate von 50 % (AC_{50}) erreicht wurde lag bei den vier Derivaten in einem Konzentrationsbereich zwischen 50 und 100 μM . Die niedrigste AC_{50} erzielte Ti 8 mit Konzentrationen von 50-60 μM . Dieser Wirkungsbereich liegt über dem herkömmlich verwendeter Zytostatika (LC_{50} -Werte *in vitro* bei BJAB-Zellen: Daunorubicin 8,9 μM , Doxorubicin 8,6 μM , Cytarabinosid 20,5 μM und Fludarabin 12,9 μM ; Vorarbeiten der AG Prokop). Ausschlaggebend für den klinischen Einsatz sind die Spezifität und die therapeutische Breite eines Wirkstoffes. Unter Verwendung des LDH-Release-Assay nach 2 Stunden Inkubation wurde die unspezifische Zytotoxizität durch Nekrose für die Titanocenderivate ermittelt. Bei allen Derivaten lag die unspezifische zytotoxische Schädigung im Konzentrationsbereich der jeweiligen AC_{50} unter 8 %, bei Ti 8 sogar unter 2%. Dies spricht für eine geringe unspezifische Toxizität trotz einer vergleichsweise hohen Wirkstoffdosis.

Neben der Apoptoseinduktion spielt auch die Fähigkeit zur Proliferationsinhibition für einen zytostatisch wirksamen Wirkstoff eine wichtige Rolle. Alle vier biologisch aktiven Verbindungen zeigten auch diese Fähigkeit.

Bei den untersuchten Derivaten zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Proliferationsinhibition und der Apoptoseinduktion. Diese beiden Effekte können unabhängig voneinander auftreten, können aber auch aneinander gekoppelt sein, wenn beispielsweise die Apoptoseinduktion über einen Zellzyklusarrest erzielt wird. Weiterhin ist nach erfolgter Aktivierung des Selbstmordprogramms die Teilung der sterbenden Zelle nicht mehr möglich. Daher kann man nicht nur bei dieser Substanzklasse, sondern auch bei vielen Klassen der herkömmlichen Zytostatika sowohl die Proliferationshemmung als auch die Apoptoseinduktion als Hauptwirkmechanismen feststellen.

Aussagekräftige Rückschlüsse auf mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich aufgrund der geringen Zahl der Derivate nicht ziehen. Zwar waren unter den wirksamen Derivaten die Amidverbindungen (Abb. 43 (a)) in einem Verhältnis von 3:1 stärker vertreten als die Carboxylverbindungen (Abb. 43 (b)), dennoch gab es auch Amidverbindungen, die keine ausreichende biologische Wirksamkeit zeigten.

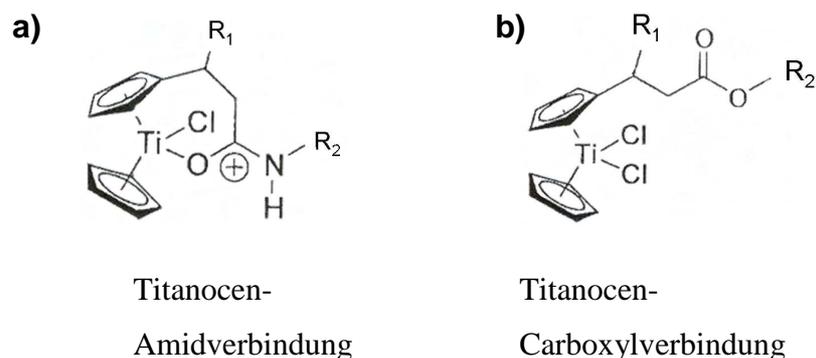


Abbildung 43: **Allgemeine Struktur der Titanocenamid- (a) und Titanocencarboxylverbindung (b).** An Position R_1 und R_2 finden sich derivatabhängig verschiedene Substituenten.

Auch die Präsenz spezieller Substituenten zeigte keinen direkten Zusammenhang zur Wirkung der Verbindung. Beispielsweise findet man einen Cyclohexadienylrest (C_6H_5) als Substituenten (an Position R_2) der wirksamen Amidverbindung Ti 26, ebenso wie bei der unwirksamen Verbindung Ti 9 (Abb. 44, hellgrün unterlegt). Die Cyclohexadienylsubstitution scheint also nicht wirkungsentscheidend zu sein. Diese beiden Verbindungen unterscheiden sich voneinander an Position R_1 in einem weiteren Substituenten, der die Wirksamkeit zu beeinflussen scheint.

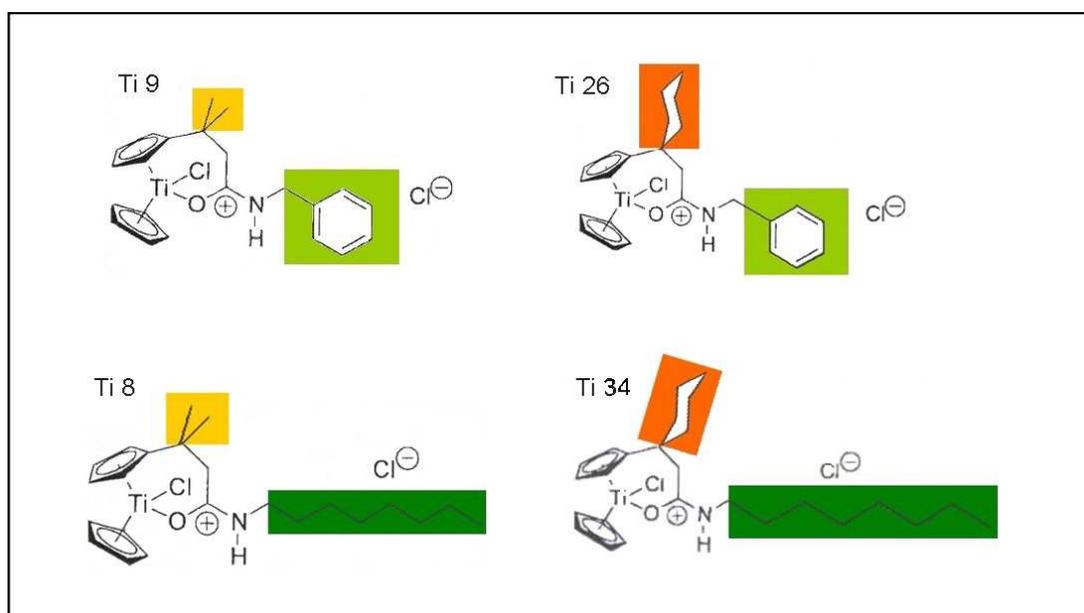


Abbildung 44: **Strukturvergleich.** Dargestellt sind die Strukturformeln der Derivate Ti 9, Ti 26, Ti 8 und Ti 34 mit farblich unterlegten Substituenten: zwei Methylreste (gelb) und Cyclohexylrest (orange) an Position R_1 , Cyclohexadienylrest (hellgrün) an Position R_2 .

Die wirksame Verbindung Ti 26 weist an dieser Position einen Cyclohexylrest (C_6H_{10}) auf (Abb. 44, orange unterlegt), das unwirksame Ti 9 zwei Methylreste ($2(CH_3)$) (Abb. 44, gelb unterlegt). Der Cyclohexylrest scheint demzufolge die Wirksamkeit zu begründen. Diese Vermutung wird

jedoch anhand eines anderen Derivatpaares widerlegt. Denn auch die beiden Derivate Ti 8 und Ti 34 unterscheiden sich auf die gleiche Weise an Position R₁, beide Derivate zeigen jedoch biologische Aktivität in malignen Zellen (Abb. 44).

Die Verbindung Ti 34 wurde von den Chemikern des Kekulé-Institutes synthetisiert, nachdem das zytotoxische Potential von Ti 8 und Ti 26 in malignen Zellen nachgewiesen worden war. Das Derivat stellt ein Kombinationsprodukt aus Strukturanteilen von Ti 8 und Ti 26 dar.

Die Vermutungen über eventuelle Struktur-Wirkungsbeziehungen sind widersprüchlich und die Zahl der Derivate für ein computergesteuertes Modelling zu gering, als dass man zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung fundierte Aussagen darüber treffen könnte.

5.2. Untersuchungen des Wirkmechanismus von Ti 8

Nach erfolgreicher Quantifizierung des Potentials zur Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition unter Ausschluss des Einflusses ungerichteter Nekrose, wurde das Derivat Ti 8 in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen getestet, um einen Überblick über das Wirkspektrum der Substanz zu erhalten. Um ein besseres Verständnis für den Wirkungsweise zu erhalten wurden Apoptosemechanismen und beteiligte Faktoren der Signaltransduktion untersucht. Weiterführend wurden in einem ersten *in vivo*-Experiment die Toxizität und therapeutischen Effekte von Ti 8 ermittelt.

5.2.1. LC₅₀-Bestimmung

Für den allgemeinen therapeutischen Einsatz eines Arzneistoffes muss seine Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt werden. Dazu muss zweierlei nachgewiesen sein: die Wirksamkeit und die Konzentration (Dosis), bei der die gewünschte Wirkung eintritt. Ferner ist die Toxizität von Bedeutung, bei der zwischen akuter und chronischer Toxizität unterschieden wird. Zur Quantifizierung der akuten Toxizität wird in der Medizin der Begriff der Letaldosis (LD) verwendet. Die LD₅₀ ist definiert als diejenige Wirkstoffdosis, bei der in einem bestimmten Zeitraum der Tod bei 50 % der Testpopulation verursacht wird. Der Begriff der LC₅₀ (letale Konzentration) wird zum Teil synonym verwendet, von anderen Autoren jedoch auch von der LD₅₀ unterschieden. Der Begriff der Zytotoxizität umfasst allgemeiner die Gesamtheit einer Zellschädigung. Er unterscheidet weder die Art der Schädigung, noch ob die Zelle daraufhin apoptotisch oder nekrotisch zugrunde geht. Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung der LD₅₀ und LC₅₀. Zur Abschätzung des zytotoxischen Potentials der Titanocenderivate wurde die Annexin/Propidiumiodid-Doppelfärbung nach 48-stündiger Inkubation auf BJAB-Zellen

durchgeführt. Dadurch konnte der prozentuale Anteil der vitalen Zellen ermittelt werden, unabhängig davon ob geschädigte Zellen apoptotisch oder nekrotisch zugrunde gingen. Anders ist dies bei der Detektion der frühen zytotoxischen Schädigung der Zellen mittels LDH-Release-Assay nach 2 Stunden Inkubation, da dabei lediglich der Anteil nekrotischer Zellen gemessen wird.

Die ermittelte LC_{50} von Ti 8 befindet sich in dem Konzentrationsbereich von 40-60 μM und liegt damit höher als die LC_{50} anderer, verwendeter Zytostatika. Eine niedrige LC_{50} ist jedoch kein alleiniges Kriterium für ein gutes Chemotherapeutikum, vielmehr zählt die Dosis-Wirkungsbeziehung ebenso wie die Relation von Wirkung und Nebenwirkung des Wirkstoffes im Organismus.

5.2.2. Proliferationsinhibition

Zu den charakterisierenden Eigenschaften maligne transformierter Zellen zählt die Fähigkeit zu unkontrollierter Proliferation mit einer hohen Teilungsrate. Entsprechend besteht eine weitere wichtige Eigenschaft eines Zytostatikums in der Fähigkeit zur Proliferationshemmung. Schon der Name Zytostatikum beschreibt diesen wichtigen Aspekt der Wirkung (aus dem griechischen: Cyto = Zelle, statik = anhalten). Für die Verbindung Ti 8 konnte eine signifikante Proliferationsinhibition konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde bei der eingesetzten Maximalkonzentration von 100 μM die Ausgangszellzahl von $1 \times 10^5/\text{ml}$ unterschritten, so dass bei dieser Wirkstoffdosis von einem zusätzlichen Ti 8-induzierten Zelltod auszugehen ist. Auch die anderen biologisch aktiven Titanocenderivate zeigten eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition. Ti 34 erwies sich dabei mit einer Wachstumshemmung von 100% bei einer eingesetzten Konzentration von 40-60 μM als der potenteste Inhibitor. Die Proliferationsinhibition wurde nach einer festgelegten Inkubationszeit von 24 Stunden gemessen. Um Aussagen über den zeitlichen Verlauf und eventuelle zeitliche Abhängigkeiten treffen zu können, sollte eine Kinetik, beispielweise nach 12, 24, 48 und 72 Stunden, durchgeführt werden.

Die Hemmung der Proliferation ist ein wichtiger Aspekt der Tumorthherapie, auch weil zum Teil bereits durch Anhalten des Zellzyklus eine Apoptose in Tumorzellen induziert werden kann. Andererseits sind Tumorzellen nach dem medikamentös erzielten zwischenzeitlichen Teilungsstopp erneut zu ungehinderter Proliferation in der Lage. Dadurch wird eine Verzögerung der Krankheitsprogression erzielt, ohne jedoch eine Heilung zu erreichen. Nur durch einen „total

cell kill“ kann eine Heilung erreicht werden. Die Grundidee des „total cell kill“-Konzeptes ist die Beseitigung aller Tumorzellen durch Apoptoseinduktion.

5.2.3. *In vitro*-Apoptoseinduktion

Die Apoptoseinduktionsrate wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung der modifizierten Zellzyklusanalyse, bei der die DNA-Fragmentierung anhand der Abnahme der Propidiumiodid-Floureszenz detektiert wird, auf Einzelzellniveau ermittelt. Eine signifikante Apoptoseinduktion zeigte sich nach 72-stündiger Inkubation mit Ti 8 bei BJAB-Zellen ab einer Konzentration von 50 μM . Die maximale Induktionsrate von 84% wurde mit der Maximalkonzentration von 100 μM erreicht. Dieses Nachweisverfahren wurde nach einer festgelegten Inkubationszeit von 72 Stunden durchgeführt. Auch hier sollte eine Kinetik angefertigt werden, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf und eventuelle zeitliche Abhängigkeiten treffen zu können.

Das Ansprechverhalten verschiedener Tumorentitäten variiert sehr stark gegenüber Chemotherapeutika. Zur Evaluation des Wirkspektrums wurde die Wirkung von Ti 8 in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei erwiesen sich Lymphom- und Leukämiezelllinien als vergleichsweise sensibel für Ti 8. Hier waren ab einer Konzentration von 30 μM signifikante Apoptoseinduktionsraten nachweisbar, die bei 100 μM Ti 8 bis zu 82 % erreichten. Unter den untersuchten Zelllinien befanden sich sowohl Lymphomzellen, als auch Zellen von T-Zell- und B-Zell-Leukämien. Zelllinien solider Tumore sprechen meist weniger auf Chemotherapeutika an. Oft findet man in diesen Zellen Resistenzen, die eine suffiziente Apoptoseinduktion verhindern und dadurch zu einem Therapieversagen führen können. In der humanen Melanomzelllinie MelHO erzielte Ti 8 mit einer Konzentration von 80 μM eine maximale Apoptoserate von 56 %. Die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 zählt durch ihre Caspase-3-Defizienz zu den resistenten etablierten Zelllinien. Dennoch konnte Ti 8 in immerhin 26 % der Zellen das Selbstmordprogramm initiieren. In einem breiten Spektrum von Suspensions- wie adhären Zellen konnte für Ti 8 und andere Titanocenderivate das Potential zur Apoptoseinduktion, trotz zum Teil vorliegender Resistenz der Tumorzellen, signifikant nachgewiesen werden. Auch die anderen, biologisch aktiven Derivate erwiesen sich in verschiedenen Zelllinien als wirksam. Dabei war das Derivat Ti 4 verglichen mit Ti 8 in Suspensionszellen, vor allem aber in adhären Zellen hinsichtlich seiner Wirkung unterlegen. Auch die Verbindung Ti 26, die nur in wenigen Suspensionszelllinien getestet werden konnte, erreichte nicht die Apoptoseraten von Ti 8. Für Ti 34 konnte in verschiedenen Zelllinien im Vergleich zu Ti 8 ein Wirkeintritt bei geringeren Konzentrationen und ein

Sättigungseffekt der Wirkung nachgewiesen werden. Insgesamt konnte Ti 34 bei den maximalen Induktionsraten die Ti 8-Wirkung nicht übertreffen.

5.2.4. *Ex vivo*-Apoptoseinduktion

Bei der Evaluation der Wirkspektren potentieller, neuer Wirkstoffe vermitteln die Ergebnisse von *in vitro*-Versuchen einen ersten, wichtigen Überblick. Die Zelllinien entstammen humanen Tumorentitäten und sind unter entsprechenden Kultivierungsbedingungen unbegrenzt teilungsfähig. Im Verlauf von Kultivierung und Passagierung finden sich jedoch genetische Veränderungen in den kultivierten Zellen, so dass es zu großen Unterschieden zwischen primären Zellen und Zellen der Zellkultur kommen kann. Zelllinien von Leukämiezellen lassen sich meist leicht mit hohen Vitalitäten in Kultur vermehren. Primäre Zellen dagegen zeigen keine oder nur ein geringes Maß an Zellteilungen. In Kultur kommt es bei primären Zellen schnell und stetig zu einer Abnahme der Vitalität. Durch eine Kokultivierung mit Feederzellen könnte man zwar die Vitalität erhalten, würde aber nicht die Proliferationsfähigkeit der primären Zellen beeinflussen. Dennoch sind die Daten von Untersuchungen an primären Zellen (*ex vivo*) aussagekräftiger als *in vitro*-Daten, da sie unmittelbar nach ihrer Entnahme verwendet werden müssen und dadurch bei ihrer Verwendung genetisch unverändert sind.

Für die *ex vivo*-Untersuchungen wurde peripheres Blut oder Knochenmaraspirat von Patienten mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter verwendet. Unmittelbar nach der Probengewinnung wurden mononukleäre Zellen, die mittels Dichtezentrifugation selektiert, gewaschen und mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt.

Der Begriff der Leukämie wurde 1845 von Rudolf Virchow als „Weißblütigkeit“ in die medizinische Literatur eingeführt. Heute dient er als Sammelbegriff für maligne Erkrankungen der Leukozyten, die durch neoplastische Transformation und klonale Proliferation unreifer hämatopoetischer Stammzellen entstehen. Die unter dem Begriff der Leukämie zusammengefassten Erkrankungen, werden anhand verschiedener Gesichtspunkte differenziert: Nach morphologischen, zytochemischen, sowie immunzytologischen Kriterien werden die atypischen Zellen als *myeloisch* oder *lymphoblastisch* unterschieden (1), anhand des Differenzierungsgrades der atypischen Zellen in *reifzellig* oder *unreifzellig* unterteilt (2) und der klinische Verlauf der Erkrankung führt zur Unterscheidung *akut* – *chronisch* (3). So ergeben sich die folgenden vier Krankheitsgruppen:

1. Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)
2. Akute myeloische Leukämie (AML)
3. Chronisch lymphoblastische Leukämie (CLL)
4. Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Im Rahmen dieser Arbeit ist besonders die ALL, die akute lymphoblastische Leukämie, des Kindesalters von Interesse. Diese bildet mit einer Inzidenz von 3,3 Erkrankungen/100 000 Einwohner < 15 Jahren und einem Anteil von ca. 30 % die häufigste bösartige Erkrankung im Kindesalter. Die Altersverteilung zeigt einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr. Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt 1,2 : 1.

Im Rahmen der Pathogenese kommt es nach erfolgter maligner Transformation der hämatopoetischen Stammzellen zur diffusen autonomen Proliferation einer Leukozytenrasse mit Expansion im blutbildenden Knochenmark unter Verdrängung der physiologischen Hämatopoese, Ausschwemmung unreifzelliger Blasten ins Blut, sowie eventueller Infiltration extramedullärer Organe. Die klinische Symptomatik ist vorwiegend auf die progrediente Knochenmarkinsuffizienz zurückzuführen. Es zeigen sich Blässe und Abgeschlagenheit als Zeichen des Erythrozytenmangels (Anämie), Blutungsneigung mit petechialen Einblutungen infolge einer Thrombozytopenie, sowie Infektanfälligkeit bedingt durch einen Mangel an funktionsfähigen Leukozyten. Die ALL ist kein einheitliches Krankheitsbild, sondern kann bei verschiedenen Patienten einen sehr unterschiedlichen Verlauf nehmen. Manche Patienten zeigen gutes Therapieansprechen, während andere nur verzögert auf die Therapie ansprechen oder schnell rezidivieren. Nachdem in den letzten Jahrzehnten verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden konnten, die mit einem schlechten Therapieansprechen oder einem erhöhtem Rezidivrisiko einhergehen, wird die Therapie risikoadaptiert nach Stratifizierung der prognostischen Faktoren durchgeführt. International werden neben seltenen molekulargenetischen Veränderungen vor allem die initiale Leukozytenzahl, das Alter und das Ansprechen auf die Therapie, zum Teil auch der Immunphänotyp und die Ploidie als wichtigste Risikofaktoren angesehen. Ziel der Polychemotherapie, bei der verschiedene zytostatisch wirkende Substanzen parallel eingesetzt werden, ist es durch eine frühe Therapieintensivierung eine komplette Remission zu erreichen und einer möglichen Resistenzentwicklung vorzubeugen. Bevor wirksame Zytostatika zur Verfügung standen, bedeutete die Diagnose „akute lymphoblastische Leukämie“ das Todesurteil für die betroffenen Patienten. Abhängig vom Krankheitsstadium verstarben die Betroffenen innerhalb von Tagen bis Wochen nach Diagnosestellung. In den letzten Jahrzehnten konnte die Therapie durch umfangreiche, klinische Studien deutlich verbessert werden. In Abhängigkeit von den initialen Risikofaktoren betragen

die Überlebensraten bei der ALL heute ca. 80%. Trotz dieser guten Prognose erleiden jedoch ca. 25% der erkrankten Kinder ein Rezidiv, welches die Prognose signifikant verschlechtert. Nur 50% der rezidivierend erkrankten Kinder überleben. Deshalb ist das Interesse an neuen resistenz-brechenden Zytostatika groß.

Bei der Untersuchung des Apoptoseinduktionspotentials von Ti 8 im Vergleich mit anderen, in der Leukämitherapie verwendeten, Zytostatika *ex vivo* in mononukleären Zellen von Kindern mit ALL zeigte sich eine signifikante Überlegenheit von Ti 8 gegenüber einigen der Chemotherapeutika (Daunorubicin, Doxorubicin, Vincristin und Cytarabinosid). Diese Überlegenheit konnte jedoch nicht gegenüber allen Zytostatika (Idarubicin) signifikant nachgewiesen werden. Das Ansprechverhalten der primären Zellen der einzelnen Patienten unterschied sich dabei zum Teil sehr deutlich voneinander. Während sich die primären Zellen einiger Patienten als resistent gegenüber Ti 8 erwiesen (nur 2,2 % Apoptoseinduktion), reagierten andere sehr sensibel auf die Ti 8-Behandlung (60 % Induktion). Da es sich bei den verglichenen Induktionsraten um die Mittelwerte der insgesamt 25 Patienten mit diesen großen Schwankungen handelt, ist die Standardabweichung entsprechend groß. Eine allgemeine Aussage über die mögliche Überlegenheit der Wirksamkeit von Ti 8 *ex vivo* kann zu diesem Zeitpunkt aufgrund der geringen Fallzahl nicht getroffen werden.

Eine weitere Schwäche dieses Testmodells liegt in der fehlenden Fähigkeit zur Proliferation der primären Zellen *ex vivo*. Wirkungen, die über eine Inhibition des Zellzyklus erzielt werden, kommen dadurch nicht zum Tragen. Es wird lediglich die direkte Apoptoseinduktion quantifiziert, nicht die Gesamtheit der potentiellen Wirkmechanismen. Daher ist anzunehmen, dass Zytostatika, die ihre Wirkung beispielsweise über einen Zellzyklusarrest entfalten *in vivo* höhere Induktionsraten erzielen, als dies die erhobenen Daten widerspiegeln. Das verwendete *ex vivo*-Testmodell ist realistischer und aussagekräftiger als *in vitro*-Daten, dennoch ist es nur begrenzt möglich Rückschlüsse von der Wirkung einer Substanz *ex vivo* auf die Wirksamkeit im Organismus zu ziehen.

Die *ex vivo* Versuche zeigen, dass Ti 8 auch bei nicht-proliferierenden Zellen zu einer suffizienten Apoptoseinduktion in der Lage ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ti 8-induzierte Apoptose unabhängig von der Zellteilung vermittelt wird. Ließe sich diese Behauptung bestätigen so wäre eine wichtige Eigenschaft von Ti 8 identifiziert. Denn laut des „total-cell-kill“-Konzeptes ist eine komplette Remission nur dann möglich, wenn alle transformierten Zellen beseitigt werden können. Unter den Tumorzellen gibt es aber immer auch Zellen, die sich in einem ruhenden Stadium befinden und oft nicht durch die Chemotherapie erreicht werden können. Gelänge auch die Eliminierung dieser ruhenden Tumorstammzellen,

könnte das Risiko einer Rezidivkrankung deutlich vermindert werden. Dies ist besonders für die akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter von Interesse, da sich die Prognose bei einem Rezidiv deutlich verschlechtert.

Die anderen Titanocenderivate zeigten, bis auf Ti 34, *ex vivo* geringere Apptoseraten ohne signifikante Unterschiede zu den herkömmlichen Zytostatika. Dies sollte in die Überlegungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung für zukünftige Strukturmodifikationen mit einbezogen werden. Wie bereits erwähnt ist die Dosis-Wirkungsbeziehung nur ein Aspekt für ein potentielles Chemotherapeutikum. Ein weiteres wichtiges Kriterium für eine mögliche therapeutische Anwendung ist das Nebenwirkungsprofil des Wirkstoffes im Organismus. Bei der Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter ist es wichtig, dass die Eliminierung der Lymphoblasten möglichst ohne eine Schädigung gesunder Leukozyten erfolgt. Häufig stellt die therapieinduzierte Leukopenie mit assoziierten Infektionen einen limitierenden Faktor der Therapie dar. Um die Selektivität der Wirkung von Ti 8 zu überprüfen wurden mononukleäre Zellen von gesunden Probanden *ex vivo* hinsichtlich einer möglichen Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion untersucht. Wie erwartet zeigten die primären Zellen keine Zellteilungen. Die Zahl der vitalen Zellen wurde durch die Behandlung mit Ti 8 jedoch auch nicht vermindert, sie blieb annähernd konstant. Bei den Zelllinien BJAB und Nalm 6 konnte dagegen eine Proliferationsinhibition und bei Nalm 6 zusätzlich eine Minderung der Zellzahl durch Zelltod nachgewiesen werden. Bei der Detektion des Apoptoseinduktionspotentials konnte bei allen untersuchten Zellen eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden, die sich jedoch in ihrem Ausmaß signifikant voneinander unterschieden. Hinsichtlich der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion zeigte Ti 8 eine konzentrationsabhängige Wirkung. Wenn auch in einem geringeren Ausmass, wurde dennoch auch in den gesunden mononukleären Zellen das Selbstmordprogramm initialisiert. An dieser Stelle bestätigt sich erneut die Vermutung, dass Ti 8 die Fähigkeit besitzt auch in nicht-proliferierenden Zellen Apoptose in einem gewissen Maß zu induzieren. Inwiefern andere Zellen des hämatopoetischen Systems oder andere Organe des Organismus durch eine Behandlung mit Ti 8 geschädigt werden, und welcher Art die Zellschädigung ist, bleibt noch zu klären.

5.3. Mechanismen des Ti 8-induzierten Zelltodes

Der Großteil der mechanistischen Untersuchungen wurde mit der humanen Burkitt-like-Lymphom Zelllinie BJAB durchgeführt. Die Vorteile dieser Zellkulturlinie liegen in ihrem schnellen Proliferationsvermögen und in der einfachen Kultivierbarkeit mit hoher Vitalität. Auch langwierige und zellstressende Aufarbeitungen der Proben bei der Versuchsdurchführung führen nicht so schnell zu schlechten Kontrollwerten. BJAB-Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche CD95-Rezeptoren und eignen sich daher sehr gut als Modellsystem für viele Versuchsanordnungen. Dabei sind sie weniger sensibel gegenüber Chemotherapeutika und Chemikalien als Leukämiezelllinien.

5.3.1. Charakterisierung des Zelltodes

In den vorherigen Abschnitten wurde das Potential von Ti 8 zur Apoptoseinduktion quantitativ diskutiert. Als Nachweismethode wurde die modifizierte Zellzyklusanalyse verwendet, deren Messprinzip auf der Detektion der DNA-Fragmentierung in der Endphase der Apoptose beruht. Diese Testmethode ist international anerkannt und weit verbreitet. Ihre Spezifität als Apoptosenachweis ist jedoch limitiert, da die Fragmentierung der DNA inzwischen auch bei anderen Formen des Zelltodes, wie der Nekrose und der Onkose, identifiziert wurde. Um tatsächlich eine Aussage über den Anteil der Apoptose treffen zu können, muss die Nekrose ausgeschlossen und die Apoptose auch mithilfe anderer Testverfahren nachgewiesen werden.

Ein Charakteristikum des nekrotischen Zelltodes ist der frühzeitige Verlust der Membranintegrität. Dieses Merkmal kann mithilfe des LDH-Release-Assays detektiert werden. Durch die Detektion der LDH-Freisetzung aus der Zelle nach einer kurzen Inkubationszeit von 2 Stunden wird die primäre Nekrose, also der direkte, schnelle Zelltod durch Zellyse quantifiziert. Der Anteil des langsamer verlaufenden, sekundären nekrotischen Zelltodes, der als lytischer Ausgang nach Ablauf der Apoptose auftritt, wird dabei nicht detektiert.

Eine weitere Methode, die zum Nachweis der induzierten Apoptose verwendet wurde, ist die Annexin-Propidiumiodid-Doppelfärbung. Bei diesem Verfahren wird unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie neben der intrazellulären Propidiumiodid-Floureszenz auch die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran auf Einzelzellniveau detektiert. Der Phosphatidylserin-Flip wird als ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose angesehen. Dabei erlaubt diese Methode eine Differenzierung in Frühapoptose, Spätapoptose und Nekrose. Infolge der Behandlung mit Ti 8 in verschiedenen Konzentrationen zeigte sich eine Reduktion der vitalen Zellen mit diametralem Anstieg der spätapoptotischen Zellen. Die

Fraktion der frühapoptotischen Zellen ebenso wie der Anteil nekrotischer Zellen blieb gering. Von einigen Autoren wird allerdings die Spätapoptose mit der Nekrose gleichgesetzt, da bei dieser Zellpopulation Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, gleichzeitig aber auch eine Propidiumiodid-Fluoreszenz detektiert wird. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid kann nur dann in die Zelle gelangen und detektiert werden, wenn zuvor die Membranintegrität infolge nekrotischer Prozesse verloren gegangen oder in der Endphase der Apoptose die Membranpermeabilität stark erhöht ist. Bei der endgültigen Interpretation der Ergebnisse dieser Testmethode können die Daten nicht für sich alleinstehend angesehen werden, sondern müssen im Kontext zu anderen Versuchen betrachtet werden. Vergleicht man die Daten der modifizierten Zellzyklusanalyse mit denen der AnnexinV-Propidiumiodid-Doppelfärbung so wird ein ähnlicher Verlauf der detektierten Apoptoserate und der spätapoptotischen Fraktion deutlich. Dabei liegen die Werte der Doppelfärbung weit über den, mithilfe der Zellzyklusanalyse ermittelten, Apoptoseinduktionsraten. Beide Testverfahren unterscheiden sich in vielen Punkten, wie beispielsweise der Inkubationszeit, der Aufarbeitung der Proben und der Messparameter, sodass darin die Varianz begründet sein könnte. Das Ergebnis der Doppelfärbung kann dementsprechend als ein weiteres Indiz für die apoptoseinduzierende Wirkung von Ti 8 angesehen werden, da sie annähernd mit den Daten der Zellzyklusanalyse korrelieren und der Einfluss der Nekrose durch den LDH-Release-Assay ausgeschlossen wurde. Es sollte jedoch eine Kinetik mit diesem Verfahren angefertigt werden, um einen besseren Überblick über den zeitlichen Verlauf der Ti 8-Wirkung zu erhalten und um zu überprüfen, ob eventuell zu einem früheren Zeitpunkt frühapoptotische Zellen nachweisbar sind.

Die bisher diskutierten Verfahren der Zellzyklusanalyse und der Doppelfärbung beruhen beide auf der durchflusszytometrischen Detektion und sind in ihrer Spezifität limitiert. Ein Verfahren, das unabhängig von der Durchflusszytometrie ist und zudem eine hohe Spezifität aufweist, ist der Nachweis prozessierter Caspasen und Caspasensubstraten via Western Blot Technik. Die große Spezifität wird durch die Verwendung monoklonaler Antikörper erzielt, die spezifisch an die Caspasenuntereinheit binden. Die Prozessierung der Caspase-3 aus ihrer Procaspase gilt als ein zentrales Ereignis bei der Exekution der Apoptose. Mittels Western Blot konnte die prozessierte Caspase-3 nach 48 Stunden Inkubation mit Ti 8 nachgewiesen werden. Ebenso wurde die Prozessierung der Caspase-9 und des Caspasensubstrates PARP, ein DNA-Reparaturenzym, das spät in Apoptose durch Spaltung inaktiviert wird, mittels Western Blot detektiert.

Die Ti 8-induzierte Apoptose konnte mithilfe verschiedener Testmethoden nachgewiesen werden, während nekrotische Prozesse ausgeschlossen wurden. Dabei wurden charakteristische

Aspekte der Apoptose, wie die DNA-Fragmentierung, die Phosphatidylserintranslokation sowie die Caspasenspaltung und konsekutive PARP-Inaktivierung erfolgreich nachgewiesen. Somit ist der Beweis erbracht, dass Ti 8 in der Lage ist in malignen Zellen Apoptose zu induzieren. Zur Komplettierung der Charakterisierung der Ti 8-induzierten Apoptose wird im folgenden Abschnitt der Apoptosesignalweg analysiert.

5.3.2. Apoptosesignalweg

Verschiedene Signale vermögen die Apoptose zu triggern und führen über definierte Signalwege zu einer programmierten, kontrollierten zellulären Reaktion. Die beiden bisher identifizierten Hauptwege der Signaltransduktion sind zum einen der extrinsische (rezeptorvermittelte) und zum anderen der intrinsische (mitochondriale) Signalweg. Zur Charakterisierung der Ti 8-induzierten Signaltransduktion wurden charakteristische Ereignisse des jeweiligen Signalweges untersucht.

Beim extrinsischen Signalweg werden Signale von aussen durch sogenannte Todesrezeptoren registriert und mithilfe von Adaptermolekülen, wie FADD, ins Zellinnere weitergeleitet. Die Ti 8-induzierte Apoptose trat in Zellen mit normaler FADD-Expression in gleichem Ausmaß auf, wie in Zellen ohne funktionale FADD-Proteine. Daraus läßt sich schlussfolgern, dass dieser Signaltransduktionsweg für die Ti 8-induzierte Apoptose ohne Bedeutung ist.

Die zentralen Elemente des intrinsischen Signalweges sind die Mitochondrien. Verschiedene intrazelluläre Signale führen dabei zu einer Permeabilitätssteigerung über der mitochondrialen Membran mit einer konsekutiven Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials. Moleküle, wie Cytochrom C, AiP und Smac, treten daraufhin aus den Mitochondrien ins Zytosol über und führen über die Bildung des Apoptosom-Komplexes zur Prozessierung der Effektorcaspase 9. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kann mithilfe der JC-1-Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit Ti 8 zeigte sich konzentrationsabhängig eine signifikante Reduktion des Potentials als Hinweis auf eine mitochondriale Beteiligung. Da es jedoch auch bei anderen Formen des Zelltodes als sekundäres Ereignis zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials kommt, kann dieser Nachweis als nur bedingt apoptosespezifisch gewertet werden. Der Cytochrom C-Release infolge der Permeabilitätssteigerung und die anschließende Bildung des Apoptosoms ist ein entscheidendes und spezifisches Ereignis im Verlauf des intrinsischen Signalweges. Die Apoptosomformation führt zur Aktivierung der Effektorcaspase-9, die in der eigentlichen Exekution der Apoptose mündet. Mithilfe des Western Blot Verfahrens konnte die aktivierte Caspase-9 nachgewiesen

werden. Aufgrund der detektierten Membranpotentialänderung und der nachgewiesenen Caspase-9-Prozessierung liegen eindeutige Hinweise dafür vor, dass die Ti 8 induzierte Apoptose über den intrinsischen Signalweg vermittelt wird.

Zur Komplettierung des Nachweises der Beteiligung des intrinsischen Signalweges könnte ergänzend mithilfe des Western Blot Verfahrens die mitochondriale und zytosolische Cytochrom C-Fraktion als weiteren Faktor des intrinsischen Weges determiniert werden.

5.3.3. Weitere mechanistische Untersuchungen

Wie einleitend bereits erörtert, gibt es neben den Hauptsignalwegen auch viele Faktoren, die modulierend in den Ablauf der Apoptose einwirken. Für die Wirkungsweise einer Substanz sind daher auch diese modulierenden Faktoren von großer Bedeutung. So kann die Überexpression eines antiapoptotischen Faktors dazu führen, dass die malignen Zellen unempfindlicher gegenüber Chemotherapeutika reagieren. Ist eine Wirksubstanz in der Lage die Apoptose unabhängig von diesem Faktor zu induzieren, können mögliche Resistenzen der malignen Zellen durchbrochen werden, was für die Therapie maligner Erkrankungen von enormer Bedeutung ist. Im folgenden Abschnitt soll das Zusammenwirken der Titanocenderivate mit einzelnen pro- und antiapoptotischen Faktoren analysiert werden, um zusätzliche Erkenntnisse über den Wirkmechanismus zu erhalten.

Das Protein Bcl-2 ist ein antiapoptotisch wirkendes Protein, das eine große Relevanz für die Bildung von Zytostatikaresistenzen in Tumorzellen hat. Bei der Untersuchung eines Melanom-Zelllinienpaares (MelHO), bei dem eine Zelllinie Bcl-2 überexprimiert, während die andere einen normalen Bcl-2-Gehalt aufweist, zeigten sich nach Behandlung mit Ti 8 keine signifikanten Unterschiede bei der Proliferationsinhibition und bei der Apoptoseinduktion. Dies weist daraufhin, dass diese Ti 8-induzierten Prozesse unabhängig vom Bcl-2-Level der Zelle ablaufen. Somit ist die Verbindung Ti 8 in der Lage Therapieresistenzen aufgrund einer Bcl-2-Überexpression zu überwinden.

Der Faktor Smac/Diablo wird infolge der Permeabilitätssteigerung aus den Mitochondrien freigesetzt und wirkt durch die Inhibition der IAPs, welche Caspasen inhibieren, proapoptotisch. Auch eine Smac-Überexpression kann Auswirkungen auf den Therapieerfolg einer Chemotherapie haben. Daher wurde die T-Leukämiezelllinien Jurkat als Zelllinienpaar mit Smac-Überexpression bzw. ursprünglicher Smac-Expression untersucht. Dabei zeigte sich in einem geringeren Konzentrationsbereich eine Smac-Abhängigkeit bei der Proliferationsinhibition, wie der Apoptoseinduktion, die in höheren Konzentrationsbereichen nicht mehr

nachgewiesen werden konnte. Bei geringeren Konzentrationen wäre folgendes Szenario vorstellbar: Infolge der Ti 8-Triggerung wird in einer Zelle das mitochondriale Membranpotential reduziert und Smac ins Zytosol freigesetzt. Dort bindet es an die antiapoptotisch wirkenden IAPs, die durch Ubiquitinierung abgebaut werden, so dass aufgrund der unzureichenden Caspaseninhibition die Apoptoseexekution ablaufen kann. Dabei werden in Zellen mit einer Smac-Überexpression auf denselben Stimulus hin mehr Moleküle Smac ausgeschüttet, so dass mehr IAP-Moleküle abgebaut werden und die Apoptose in einem größeren Ausmaß eintreten kann als dies bei Zellen mit normalem Smac-Level der Fall ist. Daraus resultiert die Smac-Abhängigkeit. Zur Veranschaulichung eine Übersicht zur Apoptosemaschinerie (Abb. 45).

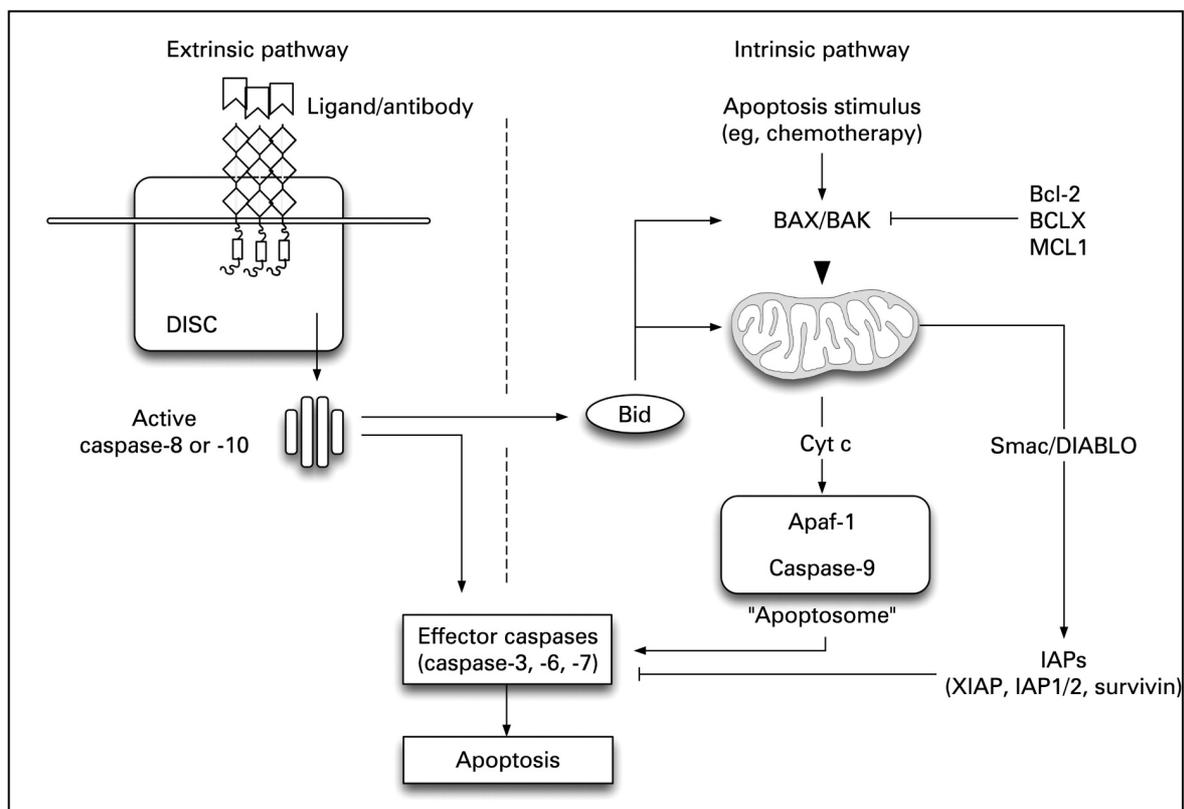


Abbildung 45: **Übersicht zur Apoptoseinduktion.** Beim extrinsischen Signaltransduktionweg wird rezeptorvermittelt die Caspasencaskade aktiviert, die zur Exekution der Apoptose führt. Beim intrinsischen Signalweg führen apoptotische Stimuli zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, woraufhin Cytochrom C ins Cytoplasma gelangt und mit den Molekülen Apaf-1 und Caspase 9 das Apoptosom formt, das ebenfalls die Caspasencaskade initiiert. Die Signalwege sind miteinander verknüpft, sodass auch beim extrinsischen Signalweg Bid-vermittelt das mitochondriale Membranpotential reduziert wird. Apoptosehemmende Faktoren sind Bcl-2-Proteine, sowie IAPs. Letztere können die Caspasenprozessoren inhibieren und werden durch Smac gehemmt.

(Modifiziert nach [199].)

Bei höheren Konzentrationen Ti8 konnte diese Abhängigkeit nicht mehr nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass dann andere Mechanismen zum Tragen kommen. So ist es vorstellbar, dass bei höheren Konzentrationen die Apoptose durch einen Caspasen-unabhängigen und damit auch Smac-unabhängigen Mechanismus ausgeführt wird. Bestätigend dafür ist der positive Nachweis der Apoptoseinduktion in Caspase-3-defizienten MCF-7-Zellen. Die nachgewiesene Caspase-3-Prozessierung müsste dementsprechend als sekundäres Ereignis interpretiert werden. Zur Überprüfung dieser These könnten Versuche mit Caspaseninhibitoren, wie beispielsweise z-VAD-FMK, durchgeführt werden.

In Vorversuchen wurde von Mitgliedern der AG Prokop per Western Blot nachgewiesen, dass das Bcl-2- beziehungsweise das Smac-Level in den entsprechenden Zelllinien stark erhöht ist. Zudem wurden für andere Wirkstoffe bei identischen Versuchsanordnungen Abhängigkeiten nachgewiesen, so dass auf weitere Positivkontrollen verzichtet worden ist.

Neben intrinsischem und extrinsischem Pathway gibt es eine Gruppe von Molekülen, die ebenfalls die Apoptosemaschinerie in Gang setzen können. Zu dieser Gruppe der sogenannten "Reactive Oxygen Species" (ROS) zählen freie Radikale, wie Hydroxid-Anionen (O_2^-), Hydroxyl-Anionen (OH^\bullet) und nicht-radikalisches Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Sie sind enorm reaktionsfreudig und kurzlebig. Sie reagieren mit der DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden auf destruktive Weise, wodurch intrazellulär oxidativer Stress erzeugt wird, der zur Auslösung des programmierten Selbstmordprogrammes führen kann. Um die Bedeutung der ROS-Moleküle für die Ti 8-induzierte Apoptose zu klären, wurden Versuche mit verschiedenen Antioxidantien durchgeführt. Die verwendeten antioxidativen Moleküle sind in der Lage reaktive ROS-Moleküle zu binden und ihre Wirkung dadurch zu inhibieren. Bei den durchgeführten Versuchen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede durch eine Vorinkubation mit den Antioxidantien NAC, Ebselen, L-NMMA und Thiourea. ROS-Moleküle und der daraus resultierende oxidative Stress scheinen bei der Apoptoseinduktion durch Ti 8 keine wesentliche Rolle zu spielen.

5.4. *In vivo*-Untersuchungen

Anhand von Zellkulturversuchen kann man erste Aussagen über die Wirksamkeit eines Wirkstoffes treffen, Wirkmechanismen untersuchen und eine Vielzahl von Stoffeigenschaften aufklären. Dennoch kann man durch Zellkulturversuche nie die Bedingungen eines lebendigen Organismus simulieren. Dafür bedarf es noch immer *in vivo*-Untersuchungen. Im NOD/SCID-Mausmodell konnte ein therapeutischer Effekt infolge einer oralen Behandlung mit Ti 8 in Form einer signifikanten Reduktion der Tumorprogression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei insgesamt guter Tolerabilität der Ti 8-Gabe lassen sich anhand der Gewichtsreduktion und des Versterbens eines der Versuchstiere deutliche Anzeichen einer gewissen Toxizität des Wirkstoffes erkennen. Zeichen einer höhergradigen Toxizität, zeigten sich während der Behandlung nicht.

5.5. Weitere Substanzeigenschaften

Neben der Fähigkeit zur Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion sind auch andere „allgemeine“ Substanzeigenschaften für die Verwendung einer Substanz als Wirkstoff von Bedeutung. Eine solche Eigenschaft mit Relevanz für den therapeutischen Einsatz ist die Proteinbindung. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen mit den Titanocenen zeigten oftmals einen ähnlichen Verlauf: In niedrigen Konzentrationsbereichen ($< 40\mu\text{M}$) zeigten die Derivate kaum eine relevante Wirkung, ab einer bestimmten Konzentration zeigte sich dann ein sprunghafter Anstieg der Wirksamkeit (bei Ti8 ca. $50\mu\text{M}$) mit anschließender konzentrationsabhängiger, kontinuierlicher Wirkungssteigerung. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass ein Teil des Wirkstoffes proteingebunden und dadurch biologisch unwirksam vorliegt. Erst wenn mit einer bestimmten Konzentration eine Sättigung der Proteinbindung erreicht ist, tritt die Wirkung ein. Diese These bestätigte sich bei Versuchen mit Zellkulturmedien, bei denen die Konzentration des zugesetzten fetalen Kälberserums (FCS) variiert wurde. FCS ist ein wichtiger Zusatz von Nährmedien. Es wird aus dem Blut von Kuhfeten gewonnen und enthält Wachstumsfaktoren und verschiedene Proteine, wie beispielsweise das bovine Serumalbumin (BSA). Die proteinreiche Zusammensetzung des Serums ist wichtig für das Überleben, das Wachstum und die Teilung der kultivierten Zellen. Die Versuche zeigten, dass die proliferationsinhibierende und apoptoseinduzierende Wirkung von Ti 8 bei geringeren Konzentrationen FCS deutlicher hervortraten, als beim üblichen Proteingehalt des Zellkulturmediums. Dies weist darauf hin, dass der Wirkstoff zum Teil proteingebunden und dadurch biologisch inaktiv vorliegt. Bei höheren Konzentrationen zeigten

sich keine signifikanten Unterschiede, da in höheren Konzentrationsbereichen eine Sättigung der Proteinbindung eintrat. Eine derartige Proteinbindung wurde bereits für verschiedene metallorganische Zytostatika beschrieben. Diese können mit Molekülen wie Albumin, Transferrin und ATP interagieren und diese zur Kommunikation oder als Transportvehikel zwischen Extra- und Intrazellulärraum oder zwischen verschiedenen intrazellulären Kompartimenten nutzen.

Andererseits ist bei der Versuchsanordnung durch die Verwendung verschiedener Konzentrationen FCS nicht nur der Proteingehalt vermindert, sondern auch die Konzentration wichtiger Wachstumsfaktoren und Nährstoffe, sodass auch dies der Grund für die vergleichsweise erhöhte Wirksamkeit sein kann.

Titanhaltige Verbindungen, so wird vermutet, binden an das Serumprotein Transferrin. Für einige Titanocenkomplexverbindungen wurde NMR-spektroskopisch eine Bindung an der spezifischen FeIII-Bindungsstelle nachgewiesen. Auf diese Weise gelangen die Ti-Moleküle möglicherweise zum Tumor und mithilfe der Transferrinrezeptoren über Endozytose in die Tumorzelle. Maligne Zellen weisen eine verstärkte Expression von Transferrin-Rezeptoren auf, vermutlich begründet durch einen erhöhten Eisenbedarf für Zellstoffwechsel, -wachstum und -entwicklung. Dies bringt eine gewisse Selektivität der titanocenvermittelten Wirkungen mit sich. Beobachtete Schwankungen der Ti 8-Wirkung führten zu der Vermutung, dass die in DMSO gelöste Substanz an Wirksamkeit verliert. Diese Vermutung konnte durch die vergleichende Untersuchung einer frisch angesetzten und einer 7 Tage alten Stocklösung Ti 8 im Hinblick auf das jeweilige Vermögen zur Apoptoseinduktion bestätigt werden. Wodurch der Wirkverlust bedingt wird muss noch eingehender, beispielsweise mittels NMR-Analyse, untersucht werden.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten gab es enorme Weiterentwicklungen im Wissen um maligne Erkrankungen und deren Therapie. Bedeutete die Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter vor Jahren noch das Todesurteil für den Patienten, können heute ca. 80% der Patienten geheilt werden. Ausgeprägte Nebenwirkungen der Therapien und die Entwicklung von Resistenzmechanismen der transformierten Zellen limitieren jedoch die therapeutischen Erfolge. Aufgrund von Resistenzen verschlechtert sich beispielsweise die Prognose von Patienten, die an einem ALL-Rezidiv erkranken deutlich. Daher besteht großes Interesse an neuen Wirkstoffen mit möglichst selektiver Wirkung, geringen Nebenwirkungen und zytostatika-resistenzbrechendem Potential.

Die antileukämische und antitumorale Wirkung einer Gruppe neuartiger Titanocenderivate wurde untersucht und ihre biologische Aktivität mit dem Hauptaugenmerk auf ihre Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in malignen Zellen beschrieben. Vier der zwölf untersuchten Titanocenderivate zeigten *in vitro* eine biologische Aktivität mit großem antiproliferativem und apoptoseinduzierendem Potential in einem breiten Spektrum verschiedener Tumorentitäten. Darunter befanden sich verschiedene Leukämiezelllinien, Lymphomzellen und Zellen solider Tumore, zum Teil mit einer ausgeprägten Zytostatikaresistenz, wie die resistente, Caspase-3-defiziente Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. *Ex vivo* in mononukleären Zellen von Kindern mit einer ALL-Ersterkrankung zeigte die Verbindung Ti 8 die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in vergleichbarem bzw. überlegenem Ausmaß, verglichen mit therapeutisch relevanten Zytostatika. Die Wirkung von Ti 8 zeigte eine relative Selektivität im Vergleich der Apoptoseinduktion in Leukämie- und Lymphomzellen vs. primären mononukleären Zellen eines gesunden Probanden. *In vivo* zeigte die Verbindung Ti 8 das Potential zur Reduktion der Tumorprogression bei insgesamt guter *oraler* Verträglichkeit. Bei der Charakterisierung der Apoptosemechanismen erwies sich der intrinsische Signaltransduktionsweg als entscheidend für die Titanocen-induzierte Apoptose. Der Einfluss der extrinsischen Signalübermittlung und der ROS-Moleküle auf die Wirksamkeit von Ti 8 konnte ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist die Wirkung unabhängig von den modulierenden Faktoren Bcl-2 und in hohen Konzentrationen auch von Smac. Diese Ergebnisse deuten auf ein vielversprechendes Potential der Titanocenverbindungen für die Therapie maligner Erkrankungen und besonders der ALL im Kindesalter hin.

7. Ausblick

Der exakte Wirkmechanismus der Titanocenverbindungen ist noch nicht ausreichend geklärt. Man vermutet, dass der Wirkstoff an Transferrin gebunden wird, auf diesem Wege zur Zelle gelangt und über Bindung an den Transferrinrezeptor in die Zelle gelangt. Diese Vermutung muss validiert werden, weitere Bindungs- und Transportproteine müssen identifiziert werden. Offen ist auch die Suche nach dem Target dieser Stoffklasse. Vertiefend muss die Zytotoxizität der Wirkstoffklasse untersucht werden. Da die Chemotherapie heute zumeist als Kombinationstherapie durchgeführt wird, muss das Zusammenwirken der Titanocenderivate mit anderen herkömmlichen Zytostatika untersucht werden, um potentielle Synergieeffekte oder hemmende Interaktionen zu eruieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Karlson, P., et al., *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15 ed. Vol. 15. 2005: Thieme Verlag.
2. Estler, C.-J., *Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 6. 2007: Schattauer Verlag. 896.
3. Hiddemann, W. and C.R. Bartram, *Die Onkologie*. 2 ed. 2010: Springer Verlag.
4. Horn, F., et al., *Biochemie des Menschen*. Vol. 2. 2003, Stuttgart: Thieme. 259-271.
5. Riede, U.-N. and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 4. 1999, Stuttgart: Thieme. 344-366.
6. Boveri, T., *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. 1914: G. Fischer.
7. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-823.
8. Nordling, C.O., *A new theory on cancer-inducing mechanism*. Br J Cancer, 1953. **7**(1): p. 68-72.
9. Murken, J., *Taschenbuch Humangenetik*. Vol. 7. 2006, Stuttgart: Thieme. 500.
10. Raff, M.C., *Social controls on cell survival and cell death*. Nature, 1992. **356**(6368): p. 397-400.
11. Riede, U.-N. and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 4. 1998, Stuttgart: Thieme.
12. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. 2005, München: Urban und Fischer. 922-928.
13. Hildebrandt, H., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 1998, de Gruyter: Berlin. p. 100.
14. Fahlke, C., et al., *Taschenatlas Physiologie*. Vol. 1. 2008.
15. Fraser, A. and G. Evan, *A license to kill*. Cell, 1996. **85**(6): p. 781-784.
16. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-257.
17. Ellis, R.E., J.Y. Yuan, and H.R. Horvitz, *Mechanisms and functions of cell death*. Annu Rev Cell Biol, 1991. **7**: p. 663-698.
18. Hengartner, M.O. and H.R. Horvitz, *Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans**. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(4): p. 581-586.
19. Yuan, J., et al., *The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Cell, 1993. **75**(4): p. 641-652.
20. Hesketh, R., *The oncogene and tumour suppressor gene factsbook*. 2 ed. 1997: academic press.
21. Miura, M., *Active participation of cell death in development and organismal homeostasis*. Dev Growth Differ, 2011. **53**(2): p. 125-36.

22. Raff, M., *Cell suicide for beginners*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 119-122.
23. White, K., et al., *Genetic control of programmed cell death in Drosophila*. Science, 1994. **264**(5159): p. 677-683.
24. Solomon, M., et al., *The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants*. Plant Cell, 1999. **11**(3): p. 431-444.
25. Ameisen, J.C., *On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years*. Cell Death Differ, 2002. **9**(4): p. 367-393.
26. Arnoult, D., et al., *On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote Leishmania major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization*. Cell Death Differ, 2002. **9**(1): p. 65-81.
27. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. **88**(3): p. 347-354.
28. Eißmann, M., *Ferrocenyl Nukleosidanaloga als Apoptoseinduktoren in malignen Zellen 2007*: Berlin. p. 1-14.
29. Sadler, T.W., *Medizinische Embryologie*. Vol. 9. 1998, Stuttgart: Thieme. 158-164.
30. Sadler, T.W., *Medizinische Embryologie*. Vol. 9. 1998, Stuttgart: Thieme. 294-307.
31. Feinstein-Rotkopf, Y. and E. Arama, *Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes*. Apoptosis, 2009. **14**(8): p. 980-95.
32. Fuchs, Y. and H. Steller, *Programmed cell death in animal development and disease*. Cell, 2011. **147**(4): p. 742-58.
33. Horn, F., et al., *Biochemie des Menschen*. Vol. 2. 2003, Stuttgart: Thieme. 561-568.
34. Krueger, A., et al., *The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 58-69.
35. Gougeon, M.L., *Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 392-404.
36. Du, C., et al., *Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?* J Cereb Blood Flow Metab, 1996. **16**(2): p. 195-201.
37. Anglade, P., et al., *Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease*. Histol Histopathol, 1997. **12**(1): p. 25-31.
38. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-1462.
39. Nicholson, D.W., *ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(3): p. 297-301.
40. Hainaut, P. and M. Hollstein, *p53 and human cancer: the first ten thousand mutations*. Adv Cancer Res, 2000. **77**: p. 81-137.
41. Kondo, S., et al., *Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4328-4330.

42. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-336.
43. Galluzzi, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy*. Oncogene, 2011.
44. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-1308.
45. Petit, P.X., et al., *Mitochondria and programmed cell death: back to the future*. FEBS Lett, 1996. **396**(1): p. 7-13.
46. Jing, G., J.J. Wang, and S.X. Zhang, *ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 589589.
47. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
48. Hawkins, C.J., et al., *The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27084-27093.
49. Thornberry, N.A., et al., *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17907-11.
50. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-470.
51. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 1): p. 1-16.
52. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
53. Bao, Q. and Y. Shi, *Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 56-65.
54. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspases: intracellular signaling by proteolysis*. Cell, 1997. **91**(4): p. 443-446.
55. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(8): p. 299-306.
56. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 897-907.
57. Cotter, T.G., et al., *Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis*. Cancer Res, 1992. **52**(4): p. 997-1005.
58. Martin, S.J., et al., *Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6425-6428.
59. Kayalar, C., et al., *Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 2234-2238.
60. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.

61. Kaufmann, S.H., *Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note.* Cancer Res, 1989. **49**(21): p. 5870-5878.
62. Voelkel-Johnson, C., et al., *Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis.* J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1707-1716.
63. Lazebnik, Y.A., et al., *Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9042-9046.
64. Neamati, N., et al., *Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei.* J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3788-3795.
65. Martin, S.J. and D.R. Green, *Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?* Cell, 1995. **82**(3): p. 349-352.
66. Kaufmann, S.H., et al., *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.* Cancer Res, 1993. **53**(17): p. 3976-3985.
67. Wang, Z.Q., et al., *Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease.* Genes Dev, 1995. **9**(5): p. 509-520.
68. Tewari, M., et al., *Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase.* Cell, 1995. **81**(5): p. 801-809.
69. Weil, M., et al., *Constitutive expression of the machinery for programmed cell death.* J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1053-1059.
70. Fiers, W., *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level.* FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 199-212.
71. Tartaglia, L.A., et al., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.* Cell, 1993. **74**(5): p. 845-853.
72. De Trez, C. and C.F. Ware, *The TNF receptor and Ig superfamily members form an integrated signaling circuit controlling dendritic cell homeostasis.* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 277-84.
73. Schulze-Osthoff, K., et al., *Apoptosis signaling by death receptors.* Eur J Biochem, 1998. **254**(3): p. 439-459.
74. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-1456.
75. Stanger, B.Z., et al., *RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death.* Cell, 1995. **81**(4): p. 513-523.
76. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.* Cell, 1995. **81**(4): p. 505-512.
77. Kischkel, F.C., et al., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5.* Immunity, 2000. **12**(6): p. 611-620.
78. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.* EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-5588.

79. Walczak, H. and M.R. Sprick, *Biochemistry and function of the DISC*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(7): p. 452-453.
80. Sprick, M.R., et al., *FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 599-609.
81. Boldin, M.P., et al., *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death*. Cell, 1996. **85**(6): p. 803-815.
82. Srinivasula, S.M., et al., *Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14486-14491.
83. Muzio, M., et al., *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex*. Cell, 1996. **85**(6): p. 817-27.
84. Chaigne-Delalande, B., J.F. Moreau, and P. Legembre, *Rewinding the DISC*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008. **56**(1): p. 9-14.
85. Medema, J.P., et al., *FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2794-2804.
86. Muzio, M., G.S. Salvesen, and V.M. Dixit, *FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2952-2956.
87. Enari, M., H. Hug, and S. Nagata, *Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis*. Nature, 1995. **375**(6526): p. 78-81.
88. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-1312.
89. Löffler, G. and P. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 6. 1998.
90. Macho, A., et al., *Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2481-7.
91. Adrie, C., et al., *Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(3): p. 389-95.
92. Kroemer, G., N. Zamzami, and S.A. Susin, *Mitochondrial control of apoptosis*. Immunol Today, 1997. **18**(1): p. 44-51.
93. Hague, A. and C. Paraskeva, *Apoptosis and disease: a matter of cell fate*. Cell Death Differ, 2004. **11**(12): p. 1366-72.
94. Prokop, A., et al., *Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo*. Leukemia, 2000. **14**(9): p. 1606-1613.
95. Prokop, A., et al., *Induction of apoptosis by enediyne antibiotic calicheamicin thetaII proceeds through a caspase-mediated mitochondrial amplification loop in an entirely Bax-dependent manner*. Oncogene, 2003. **22**(57): p. 9107-20.
96. Bernardi, P., K.M. Broekemeier, and D.R. Pfeiffer, *Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane*. J Bioenerg Biomembr, 1994. **26**(5): p. 509-517.

97. Xiang, J., D.T. Chao, and S.J. Korsmeyer, *BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14559-14563.
98. Hajnoczky, G., E. Davies, and M. Madesh, *Calcium signaling and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 445-454.
99. Li, Z.Y., et al., *Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **414**(1): p. 5-8.
100. Fernandez-Checa, J.C., *Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 471-479.
101. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-413.
102. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp, *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 155-156.
103. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-489.
104. Zou, H., et al., *An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-11556.
105. Saleh, A., et al., *Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17941-17945.
106. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 2001. **15**(22): p. 2922-2933.
107. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3179-3184.
108. Chai, J., et al., *Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 855-862.
109. Wu, G., et al., *Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1008-1012.
110. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-446.
111. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-99.
112. Curtin, J.F., M. Donovan, and T.G. Cotter, *Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis*. J Immunol Methods, 2002. **265**(1-2): p. 49-72.
113. Ramalingam, M. and S.J. Kim, *Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases*. J Neural Transm, 2012.
114. Reed, J.C., *Double identity for proteins of the Bcl-2 family*. Nature, 1997. **387**(6635): p. 773-776.
115. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1322-1326.

116. Vaux, D.L., I.L. Weissman, and S.K. Kim, *Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1955-1957.
117. Kroemer, G., *The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis*. Nat Med, 1997. **3**(6): p. 614-620.
118. Brunelle, J.K. and A. Letai, *Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 437-441.
119. Kelekar, A. and C.B. Thompson, *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(8): p. 324-330.
120. Letai, A., et al., *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 183-192.
121. Merry, D.E. and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 gene family in the nervous system*. Annu Rev Neurosci, 1997. **20**: p. 245-267.
122. Oltvai, Z.N., C.L. Millman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-619.
123. Chittenden, T., et al., *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5589-5596.
124. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-219.
125. Xue, D. and H.R. Horvitz, *Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor*. Nature, 1997. **390**(6657): p. 305-308.
126. Pan, G., K. O'Rourke, and V.M. Dixit, *Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5841-5845.
127. Susin, S.A., et al., *The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis*. J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 25-37.
128. Zamzami, N., et al., *Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins*. Oncogene, 1998. **16**(17): p. 2265-2282.
129. Tsujimoto, Y., *Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria*. J Cell Physiol, 2003. **195**(2): p. 158-167.
130. Kozopas, K.M., et al., *MCLI, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3516-3520.
131. Lin, E.Y., et al., *Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 1979-1988.
132. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. Cell, 1996. **87**(4): p. 619-628.
133. Alimonti, J.B., et al., *Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 6974-6982.

134. Heibein, J.A., et al., *Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1391-1402.
135. Stoka, V., et al., *Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3149-3157.
136. Darding, M. and P. Meier, *IAPs: guardians of RIPK1*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 58-66.
137. LaCasse, E.C., et al., *The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3247-3259.
138. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-252.
139. Rothe, M., et al., *The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1243-1252.
140. Duckett, C.S., et al., *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors*. EMBO J, 1996. **15**(11): p. 2685-2694.
141. Liston, P., et al., *Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 349-353.
142. Uren, A.G., et al., *Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4974-4978.
143. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-921.
144. Fulda, S., *Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies*. Leukemia, 2009. **23**(3): p. 467-476.
145. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-304.
146. Roy, N., et al., *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6914-6925.
147. Liston, P., W.G. Fong, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8568-8580.
148. Chai, J., et al., *Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP*. Cell, 2001. **104**(5): p. 769-780.
149. Huang, Y., et al., *Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain*. Cell, 2001. **104**(5): p. 781-790.
150. Riedl, S.J., et al., *Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP*. Cell, 2001. **104**(5): p. 791-800.
151. Suzuki, Y., et al., *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27058-27063.
152. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. EMBO J, 1998. **17**(8): p. 2215-2223.

153. Bratton, S.B., et al., *Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 998-1009.
154. Vucic, D., et al., *ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas*. Curr Biol, 2000. **10**(21): p. 1359-1366.
155. Richter, B.W., et al., *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4292-4301.
156. Shiozaki, E.N., et al., *Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 519-527.
157. Damiano, J.S. and J.C. Reed, *CARD proteins as therapeutic targets in cancer*. Curr Drug Targets, 2004. **5**(4): p. 367-374.
158. Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, and R. Takahashi, *Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8662-8667.
159. MacFarlane, M., et al., *Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36611-36616.
160. Hu, S. and X. Yang, *Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10055-10060.
161. Vaux, D.L. and J. Silke, *IAPs, RINGs and ubiquitylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 287-297.
162. Riede, U.-N. and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 4. 1999, Stuttgart: Thieme. 135-144.
163. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck, *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. Anat Histol Embryol, 2002. **31**(4): p. 214-223.
164. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
165. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-1916.
166. Yuan, J. and G. Kroemer, *Alternative cell death mechanisms in development and beyond*. Genes Dev, 2010. **24**(23): p. 2592-602.
167. Kaufmann, S.H. and W.C. Earnshaw, *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 42-49.
168. Brown, J.M. and L.D. Attardi, *The role of apoptosis in cancer development and treatment response*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 231-237.
169. Reed, J.C., *Apoptosis-based therapies*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(2): p. 111-121.
170. Reed, J.C. and M. Pellecchia, *Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies*. Blood, 2005. **106**(2): p. 408-418.

171. Picarda, G., et al., *TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(1): p. 45-64.
172. Tsuruo, T., et al., *Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal*. Cancer Sci, 2003. **94**(1): p. 15-21.
173. Reid, G., et al., *Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(5): p. 1094-1103.
174. Zhou, S.F., et al., *Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development*. Curr Med Chem, 2008. **15**(20): p. 1981-2039.
175. Strohfelddt, K. and M. Tacke, *Bioorganometallic fulvene-derived titanocene anti-cancer drugs*. Chem Soc Rev, 2008. **37**(6): p. 1174-1187.
176. Pavlaki, M., et al., *A proposed mechanism for the inhibitory effect of the anticancer agent titanocene dichloride on tumour gelatinases and other proteolytic enzymes*. J Biol Inorg Chem, 2009. **14**(6): p. 947-57.
177. Hogan, M., et al., *Synthesis and cytotoxicity studies of new morpholino-functionalised and N-heteroaryl-substituted titanocene anticancer drugs*. Med Chem, 2008. **4**(2): p. 91-9.
178. Gomez-Ruiz, S., et al., *Cytotoxic studies of substituted titanocene and ansa-titanocene anticancer drugs*. J Inorg Biochem, 2008. **102**(8): p. 1558-70.
179. Winkler, I., *Modulare Darstellung neuer Titanocene*, 2006: Bonn. p. 7-18.
180. Sinn, H., et al., *"Living Polymers" on Polymerization with extremely productive Ziegler catalysts*. Angewandte Chemie International Edition, 1980. **19**(5): p. 390-392.
181. Kopf-Maier, P., et al., *[Molybdocene dichloride as an antitumor agent (author's transl)]*. Z Naturforsch C, 1979. **34**(12): p. 1174-1176.
182. Lauterbach, T.E.B., *Radikalische 3- und 4-exo Zyklisierungen und modulare Darstellung von Titanocenen*, 2006: Bonn. p. 74-77.
183. Melendez, E., *Titanium complexes in cancer treatment*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **42**(3): p. 309-15.
184. Kuo, W., et al., *Postural stability assessment in sewer workers*. J Occup Environ Med, 1996. **38**(1): p. 27-34.
185. Gansauer, A., T. Lauterbach, and D. Geich-Gimbel, *Polarity matching of radical trapping: high yielding 3-exo and 4-exo cyclizations*. Chemistry, 2004. **10**(20): p. 4983-4990.
186. Harding, M.M. and G. Mokdsi, *Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules*. Curr Med Chem, 2000. **7**(12): p. 1289-303.
187. Guo, M., et al., *Ti(IV) uptake and release by human serum transferrin and recognition of Ti(IV)-transferrin by cancer cells: understanding the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride*. Biochemistry, 2000. **39**(33): p. 10023-10033.
188. Waern, J.B. and M.M. Harding, *Coordination chemistry of the antitumor metallocene molybdocene dichloride with biological ligands*. Inorg Chem, 2004. **43**(1): p. 206-13.

189. Bantel, H., et al., *Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 1999. **59**(9): p. 2083-2090.
190. Wieder, T., et al., *Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3*. *Blood*, 2001. **97**(5): p. 1378-87.
191. Hurwitz, R., et al., *Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype*. *Int J Cancer*, 1979. **23**(2): p. 174-180.
192. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. *Int J Cancer*, 1977. **19**(5): p. 621-626.
193. Kizaki, M., et al., *Induction of apoptosis via the modulation of reactive oxygen species (ROS) production in the treatment of myeloid leukemia*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006. **7**(5): p. 323-329.
194. Holzmann, B., et al., *Glycoprotein P3.58, associated with tumor progression in malignant melanoma, is a novel leukocyte activation antigen*. *Int J Cancer*, 1988. **41**(4): p. 542-547.
195. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1409-1416.
196. Aden, D.P., et al., *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. *Nature*, 1979. **282**(5739): p. 615-616.
197. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias*. *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. *Leukemia*, 1995. **9**(10): p. 1783-1786.
198. Bene, M.C., et al., *Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias*. *Haematologica*, 1999. **84**(11): p. 1024-1034.
199. Schulze-Bergkamen, H., et al., *Novel ways to sensitise gastrointestinal cancer to apoptosis*. *Gut*, 2009. **58**(7): p. 1010-24.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anja Selig, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel: "Präklinische Evaluation von Titanocenverbindungen als potentielle Zytostatika" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 26.01.2013

Anja Selig

10. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. PUBLIKATIONEN

- 11/2006 Banu Katik, Anja Selig, Janna Velder, Elvira E. Shults, Thomas Wieder, Guenter Henze, Hans-Guenther Schmalz, Aram Prokop. **New Pinostilbene Analogues Overcome Anthracycline Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia *Ex Vivo***. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2006; 108: 4403.
- 11/2007 Anja Selig, Laura Wagner, Iris Winkler, Thorsten Lauterbach, Andreas Gansaeuer, Aram Prokop; **Carbonyl-Substituted Titanocenes as New Cytostatic Agents Against Lymphoma and Leukemia in Childhood**. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2007; 110: 4208.
- 04/2008 Gansäuer A, Winkler I, Worgull D, Lauterbach T, Franke D, Selig A, Wagner L, Prokop A; **Carbonyl-Substituted Titanocenes: A Novel Class of Cytostatic Compounds with High Antitumor and Antileukemic Activity**. Chemistry. 2008 Apr 2;14 (14):4160-4163.

Berlin, 26.01.2013

Anja Selig