

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

DISSERTATION

**Untersuchung der Apoptose auslösenden und Resistenz überwindenden
Eigenschaften neuartiger organometallischer Verbindungen am Beispiel eines
Ferrocen-Aminosäurederivats**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Benjamin Kater
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	3
1.1	Abstract.....	3
1.2	Abkürzungsverzeichnis.....	5
1.3	Einleitung.....	7
1.3.1	Zytostatika-Resistenz in der Krebstherapie.....	7
1.3.2	Die Apoptose-Signalkaskade	8
1.3.3	Organometallische Verbindungen mit Resistenz überwindenden Eigenschaften	8
1.3.4	Zielstellung	9
1.4	Material und Methoden.....	9
1.4.1	Materialien.....	9
1.4.1.1	Geräte.....	9
1.4.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	9
1.4.1.3	Chemikalien und Reagenzien	10
1.4.1.4	Pufferlösungen.....	10
1.4.1.5	Zytostatika	11
1.4.1.6	Antikörper.....	11
1.4.1.7	Zelllinien.....	11
1.4.1.8	Primäre Zellen.....	12
1.4.2	Methoden.....	12
1.4.2.1	Kultivierung von Zelllinien	12
1.4.2.2	Züchtung von Zytostatika-resistenten Zelllinien	13
1.4.2.3	Isolation und Kultivierung primärer Zellen	13
1.4.2.4	Zellzahlbestimmung.....	14
1.4.2.5	Messung der DNS-Fragmentierung.....	14
1.4.2.6	Abgrenzung apoptotischen Zelltods von Nekrose	15
1.4.2.7	Genexpressionsanalyse	16
1.4.2.8	Messung des mitochondrialen Membranpotentials	17
1.4.2.9	Westernblot und Immundetektion	17
1.4.2.10	Statistische Analyse.....	18
1.5	Ergebnisse	19
1.5.1	Der Eisen-Komplex <i>HUNI 068</i> (Publikation 1).....	19
1.5.1.1	<i>HUNI 068</i> inhibiert die Proliferation und führt zu einer Fragmentierung der DNS in Tumorzellen.....	19

1.5.1.2	<i>HUNI 068</i> induziert Apoptose in Tumorzellen; die nekrotische Wirkung ist gering	19
1.5.1.3	<i>HUNI 068</i> überwindet Zytostatika-Resistenz <i>in vitro</i>	20
1.5.1.4	<i>HUNI 068</i> ist wirksam gegen Leukämiezellen <i>ex vivo</i>	21
1.5.1.5	<i>HUNI 068</i> induziert Apoptose über den intrinsischen/ mitochondrialen Signalübertragungsweg	21
1.5.2	Titanocen- und nickelhaltige Verbindungen: Zusammenfassung der Ergebnisse (Publikationen 2 und 3)	22
1.6	Diskussion	22
1.7	Literaturverzeichnis	25
1.8	Abbildungen	29
2	Eidesstattliche Versicherung	34
3	Anteilerklärung	35
4	Ausgewählte Publikationen	36
5	Lebenslauf	61
6	Komplette Publikationsliste	63
7	Danksagung	65

1 Zusammenfassung

1.1 Abstract

Ziel: Zytostatika-Resistenz ist bei der Therapie onkologischer Erkrankungen ein besonderes Problem. Deshalb ist es sinnvoll, nach Wirkstoffen zu suchen, welche Zytostatika-Resistenz in Tumor- und Leukämiezellen überwinden und in diesen Zellen Apoptose auslösen können. Hierbei sind Metall-organische Komplexverbindungen besonders interessant. Im Rahmen dieser Dissertation sind einige neuartige organometallische Verbindungen auf ihre Wirkung untersucht worden, darunter ein Eisenkomplex, ein Titan- und ein Nickelkomplex. Insbesondere soll hier beispielhaft über das Ferrocen-Aminosäurederivat *HUNI 068* berichtet werden.

Methoden: Die Zellzahl wurde mithilfe eines CASY®CellCounter gemessen. Mit den DNS-Fragmentierungs- und Annexin-V/PI-Doppelfärbungs-Assays wurde Apoptose gemessen, und mit dem LDH-release-Assay bestimmten wir das Ausmaß an Nekrose. Wir stellten Zytostatika-resistente Zelllinien her, um die Fähigkeit zur Resistenzüberwindung zu prüfen. Mit Echtzeit-PCR untersuchten wir Veränderungen der Genexpression behandelter Zellen. Der Apoptose-Signalübertragungsweg wurde durch Immunoblotting und Messung des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials untersucht.

Ergebnisse: Der Eisen-Komplex *HUNI 068* hemmt die Proliferation von malignen Zellen und führt zur Induktion von Apoptose. Die Auslösung von Nekrose ist gering, und gesunde Leukozyten werden weniger stark angegriffen als Krebszellen. Der Wirkstoff überwindet Zytostatika-Resistenz gegenüber Vincristin und Daunorubicin und wirkt unabhängig von p-Glykoprotein- und Bcl-2-Überexpression. Ferner konnte eine Hochregulation des Anti-Bcl-2 Proteins Harakiri beobachtet werden. *HUNI 068* induzierte Apoptose auch in primären Leukämiezellen, welche gegenüber einigen konventionellen Medikamenten eine ausgeprägte Resistenz zeigten. Die Apoptose-Induktion ist unabhängig von der CD95-Expression und assoziiert mit einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials sowie einer Aktivierung von Caspase-9, was für den intrinsischen Apoptose-Signalweg über die Mitochondrien spricht. Für die untersuchten Titan- und Nickel-Komplexverbindungen konnten ebenfalls zytostatische und Apoptose induzierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Sie wirken unabhängig von Bcl-2 und durchbrechen Zytostatika-Resistenz gegenüber Vincristin. Als Signalübertragungsweg konnte hier der extrinsische Pfad identifiziert werden.

Schlussfolgerungen: Die untersuchten Metall-Komplexe überwinden verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber Zytostatika in malignen Zellen. Die Induktion von Apoptose erfolgt im Falle des Eisen-Komplexes *HUNI 068* über die intrinsische und im Falle der Titan- und Nickel-Komplexe über die extrinsische Apoptose-Signalkaskade.

Purpose : As resistance against cytostatic drugs is a severe problem in cancer therapy, it makes sense to search for agents, which can overcome drug resistance in tumor and leukemia cells and induce apoptosis in these cells. Metal-organic complex compounds are particularly interesting. This dissertation contains the research of some recently discovered organometallic compounds, including an iron, a titanium and a nickel complex, which have been tested for their effects on cancer cells. Special attention is paid to the ferrocene amino acid derivative *HUNI 068*.

Methods: Cell count was determined by using a CASY®CellCounter. DNA fragmentation assay and annexin-V/PI binding assays were used to measure apoptosis, and necrosis was determined by LDH-release assay. Cell lines with resistance to cytostatic drugs were generated to test the ability to overcome drug resistance. Via real-time PCR, alterations in gene expression of treated cells were analyzed. The involved apoptosis pathway was investigated by immunoblotting and the measurement of mitochondrial membrane permeability transition.

Results: The iron complex *HUNI 068* inhibits proliferation of cancer cells and induces apoptosis. Induction of necrosis is low and healthy leucocytes are less affected than cancer cells.

The compound overcomes drug resistance to vincristine and daunorubicin and acts independently of p-glycoprotein and Bcl-2 overexpression. Upregulation of the anti-Bcl-2 protein harakiri was seen. Also, HUNI 068 achieved acceptable effects in primary leukemia cells whereas tolerance to some common drugs was shown. Induction of apoptosis is independent of CD95 expression, but associated with a reduced mitochondrial membrane potential and activation of caspase-9, indicating the intrinsic apoptosis pathway via mitochondria. The tested titanium and nickel complex compounds also proved to have cytostatic and apoptosis inducing properties. They act independently of Bcl-2 and overcome drug resistance to vincristine. Here, the extrinsic pathway of signal transduction was identified.

Conclusions: The tested metal complex compounds overcome different resistance mechanisms to cytostatic drugs in cancer cells. The iron complex *HUNI 068* induces apoptosis via the intrinsic signal transduction pathway, the titanium and nickel complexes use the extrinsic apoptosis pathway.

1.2 Abkürzungsverzeichnis

AC50 (48 h)	halbmaximale apoptotische Konzentration nach 48 h
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Cytarabin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under Curve
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma- 2 gene
BSA	Bovines Serum Albumin
Caspase	Cysteinylaspartase
CD	Cluster of Differentiation
Dauno	Daunorubicin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

Doxo	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme- Linked- Immunosorbent Assay
Epi	Epirubicin
FACS	Fluorescent- Activated Cell Sorting
FADD	Fas Associated Death Domain
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FKS	Fetales Kälberserum
Flu	Fludarabin
Fmock	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)Piperazin- <i>N'</i> -3(Ethansulfonsäure)
HRP	Horse Radish Peroxidase
Ida	Idarubicin
IGC50 (24 h)	halbmaximale Hemmkonzentration nach 24 h
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazoliumchlorid
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-Benzimid-Azolyl Carbocyaniniodid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC50 (48 h)	halbmaximale letale Konzentration nach 48 h
LDH	Laktatdehydrogenase
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
m	Milli
μ	Mikro
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophores
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumiodid
RNAse	Ribonukleinase
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMAC	supramolekularer Adhäsionskomplex
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vcr	Vincristin
5-FU	Fluorouracil
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential

1.3 Einleitung

1.3.1 Zytostatika-Resistenz in der Krebstherapie

Zytostatika-Resistenz ist bei der Therapie maligner onkologischer bzw. hämatologischer Erkrankungen ein zunehmend beachtetes Problem.¹ Insbesondere bei der Rezidivkrankung bewirken erworbene Abwehrmechanismen der malignen Zellen, dass die eingesetzten Medikamente nicht mehr ausreichend wirken.^{2,3} Hier sei beispielhaft die ALL im Kindesalter genannt, die häufigste maligne Erkrankung in dieser Altersgruppe.⁴ Die Prognose der ALL im Kindesalter ist heutzutage insgesamt gut, etwa 85 % der Patienten sind 5 Jahre nach Diagnosestellung krankheitsfrei.⁵ Bei ca. 20 % der Kinder kommt es jedoch zu einem Rezidiv. Bei diesen Patienten führt Zytostatika-Resistenz zu einer schlechten Prognose mit Behandlungserfolgsaussichten von nur noch etwa 50 %.⁶

Resistenztestungen, wie sie bei der Therapieplanung von bakteriellen Infektionen durchgeführt werden, haben sich bislang in der Krebstherapie nicht durchsetzen können. Dies kann dazu führen, dass die Unwirksamkeit einer für den Patienten ohnehin belastenden Therapie erst spät im Laufe der Behandlung erkannt wird. Im Rahmen von *ex vivo* Versuchen an von Patienten direkt entnommenen Tumorzellen, kann allerdings durchaus die Sensibilität gegenüber unterschiedlichen Zytostatika untersucht werden und auf diese Weise zumindest eine grobe Aussage getroffen werden, welcher Wirkstoff am besten für die Therapie geeignet wäre.⁷

Tumorzellen erlangen Zytostatika-Resistenz durch eine verminderte Expression von Apoptose fördernden Proteinen und umgekehrt durch verstärkte Bildung von antiapoptotischen Faktoren, z.B. Überexpression des Apoptose unterdrückenden Proteins Bcl-2. Auch das Herausschleusen des verabreichten Wirkstoffs aus der Zelle durch Membrantransporter kann Resistenzen bewirken. Hierbei spielt beispielsweise das Transportprotein p-Glykoprotein eine wichtige Rolle.⁸ Ein in dieser Arbeit erwähntes proapoptotisches Protein ist Harakiri, welches mit dem

antiapoptotischen Bcl-2, jedoch nicht mit dessen Apoptose fördernden Homologen Bax oder Bak interagiert.⁹

Durch den gezielten Einsatz von Wirkstoffen, welche die jeweiligen Apoptose-Abwehrmechanismen umgehen, könnte bei multipler Zytostatika-Resistenz die Therapie entscheidend verbessert werden.

1.3.2 Die Apoptose-Signalkaskade

Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod, bei dem Zellbestandteile nach Aufhebung der Membranintegrität unkontrolliert freigesetzt werden, bezeichnet Apoptose einen kontrolliert ablaufenden und für den Organismus schonenden Zelltod. Zwei Hauptsignalwege der Apoptose-Kaskade sind bekannt, der extrinsische und der intrinsische Pfad. Beide führen zu einer Aktivierung von speziellen Proteasen, den sogenannten Caspasen. Initiator-Caspasen spalten die Proform von Effektor-Caspasen, welche schließlich zelleigene Proteine wie Aktin und Laminin abbauen und eine DNS-spaltende Nuklease aktivieren. Das FADD-Molekül ist, durch seine Rolle bei der Übertragung des Signals des Todesrezeptors CD95 auf die Caspasen, ein wichtiger Faktor des extrinsischen Weges.¹⁰ Die frühe Phase des intrinsischen Übertragungsweges beinhaltet eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, gefolgt von einer Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Cytochrom-C bewirkt die Prozessierung der Caspase-9.¹¹

1.3.3 Organometallische Verbindungen mit Resistenz überwindenden Eigenschaften

Seitdem die Wirksamkeit von Cisplatin gegen Tumorzellen bekannt ist, hat die Forschung an bioaktiven Metall-organischen Substanzen immer größere Bedeutung gewonnen.¹² Verschiedene metallhaltigen Verbindungen werden seither erforscht. Ein Beispiel für ein besonders interessantes Molekül ist die erstmals 1951 in der Fachzeitschrift Nature beschriebene Eisen-Komplexverbindung Ferrocen. Beim Ferrocen ist ein zentrales Eisenmolekül zwischen zwei anionischen Cyclopentadienyl-Liganden eingebettet.¹³ Es ist sehr stabil und reaktionsfreudig, wodurch die Herstellung von unterschiedlichen Derivaten ermöglicht wird. Für eine Reihe von Abkömmlingen des Ferrocens konnte eine Wirksamkeit gegen Krebszellen nachgewiesen werden, und es werden bereits ferrocenhaltige Medikamente in klinischen Studien erprobt.¹⁴ In diesem Zusammenhang ist das Ferrocifen zu nennen, ein vielversprechendes Analogon des Brustkrebsmedikaments Tamoxifen.¹⁵ Bei der Untersuchung verschiedener Ferrocenyl-Nukleosidanaloga stellte sich heraus, dass mit einigen von ihnen Apoptose in unterschiedlichen Leukämie- und Lymphomzelllinien induziert werden kann.¹⁶ Nukleosidanaloga werden bei der

Chemotherapie vieler maligner Erkrankungen eingesetzt.¹⁷ Cytarabin ist bei der Therapie der ALL im Kindesalter beispielsweise eines der häufigsten verabreichten Medikamente.¹⁸ Wir untersuchten weitere Ferrocen-Verbindungen und stießen dabei auf die Fmoc-geschützte Aminosäure *HUNI 068* (C₃₄H₃₃FeNO₆).¹⁹ Dieses Molekül ist durch die fehlende Base strukturell kein Nukleosidanalogen. Dennoch induziert es Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien und ist auch in solchen Zellen wirksam, die gegenüber unterschiedlichen etablierten Chemotherapeutika Resistenzen aufweisen. Diese Ergebnisse wurden 2011 publiziert und werden hier noch einmal zusammengefasst.²⁰ Für einige andere Metall-Komplexe konnten wir ähnliche Eigenschaften nachweisen, wobei in dieser Arbeit auch eine kurze Darstellung der ebenfalls bereits veröffentlichten Ergebnisse zu der titanhaltigen Verbindung *Titanocen-Y* und zu dem nickelhaltigen [*Ni^{II}(3-OMe-Salophen)*] erfolgt.^{21,22}

1.3.4 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Untersuchungen zu den Apoptose auslösenden Eigenschaften von *HUNI 068* beispielhaft für unser methodisches Vorgehen zur Wirksamkeitsanalyse neuartiger Substanzen für die Therapie maligner Erkrankungen dargestellt werden. Die Studien zu *Titanocen-Y* und [*Ni^{II}(3-OMe-Salophen)*] werden im Ergebnisteil in einem separaten Abschnitt zusammengefasst.

1.4 Material und Methoden

1.4.1 Materialien

1.4.1.1 Geräte

Wir benutzten die Zentrifugen 5804 R und 5415 R, sowie den Thermomixer comfort von Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), den CASY® CellCounter von Innovatis (Bielefeld), den Brutschrank Hera Cell 150 von Thermo (Waltham, USA), das Chemigenius-2-Bio-Imaging Systems von Syngene (Cambridge, USA), den Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell von Biorad (München), den FACSCalibur von Becton Dickinson (Heidelberg) und den LightCycler480 von Roche Diagnostics.

1.4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen, Lochplatten, Röhrchen und Pipetten waren von Becton Dickinson (Heidelberg), CASY®cups von Innovatis (Bielefeld), Protran Nitrocellulose Transfer Membranen

von Schleicher & Schnell Bioscience Inc (Dassel) und SuperArray PAHS-012 von SABiosciences Corporation (Frederick, MD, USA).

1.4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Formaldehyd ($\geq 37\%$), APS, TEMED, β -Mercaptoethanol, Tris, Acrylamid und Magermilchpulver stammten von Carl Roth (Karlsruhe), Ethanol, PBS, Triton X-100, Ammoniumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumazid, Essigsäure und Tween 20 von Merck (Darmstadt), RNase A von Quiagen (Hilden), PI, DMSO, SDS, Glycin und EDTA von Serva (Heidelberg), BSA von Sigma (Saint Louis, USA), ECL Western Blotting Detection und DNA-Molecular Weight Marker (Rainbow) von Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England), Super Signal West Pico ECL-Substrate von Pierce (Rockford, USA), Penicillin (1000 U/ml)/ Streptomycin (1000 $\mu\text{g/ml}$) von Biochrom AG (Berlin), Trypanblau 0,4 % und Trypsin von Sigma-Aldrich (München), JC-1 von Molecular Probes (Leiden, Niederlande), FKS von Gibco, Invitrogen (Karlsruhe), CASY[®]ton-Messlösung von Innovatis (Bielfeld) und Annexin-V-FITC von BD Pharmingen (Heidelberg).

1.4.1.4 Pufferlösungen

Wir benutzten folgende Pufferlösungen: Probenpuffer (5 x), bestehend aus Tris/HCl (260 mM, pH 6,8), Glycerin (40 %, v/v), β -Mercaptoethanol (12,5 %, v/v), DTT (400 mM), Bromphenol blau (0,004 %, w/v) und SDS (2 %, w/v); Bindungspuffer, bestehend aus HEPES (10 mM)/NaOH (pH 7,4), NaCl (140 mM) und CaCl_2 (2,5 mM); Transferpuffer, bestehend aus 480 mM Tris (Base) und 300 mM Glycin; Blockierpuffer, bestehend aus PBS, Tween-20 (0,05 %) und Magermilchpulver (5 %); Laufpuffer (10 x), bestehend aus 250 mM Tris (Base), 2 M Glycin und 1 % (w/v) SDS; Erythrozytenlysepuffer, bestehend aus 1,5 M Ammoniumchlorid, 0,1 M KHCO_3 , 1,27 mM EDTA mit dH_2O ; Lysepuffer, bestehend aus Tris/HCl (10 mM, pH 7,5), EDTA (2 mM), SDS (0,1 %, w/v), Triton-X-100 (1 %, w/v), Phenylmethylsulfonylfluorid (200 mM, 5 $\mu\text{l/ml}$), Pepstatin (1 $\mu\text{l/ml}$) und Leupeptin (1 $\mu\text{l/ml}$); Waschpuffer (1 x PBST), bestehend aus 1x PBS und 0,05 % Tween 20; Strippuffer, bestehend aus 0,1 M β -Mercaptoethanol, 0,2 M Glycin und 0,05 % (v/v) Tween 20; Ponceau-Rot-Lösung, bestehend aus 0,5 % (w/v) Ponceau-Rot und 1 % (v/v) Essigsäure; Sammelgel (5 %), bestehend aus 5 % Acrylamid, 0,1875 M Tris, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,1 % TEMED; Trenngel (16 %), bestehend aus 16 % Acrylamid, 0,375 M Tris, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,04 % TEMED.

1.4.1.5 Zytostatika

HUNI 068 (C₃₄H₃₃FeNO₆, Molgewicht: 607.47) wurde synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt von Andrea Hunold aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz, wie bereits im Vorfeld publiziert.¹⁹ Bis-[(p-methoxybenzyl)cyclopentadienyl] titanium(IV) dichlorid (*Titanocene-Y*) erhielten wir aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tacke (UCD School of Chemistry and Chemical Biology, Dublin, Ireland). [*Ni^{II}(3-OMe-Salophen)*] wurde synthetisiert wie bereits in einer Publikation beschrieben.²³ Die Substanzen wurden zur Herstellung von 40 mM Stocklösungen in DMSO gelöst. Folgende konventionelle Zytostatika wurden verwendet und uns von der Charité (Berlin) zur Verfügung gestellt: Cytarabin (AraC), Fludarabin (Flu), Doxorubicin (Doxo), Daunorubicin (Dauno), Fluorouracil (5-FU), Vincristin (Vcr), Idarubicin (Ida) und Epirubicin (Epi). Zur Herstellung von Stocklösungen erfolgte eine Verdünnung mit DMSO sowie mit den entsprechenden Zellkulturmedien oder Pufferlösungen während der Experimente. Für die verschiedenen Experimente wurden jeweils einige Zellen als DMSO-Kontrolle lediglich mit der entsprechenden Menge an DMSO inkubiert. Die hier gemessenen Effekte entsprachen den Ergebnissen mit den unbehandelten Kontrollen, wenn nicht anders angegeben.

1.4.1.6 Antikörper

Für die Westernblot-Analyse wurden primäre Maus anti-humane Caspase-9 Antikörper benutzt, welche von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt) stammten und in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt wurden. Primäre Maus anti-humane β -Aktin Antikörper stammten von Sigma (Saint Louis, USA) und wurden in einer Konzentration von 1:2000 verwendet. Sekundäre anti-Maus HRP-gekoppelte Antikörper waren von Promega (Minneapolis, USA) und wurden in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt.

1.4.1.7 Zelllinien

Die Zelllinie BJAB stammt von einem humanen Burkitt-Lymphom, wobei es sich in Kultur um Suspensionszellen handelt. Wir verwendeten die Zelllinien BJAB-Mock und BJAB FADD-dn. Während bei den BJAB-Mock Zellen die Expression des funktionellen FADD unverändert ist, wurde die FADD-dn Zelllinie mit pcDNA3-FADD-dn transfiziert. Dadurch exprimiert sie eine dominant-negative FADD-Mutante, der die N-terminale death effector-Domäne fehlt. Die FADD-dn-Mutante blockiert CD95-vermittelte Apoptose, wie bereits in früheren Publikationen beschrieben.²⁴ Die Zellen wurden uns zur Verfügung gestellt von Peter Daniel, Charité Berlin. Die Zelllinie Nalm-6 wurde aus humanen leukämischen B-Vorläuferzellen gewonnen und

stammt von einem Patienten mit einem Rezidiv einer ALL. Es handelt sich um Suspensionszellen, die uns von der AG Henze, Charité Berlin zur Verfügung gestellt wurden. Wie benutzten des Weiteren speziell gezüchtete BJAB- und Nalm-6-Zelllinien, die Resistenzen gegenüber verschiedenen Zytostatika aufweisen. Dabei handelte es sich um Vincristin-resistente BJAB- und Nalm-6-Zellen (BJAB/Vcr, Nalm-6/Vcr) sowie um Daunorubicin-resistente Nalm-6-Zellen (Nalm-6/Dauno). Im Methodenteil ist deren Herstellung erläutert. Die Verbindung *Titanocene-Y* untersuchten wir außerdem auf der Melanomzelllinie MelHO pRes/Bcl-2, die uns von Dr. Eberle, Charité Berlin, zur Verfügung gestellt wurde. Auf der von einer humanen T-Zell-Leukämie stammenden Zelllinie Jurkat neo/smac überprüften wir des Weiteren die Apoptoseauslösung der Verbindungen *Titanocene-Y* und $[Ni^{II}(3-OMe-Salophen)]$ auf Abhängigkeit von dem proapoptotischen Protein SMAC. Diese Zelllinie erhielten wir von PD Dr. Fulda, Universität Ulm.

1.4.1.8 Primäre Zellen

Wir verwendeten primäre Lymphoblasten bzw. mononukleäre Zellen von Patienten, die an einer Leukämie im Kindesalter erkrankt waren. Es handelte sich um einen Patienten mit einer ALL, um einen Patienten mit einer AML sowie um einen Patienten mit einem ALL-Rezidiv. Die Patienten waren in der Abteilung für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie/ Onkologie der Charité Berlin behandelt worden. Die Zellen wurden aus Knochenmarkaspirat oder aus peripherem Venenpunktat gewonnen. Die Diagnose wurde durch Immunphänotypisierung von Leukämiezellen gestellt, wie im Vorfeld beschrieben.²⁵ Die Verwendung des Patientenmaterials steht im Einklang mit dem Ethikvotum der Charité Berlin vom 14.12.2000, sowie mit den ethischen Standards der überarbeiteten Fassung der Deklaration von Helsinki. Des Weiteren verwendeten wir aus peripherem Venenpunktat gewonnene primäre Leukozyten einer gesunden Versuchsperson. Die Isolierung der primären Zellen wird im Methodenteil erläutert.

1.4.2 Methoden

1.4.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 250-ml Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C mit 35 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedium verwendeten wir für die Suspensionszellen RPMI 1640 Medium von Invitrogen (Karlsruhe), supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FKS, L-Glutamine (0,56 g/l), Penicillin (100000 i.u.) und Streptomycin (0,1 g/l). Adhäsionszellen wie MelHO kultivierten wir in DMEM von Invitrogen (Karlsruhe), supplementiert mit 10 % (v/v) FKS und Genitacin (0,4 g/l). Die Zellpassagierungen erfolgten 2-3

mal pro Woche durch Verdünnung auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml. 24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf eine Dichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt, um standardisierte Versuchsbedingungen zu erreichen. Für die Proliferations- und Apoptose-Assays wurden die Zellen direkt vor der Wirkstoffzugabe auf 1×10^5 Zellen/ml verdünnt und in 6-Lochplatten überführt.

1.4.2.2 Züchtung von Zytostatika-resistenten Zelllinien

Für die Herstellung resistenter Zelllinien behandelten wir BJAB- und Nalm-6-Zellen über einen Zeitraum von ca. einem halben Jahr mit schrittweise ansteigenden Konzentrationen verschiedener Zytostatika, bis sie auch hohe Konzentrationen ohne einen Verlust der Vitalität tolerierten. Wir begannen mit äußerst niedrigen Konzentrationen, mit denen wir keinen deutlichen Einfluss auf die Proliferation und Vitalität der Zellen erwarteten. Wir behandelten parallel zwei Zelllinien mit jeweils einer höheren und einer tieferen Konzentration, damit bei einem zu starkem Abfall der Vitalität mit der höheren Konzentration, der Versuch mit der anderen Zelllinie fortgesetzt werden konnte. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellzahl und die Vitalität gemessen (siehe Kapitel 1.4.2.4) und die Zellen auf eine Dichte von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Bei einer Vitalität über 80 % wurde eine Behandlung gegebenenfalls mit leicht erhöhten Konzentrationen durchgeführt, andernfalls wurde eine Ruhephase eingelegt, wobei sich die Zellen gewöhnlich nach drei Tagen wieder erholt hatten. Im Falle der Behandlung von Nalm-6-Zellen mit Vincristin, konnte auf diese Weise innerhalb von 7 Monaten die Konzentration von 1,0 nM auf 20-40 μ M gesteigert werden. Durch Messung der DNS-Fragmentierung (siehe Kapitel 1.4.2.5) konnten wir abschließend zeigen, dass die Auslösung von Apoptose in diesen Zellen bei einer Behandlung mit 20 nM Vincristin extrem signifikant verringert ist, im Vergleich zu einer nicht resistenten Kontrollzelllinie (Abb 3a).

1.4.2.3 Isolation und Kultivierung primärer Zellen

Die Vollblutproben oder Knochenmarkaspirate wurden zunächst mit RPMI 1640 auf ein durch fünf teilbares Volumen aufgefüllt, dann wurden 5 ml des Materials über 4 ml Ficoll in einem Redcap-Röhrchen überschichtet. Die Isolierung der Lymphoblasten und monoklonalen Zellen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit 657 g für 18 Minuten bei 20 °C und den Zentrifugeneinstellungen Beschleunigung = 4/5 und Bremse = 0. Der Buffycoat, bestehend aus Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten, wurde abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Bei rötlichem Buffycoat wurde noch zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und eine Erythrozytenlyse durchgeführt, indem die Zellen in 3 ml Erythrozytenlysepuffer für 2,5 Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Durch Zugabe von 20 ml Medium wurde die Lyse gestoppt, und nach einem weiteren Waschschrift mit RPMI 1640 wurde die Zellzahl mit einem CASY®Cellcounter gemessen. Nach der Separation lag der prozentuale Anteil von Leukämiezellen über 95 %, was im Einklang mit einer früheren Studie ist.²⁶ Die primären Zellen wurden daraufhin sofort mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml in RPMI 1640 auf 6-Lochplatten ausgesät und mit den jeweiligen zu untersuchenden Wirkstoffen für die Apoptose-Assays behandelt. Das Ausmaß der DNS-Fragmentierung wurde schon nach 60 h bestimmt, um die hohe unspezifische Zelltodrate, die nach längeren Zeiträumen auftritt, möglichst gering zu halten.

1.4.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität erfolgte mit einem CASY®CellCounter + Analyzer System, wie im Vorfeld beschrieben.²⁷ Für die jeweiligen Zellen wurden speziell angepasste Messparameter verwendet. Mit diesem System kann die Zellkonzentration simultan nach drei verschiedenen Größenbereichen analysiert werden, wobei zwischen Zelltrümmern, toten Zellen und vitalen Zellen unterschieden werden kann. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 6-Lochplatten überführt und mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Wirkstoffe behandelt. Als Kontrolle wurden einige Zellen unbehandelt belassen oder lediglich mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubationsperiode bei 37 °C wurden die Zellen sorgfältig resuspendiert, und 100 µl jeder Probe wurde mit 10 ml CASY®ton (gebrauchsfertige isotonische Kochsalzlösung) in einem CASY®cup vermischt und mit dem CASY®Cellcounter analysiert. Die gemessene Zellzahl der Kontrolle wurde als eine Proliferation von 100 % definiert. Eine maximale Proliferationshemmung wurde erreicht, wenn die gemessene Zellzahl gegenüber der Zellzahl zu Beginn des Experiments nicht zugenommen hatte. Die halbmaximale Hemmkonzentration wurde definiert als jene Konzentration eines Wirkstoffes, welche die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle nach 24-stündiger Inkubationszeit um 50 % inhibieren konnte. Dieser Wert wurde mit der Bezeichnung IGC50 (24 h) abgekürzt.

1.4.2.5 Messung der DNS-Fragmentierung

Apoptosetypische DNS-Fragmentierung wurde mit einer modifizierten Zellzyklusanalyse gemessen, wie im Vorfeld beschrieben.^{28,29} Nach einer Inkubationszeit von 60 h (bei der Untersuchung primärer Zellen), bzw. 72 h (bei Zelllinien) bei 37 °C in 6-Lochplatten, erfolgte die Sammlung der Zellen durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten. Die Zellen wurden mit PBS bei 4°C gewaschen und mit PBS/ 2 % (v/v) Formaldehyd auf Eis für 30 Minuten fixiert.

Nach der Fixation wurden die Zellen pelletiert, mit Ethanol/PBS (2:1, v/v) 15 Minuten inkubiert, erneut pelletiert und schließlich mit RNase A (40 µg/ml) enthaltendem PBS resuspendiert. Die RNS wurde für 30 Minuten bei 37 °C aufgeschlossen, daraufhin erfolgte eine erneute Pelletierung und Resuspendierung mit PI (50 µg/ml) enthaltendem PBS. Die DNS-Fragmentierung wurde mittels durchflusszytometrischer Bestimmung von hypodiploider DNS (FACS) quantifiziert. Die Daten wurden mit Hilfe eines mit der CELL Quest software ausgestatteten FACScan-Apparates (FACSCalibur) erhoben und analysiert. Der prozentuale Anteil an Hypodiploidie (Sub-G1) reflektiert die Anzahl apoptotischer Zellen. Die spezifisch durch die applizierten Wirkstoffe induzierte Apoptose wurde berechnet, indem die in den Kontrollzellen beobachtete Hintergrundapoptose von der Apoptoserate in den behandelten Zellen subtrahiert wurde.

1.4.2.6 Abgrenzung apoptotischen Zelltods von Nekrose

Die oben beschriebene Messung der DNS-Fragmentierung basiert auf der enzymatischen Spaltung der DNS während der späten Apoptosephase und ist als sensitive Methode zur Apoptoseerkennung allgemein akzeptiert. Dennoch ist deren Spezifität limitiert, da auch nekrotische und onkotische Zellen fragmentierte DNS aufweisen können.³⁰ Aus diesem Grund nutzten wir zusätzlich den LDH-release-Assay sowie den Phosphatidylserin-Translokations-Assay, um sicherzustellen, dass der ausgelöste Zelltod durch Apoptose zustande kommt. Der LDH-release-Assay macht sich zunutze, dass die Apoptoseauslösung über eine Kaskade verläuft, die mehrere Stunden in Anspruch nimmt, wohingegen Nekrose auslösende zytotoxische Substanzen zu einer direkten Membranschädigung führen, was schon kurz nach der Behandlung beobachtet werden kann. Das Ausmaß einer Nekroseauslösung korreliert dabei mit der Höhe der Freisetzung des Enzyms LDH aus der geschädigten Zelle. Mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit von Roche (Mannheim) quantifizierten wir die unspezifische Zytotoxizität der zu untersuchenden Substanzen gegenüber BJAB-Zellen. Es handelt sich um einen enzymatischen Test, der die Aktivität von LDH im Medium misst, wobei eine Reduktion von NAD⁺ zu NADH während der von der LDH katalysierten Umwandlung von Laktat zu Pyruvat erfolgt. Diese Methode wurde bereits im Vorfeld beschrieben und erfolgte nach den Instruktionen des KIT-Herstellers.³¹ Die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgte in 96-Lochplatten in Kulturmedium. Als Kontrollen wurden einige Zellen unbehandelt belassen bzw. lediglich mit DMSO oder für eine maximale Lyse mit Triton-X-100 (0,1 %) versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Die Platten wurden daraufhin für 5 Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert. 20 µl des zellfreien Überstandes jeder Probe wurden in eine

neue 96-Lochplatte mit flachem Boden überführt und mit jeweils 80 µl PBS verdünnt. Eine Reaktionsmischung bestehend aus INT, Natriumlaktat, NAD⁺ und Diaphorase (100 µl) wurde hinzugefügt. Es erfolgte dann die photometrische Messung der zeitabhängigen Bildung des Reaktionsprodukts bei 490 nm im ELISA-Reader. Die maximal mögliche Freisetzung der LDH wurde anhand der LDH-Freisetzung aus den mit Triton-X-100 lysierten Zellen abgeleitet. Der für die unbehandelten Kontrollzellen gemessene Wert wurde als 100 % -ige Viabilität definiert. Eine weitere Methode zur Unterscheidung zwischen unspezifischem Zelltod und Apoptose ist der Annexin-V-FITC/ PI-Doppelfärbungstest. Diese Methode basiert auf dem frühapoptotischen Prozess der Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Zellmembranseite. Annexin-V-FITC kann dadurch in apoptotischen Zellen an Phosphatidylserin binden, während in gesunden Zellen mit intakter Membran diese Bindung nicht erfolgt.³² Die Durchführung erfolgte wie bereits im Vorfeld beschrieben, wobei wir das Phosphatidylserine Detection Kit von IQ Products (Groningen, Niederlande) verwendeten.³³ 1 x 10⁵ Zellen wurden zweimal mit eiskühlem PBS gewaschen und dann mit Bindungspuffer resuspendiert. Es wurde Annexin-V-FITC (10 µl) und PI (10 µl, 50 µg/ml) hinzugefügt, und nach 48 h Inkubation erfolgte die Analyse der Zellen mit dem mit der CellQuest-Software ausgerüsteten FACSCalibur. Die Klassifikation der Zellen erfolgte in 3 Gruppen: Als vital wurden diejenigen Zellen klassifiziert, die sowohl Annexin-V-FITC-negativ, als auch PI-negativ waren (Annexin-V-/PI-). PI-positive Zellen (Annexin-V+/PI+ und Annexin-V-/PI+) gelten als nekrotisch. Als apoptotisch wurden diejenigen Zellen eingestuft, die Annexin-V-FITC-positiv aber PI-negativ waren. Annexin-V+/PI-). Um die spezifisch von den getesteten Wirkstoffen erzeugten Effekte zu berechnen, wurde der in den unbehandelten Kontrollzellen gemessene Zelltod (PI+ und Annexin-V+/PI-) von den entsprechenden Zellfraktionen der behandelten Proben subtrahiert. Als halbmaximale letale Konzentration wurde diejenige Konzentration eines Wirkstoffes definiert, welche die Anzahl vitaler Zellen nach 48 h um 50 % reduzierte. Dieser Wert wurde mit LC50 (48 h) abgekürzt. Die halbmaximale apoptotische Konzentration wurde als diejenige Konzentration definiert, welche nach 48 h in 50 % der Zellen eine Phosphatidylserin-Translokation bewirkte, ohne die Membranintegrität zu beschädigen (Annexin-V+/PI-). Dieser Wert wurde mit AC50 (48 h) abgekürzt.

1.4.2.7 Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der Expression verschiedener Gene, die während der unterschiedlichen Apoptosewege involviert sind, benutzten wir Apoptose spezifische RT²-Profiler PCR Expression Arrays (SuperArray PAHS-012) nach den Instruktionen des Herstellers. Wir inkubierten BJAB-

Zellen für 15 h mit *HUNI 068* (30 μM), woraufhin die RNS der Zellen extrahiert wurde. Die RNS wurde mit DNAase I (2 U/ μl) behandelt, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNS zu eliminieren. Die RNS (700 ng/ μl) wurde dann als Matrize für die Synthese einer cDNS-Sonde verwendet und nach den Herstellerangaben einer quantitativen Echtzeit-PCR SuperArray Analyse unterzogen. Dafür verwendeten wir einen LightCycler480. Die Mittelwerte von neun sog. housekeeping Genen wurden benutzt, um die Hybridisationssignale zu normalisieren. Die Ergebnisse wurden mithilfe der SuperArray Analyzer Software analysiert. Die Daten wurden dargestellt als Vielfaches der Expression der entsprechenden Gene im Vergleich zu für 15 h lediglich mit trägerstoffenthaltendem Medium inkubierten Kontrollzellen.

1.4.2.8 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Mitochondriale Apoptose wurde durch Messung des Umschlags des mitochondrialen Membranpotentials untersucht, wie im Vorfeld bereits beschrieben.³⁴ Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit den zu untersuchenden Substanzen in 6-Lochplatten wurden die Zellen mit 1500 rpm bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. 1×10^5 Zellen wurden in phenol-rot- und zusatzstofffreiem RPMI 1640 (500 μl) resuspendiert und JC-1-Farbstoff wurde hinzugefügt, wobei letztendlich eine Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht wurde. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C unter moderatem Schütteln inkubiert. Kontrollzellen wurden entsprechend ohne JC-1 inkubiert. Es folgten eine 5-minütige Zentrifugation der Zellen bei 1500 rpm und 4 °C, ein Waschschrift mit eisgekühltem PBS und schließlich eine Resuspendierung in 200 μl PBS bei 4 °C. Die Messung wurde dann mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung der Zellen mit einer verminderten Fluoreszenz, d.h. mit Mitochondrien, die ein abgesenktes Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) aufweisen, vorgenommen. Die Daten wurden gesammelt und mit dem mit der CELL QUEST Software ausgestattetem FACSCalibur analysiert. Unbehandelte Kontrollzellen mit vermindertem $\Delta\Psi_m$ wurden von den für die behandelten Zellen gemessenen Werten subtrahiert. Die Daten sind als prozentualer Anteil der Zellen mit erniedrigtem $\Delta\Psi_m$ gegeben, was diejenigen Zellen widerspiegelt, die mitochondriale Apoptose durchlaufen.

1.4.2.9 Westernblot und Immundetektion

Der Nachweis bestimmter Proteine erfolgte mittels Westernblot-Analyse, wie im Vorfeld zahlreich beschrieben.³⁵ Die Zellen wurden mit den zu untersuchenden Wirkstoffen in großen 750-ml-Kulturflaschen inkubiert, weil eine hohe Zellzahl für die Isolierung ausreichender Proteinmengen nötig war. Sie wurden mit PBS gewaschen und dann in 100 μl Lysepuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde gegen einen BSA-Standard mit Hilfe des BCA

Protein Assay Kit (Pierce, Illinois, USA) bestimmt. Die Proteine wurden dann in 5 x Probenpuffer bei 95 °C mit einem Thermomixer comfort denaturiert. Es folgte die Proteinseparation durch SDS-PAGE. Die Geltaschen wurden mit gleichen Proteinnengen (gewöhnlich 30 µg pro Tasche) beladen. Die Molekulargewichte wurden durch Vergleich mit parallel laufenden Standardproteinen (Rainbow marker) bestimmt. Für das Immunoblotting benutzten wir in 1 x Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembranen. Das Blotting erfolgte für 1 Stunde mit 1 mA/cm² in einer Transblot SD cell. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen benutzten wir Blockierpuffer. Die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte entsprechend der Instruktionen der Hersteller der jeweiligen Antikörper. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden inkubierten wir die Membranen mit ECL® Western Blotting Detection. Die Lumineszenz Signale wurden mit einem Chemigenius-2-Bio-Imaging-System detektiert.

1.4.2.10 Statistische Analyse

Die Daten in den Diagrammen zur Messung von LDH-Freisetzung, Proliferation, DNA-Fragmentierung und Annexin-V/PI-Doppelfärbung wurden als Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines Ansatzes dargestellt. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerindikatoren angegeben. Datenauswertung und Statistikberechnungen erfolgten mit Microsoft Excel. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen (FACS) erfolgte mit der Cellquest Pro Software. In den Histogrammen der modifizierten Zellzyklusanalyse wurde die AUC bestimmt, welche den Anteil der hypodiploiden sub-G1- Population widerspiegelt. Bei den Dotplots des JC- 1 Testes und der Annexin-V/PI- Doppelfärbung wurden die Verteilungen der Zellen in den Quadranten ermittelt und für die Berechnungen verwendet.

Die Signifikanz von Unterschieden bei der vergleichenden Gegenüberstellung von Daten wurde mittels des zweiseitigen Student's t-Test berechnet. $P < 0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant und $p < 0,001$ als extrem signifikant bewertet; $p > 0,05$ wurde als nicht signifikant (n.s.) gewertet. Entsprechend erfolgte die Kennzeichnung der Ergebnisse mit einem einzelnen Asterisk, wenn der p-Wert geringer war als 0,05, mit zwei Asterisken bei einem p-Wert kleiner als 0,01 und mit drei Asterisken bei einem p-Wert kleiner als 0,001.

1.5 Ergebnisse

1.5.1 Der Eisen-Komplex *HUNI 068* (Publikation 1)

1.5.1.1 *HUNI 068* inhibiert die Proliferation und führt zu einer Fragmentierung der DNS in Tumorzellen

Wir inkubierten BJAB- und Nalm-6-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von *HUNI 068* und ließen als Kontrolle einige Zellen unbehandelt. Nach 24 h zählten wir die Zellen, um zunächst den Effekt der Substanz auf die Zellproliferation zu ermitteln (Abb. 1a). Es konnte in beiden Zelllinien eine Hemmung der Proliferation beobachtet werden, wobei *HUNI 068* in höheren Konzentrationen auf die BJAB Zellen stärker antiproliferativ wirkte als auf die Nalm-6 Zellen. Die IGC50 (24 h) lag in beiden Zelllinien zwischen 30 und 40 μM .

Nach Behandlung über drei Tage überprüften wir durch Untersuchung der DNS-Fragmentierung, ob es zu einer Induktion von Apoptose gekommen war (Abb. 1b). Die Konzentration, mit der in 50 % der BJAB-Zellen nach 72 h eine DNS-Fragmentierung erreicht werden konnte, lag bei 40 μM . Die Leukämiezellen zeigten sich wiederum etwas weniger sensitiv gegenüber *HUNI 068* als die Lymphomzellen.

1.5.1.2 *HUNI 068* induziert Apoptose in Tumorzellen; die nekrotische Wirkung ist gering

Durch Messung der LDH-Freisetzung aus mit dem Eisen-Komplex behandelten Zellen, bestimmten wir den direkten zytotoxischen Effekt von *HUNI 068* auf BJAB-Zellen nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde. Bei Konzentrationen von bis zu 80 μM verminderte sich die Zellviabilität dabei um weniger als 10 % (Abb. 2a).

Mittels der Annexin-V-FITC/PI-Bindungsmessung bestimmten wir das Verhältnis von Apoptose zu unspezifischem Zelltod nach einer Inkubationsperiode von 48 h und untersuchten die Selektivität von *HUNI 068* gegen maligne Zellen im Vergleich zu primären Leukozyten. Dafür testeten wir die Wirkung sowohl auf der Zelllinie BJAB, als auch auf primären Leukozyten einer gesunden Person. Wir inkubierten die Zellen mit dem Eisen-Komplex in Konzentrationen von 20, 30 und 60 μM und bestimmten nach 2 Tagen den prozentualen Anteil der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen. Hierbei zeigte sich, dass 60 μM *HUNI 068* die Anzahl vitaler BJAB Zellen um ca. 60 % reduzierte, während die gleiche Konzentration die Anzahl vitaler Leukozyten um 20 % verminderte (Abb. 2b). Die weitere Analyse bestätigte, dass der beobachtete Zelltod vor allem auf apoptotischen Vorgängen basiert. Im Falle der primären, normalen Leukozyten, zeigten sich mit 60 μM *HUNI 068* ca. 5 % aller Zellen nekrotisch, 15 %

konnten als apoptotisch klassifiziert werden. Für die BJAB-Zellen fiel die Differenz zwischen Apoptose und Nekrose noch deutlicher aus (Abb. 2c): Die als apoptotisch klassifizierbaren Zellen erhöhten sich proportional zu der Verminderung der vitalen Zellen, während unspezifischer Zelltod nur minimal vorhanden war. Bei 60 μM lagen vergleichbar viele nekrotische Zellen vor, wie in der unbehandelten Kontrolle. Wir unterzogen die Ergebnisse einer Regressionsanalyse und bestimmten die LC50 (48 h) und die AC50 (48 h). Beide Werte lagen bei einer Konzentration von ca. 50 μM .

1.5.1.3 *HUNI 068* überwindet Zytostatika-Resistenz *in vitro*

Wir testeten den Eisen-Komplex auf speziell gezüchteten Zelllinien mit Resistenzen gegenüber bestimmten Zytostatika. Für die Vincristin-resistente Zelllinie Nalm-6/Vcr stellte sich bei Versuchen mit unterschiedlichen Zytostatika heraus, dass diese zusätzlich zu Vincristin auch gegenüber Fludarabin und Paclitaxel resistent ist. Hier konnte mittels FACS-Scan-Analyse eine Überexpression von p-Glykoprotein gezeigt werden. In den Vincristin-resistenten BJAB/Vcr-Zellen konnten wir mittels Westernblot-Analyse eine Überexpression von Bcl-2 nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Wir untersuchten, ob *HUNI 068* in den resistenten Zelllinien Apoptose auslöst, indem wir nach 72 h Inkubation die Anzahl der Zellen mit fragmentierter DNS bestimmten. Nichtresistente Nalm-6- und BJAB- Zellen dienten als Kontrolle. Dabei stellten sich die multiresistenten Nalm-6/Vcr-Zellen als sensibler gegenüber *HUNI 068* heraus, als die nichtresistenten Kontrollzellen (Abb. 3a). In den Daunorubicin-resistenten Nalm-6/Dauno-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Apoptose-Induktion gegenüber den nichtresistenten Nalm-6-Zellen (Abb. 3b). In den Vincristin-resistenten BJAB/Vcr-Zellen wurde mit 50 μM *HUNI 068* eine Apoptoserate von 63 % erreicht, während die gleiche Konzentration in 79 % der nichtresistenten BJAB-Zellen Apoptose auslöste (Abb. 3c). Dieser Unterschied wurde bei einer Konzentration von 30 μM , bei der in beiden Zelllinien eine Apoptoserate von 20 % gemessen wurde, nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung des Mechanismus der Resistenzüberwindung, bestimmten wir die Expression von 84 apoptoserelevanten Genen in mit dem Eisen-Komplex behandelten BJAB-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 15 h mit 30 μM *HUNI 068* zeigten die Zellen eine 50-fach erhöhte Expression des Apoptose fördernden Harakiri-Gens.

1.5.1.4 *HUNI 068* ist wirksam gegen Leukämiezellen *ex vivo*

Um zu untersuchen, ob *HUNI 068* auch unter *ex vivo*-Bedingungen wirksam ist, verwendeten wir primäre Lymphoblasten von drei verschiedenen Patienten mit Leukämie im Kindesalter. Von diesen war ein Patient an einer AML erkrankt, einer an einer primären ALL und einer an einem ALL-Rezidiv. Wir inkubierten die Zellen mit dem Eisen-Komplex und, für einen Wirksamkeitsvergleich, mit unterschiedlichen etablierten Zytostatika. Alle Wirkstoffe wurden in den jeweiligen LC50 (48 h) eingesetzt, die zuvor mit Hilfe des Annexin-V-FITC/PI-Bindungs-Assays auf BJAB-Zellen nach 48 h Inkubationszeit bestimmt worden waren. *HUNI 068* wurde in einer Konzentration von 50 μ M appliziert, was ebenfalls der LC50 (48 h) in BJAB-Zellen entspricht. Nach einer Inkubationszeit von 60 h wurde das Ausmaß der DNS-Fragmentierung bestimmt. Es zeigte sich, dass die *ex vivo*-Zellen, insbesondere die ALL-Rezidiv-Zellen, im Vergleich zu entsprechenden Zelllinien, eine erhöhte Toleranz gegenüber allen eingesetzten Wirkstoffen aufwiesen. Die geringste Resistenz bestand gegenüber dem Eisen-Komplex, welcher signifikant höhere Apoptoseraten erzielte, als die getesteten konventionellen Zytostatika (Abb. 4a-c).

1.5.1.5 *HUNI 068* induziert Apoptose über den intrinsischen/ mitochondrialen Signalübertragungsweg

Als nächstes untersuchten wir den Signalübertragungsweg, über den *HUNI 068* Apoptose induziert. Wir verwendeten die Zelllinien BJAB mock/FADD-dn, um zu überprüfen, ob es zur Aktivierung von CD95 kommt. Die mock- und die FADD-dn-Linien wurden mit dem Eisen-Komplex inkubiert und nach 72 h bestimmten wir den prozentualen Anteil der Zellen mit fragmentierter DNS. Dabei zeigte sich, dass die Wirksamkeit von *HUNI 068* durch die Expression von FADD-dn nicht beeinflusst wird (Abb. 5a).

Um die Beteiligung des intrinsischen/ mitochondrialen Übertragungsweges zu untersuchen, bestimmten wir die Aktivierung der Mitochondrien in BJAB-Zellen nach 48 h Inkubation mit *HUNI 068*. Die Anzahl der Zellen mit einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential erhöhte sich dabei mit steigender Konzentration des Wirkstoffes (Abb. 5b). Mittels Westernblot-Analyse konnten wir zudem in BJAB-Zellen nach 36 h Inkubation mit *HUNI 068*, prozessierte Caspase-9, welche spezifisch während mitochondrialer Apoptose gespalten wird, nachweisen (Abb. 5c).

1.5.2 Titanocen- und nickelhaltige Verbindungen: Zusammenfassung der Ergebnisse (Publikationen 2 und 3)

Als weitere Metall-organische Verbindungen untersuchten wir den Titanocen-Komplex Bis-[(p-methoxybenzyl)cyclopentadienyl] titanium(IV) dichlorid (*Titanocen-Y*) sowie verschiedene nickelhaltige methoxy-substituierte Nickel(II)(Salophen)-Derivate, mit Konzentration auf $[Ni^{II}(3-OMe-Salophen)]$, als dem am stärksten aktiven Komplex (Publikation 2, Fig.1). Die verwendeten Methoden entsprachen den geschilderten Untersuchungen zu dem Eisen-Komplex *HUNI 068*. Wir konnten zeigen, dass sowohl $[Ni^{II}(3-OMe-Salophen)]$, als auch *Titanocen-Y* zytostatisch wirken und Apoptose in der Leukämiezelllinie Nalm-6 und der Lymphomzelllinie BJAB auslösen. In BJAB-Zellen liegt die IC_{50} (24 h) von $[Ni^{II}(3-OMe-Salophen)]$ bei unter 5 μM (Publikation 2, Fig.3), die IC_{50} (24 h) von *Titanocen-Y* bei 30 μM (Publikation 3, Fig.1). Die AC_{50} (72 h) von $[Ni^{II}(3-OMe-Salophen)]$ liegt bei ca. 10 μM (Publikation 2, Fig.4), die von *Titanocen-Y* bei ca. 50 μM (Pubikation 3, Fig.2). Eine kombinierte Gabe von *Titanocen-Y* mit Vincristin führt zu einem synergistischen Effekt bei der Apoptoseinduktion von > 200 % (Publikation 3, Fig.7). Die Nickel- und Titanocen-Komplexe lösen Apoptose in speziell gezüchteten Vincristin-resistenten BJAB- und Nalm-6-Zellen aus, wodurch Unabhängigkeit der Wirksamkeit von p-Glykoprotein und Bcl-2 nahegelegt wird (Publikation 2, Fig.6, Publikation 3, Fig.6). Für *Titanocen-Y* konnten wir in Versuchen mit Bcl-2-überexprimierenden Melanomzellen (Mel-HO) die Unabhängigkeit von Bcl-2 bestätigen (Publikation 3, Fig.5). Die Wirkung beider Verbindungen wurde außerdem durch die Expression des proapoptotischen SMAC-Proteins in Jurkat-Zellen nicht beeinflusst (Publikation 2, Fig.7, Publikation 3, Fig.4). In BJAB FADD-dn-Zellen ist im Falle der Nickel- und Titanocen-Komplexe die Induktion von Apoptose ininhibiert (Publikation 2, Fig. 8, Publikation 3, Fig. 3). Dies spricht dafür, dass hier die extrinsische Signalkaskade zumindest teilweise an der Apoptoseinduktion beteiligt ist. Für *Titanocen-Y* konnte mittels Echtzeit-PCR eine signifikante Hochregulation des Fas-Liganden in den behandelten Tumorzellen beobachtet werden (Publikation 3, Kapitel 3.4).

1.6 Diskussion

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffen handelt es sich um Metall-organische Verbindungen, die entweder Eisen (*HUNI 068*), Titan (*Titanocen-Y*) oder Nickel ($[Ni^{II}(3-OMe-Salophen)]$) enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass sie Apoptose in Krebszellen auslösen und dabei auch in Zellen wirken, die Resistenzen gegen verschiedene Zytostatika aufweisen. *HUNI 068* gehört zu einer Klasse von Molekülen, die das sog. Ferrocen als zentrale Aktivitätseinheit aufweisen. Es hemmt die Proliferation von Leukämie- und Lymphomzelllinien mit einer IC_{50}

(24 h) von 30-40 μM und führt zu apoptotischer DNS-Fragmentierung und Phosphatidylserin-Translokation, ohne eine signifikante direkte Schädigung der Membranintegrität zu bewirken. Sowohl die LC50 (48 h) als auch die AC50 (48 h) liegen gegenüber der Lymphomzelllinie BJAB bei ungefähr 50 μM . *Titanocen-Y* wirkt in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie der Eisen-Komplex *HUNI 068*, das nickelhaltige [Ni^{II} (3-*OMe-Salophen*)] zeigt bereits bei 5-10 μM eine halbmaximale inhibitorische und apoptotische Wirkung.

Verglichen mit bereits im nanomolaren Bereich stark wirkenden Chemotherapeutika wie Vincristin sind diese Konzentrationen relativ hoch. Die Dosen der heutzutage eingesetzten zytostatischen Medikamente variieren allerdings stark von nanomolaren bis mikromolaren Konzentrationsbereichen. Es ist daher bei neuen Wirkstoffen nicht nur eine niedrige AC50, sondern vor allem eine hohe Selektivität in Kombination mit einer niedrigen Toxizität erwünscht. Um eine erste Einschätzung unerwünschter zytotoxischer Aktivität gegenüber normalen Zellen zu erhalten, testeten wir *HUNI 068* auf primären Leukozyten einer gesunden Person. Die hier ermittelte Zytotoxizität war im Vergleich zu den Effekten auf der Lymphomzelllinie BJAB gering. Es muss hierbei allerdings bedacht werden, dass sich die Sensibilität von Zellen gegenüber einer zytostatischen Behandlung unter natürlichen Bedingungen von der Sensibilität *ex vivo* kultivierter Zellen unterscheidet. So ist die Proliferation von *ex vivo* Zellen vermindert, während Tumorzelllinien *in vitro* hohe Vermehrungsraten aufweisen und damit sensibler auf die zytostatische Therapie reagieren. Daher sind Schlussfolgerungen zur Verträglichkeit von Wirkstoffen unter natürlichen Bedingungen, die aus *ex vivo* Experimenten gezogen werden könnten, nur sehr limitiert möglich.

Neue Wirkstoffe sollten, bei der großen Zahl von etablierten Zytostatika auf dem Markt, vor allem zur Überwindung multipler Zytostatika-Resistenz einsetzbar sein. So würden vor allem Patienten mit Rezidiven einer bösartigen Erkrankung von Resistenz überwindenden Wirkstoffen profitieren können. Beispielsweise erkranken etwa 20 % der Patienten mit einer ALL im Kindesalter an einem Rezidiv, was häufig mit reduzierten therapeutischen Möglichkeiten einhergeht und zu einer geringen Überlebensrate führt.^{3,6,36} Für diese Patientengruppe werden neue Therapieansätze benötigt, wobei Wirkstoffe, die in der Lage sind, auf Apoptose-Signalwegen Zytostatika-Resistenz-Mechanismen zu umgehen, eine wichtige Rolle spielen könnten. Im Hinblick auf die Überwindung von Zytostatika-Resistenz besitzen die untersuchten Metall-Komplexe interessante Eigenschaften, die für die Therapie hilfreich sein könnten. So konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion in Vincristin-resistenten Leukämie- und Lymphomzellen nicht vermindert ist. *HUNI 068* testeten wir zusätzlich auch auf Daunorubicin-

resistenten Leukämiezellen, die ebenfalls sensibel reagierten. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen ihre Zytostatika-Resistenz durch p-Glykoprotein- bzw. Bcl-2-Überexpression entwickelten, zwei typische Mechanismen für die Ausbildung von Resistenzen. Die Expression dieser Proteine bei der ALL im Kindesalter korreliert mit einer verminderten Ansprechrate gegenüber der Chemotherapie.^{26,37,38} Durch Genexpressionsanalyse fanden wir eine 50-fache Hochregulation des proapoptotischen Harakiri-Gens in mit dem Eisen-Komplex behandelten Lymphomzellen. Da Harakiri mit Bcl-2 interagiert, ist dies eine mögliche Erklärung für eine Bcl-2-unabhängige Apoptoseinduktion, indem die durch *HUNI 068* verursachte Überexpression von Harakiri den Apoptose unterdrückenden Effekt von Bcl-2 neutralisiert.⁹ Der Mechanismus in den p-Glykoprotein überexprimierenden Leukämiezellen bleibt bislang ungeklärt und bedarf weiterer Experimente.

Wir konnten außerdem zeigen, dass *HUNI 068* gegen direkt aus Patientenmaterial gewonnene primäre Leukämiezellen wirksam ist. Die Wirksamkeit der verschiedenen im Vergleich getesteten Substanzen und Zytostatika variierte interindividuell stark. So zeigte sich die stärkste Zytostatika-Resistenz bei den Zellen des Patienten mit dem ALL-Rezidiv, welche nur minimal auf die Behandlung mit den konventionellen Chemotherapeutika reagierten. Dies entspricht der schlechten Ansprechrate von ALL-Rezidiven auf die Therapie *in vivo*. Obwohl hier auch die Wirksamkeit von *HUNI 068* vermindert war, erzeugte es höhere Apoptoseraten als alle anderen getesteten Wirkstoffe. Dies deutet darauf hin, dass der Eisen-Komplex hilfreich bei der Therapie des Rezidivs der ALL im Kindesalter sein könnte, wenn konventionelle Medikamente keine Remission mehr erzielen. Da der Wirkstoff bei den *in vitro* Versuchen in der Lymphomzelllinie BJAB eine höhere Apoptoseaktivität aufwies als in der Leukämiezelllinie Nalm-6, liegt es nahe, dass bislang noch ausstehende Versuche mit primären Zellen von Lymphompatienten möglicherweise noch bessere Ergebnisse aufzeigen könnten, als mit den primären Leukämiezellen.

Die Ergebnisse der *in vitro*- und *ex vivo*- Experimente gaben uns Anlass für eine tiefere Untersuchung der Apoptose induzierenden Mechanismen. Es stellte sich heraus, dass *HUNI 068*, im Gegensatz zu den untersuchten Titan- und Nickel-Verbindungen, unabhängig von Todesrezeptoren wie CD95 wirkt. Stattdessen erfolgt eine intrinsische Aktivierung der Mitochondrien, was durch die messbare Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und den Nachweis von gespaltener Caspase-9 nahegelegt wird. Mitochondriale Apoptose ist der wichtigste intrinsische Apoptose-Signalweg, über den viele verschiedene Medikamente wirken, u.a. Taxol und Epirubicin.^{24,39} Die Aktivierung des mitochondrialen Signalübertragungsweges steht im Einklang mit dem Befund, dass *HUNI 068* eine Hochregulation des Harakiri-Gens

bewirkt. Dieser Mechanismus ermöglicht es *HUNI 068* unabhängig von Bcl-2, einem Schlüsselregulator des mitochondrialen Übertragungsweges, Apoptose zu induzieren.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die untersuchten Metall-organischen Verbindungen einige klinisch vielversprechende Eigenschaften besitzen, wie Induktion von Apoptose in Tumorzellen und Überwindung von verschiedenen Resistenzmechanismen. Unsere Ergebnisse sollen einen Anreiz für die weitere Synthese und Erforschung von strukturverwandten Wirkstoffen geben. Im Mittelpunkt weiterführender Untersuchungen befindet sich u.a. die Suche nach den entsprechenden zellulären Zielproteinen, wobei fluoreszenzmikroskopische und affinitätschromatografische Methoden in Betracht kommen.

1.7 Literaturverzeichnis

1. Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents*, 2003;22(3):188-199.
2. Elliott A, Adams J, Al-Hajj M. The ABCs of cancer stem cell drug resistance. *IDrugs*, 2010;13(9):632-635
3. Uderzo C, Conter V, Dini G, Locatelli F, Miniero R, Tamaro P. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica*, 2001;86:1-7.
4. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*, 2007;115:138-45.
5. Kaatsch P, Spix C. Registry - Annual Report 2008 (Jahresbericht 2008 des Deutschen Kinderkrebsregisters). Technischer Bericht, Universität Mainz 2008
6. Henze G. 20 Jahre Studien zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL-REZ BFM). *WIR Informationsschrift der Aktion für krebskranke Kinder e.V. (Bonn)*, 2004;3:13.
7. Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Current status of methods to assess cancer drug resistance. *Int J Med Sci*, 2011;8(3):245-253.
8. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*, 2000;11:265-283.0
9. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J*, 1997;16:1686-1694.

10. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997;88:355-365.
11. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 2000;256:42-49.
12. Schatzschneider U, Metzler-Nolte N. New principles in medicinal organometallic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006;45:1504-1507.
13. Wilkinson G. The iron sandwich. A recollection of the first four months. *J Organometal Chem*, 1975;100:273-278.
14. Viotte M, Gautheron B, Kubicki MM, Nifant'ev IE, Fricker SP. Synthesis, Structure of Nitrogen-Containing Phosphinogold(I) Ferrocenes. In vitro Activity against Bladder and Colon Carcinoma Cell Lines. *Met Based Drugs*, 1995;2:311-326.
15. Nguyen A, Vessières A, Hillard E, Top S, Pigeon P, Jaouen G. Ferrocifens and Ferrocifenols as New Potential Weapons against Breast Cancer. *Chimia*, 2007;61:716-724.
16. James P, Neudorfl J, Eissmann M, Jesse P, Prokop A, Schmalz HG. Enantioselective synthesis of ferrocenyl nucleoside analogues with apoptosis-inducing activity. *Org Lett*, 2006;8:2763-2766.
17. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol*, 2002;3:415-24.
18. Galmarini CM, Jordheim L, Dumontet C. Role of IMP-selective 5'-nucleotidase (cN-II) in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*, 2003;44:1105-11.
19. Hunold A, Neundorf I, James P, Neudörfl J, Schmalz HG. Stereoselective Synthesis of New Ferrocene-Derived Amino Acid Building Blocks. *Eur J Org Chem*, 2009;4429-4440.
20. Kater B, Hunold A, Schmalz HG, Kater L, Bonitzki B, Jesse P, Prokop A. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011;137(4):639-649.
21. Lee SY, Hille A, Frias C, Kater B, Bonitzki B, Wöfl S, Scheffler H, Prokop A, Gust R. [NiII(3-OMe-salophene)]: a potent agent with antitumor activity. *J Med Chem*, 2010;53(16):6064-6070
22. Kater L, Claffey J, Hogan M, Jesse P, Kater B, Strauss S, Tacke M, Prokop A. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. *Toxicol In Vitro*, 2011;26(1):119-124.
23. Hille A, Ott I, Kitanovic A, Kitanovic I, Alborzinia H, Lederer E, Wöfl S, Metzler-Nolte N, Schäfer S, Sheldrick WS, Bischof C, Schatzschneider U, Gust R. [N,N0-Bis-

- (salicylidene)-1,2-phenylenediamine]metal complexes with cell death promoting properties. *J Biol Inorg Chem*, 2009;14: 711–725.
24. Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dörken B, Daniel PT. 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;97:1378-1387.
 25. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 1995; 9:1783-1786.
 26. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, Seeger K, Wuchter C, Ludwig WD, Henze G, Dörken B, Daniel PT. 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;14:1606-1613.
 27. Tillner J, Winckler T, Dingermann T. A simple cytotoxicity assay using the eukaryotic microorganism *Dictyostelium discoideum*. *Pharmazie*, 1994;49:759-761.
 28. Essmann F, Wieder T, Otto A, Muller EC, Dörken B, Daniel PT. GDP dissociation inhibitor D4-GDI (Rho-GDI 2), but not the homologous rho-GDI 1, is cleaved by caspase-3 during drug induced apoptosis. *Biochem J*, 2000;346 Pt 3:777-783.
 29. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991;139:271-279.
 30. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, 2002;31:214–223.
 31. Wieder T, Orfanos CE, Geilen CC. Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem*, 1998;273:11025-11031.
 32. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001;276:1071-1077.
 33. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995;184:39-51.
 34. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol*, 1995;260:406-417.

35. Wieder T, Geilen CC, Wieprecht M, Becker A, Orfanos CE. Identification of a putative membrane-interacting domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from rat liver. *FEBS Lett*, 1994;345:207-210.
36. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, Willoughby ML, Tubergen DG, Steinherz PG, Trigg ME. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse—the Children’s Cancer Group Experience. *Cancer*, 1998;82:1387-1395.
37. Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK, Panicker KR, Pillai MR. Mutant p53 protein, Bcl-2/Bax ratios and apoptosis in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000;126:62-67
38. Brozek J, Bryl E, Ploszynska A, Balcerska A, Witkowski JM. P-glycoprotein activity predicts outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009;31:493-499.
39. von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene*, 2003;22:2236-2247

1.8 Abbildungen

Abb. 1

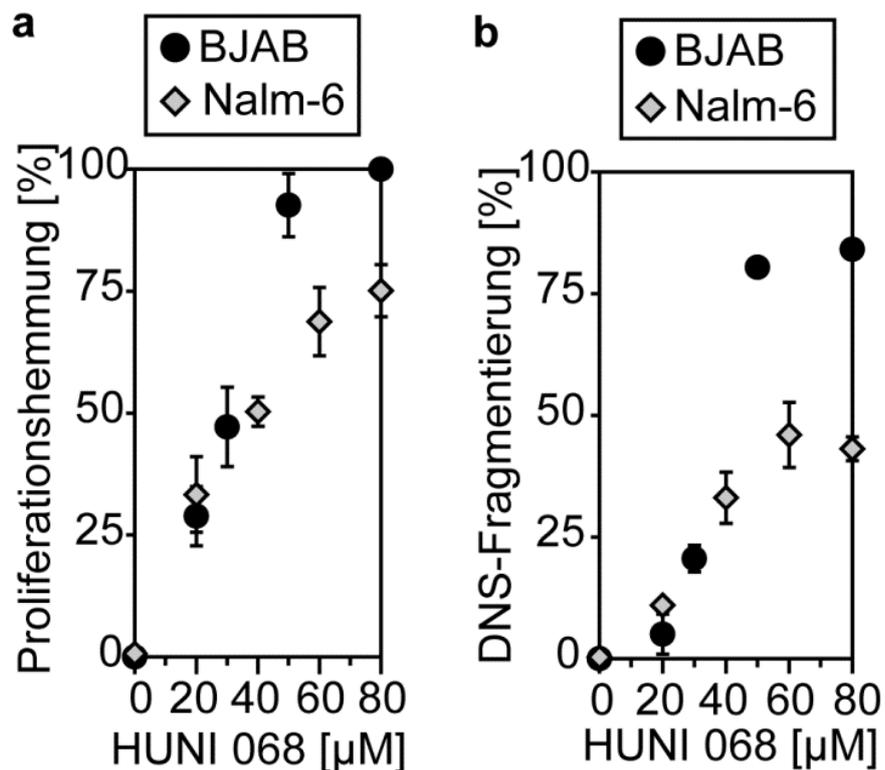


Abb. 1 a-b Proliferationshemmung und Induktion apoptotischer DNS-Fragmentierung. BJAB- und Nalm-6-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *HUNI 068* inkubiert oder als Kontrollen unbehandelt belassen. **a** Nach 24 h wurde die Zellkonzentration mit einem CASY@CellCounter + Analyzer System bestimmt. Die Proliferationshemmung ist in % gegenüber der unbehandelten Kontrolle \pm SD ($n = 3$) angegeben. **b** Nach 72 h wurde die DNS-Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten sind in % \pm SD ($n = 3$) gegeben.

Abb. 2

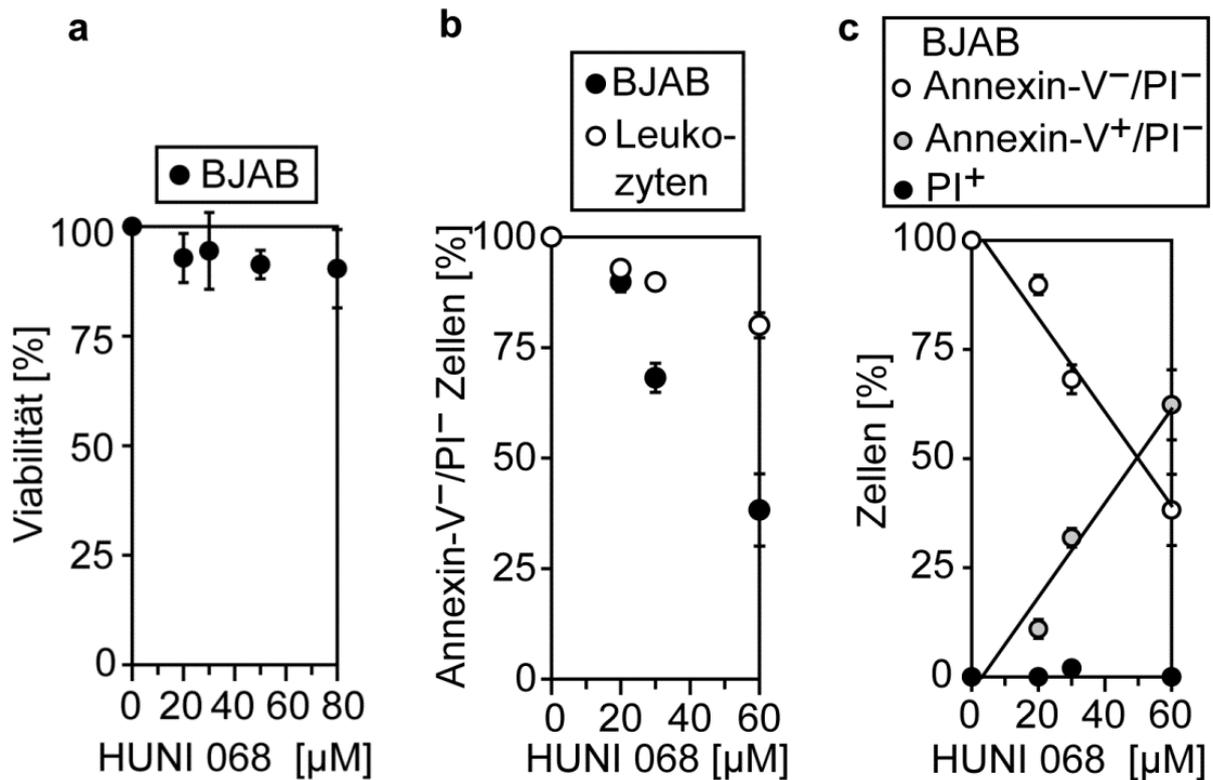


Abb. 2 a-c Abgrenzung Apoptose von Nekrose. **a** Eine direkte Schädigung der Membranintegrität von BJAB-Zellen wurde durch Aktivitätsmessung der LDH im Medium nach 1 Stunde Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von *HUNI 068* bestimmt. Einige Zellen wurden als Kontrollen unbehandelt belassen. Die Daten sind als Viabilität [%] dargestellt und als % der Kontrolle \pm SD ($n = 3$) gegeben. **b** BJAB-Zellen und primäre Leukozyten einer gesunden Versuchsperson wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *HUNI 068* inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach 48 h wurde die Anzahl vitaler Zellen (Annexin-V/PI) bestimmt. **c** Der gemessene Zelltod in den BJAB-Zellen wurde in apoptotischen (Annexin-V⁺/PI⁻) und unspezifischen Zelltod (PI⁺) unterteilt und mit der Anzahl vitaler Zellen verglichen. Die Werte sind in % \pm SD ($n = 3$) gegeben.

Abb. 3

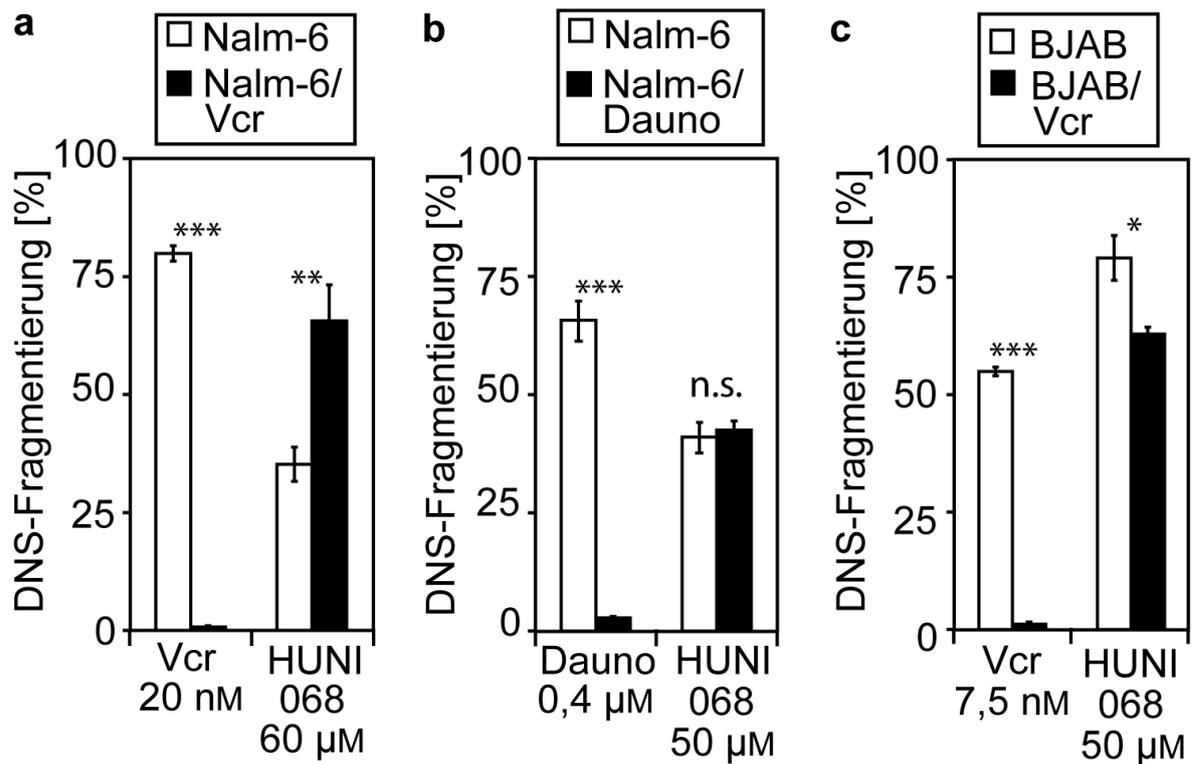


Abb. 3 a-c Resistenzüberwindung. Zytostatika-resistente Zelllinien (**a**: Nalm-6/Vcr, **b**: Nalm-6/Dauno und **c**: BJAB/Vcr) und die entsprechenden nichtresistenten Zellen (Nalm-6 und BJAB) wurden mit *HUNI 068* behandelt oder mit den Wirkstoffen, gegen welche die Zellen Resistenzen aufwiesen. Vincristin wurde in hohen Konzentrationen von 20 bzw. 7,5 nM, Daunorubicin in einer Konzentration von 0,4 µM eingesetzt. Einige Zellen jeder Zelllinie wurden als Kontrollen unbehandelt belassen. Die DNS-Fragmentierung wurde nach 72 h mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Werte sind in % ± SD ($n = 3$) gegeben. Die Asterixe kennzeichnen die Signifikanz der Unterschiede der induzierten DNS-Fragmentierung zwischen resistenter und nichtresistenter Zelllinie.

Abb. 4

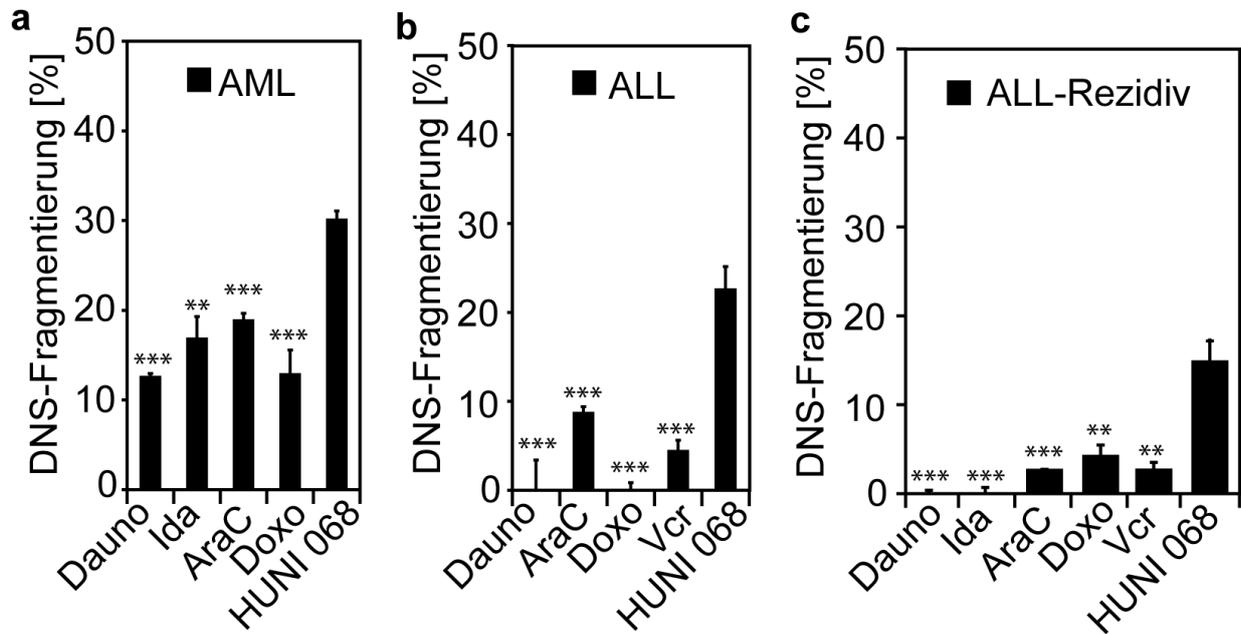


Abb. 4 a-c Wirkung *ex vivo*. Primäre Tumorzellen von Patienten mit Leukämie im Kindesalter (**a**: primäre AML, **b**: primäre ALL und **c**: ALL-Rezidiv) wurden mit *HUNI 068* (50 μ M) oder mit verschiedenen etablierten Zytostatika behandelt. Alle Wirkstoffe wurden in den jeweiligen LC50 (48 h) eingesetzt, welche zuvor durch den Annexin-V/PI-Doppelfärbungsassay in BJAB-Zellen ermittelt worden waren: Daunorubicin (Dauno) 8,9 μ M, Doxorubicin (Doxo) 8,6 μ M, Vincristin (Vcr) 0,54 nM, Cytarabin (AraC) 41 μ M, Idarubicin (Ida) 1,8 μ M. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Nach 60 h Inkubation wurde die DNS-Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Werte sind in % \pm SD ($n = 3$) gegeben. Die Asterixe kennzeichnen die Signifikanz der Unterschiede der induzierten DNS-Fragmentierung im Vergleich zu *HUNI 068*.

Abb. 5

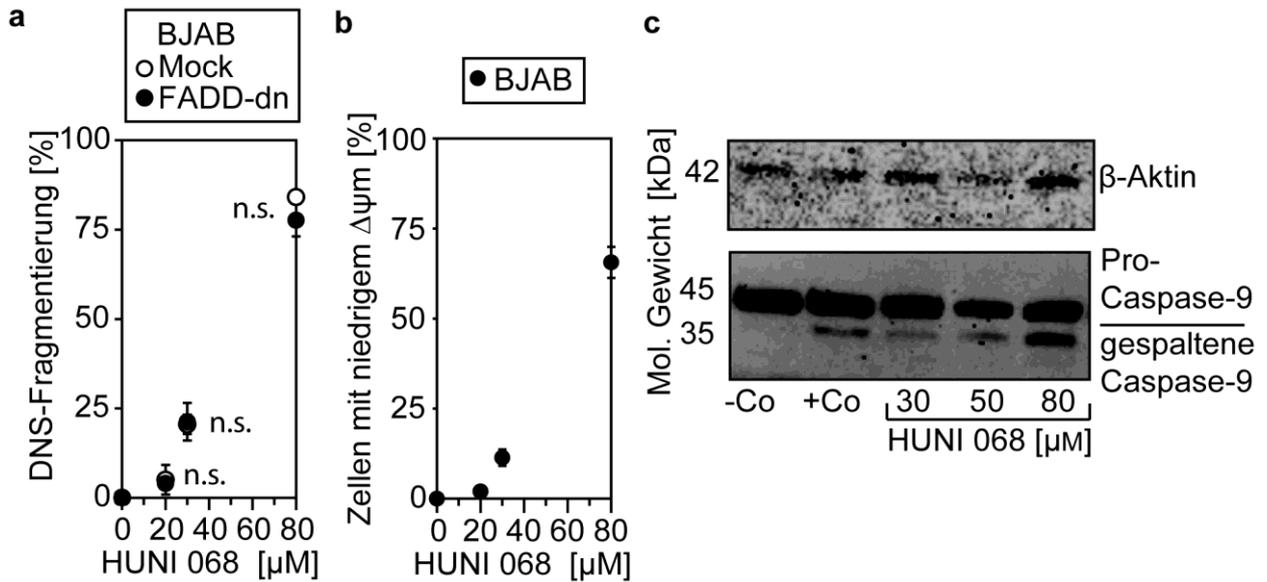


Abb. 5 a-c Untersuchung der Apoptose-Signalkaskade. **a** BJAB/FADD-dn- und BJAB/mock-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *HUNI 068* inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach 72 h wurde die DNS-Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Werte sind in % \pm SD ($n = 3$) gegeben. Die Unterschiede der DNS-Fragmentierung zwischen Mock- und FADD-dn-Zelllinie stellten sich nach Berechnung der P-Werte als nicht signifikant heraus und wurden entsprechend gekennzeichnet (n.s.) **b** BJAB-Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von *HUNI 068* inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Dann wurden die Zellen durch Färbung mit JC-1 und durchflusszytometrischer Analyse auf eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials hin untersucht. Die Werte sind gegeben in % der Zellen mit niedrigem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) \pm SD ($n = 3$). **c** Die Westernblot-Analyse mit Anti-Caspase-9-Antikörpern nach 36 h Behandlung von BJAB-Zellen mit *HUNI 068* (30, 50 und 80 μ M) zeigt gespaltene Caspase-9 (35 kDa). Diese ist ebenfalls sichtbar in der parallel getesteten Positivkontrolle (Co+) mit Epirubicin (5 μ M) aber nicht in der unbehandelten Negativkontrolle (-Co). Die Banden für die unprozessierte Caspase-9 (45 kDa) stellen sich auch in der Negativkontrolle dar. Das Molekulargewicht wird auf der linken Bildseite gezeigt. Es wurden gleiche Mengen an Protein verwendet, was durch die Detektion von β -Aktin verifiziert wurde.

2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Benjamin Kater, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Apoptose auslösenden und Resistenz überwindenden Eigenschaften neuartiger organometallischer Verbindungen am Beispiel eines Ferrocen-Aminosäurederivats“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

3 Anteilserklärung

Benjamin Kater hatte folgenden Anteil an den verwendeten Publikationen:

Publikation 1: **B. Kater**, A. Hunold, H. G. Schmalz, L. Kater, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop.

Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. J Cancer Res Clin Oncol 2011;137(4):639-649.

Anteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Planung und Durchführung der Experimente (außer Genexpressionsanalyse, an der Patrick Jesse den größten Anteil hatte), Herstellung und Kultivierung resistenter Zelllinien, Verfassen und Einreichen des Manuskripts.

Publikation 2: S. Y. Lee, A. Hille, C. Frias, **B. Kater**, B. Bonitzki, S. Wöfl, H. Scheffler, A.

Prokop, R. Gust. [NiII(3-OMe-salophene)]: a potent agent with antitumor activity. J Med Chem 2010;53(16):6064-6070.

Anteil: 10 %

Beitrag im Einzelnen: Anteil an *in-vitro*-Versuchen, Herstellung und Kultivierung resistenter Zelllinien

Publikation 3: L. Kater, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, **B. Kater**, S. Strauss, M. Tacke, A.

Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. Toxicol In Vitro 2011;26(1):119-124.

Anteil: 10 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Anteil an *in-vitro*-Versuchen, Herstellung und Kultivierung resistenter Zelllinien, Mitarbeit am Manuskript

Prof. Dr, med. Günter Henze
Berlin, den

Benjamin Kater
Berlin, den

4 Ausgewählte Publikationen

Publikation 1:

B. Kater, A. Hunold, H. G. Schmalz, L. Kater, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. J Cancer Res Clin Oncol 2011;137(4):639-649. - Impact factor: 2,26

Publikation 2:

S. Y. Lee, A. Hille, C. Frias, **B. Kater**, B. Bonitzki, S. Wölfl, H. Scheffler, A. Prokop, R. Gust. [NiII(3-OMe-salophene)]: a potent agent with antitumor activity. J Med Chem 2010;53(16):6064-6070. - Impact factor: 4,8

Publikation 3:

L. Kater, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, **B. Kater**, S. Strauss, M. Tacke, A. Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. Toxicol In Vitro 2011;26(1):119-124. - Impact factor: 2,06

Publikation 1:

B. Kater, A. Hunold, H. G. Schmalz, L. Kater, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. J Cancer Res Clin Oncol 2011;137(4):639-649.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00432-010-0924-6>

Publikation 2:

S. Y. Lee, A. Hille, C. Frias, **B. Kater**, B. Bonitzki, S. Wöfl, H. Scheffler, A. Prokop, R. Gust. [NiII(3-OMe-salophene)]: a potent agent with antitumor activity. J Med Chem 2010;53(16):6064-6070.

<http://dx.doi.org/10.1021/jm100459k>

Publikation 3:

L. Kater, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, **B. Kater**, S. Strauss, M. Tacke, A. Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. Toxicol In Vitro 2011;26(1):119-124.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.010>

5 Lebenslauf

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

6 Komplette Publikationsliste

Publikationen:

2010 S. Y. Lee, A. Hille, C. Frias, **B. Kater**, B. Bonitzki, S. Wölfl, H. Scheffler, A. Prokop, R. Gust. [NiII(3-OMe-salophene)]: a potent agent with antitumor activity. *J Med Chem* 2010;53(16):6064-6070. DOI: 10.1021/jm100459k

2011 **B. Kater**, A. Hunold, H. G. Schmalz, L. Kater, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(4):639-649. DOI: 10.1007/s00432-010-0924-6

N. Kausch-Busies, **B. Kater**, A. Prokop, H.-G. Schmalz. Synthesis and First Biological Evaluation of an Iron-Containing HETE Analogue. *Eur J Org Chem* 2011: 2011(6):1133–1139. DOI: 10.1002/ejoc.201001445

L. Kater, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, **B. Kater**, S. Strauss, M. Tacke, A. Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. *Toxicol In Vitro* 2011;26(1):119-124. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.09.010

Posterpräsentationen:

2008 A. Prokop, M. Eissmann, **B. Kater**, G. Henze, J. Eberle, C.C. Geilen, J. Franke, P. James, J. Neudörfl, H.G. Schmalz. New pan-anti-tumor Ferrocenyl nucleoside analogues overcome multiple drug resistance in malignant cells *in vitro* and *ex vivo*. 1. ICDDD, Dubai, World Trade Center, 4.-7.2.

A. Prokop, M. Eissmann, **B. Kater**, G. Henze, J. Eberle, C.C. Geilen, P. James, H.G. Schmalz. Ferrocenyl nucleoside analogues, a new class of pan-anti-tumor agents, overcome multiple drug resistance in malignant cells *in vitro* and *ex vivo*. Symposium on Medicinal Organometallic Chemistry (DFG), St. Martin, Germany, 2.5. – 5.5.

- 2009 **B. Kater**, A. Hunold, H.G. Schmalz, L. Kater, L. Onambele, B- Bonitzki, G. Henze, J. Eberle, A. Prokop. A novel Ferrocenyl analogue induces apoptosis in cancer cells and overcomes mechanisms of drug resistance. *DFG-Konferenz FOR 630*, Kaiserslautern
- 2010 L. Onambele, N. Hoffmann, H.G. Schmalz, L. Kater, **B. Kater**, J. Eberle, A. Prokop. Effects of a novel apoptosis-inducing cobalt organo-complex on lymphoma, leukemia and melanoma cells in vitro. *DFG-Konferenz FOR 630*, Goslar
- S.Y. Lee, A. Hille, C. Frias, L. Kater, **B. Kater**, R. Gust, A. Prokop. [FeIII salophene(Cl)], a novel iron salophene complex with high antitumor activity, induces apoptosis via the intrinsic pathway and overcomes drug resistance in malignant lymphoma and leukemia cells. *DFG-Konferenz FOR 630*, Goslar

7 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Dr. Aram Prokop bedanken, der durch sein Fachwissen und Enthusiasmus mein Interesse an der Thematik geweckt und mich in die Methodik eingeführt hat. Wenn Schwierigkeiten bestanden, konnte ich mich stets auf seine Hilfe verlassen. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Henze, der diese Arbeit hilfsbereit betreut hat, und besonders meinen vielen lieben Teamkollegen, mit denen die Zeit im Labor sehr angenehm war und beim Pipettieren stets gute Laune herrschte. Also danke Lisa, Soo, Liliane, Corazon, Susanne, Birgit, Mara, Patrick, Moritz, Ulli, Anja und Laura! Vor allem auch für das geduldige Einarbeiten in die vielen Methoden, noch mal speziell Dankeschön an Susanne, Corazon und Moritz. Ihr wart mir eine sehr große Hilfe! Und meiner Schwester Lisa noch ein ganz spezielles Dankeschön für ihre Hilfe beim Korrekturlesen und nicht zuletzt, weil sie mich überhaupt erst motiviert hat, während des Studiums eine Doktorarbeit zu beginnen. Mit meiner Schwester an der Seite war alles nur halb so schwer.