

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Präklinische Evaluation
neuartiger organometallischer Verbindungen
bezüglich ihrer Apoptoseinduktion
in vitro und *ex vivo***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Soo-Young Lee

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Henze
 2. Prof. Dr. med. S. Corbacioglu
 3. Prof. Dr. Dr. Chr. Hagemeyer

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Salophenkomplexe als potentielle Antitumor-Agenzien.....	7
1.2 Seltene Erden in der Tumorthherapie.....	8
1.3 Apoptoseinduktion als Wirkmechanismus zytostatischer Substanzen.....	9
2 Zielstellung.....	10
3 Methodik.....	10
3.1 Verwendete Geräte.....	11
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
3.3 Chemikalien und Reagenzien.....	11
3.4 Kommerzielle Kits und Antikörper.....	12
3.5 Verwendete Wirkstoffe.....	13
3.6 Verwendete Zelllinien und primäre Zellen.....	13
3.7 Messung der LDH-Freisetzung.....	14
3.8 Proliferationsmessung.....	14
3.9 Annexin-V/Propidiumiodid-Doppelfärbung.....	15
3.10 Apoptosemessung mittels modifizierter Zellzyklusanalyse.....	15
3.11 Mitochondriale Membranpotentialanalyse mittels JC-1.....	15
3.12 Western Blot-Verfahren und Immundetektion.....	16
3.13 Genexpressionsanalysen via Real-Time PCR.....	16
3.14 Datenauswertung.....	16
4 Ergebnisse.....	17
4.1 Ausschluss eines unspezifischen Zelltodes und Inhibition der Zellproliferation.....	17
4.2 Apoptoseinduktion.....	17
4.3 Aktivierung des intrinsischen bzw. extrinsischen Apoptoseweges.....	18
4.4 Genexpressionsanalysen hinsichtlich Apoptose relevanter Gene.....	19
4.5 Resistenzüberwindung gegenüber Vinca-Alkaloiden und Anthracyclinen.....	19
4.6 Apoptoseinduktion in primären Patientenzellen.....	19
4.7 Synergistische Effekte.....	20
5 Diskussion.....	20
6 Literaturverzeichnis.....	23
7 Anteilserklärung.....	27
8 Verwendete Publikationen.....	28
9 Lebenslauf.....	29
10 Komplette Publikationsliste.....	30
11 Selbständigkeitserklärung.....	31
12 Danksagung.....	32

Abstract

Die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter ist die akute lymphoblastische Leukämie (ALL). Trotz der hohen Heilungschancen der initial erkrankten Kinder durch Chemotherapie liegt die Rezidivrate bei etwa 20%. Ein wesentlicher Grund dafür ist die Resistenzbildung gegenüber herkömmlichen Zytostatika. Um den Therapieerfolg zu optimieren, ist die Entwicklung neuer zytostatisch wirksamer Substanzen von großem Interesse. Hierbei bietet die Weiterentwicklung bereits bekannter Wirkstoffe durch Kopplung mit zusätzlich funktionellen Gruppen ein interessantes Forschungsfeld. In der vorliegenden Arbeit wurden ein neu synthetisiertes Eisen- bzw. Nickelsalophen sowie ein Yttriumkomplex auf ihre biologische Aktivität *in vitro* und *ex vivo* untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der Wirkstoff- induzierten Apoptosekaskade lag.

Erste präklinische Daten zur *in vitro* Wirksamkeit des Eisensalophenkomplexes $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ konnten in unterschiedlichen Zelllinien erhoben werden, darunter BJAB, Nalm-6, Jurkat, MelHO und MCF-7. Eine Inkubation mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ ergab eine Proliferationsinhibition der Tumorzellen sowie die Induktion einer spezifischen Apoptose, welche über den mitochondrialen, intrinsischen Signalweg erfolgt. Eine Apoptoseinduktion konnte ebenso in primären Patientenzellen von Kindern mit neu diagnostizierter AML sowie dem Rezidiv einer ALL gefunden werden. Es zeigte sich zudem eine Resistenzüberwindung in Vincristin bzw. Daunorubicin resistenten Nalm-6 Zellen nach vorheriger Inkubation mit dem Eisensalophen. In der zweiten Publikation konnte gezeigt werden, wie sich die zytotoxische Potenz der Eisensalophenverbindung $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ im Austausch durch einen methoxy-substituierten Nickelsalophenkomplex $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ ändert. Dieser weist ebenso antiproliferative Eigenschaften auf und initiiert eine Apoptoseinduktion, die FADD- abhängig und smac- unabhängig über den Todesrezeptor vermittelten, extrinsischen Signalweg verläuft. Eine Behandlung von Vincristin resistenten BJAB bzw. Nalm-6 Zellen mit dem Nickelsalophen resultierte in einer Resistenzüberwindung gegenüber Vincristin. In der dritten publizierten Arbeit wurde erstmalig die Wirksamkeit eines Yttriumkomplexes $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ *in vitro* evaluiert. Die Apoptose erfolgt FADD- abhängig über den extrinsischen Signalweg mit konsekutiver Prozessierung der Caspase-8 und ist selbst bei Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins nicht blockierbar. Dieses deutet auf ein großes Potential des Yttriumkomplexes für die Therapie von refraktären Malignomen hin, deren Resistenz auf Bcl-2 Überexpression zurückzuführen ist. Eine Kombination mit Vincristin ergab bemerkenswerte synergistische Effekte. Somit stellt der Yttriumkomplex einen beachtenswerten Kandidaten für Polychemotherapie dar.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APAF-1	Apoptotic protease activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Area Under Curve
Bad	Bcl-2- antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2 gene
Bcl-x _L	B-cell lymphoma- extra large
Bid	BH3 interacting domain death antagonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Caspase	Cysteinaspartase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme- Linked- Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescent- Activated Cell Sorting
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	Apoptosis stimulating fragment
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaniniodid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MDR	Multidrug resistance
μ	Mikro
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PI	Propidiumiodid
RNAse	Ribonukleinase
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Smac	Second mitochondria- derived activator of caspases
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TNF	Tumor Necrosis Factor

TRADD

$\Delta\Psi_m$

Tumor necrosis factor receptor type 1-
associated DEATH domain protein
Mitochondriales Transmembranpotential

1 Einleitung

Die zytostatische Chemotherapie gehört zu den Standardverfahren bei der Behandlung maligner Erkrankungen im Kindesalter. Das Auftreten von Chemotherapieresistenz stellt jedoch ein relevantes klinisches Problem mit meist letalem Ausgang dar.¹ Bisherige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Resistenzen dem Goldie- Coldman Prinzip zugrunde liegend und begünstigt durch genetische Instabilität von Tumorzellen bereits zu Behandlungsbeginn im Tumor vorhanden sind. Aufgrund des mutagenen Charakters vieler zytostatisch wirksamer Agentien können aber auch Therapie induzierte Faktoren zu Chemoresistenz führen.² Eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen sind an der zellulären Resistenzbildung beteiligt, unter anderem Transportfunktionen (gesteigerter Export von Zytostatika aus der Zelle) und Veränderungen in Signalkaskaden, die Apoptoseprozesse induzieren.³ Bei *in vitro* selektionierten resistenten Zellen findet sich häufig eine erhöhte Expression von Transportproteinen, wie das P-Glykoprotein, das als Hauptkomponente eines ATP-abhängigen Efflux-Systems der Zelle für die Ausschleusung von Zytostatika verantwortlich ist.^{4,5} Die Überexpression dieses Transporters konnte in unterschiedlichen Typen von humanen Malignomen beobachtet werden und korreliert mit einem geringen Ansprechen auf Chemotherapie.⁶ Die Überexpression dieses „ATP-binding cassette (ABC) drug efflux“ Transporters führt zu einer als „multidrug resistance“ (MDR) bezeichneten Ausbildung von Kreuzresistenzen gegenüber strukturell und funktionell unterschiedlichen Zytostatika, u.a. Anthracyclinen und Vinca Alkaloiden.^{7,8} Die Entwicklung neuartiger, Resistenz überwindender Wirkstoffe für die Behandlung onkologischer Erkrankungen ist dringend notwendig und bildet einen großen medizinisch- pharmazeutischen Forschungsschwerpunkt. Da bislang kaum präklinische Daten zu den in dieser Arbeit vorgestellten organometallischen Verbindungen vorliegen, lag es nahe, die Wirksamkeit der Substanzen genauer zu evaluieren sowie den zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu identifizieren.

1.1 Salophenkomplexe als potentielle Antitumor-Agenzien

Für die Therapie maligner Erkrankungen bilden Metallkomplexe ein wichtiges experimentelles Forschungsfeld. Derzeit erfolgreich in der Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten eingesetzte Zytostatika sind Platinverbindungen, die ein hohes zytotoxisches Potential in der Tumorthherapie aufzeigen.⁹ Trotz der erheblich verbesserten Therapieerfolge bei Tumorerkrankungen ist die Anzahl effizienter Wirkstoffe aufgrund von zahlreichen

Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen gegenüber diesen Verbindungen limitiert.¹⁰ Übergangsmetallkomplexe bieten einen interessanten Ansatzpunkt. Sie gewinnen in zunehmendem Maße an Bedeutung, da sie aufgrund ihrer Redoxpotentiale und Koordinationsgeometrien fähig sind, biologische Aktivität gezielt zu steuern. Auch die Ligandenstruktur bestimmt mitunter biologische Eigenschaften, unter anderem den Transport von Stoffen. Eisen repräsentiert beispielsweise das Metallzentrum des Sauerstoff transportierenden Hämoglobins.

Salophene (N,N'-Bis(salicyliden)-1,2-phenylendiamin) bilden mit Übergangsmetallen wie Eisen und Nickel stabile Komplexe und gelten aus klinischer Sicht als potentielle Kandidaten für die Entwicklung und den Einsatz metallhaltiger Zytostatika.¹¹⁻¹⁷ Es konnte gezeigt werden, dass freie Liganden wie Methoxy- substituierte Salophene u.a. als tumorwachstumshemmende Wirkstoffe eingesetzt werden.^{18,19} Methoxy-substituierte Eisen(salophen)-Komplexe beispielsweise zeigten beeindruckende Effekte zur Proliferationsinhibition cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen.^{16,17} Es wird postuliert, dass die antiproliferativen Effekte des $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ Komplexes nicht interkalativ, sondern über elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA hervorgerufen werden.¹⁵ Weitere Untersuchungen ergaben, dass das zytotoxische Potenzial von Nickel(diarylsalen)-Komplexen (Salen = N,N'-Bis(salicyliden)-1,2-phenylendiamin) hingegen auf interkalative Bindungen mit der DNA beruht, was letztendlich zu massiven Zellschädigungen führt.^{20,21} Interessanterweise sprechen weitere Untersuchungen dafür, dass Eisen im Vergleich zu anderen Übergangsmetallen wie Kupfer, Mangan, Kobalt und Zink sowie Salophen als Ligand maßgeblich für die antiproliferativen und zytotoxischen Eigenschaften in unterschiedlichen Tumorzelllinien sind und darüber hinaus Eisensalophene die Wirkung von Cisplatin, einem gut etablierten Antitumoragenz, übertreffen.²²

Bislang gibt es keine Daten zur Resistenzüberwindung und *in vitro*- Wirksamkeit der Eisensalophenverbindung $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ in Lymphom- und Leukämie modellen. Dies wird in der ersten Publikation vorgestellt. Die chemische Synthese und erste biologische Evaluation des Nickelsalophenkomplexes $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ wurden in der zweiten veröffentlichten Arbeit untersucht.

1.2 Seltene Erden in der Tumorthherapie

Ein weiteres Forschungsfeld im Bereich der Übergangsmetalle bildet die Gruppe der seltenen Erden. Im Zusammenhang mit einer Krebstherapie liegen bereits Untersuchungen zur Wirksamkeit von Seltenerdmetallen bei onkologischen Erkrankungen vor. Zu den bislang

best untersuchten Seltenerdmetallen gehören Lanthanverbindungen, darunter die antineoplastisch wirksame Verbindung KP772. Diese zeigte hohe antikanzerogene Aktivität via Proliferationsinhibition, Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion in einer Vielzahl von Tumorzellmodellen, unter anderem Leukämie-, Brustkrebs- und Lungenkarzinomzelllinien. Darüber hinaus konnte *in vivo* eine antikanzerogene Wirkung in humanen Kolonkarzinom-Fremdtransplantaten nachgewiesen werden.²³ Untersuchungen an humanen Osteosarkom- und Nabelschnurzellen zeigten, dass Yttrium die zytotoxische Wirkung von Magnesium- und Calciumverbindungen deutlich erhöhte.²⁴ Obwohl Yttrium in der Strahlentherapie onkologischer Erkrankungen eingesetzt wird, liegen bislang kaum präklinische Daten zur chemotherapeutischen Wirksamkeit von Yttriumkomplexen vor. Daher wurde die Yttriumverbindung [YR(mtbmp)(thf)] (R = CH₂SiMe₃ ; mtbmp = 1,3-dithiapropandiylbis(6-tert-butyl-4-methylphenolato)) auf ihre antiproliferativen Eigenschaften untersucht. Sie gehört zur Familie der Seltenerdmetall-Alkylkomplexe, wobei der chelierende lipophile Ligand mtbmp als Schutzgruppe für das Metallzentrum dient und gleichzeitig eine hohe Reaktivität der Trimethylsilylmethylgruppe R gewährleistet.^{25,26} Die chemische Synthese und erste biologische Evaluation des Yttriumkomplexes [YR(mtbmp)(thf)] werden in der dritten Publikation vorgestellt.

1.3 Apoptoseinduktion als Wirkmechanismus zytostatischer Substanzen

Die meisten traditionellen Zytostatika zur Behandlung onkologischer Erkrankungen wirken über die Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Abhängig vom proapoptischen Reiz auf die Zelle werden unterschiedliche Signalwege aktiviert. Man unterscheidet dabei drei Apoptosesignalwege, die durch Todesrezeptoren, die Mitochondrien oder das endoplasmatische Reticulum vermittelt werden und mit der Aktivierung von Caspasen und der Spaltung zellulärer Substrate wie PARP enden.²⁷⁻²⁹

Der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg wird durch die Bindung eines spezifischen Liganden wie Fas (CD95), TRAIL oder TNF an die Todesdomäne seines Oberflächenrezeptors der Zielzellen induziert. Auf cytosolischer Seite erfolgt eine Rekrutierung von Adaptermolekülen wie FADD oder TRADD, welche mit der Initiatorcaspase-8 den sog. DISC-Komplex bilden.²⁹⁻³² Dieser rekrutiert Caspase-8 Monomere, die durch Dimerisierung aktiviert werden.³³ Aktive Caspase-8 spielt bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose eine zentrale Rolle, da sie Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 mittels proteolytischer Spaltung aktiviert. Diese spalten proteolytisch eine Vielzahl

regulatorischer und struktureller Proteine und leiten hierdurch die endgültige Exekution des apoptotischen Zelltods ein.³⁴ Dieser Schritt führt letztendlich zum Anhalten des Zellteilungszyklus, zur Inaktivierung von Reparaturmechanismen und Auflösung strukturell wichtiger, integraler Zellbestandteile wie Proteine des Zytoskeletts und der Kernmembran.³⁵ Der intrinsische, Mitochondrien regulierte Signalweg wird durch intrazelluläre Signale wie Zell- oder DNA- Schäden ausgelöst und führt zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials.³⁵⁻³⁷ Dadurch kommt es zur Freisetzung verschiedener Faktoren wie Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol, das an APAF-1 bindet, der daraufhin oligomerisiert und über Rekrutierung von Procaspase-9 zur Ausbildung des Apoptosoms führt.³⁸ Dieses prozessiert konsekutiv die Procaspase-3 in die aktive Caspase-3. Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie reguliert.³⁹⁻⁴⁰ Die Ursache der Therapieresistenz liegt hauptsächlich in der Hochregulation der anti-apoptotischen Proteinen Bcl-x_L, Bcl-2 oder Mcl-1 sowie einer reduzierten Expression der pro-apoptotischen Proteine Bak, Bax, Bim, Bid oder Bad.⁴¹⁻⁴⁵

2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden eine Eisen- bzw. Nickelsalophenverbindung sowie ein Yttriumkomplex auf ihre biologische Aktivität in einer Reihe unterschiedlicher humaner Krebszelllinien sowie in primären Zellen von Patienten mit ALL oder AML getestet. Der Fokus hierbei lag in der Untersuchung von Wachstumsinhibition, Resistenzüberwindung und Identifizierung des induzierten Zelltodes. Mittels geeigneter Experimente sollten relevante Prozesse aus unterschiedlichen Phasen der Apoptose nachgewiesen werden, um Aussagen über die Art des Apoptosesignalweges treffen zu können.

Bei der Untersuchung der Eisensalophenverbindung [Fe^{III}(salophene)Cl] sollten erste präklinische Daten zur *in vitro*- Wirksamkeit in Lymphom- und Leukämie modellen gewonnen werden sowie Experimente zur Resistenzüberwindung gegenüber herkömmlichen Zytostatika veranschaulicht werden. In der zweiten Publikation wurde erstmalig die Nickelsalophenverbindung [Ni^{II}(3-OMe-salophene)] auf ihr zytotoxisches Potential *in vitro* untersucht. In der dritten publizierten Arbeit wurde ein ebenso neu synthetisierter Yttriumkomplex verwendet und mit speziellem Hinblick auf die Apoptosekaskade untersucht.

3 Methodik

3.1 Verwendete Geräte

Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Multiskan Ascent	Thermo, Waltham, USA
CASY@CellCounter	Schärfe System, Reutlingen
Brutschrank Hera Cell 150	Thermo, Waltham, USA
Chemigenius-2-Bio-Imaging Systems	Syngene, Cambridge, UK
Cleanbench LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Power Pac HC	Bio-Rad, München
Inversmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

3.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen 25, 75, 150 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg
6-, 12-, 96-Loch-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
15ml, 50ml Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
CASY@cups	Schärfe System, Reutlingen
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Formaldehyd $\geq 37\%$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
RNase A	Qiagen, Hilden
Propidiumiodid	Serva, Heidelberg
Bicoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Bovine Serum Albumin	Sigma- Aldrich, München
DMSO	Serva, Heidelberg
ECL Western Blotting Detection	Amersham Biosciences, Freiburg

Super Signal West Pico ECL-Substrate	Pierce, Rockford, USA
Penicillin (1000 U/ml)/ Streptomycin (1000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
JC-1	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma- Aldrich, München
DNA-Molecular Weight Marker (Rainbow, full range)	Amersham Biosciences, Freiburg
DNA-Molecular Weight Marker (wide range)	Sigma- Aldrich, München
Ponceau-Rot	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Merck, Darmstadt
FKS	Gibco- Invitrogen, Karlsruhe
CASY@ton-Messlösung	Schärfe System, Reutlingen
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
APS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor- Cocktail	Roche Diagnostik, Mannheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Acrylamid (Rotiphorese Gel40)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt

3.4 Kommerzielle Kits und Antikörper

Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostik, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Illinois, USA
Phosphatidylserine Detection Kit	IQ Products, Groningen, Niederlande

Primäre Antikörper

Anti-Caspase-8	R & D, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-β-Actin	Sigma- Aldrich, München

Sekundäre Antikörper

Anti-Mouse IgG HRP

eBioscience, San Diego, USA

Anti-Rabbit IgG HRP

Promega, Minneapolis, USA

3.5 Verwendete Wirkstoffe

Für die Zellkulturversuche der veröffentlichten Arbeiten wurden die neusynthetisierten Salophenverbindungen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ und $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ sowie der Yttriumkomplex $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ verwendet. Für die exakten chemischen Syntheseschritte sei auf die entsprechende Publikation verwiesen.

3.6 Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

Für die Versuche wurden folgende Zelllinien verwendet: BJAB (humane Burkitt-ähnliche Lymphomzelllinie), Nalm-6 (humane leukämische B-Vorläufer-Zelllinie), Jurkat (humane T-Leukämiezelllinie). Bei den Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen, die in Einzelzellen oder in Zellverbänden wachsen. Die Zellen wurden in RPMI1640- Medium, supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin, bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Sie stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). Es sind die Zelllinien BJAB-mock und BJAB FADD-/- verwendet worden. BJAB FADD-/- Zellen sind mit pcDNA3-FADD-/- transfiziert. Sie exprimieren eine dominant-negative FADD-Mutante, der die N-terminale DED-Domäne fehlt.⁴⁶ Die BJAB-mock Zellen sind mit einem pcDNA3-Primer ohne FADDdn-Gen transfiziert. Die Expression des funktionalen FADD ist hier unverändert. Neben der Zelllinie Nalm-6 wurden Vincristin- und Daunorubicin- resistente Nalm-6 Zellen generiert, indem eine Behandlung mit einer initialen Konzentration von 0,1 nM Vincristin bzw. 0,5 nM Daunorubicin durchgeführt wurde und die Konzentrationen schrittweise bei Erreichen einer Vitalität von über 90 % bis 30 nM Vincristin bzw. 113,8 nM Daunorubicin erhöht wurde. Die Zelllinie Jurkat stammt aus peripherem Blut eines Patienten mit dem ersten Rückfall einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL). Jurkatzellen wurden mit einem leeren Plasmid (Jurkat neo) und mit einem smac-Gen enthaltenden Plasmid (Jurkat smac) transfiziert.

MelHO ist eine Zelllinie, die aus einem primären, humanen Melanom etabliert wurde. Die adhären Zellen wurden in DMEM- Medium, supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin, bei 37°C und 5 % CO₂- Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die MelHO- Zellen wurden stabil transfiziert mit dem Vektor pIres (MelHO/ pIres) und mit dem bcl-2 Gen in pIres (MelHO/ bcl-2). Die MelHO/Bcl-2 Zellen zeigen eine starke Überexpression des Bcl-2 gegenüber den MelHO/pIres Zellen. Dieses Zelllinienpaar wurde von PD Dr. rer. nat. Jürgen Eberle, Klinik für Dermatologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich zu den verwendeten Zelllinien wurden noch primäre Zellen von Patienten mit neudiagnostizierter ALL bzw. AML verwendet. Die Zellen wurden durch Knochenmarkaspiration gewonnen und die Lymphoblasten bzw. mononukleären Zellen über einen Ficollgradienten separiert.⁴⁷ Die Proben stammen von Patienten, die in der Abteilung Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/ Hämatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden.

3.7 Messung der LDH- Freisetzung

Ein nekrotischer Zelltod ist im Gegensatz zu einem apoptotischen Zelltod mit einer unmittelbaren LDH- Freisetzung assoziiert, da es durch die ungerichtete Membranschädigung zu einer raschen Ausschleusung der zytosolischen Laktatdehydrogenase in das Zellkulturmedium kommt. Die nach 3 h im Überstand detektierte LDH- Aktivität ist ein Maß für die toxische Schädigung der Zellen und kann in einem gekoppelten enzymatischen Test mittels ELISA bestimmt werden. Die Versuchsdurchführung wurde wie beschrieben befolgt.⁴⁸

3.8 Proliferationsmessung

Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen erfolgten mit dem CASY®CellCounter. Das Messprinzip beruht auf der Pulsflächenanalyse. Sie ermöglicht durch elektrische Pulse die Detektion sowohl der Partikelzahl/ Volumen- Verhältnisse als auch der charakteristischen Änderung der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran. Daraus können die Anzahl des Debris, der toten Zellen und der vitalen Zellen ermittelt werden.⁴⁹ Für alle Zelllinien wurde mit speziell angepassten Messparametern gearbeitet und der Versuch wie beschrieben durchgeführt.⁵⁰

3.9 Annexin-V/Propidiumiodid- Doppelfärbung

In der frühen Phase der Apoptose kommt es zur morphologischen Veränderung der Plasmamembran, und es erfolgt die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran auf die äußere Oberfläche. Annexin-V ist in der Lage calciumabhängig an Phospholipide zu binden.^{50,51} Wird das Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran präsentiert, bindet Annexin-V mit hoher Affinität. Durch die Konjugation des Annexin-V mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC ist es möglich, diese Zellen durchflusszytometrisch zu detektieren. Durch die Gegenfärbung mit Propidiumiodid können vitale, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden werden.⁵²⁻⁵⁴ Die Annexin-V/PI-Doppelfärbung wurde wie beschrieben durchgeführt.⁴⁸

3.10 Apoptosemessung mittels modifizierter Zellzyklusanalyse

In der Endphase der Apoptose kommt es zur DNA-Fragmentierung. Dies zeigt sich bei einer DNA-Färbung an einem verminderten DNA-Gehalt (Hypodiploidie) im Vergleich zu einer Zelle in der G0/ G1-Phase. Nach Anfärbung mit Propidiumiodid sind apoptotische Zellen im Fluoreszenzhistogramm auf der FL3-Achse des Durchflusszytometers unterhalb der diploiden DNA detektierbar.^{55,56} Anhand der Relation der AUC (area under curve) der hypoploiden DNA zu der AUC der gesamten detektierten DNA kann der relative Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation berechnet werden. Der Versuch wurde wie beschrieben befolgt.⁴⁷

3.11 Mitochondriale Membranpotentialanalyse mittels JC-1

Mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaniniodid (JC-1) ist eine Detektion der mitochondrialen Membranpotentialänderung möglich. Das JC-1 akkumuliert abhängig vom mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) in der Matrix der Mitochondrien.⁵⁷

Monomeres JC-1 zeigt eine grüne Fluoreszenz (525 nm). Bei hohem Membranpotential kommt es zu starker Akkumulation, die JC-1-Fluoreszenz verschiebt sich in den roten Wellenlängenbereich (590 nm). Kommt es zur Membrandepolarisierung, nimmt die rote Fluoreszenz ab und die grüne Fluoreszenz (525 nm) verstärkt sich. Zellen mit niedrigem mitochondrialem Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) wurden wie beschrieben durchflusszytometrisch durch Messung der Abnahme der roten Fluoreszenz in einem FACSCalibur quantifiziert.⁴⁷

3.12 Western Blot- Verfahren und Immundetektion

Die Zellen wurden mit einem Detergenz- und Proteaseinhibitor-haltigen Puffer für 1 h auf Eis lysiert und nichtlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernt. Mittels des BCA-Assays wurde die Proteinkonzentration bestimmt.⁵⁸ Anschließend wurden die aufgearbeiteten Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.⁶⁰ Mittels Semidry-Blotting Verfahren wurden die Peptide auf die Oberfläche einer Nitrozellulosemembran überführt.⁴⁷ Die mit den Proteinen besetzte Nitrozellulosemembran wurde mit einer Blocklösung versetzt, und es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Im letzten Schritt erfolgte nach mehreren Waschschritten die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, bevor nach erneutem Waschen und Zugabe einer Chemilumineszenzsubstanz die Lumineszenzsignale mit dem Chemigenius-2-Bio-Imaging-System detektiert wurden.⁴⁷

3.13 Genexpressionsanalysen via Real-Time PCR

Für die Analyse der Expression Apoptose relevanter Gene wurde ein Apoptose spezifischer "RT2 profiler PCR (polymerase chain reaction) Array" (SuperArray PAHS-012; SABiosciences Corporation, Frederick, MD, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.⁶¹ Die gesamte RNA wurde aus BJAB- Zellen, die mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ ($0,125\mu\text{M}$) für 15 h inkubiert wurden, extrahiert und mit DNase I ($2\text{ U}/\mu\text{l}$) behandelt, um genomische DNA Kontamination auszuschließen. Die gesamte RNA ($700\text{ ng}/\mu\text{l}$) wurde dann als Template für die Synthese der cDNA eingesetzt und einer quantitativen Real-Time PCR SuperArray Analyse unterzogen. Dazu wurde der LightCycler480 (Roche Diagnostics) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels SuperArray Analyser Software analysiert. Die Daten wurden in "-facher" Expression der entsprechenden Gene im Vergleich zu Kontrollzellen dargestellt.

3.14 Datenauswertung

In den Diagrammen der veröffentlichten Publikationen zur LDH-Freisetzung, Proliferationsmessung, Annexin-V/PI-Doppelfärbung, JC-1 Test und der modifizierten Zellzyklusanalyse mittels DNA- Fragmentierung wurden die Daten als Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben eines Ansatzes dargestellt. Die Fehlerindikatoren beschreiben die Standardabweichung. Für die Datenauswertung wurde Microsoft Excel 2004 eingesetzt. Alle

Versuche wurden mindestens zweimal wiederholt und ergaben ähnliche Resultate.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung (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 wurde die Verteilung der Zellen in den Quadranten ermittelt und für die Berechnungen verwendet.

Bei den Western Blot Daten wurden repräsentative Membranen gezeigt. Mindestens ein Wiederholungsversuch zeigte ähnliche Banden.

4 Ergebnisse

4.1 Ausschluss eines unspezifischen Zelltodes und Inhibition der Zellproliferation

Anhand der Messung der LDH-Freisetzung nach dreistündiger Inkubation von BJAB- Zellen mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ (Fig. 2A, Publikation 1), $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ (Fig. 2, Publikation 2) bzw. $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ (Fig. 1A, Publikation 3) konnte eine unspezifische toxische Wirkung der Substanzen und folglich ein nekrotischer Zelltod ausgeschlossen werden. Die Viabilität der Zellen lag nach 3 h in allen verwendeten Konzentrationen bei über 90 %.

Nach 24 h Inkubation der BJAB- Zellen zeigte sich in der Proliferationsmessung eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition (Fig. 2B, Publikation 1; Fig. 3, Publikation 2; Fig 1B, Publikation 3).

4.2 Apoptoseinduktion

Für die Verbindung $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ wurde mittels Annexin-V/PI-Doppelfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung gezeigt, dass die Apoptoseinduktion dosisabhängig erfolgt und darüber hinaus eine Differenzierung in früh- und spätapoptotische Zellen aufweist. Auch in diesem Versuch wurde keine signifikante Nekrose beobachtet (Fig. 3A, Publikation 1). Als zusätzlicher Nachweis einer spezifischen Apoptoseinduktion konnte nach 72 h Inkubation von BJAB- Zellen die DNA- Fragmentierung mittels modifizierter Zellzyklusanalyse bzw. durchflusszytometrischer Bestimmung der hypodiploiden DNA-Fragmente quantifiziert werden (Fig. 3B, Publikation 1; Fig. 4, Publikation 2; Fig. 2, Publikation 3).

4.3 Aktivierung des intrinsischen bzw. extrinsischen Apoptoseweges

Anhand einer durchflusszytometrischen Messung des mitochondrialen Membranpotentials konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von BJAB- Zellen mit der Eisensalophenverbindung $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ zu einer signifikanten Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials führt (Fig. 5, Publikation 1). Dies deutet auf die Involvierung des intrinsischen Apoptoseweges bei dem durch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ verursachten Zelltod hin.

Die Nickelsalophenverbindung $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ hingegen zeigte eine Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials von unter 10 %. Folglich ist davon auszugehen, dass der $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ induzierte Zelltod nicht über den mitochondrialen Signalweg verläuft. In zusätzlichen Untersuchungen konnte die Unabhängigkeit der Apoptoseinduktion von smac nachgewiesen werden, was eine weitere Beweis für die Involvierung des Todesrezeptor vermittelten, extrinsischen Apoptoseweges bei dem durch $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ verursachten Zelltod ist (Fig. 7, Publikation 2) . Für diesen Versuch wurden Jurkatzellen mit einem leeren Plasmid (Jurkat neo) bzw. mit einem smac-Gen enthaltenden Plasmid (Jurkat smac) transfiziert. Eine zusätzliche Bestätigung für die vorangegangenen Beobachtungen erfolgte durch den Nachweis einer Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von FADD. Dazu wurden BJAB-Zellen stabil mit einem pcDNA3-Plasmid ohne FADDdn-Gen (BJAB mock) bzw. mit der dominant-negativen FADD-Mutante (BJAB FADD) transfiziert. In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion durch $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ FADD- abhängig ist (Fig. 8, Publikation 2).

Eine Behandlung mit dem Yttriumkomplex $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ ergab eine geringe Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials von unter 4 % (Fig. 5, Publikation 3). Außerdem zeigte die Apoptoseinduktion eine deutliche Abhängigkeit von FADD (Fig. 3, Publikation 3). Um eine mögliche Bcl-2 Abhängigkeit zu untersuchen, wurden MelHO- Zellen stabil mit einem pRes Plasmid (MelHO/ pRes) bzw. mit der Bcl-2 cDNA in pRes (MelHO/ Bcl-2) transfiziert. Folglich zeichnen sich MelHO Bcl-2 Zellen im Vergleich zu MelHO/ pRes Zellen durch eine starke Überexpression des Bcl-2 Proteins aus. Die Untersuchungen ergaben, dass die Apoptoseinduktion von $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ durch hohe Bcl-2 Level nicht gemindert werden kann und somit Bcl-2 unabhängig erfolgt (Fig. 4, Publikation 3). Im Verlauf der durch $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ vermittelten Apoptose kommt es zu einer Prozessierung der Hauptinitiatorcaspase-8 in deren aktive Untereinheit bei 18 kDa, welche per Westernblot Analytik detektiert werden konnte und somit eine weitere Bestätigung für die Involvierung des extrinsischen Apoptoseweges ist (Fig. 6, Publikation 3).

4.4 Genexpressionsanalysen hinsichtlich Apoptose relevanter Gene

Mit Hilfe eines PCR Arrays wurde die Expression von Apoptose relevanten Genen untersucht, mitunter Mitglieder der Bcl-2 Familie, TNF Liganden und deren Rezeptoren, Caspase, IAP sowie Gene des ATM und p53 Signalweges.⁶¹ Die Expressionsanalyse nach einer 15-stündigen Inkubation von BJAB- Zellen mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ ergab, dass antiapoptotische Gene wie Bcl-2, CD40 (TNF-receptor 5) und CD40 Ligand herunterreguliert und das proapoptotische Gen Harakiri hochreguliert werden konnte.

4.5 Resistenzüberwindung gegenüber Vinca-Alkaloiden und Anthracyclinen

Apoptosemessungen an Vincristin-resistenten Nalm-6 Zellen zeigten, dass sowohl die Salophenverbindungen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ (Fig. 7B, Publikation 1) und $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ (Fig 6A, Publikation 2) als auch der Yttriumkomplex $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ (Fig. 7B, Publikation 3) die Resistenz gegenüber dem Vinca-Alkaloid Vincristin überwinden konnten. Zusätzlich konnte die Nickelsalophenverbindung eine Vincristinresistenz in BJAB-Zellen überwinden (Fig. 6B, Publikation 2)

Die Eisensalophenverbindung (Fig. 7A, Publikation 1) und der Yttriumkomplex (Fig. 7A, Publikation 3) zeigten ebenso eine Resistenzbrechung gegenüber dem Anthracyclin Daunorubicin.

4.6 Apoptoseinduktion in primären Patientenzellen

Um eine Apoptoseinduktion in primären Zellen zu untersuchen, wurden Zellen aus Patienten mit dem Rezidiv einer akuten myeloischen Leukämie (Fig. 6A, Publikation 1) und einer primären akuten lymphoblastischen Leukämie (Fig. 6B, Publikation 1) mit der Eisensalophenverbindung inkubiert. Zum Vergleich der Wirksamkeit wurden die Zellen mit unterschiedlichen, herkömmlichen Zytostatika (Daunorubicin, Idarubicin, Cytarabin und Vincristin) inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Eisensalophenverbindung in allen primären Zellen Apoptose induziert und darüber hinaus die mit der Verbindung erzielten Apoptosewerte höher waren im Vergleich zu den in der Behandlung dieser Erkrankung eingesetzten Zytostatika.

4.7 Synergistische Effekte

In Kombinationsversuchen der Yttriumverbindung mit unterschiedlichen in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen eingesetzten Wirkstoffe wie Doxorubicin, Cytarabin, Etoposid und Vincristin konnte ein synergistischer Effekt mit dem Vinca-Alkaloid Vincristin erreicht werden. Die Apoptoseinduktion in der Kombination des Yttriumkomplexes mit Vincristin war nach einer Inkubationszeit von 72 h in BJAB- Zellen um ein Mehrfaches höher als der additive Effekt der einzelnen Wirkstoffe (Fig. 8, Publikation 3).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden potentiell neue Wirkstoffe für medikamentöse Behandlungsoptionen onkologischer Erkrankungen dargestellt. Die chemische Weiterentwicklung bereits bekannter Wirkstoffe bildet ein interessantes Forschungsfeld und ermöglicht unter anderem Untersuchungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen ähnlicher Verbindungen für die gezielte Synthese potentieller Komplexe mit erhöhter zytotoxischer Effektivität.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit dem Eisensalophenkomplex $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ zu einer Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorzelllinien und primären Zellen von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen führt. Die Apoptose erfolgt über den mitochondrialen, intrinsischen Apoptoseweg. Dieser wird zumindest teilweise durch selektive Interaktion des hochregulierten Apoptoseaktivators Harakiri mit dem Todesrepressorprotein Bcl-2 aktiviert. Es wird angenommen, dass Harakiri die Aktivität des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins durch Bindung inhibiert, was wiederum mit dessen gemessener herunterregulierten Expression korreliert.⁶² Die Herunterregulierung des antiapoptotisch wirkenden TNF-Rezeptors CD40 und des CD40 Liganden, beides wichtige Regulatoren des Todesrezeptor-vermittelten Apoptoseweges, bestätigen die Annahme, dass die $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ induzierte Apoptose über den intrinsischen Signalweg verläuft.

Die Zytostatikaresistenz sowie die geringe Tumorspezifität sind nach wie vor ein Hauptproblem bei der Behandlung maligner Erkrankungen. Das membranständige P-Glykoprotein nimmt hinsichtlich der verschiedenen Resistenzmechanismen einen zentralen Stellenwert ein, da es für den Substratausstrom aus der Zelle verantwortlich ist. Viele Zytostatika, die Substrate für P-Glykoprotein darstellen, verfügen über aromatische und heteroaromatische Ringsysteme als gemeinsames Strukturmerkmal. Bemerkenswerter Weise

ließ sich bei $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophene})\text{Cl}]$ eine Resistenzüberwindung gegenüber Vincristin und Daunorubicin in humanen Nalm-6 Leukämiezellen zeigen. In Vorversuchen konnte in dieser Zelllinie eine Überexpression des P-Glykoproteins und eine zusätzliche Resistenz gegenüber Fludarabin und Taxol nachgewiesen werden. Somit stellt die Eisensalophenverbindung einen vielversprechenden Kandidaten für die Überwindung klassischer Multidrugresistenzen (MDR) dar.

Um eine Struktur-Wirkungsbeziehung darzulegen, wurde in der zweiten veröffentlichten Arbeit verdeutlicht, wie sich der Austausch des Zentralatoms Eisen durch Nickel sowie die Kopplung einer Methoxygruppe auf die antiproliferativen Eigenschaften der Salophenverbindung auswirken. Zellproliferation und Apoptoseinduktion waren im Vergleich zur Eisensalophenverbindung bei gleicher Konzentration deutlich vermindert. Dennoch zeigte $[\text{Ni}^{\text{II}}(3\text{-OMe-salophene})]$ bei höherer Dosis eine ausgeprägte *in vitro*-Wirksamkeit, die sich durch eine hohe Apoptoseinduktion und Resistenzüberwindung gegenüber Vincristin sowohl in Lymphom (BJAB)- als auch in Leukämiezellen (Nalm-6) auszeichnete. Wir konnten erstmalig zeigen, dass die Apoptose über den extrinsischen Apoptoseweg erfolgt, und zwar abhängig von dem extrinsischen Faktor bzw. Adaptermolekül FADD und unabhängig von dem mitochondrialen Protein Smac.

Der neu synthetisierte Yttriumkomplex $[\text{YR}(\text{mtbmp})(\text{thf})]$ weist sowohl antiproliferative als auch apoptotische Eigenschaften auf. Er verursacht eine Apoptoseinduktion, die FADD-abhängig und trotz Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins ungehemmt erfolgt und über die Initiatorcaspase-8 der extrinsischen Signalkaskade verläuft. Weitere Experimente zeigten, dass auch der Yttriumkomplex in der Lage ist, die P-Glykoprotein vermittelte Resistenz gegenüber Vincristin und Daunorubicin zu überwinden. Des Weiteren konnte ein synergistischer Effekt des Yttriumkomplexes in Kombination mit Vincristin gefunden werden. Moderne Polychemotherapie kann bei der Behandlung maligner Erkrankungen den Vorteil haben, die Dosis der Einzelkomponenten zu reduzieren und somit potentielle Nebenwirkungen zu minimieren. Somit stellt der Yttriumkomplex einen aussichtsreichen Kandidaten sowohl für die Behandlung refraktärer Tumore als auch für synergistische Wirkstoffkombinationen in der Polychemotherapie dar. Zudem repräsentiert Yttrium einen viel versprechenden Liganden für die Gewinnung neuer Medikamente.

Diese Ergebnisse bilden einen sehr interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen der in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen. In kommenden Projekten werden diese weitergehenden Experimenten unterzogen. Insbesondere wird es um die Identifizierung der Zielstrukturen dieser Wirkstoffe gehen, um deren chemische Struktur gerichtet optimieren zu

können. Dazu sollen die Komplexe biotinyliert mittels Affinitätschromatographie aufgetrennt und nach Aufreinigung mit Hilfe der MALDI-TOF-Spektroskopie identifiziert werden. Um den exakten Mechanismus des apoptotischen Effektes und die Art der Interaktion mit unterschiedlichen Zielstrukturen zu evaluieren, sind fluoreszenzmikroskopische Experimente in Planung, welche die Aufnahme und Akkumulation in spezifischen Zellkompartimenten und dem Zellkern veranschaulichen sollen. Langfristiges Ziel ist die Gewinnung von *in vivo* Daten anhand von Mausmodellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Colvin M, Chabner BA. Alkylating agents in cancer chemotherapy: principles and practice. Chabner, BA, Collins JM, eds. Philadelphia: Lippincott. 1990;276-314.
2. Griswold DP, Corbett TH, Schnabel FM. Clonogenicity and growth of experimental tumors in relation to developing resistance and therapeutic failure. *Cancer Treatm Rep.* 1981;2:51-54.
3. Skovgaard T, Nielsen D, Maare CLL, Wassermann K. Cellular resistance to cancer chemotherapy. *Int Rev Cytol.* 1994;156:77-157.
4. Gottesmann MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem.* 1988;263:12163-12166.
5. Zhou SF, Zhou ZW, Li CG, Chen X, Yu X, Xue CC, Herington A. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem.* 2008;15(20):1981-2039.
6. Kuo MT. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox signal.* 2009;11:99-133.
7. Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. Drug resistance in human melanoma. *Int J Cancer.* 2001;93:617-622.
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.
9. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumor-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;146:1-54.
10. Heffeter P, Jungwirth U, Jakupec M, Hartinger C, Galanski M, Elbling L, Micksche M, Keppler B, Berger W. Resistance against novel anticancer metal compounds: differences and similarities. *Drug Resist Updat.* 2008;11:1-16.
11. Antholine WE, Kalyanaraman D, Petering DH. ESR of copper and iron complexes with antitumor and cytotoxic properties. *Environ Health Perspect.* 1985;64:19-35.
12. Sigel A, Sigel H. Metal ions in biological systems, Vol. 11: Metal complexes as cancer agents. Marcel Dekker Inc. New York. 1980.
13. Metzler-Nolte N. *Nachr Chem.* 2006;54:967-970.
14. Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti- cancer agents. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2007;340:117-126.
15. Silvestri A, Barone G, Ruisi G, Lo Giudice MT, Tumminello S. The interaction of native DNA with iron(III)-N,N'-ethylene-bis(salicylideneiminato)-chloride. *J Inorg Biochem.* 2004;98:589-594.
16. Woldemariam G, Mandal S. Iron(III)-salen damages DNA and induces apoptosis in human cell via mitochondrial pathway. *J Inorg Biochem.* 2008;102:740-747.
17. Lange TS, Kim KK, Singh RK, Strongin RM, McCourt CK, Brard L. Iron(III)-salophene: an organometallic compound with selective cytotoxic and anti-proliferative properties in platinum-resistant ovarian cancer cells. *PloS One.* 2008;3(5):1-10.
18. Habibi M, Montazerzohori M, Mokhtari R, Harrington, Clegg W. 3,3'-Dimethoxy-2,2'-[o-phenylenebis(nitrilomethylidyne)]diphenol. *Acta Crystallogr.* 2007;E63,o4462.
19. Eltayeb NE, Teoh SG, Chantrapromma S, Fun HK, Ibrahim K. 4,4'-Dimethoxy-2,2'-(1,2-phenylenebis(nitrilomethylidyne))diphenol. *Acta Crystallogr.* 2007;E63,o3234-3235.
20. Tang N, Muller JG, Burrows CJ, Rokita SE. Nickel and cobalt reagents promote selective oxidation of Z-DNA. *Biochemistry.* 1999;38:16648-16654.

21. Muller JG, Kayser LA, Paikoff SJ, Duarte V, Tang N, Perez RJ, Rokita SE, Burrows CJ. Formation of DNA adducts using nickel(II) complexes of redox-active ligands: A comparison of salen and peptide complexes. *Coord Chem Rev.* 1999;185-186.
22. Hille A, Ott I, Kitanovic A, Kitanovic I, Alborzinia H, Lederer E, Wölf S, Metzler-Nolte N, Schäfer S, Sheldrick WS, Bischof C, Schatzschneider U, Gust R. [N,N'-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine]metal complexes with cell death promoting properties. *J Biol Inorg Chem.* 2009;145:711-25.
23. Heffeter P, Jakupec MA, Körner W, Wild S, von Keyserlingk NG, Elbling L, Zorbas H, Korynevskaya A, Knasmüller S, Sutterlüty H, Micksche M, Keppler BK, Berger W. Anticancer activity of the lanthanum compound [tris(1,10-phenanthroline)lanthanum(III)trithiocyanate (KP772;FFC24)]. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:426-40.
24. Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, Witte F, Willumeit R, Drücker H, Vogt C, Hort N. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomater.* 2010;6:1834-42.
25. Konkol M, Malgorzata K, Voth P, Spaniol T, Okuda J. Rare-earth metal alkyl and hydrido complexes containing thioether-functionalized bis(phenolato) ligand: efficient catalyst for olefin hydrosilylation. *Organometallics.* 2008;27:3774-3784.
26. Ma H, Spaniol T, Okuda J. Rare-earth metal complexes supported by 1,w-dithiaalkanediyl-bridged bis(phenolato) ligands: synthesis, structure and heteroselective ring-opening polymerization of rac-lactide. *Inorg Chem.* 2008;47:3328-3339.
27. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia.* 2000;14:2035-2044.
28. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem.* 2006; 281(11):7260-70.
29. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326(1):1-16.
30. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88:355-365.
31. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:255-260.
32. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2007;407: 789-795.
33. Daniel PT. Molekulare Grundlagen der Apoptose. *Grundlagen der Molekularen Medizin.* 2008;160-203.
34. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003;10:76-100.
35. Green D, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305:626-629.
36. Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. *Cell.* 2007;131(2):257-70.
37. Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochem Biophys Acta.* 2006;1757:1297-1300.
38. Chipuk JE, Green DR. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 2008;18:157-164.
39. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:63-67.
40. Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep* 2002;22:47-58.
41. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007;19:488-96.

42. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007;12:395-402.
43. Wobser M, Voigt H, Eggert AO, Houben R, Kauczok CS, Brocker EB, Becker JC. Bcl-2 expression in rituximab refractory cutaneous B-cell lymphoma. *British Journal of Cancer*. 2007;96:1540-1543.
44. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Review Cancer*. 2002;2:277-288.
45. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
46. Bantel H, Engels I, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:2083-2090.
47. 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.
48. Prokop A, Wrasidlo W, Lode H, Herold R, Lang F, Henze G, Dörken B, Wieder T, Daniel PT. Induction of apoptosis by enediyne antibiotic calicheamicin II proceeds through a caspase-mediated mitochondrial amplification loop in an entirely Bax-dependent manner. *Oncogene*. 2003; 22:9107-9120.
49. Voisard R, Dartsch PC, Seitzer U, Roth D, Kochs M, Hombach V. Cell culture as a prescreening system for drug prevention of restenosis? *Vasa Suppl*. 1991;33:140-141.
50. Dobroschke M, Geldmacher Y, Ott I, Harlos M, Kater L, Wagner L, Gust R, Sheldrick WS, Prokop A. Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III)polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction. *ChemMedChem*. 2008;4:177-187.
51. Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ*. 2001;8:551-563.
52. Fadok VA, Xue D, Henson P. If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. *Cell Death Differ*. 2001;8:582-587.
53. Boersma AV, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*. 1996;24:123-130.
54. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84:1415-1420.
55. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1:1458-1461.
56. Nicoletti I, Miglioratti 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.
57. 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.
58. Smith PK, Krohn RI, GTH. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.
59. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1977;252:1102-1106.

60. Dobroschke M, Geldmacher Y, Ott I, Harlos M, Kater L, Wagner L, Gust R, Sheldrick WS, Prokop A. Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction. *Chem Med Chem* 2009;4:177-187.
61. Naohiro I, Liyun D, Shu C, Gabriel N. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-XL. *EMBO Journal* 1997;7:1686-94.

7 Anteilserklärung

Soo-Young Lee hatte folgenden Anteil an den verwendeten Publikationen:

Publikation 1: Lee S, Hille A, Kitanovic I, Jesse P, Henze G, Wölf S, Gust R, Prokop A. [FeIII(salophene)Cl], a potent iron salophene complex overcomes multiple drug resistance in lymphoma and leukemia cells. Leuk Res 2011;35(3):387-93.

Publikation 2: Lee S, Hille A, Frias C, Kater B, Bonitzki B, Wölf S, Scheffler H, Prokop A, Gust R. [Ni^{II}(3-OMe-salophene)]: A potent agent with antitumor activity. J Med Chem. 2010 Aug; 53(16):6064-6070.

Publikation 3: Lee S, Peckermann I, Abinet E, Okuda J, Henze G, Prokop A. The rare-earth yttrium complex [YR(mtbmp)(thf)] triggers apoptosis via the extrinsic pathway and overcomes multiple drug resistance in leukemic cells. Med Oncol 2010, Epub ahead of print

90 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der Versuche, Literaturrecherche, Verfassung und Einreichung der Manuskripte.

Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
Berlin, 19.05.2011

Soo-Young Lee
Berlin, 23.06.2011

8 Verwendete Publikationen

Publikation 1:

Lee S, Hille A, Kitanovic I, Jesse P, Wölf S, Gust R, Henze G, Prokop A. [FeIII(salophene)Cl], a potent iron salophene complex overcomes multiple drug resistance in lymphoma and leukemia cells.

Leuk Res 2011 Mar, 35(3):387-93 – Impact Faktor: 2,358

Publikation 2:

Lee S, Hille A, Frias C, Kater B, Bonitzki B, Wölf S, Scheffler H, Prokop A, Gust R. [Ni^{II}(3-OMe-salophene)]: A potent agent with antitumor activity.

J Med Chem 2010 Aug, 53(16):6064-6070 – Impact Faktor: 4,898

Publikation 3:

Lee S, Peckermann I, Abinet E, Okuda J, Henze G, Prokop A.

The rare-earth yttrium complex [YR(mtbmp)(thf)] triggers apoptosis via the extrinsic pathway and overcomes multiple drug resistance in leukemic cells.

Med Oncol 2010, Epub ahead of print - Impact Faktor: 1,227

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

10 Komplette Publikationsliste

- August 2010 *[Ni^{II}(3-OMe-salophene)]*: A potent agent with antitumor activity;
Lee S, Hille A, Frias C, Kater B, Bonitzki B, Wölf S, Scheffler H, Prokop A, Gust R; J Med Chem. 2010 Aug; 53(16):6064-6070.
- Dezember 2010 *The rare-earth yttrium complex [YR(mtbmp)(thf)] triggers apoptosis via the extrinsic pathway and overcomes multiple drug resistance in leukemic cells*; **Lee S**, Peckermann I, Abinet E, Okuda J, Henze G, Prokop A; Med Oncol. 2010 Dec; Epub ahead of print
- März 2011 *[Fe^{III}(salophene)Cl]*, a potent iron salophene complex overcomes multiple drug resistance in lymphoma and leukemia cells;
Lee S, Hille A, Kitanovic I, Jesse P, Wölf S, Gust R, Henze G, Prokop A; Leuk Res 2011 Mar, 35(3):387-93

11 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Soo-Young Lee, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Apoptoseinduktion neuartiger organometallischer Verbindungen in humanen Tumorzellen *in vitro* und *ex vivo*“ 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, den 23.06.2011

Soo-Young Lee

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. h. c. Günter Henze für die Betreuung dieser Arbeit und seiner außerordentlichen Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Seine fortwährende herzliche Unterstützung haben mir Motivation und Mittel zur Fertigstellung meiner Arbeit gegeben.

Einen herzlichen Dank an meinen Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Dr. Aram Prokop für die Einführung in die Thematik und Methodik sowie fachliche Diskussionen, die mir mit zum Gelingen der Arbeit verholfen haben.

Prof. Dr. Dr. Bernhard K. Keppler, Prof. Dr. Ronald Gust sowie Prof. Dr. Jun Okuda danke ich für die materielle Unterstützung und Bereitstellung der für diese Arbeit verwendeten Wirkstoffe.

Und selbstverständlich danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Der größte Dank geht schließlich an meine Familie für ihren Rückhalt und ihr Vertrauen. Ich liebe euch von ganzem Herzen.

