6 Untersuchungen zur Apoptoseauslösung

6 Untersuchungen zur Apoptoseauslösung

6.1 Apoptose

Unter dem griechischen Begriff Apoptose (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung), der den Fall der Blätter im Herbst beschreibt, versteht man den so genannten "programmierten Zelltod", ein zelluläres Suizidprogramm, dass mit charakteristischen morphologischen, biochemischen und physiologischen Veränderungen einhergeht. Im Gegensatz dazu steht der physiologische Zelltod, die Nekrose, der durch unphysiologische Bedingungen, wie z.B. pH-Wert-Veränderungen, zu hohe Temperaturen oder Sauer- und Nährstoffmangel, hervorgerufen wird.^[109]

Die genetisch regulierten Abläufe der Apoptose unterscheiden sich deutlich von den Abläufen der Nekrose. Nekrose ist ein Zelltod als Folge einer Zellschädigung, der an der Zellmembran beginnt. Bei nekrotischen Zellen kommt es zu einer Lysis der Plasmamembran, bevor signifikante Veränderungen in der Zellkernmorphologie stattfinden. Die Zellen schwellen an und platzen, so dass schließlich der Inhalt der Zellen unkontrolliert freigesetzt wird. Die intrazellulären Bestandteile schädigen Zellen in der Umgebung und rufen damit Entzündungsreaktionen hervor.^[110]

Im Gegensatz zur Nekrose werden die Zellbestandteile während der Apoptose in einer aktiven Regulationskaskade kontrolliert abgebaut. Apoptotisch absterbende Zellen schrumpfen und ziehen sich zusammen, worauf Fragmente kleiner membranumhüllter apoptotischer Körperchen entstehen, die anschließend von anderen Zellen mittels Phagozytose aufgenommen werden. Dabei werden zu keinem Zeitpunkt die Bestandteile aus dem Zellinneren in das extrazelluläre Milieu freigesetzt, wo sie Nachbarzellen Schaden zufügen könnten.^[110]

Nekrose ist im Gegensatz zu den aktiven Regulationsmechanismen der Apoptose als passives, irreversibles Geschehen anzusehen. Für nekrotische Vorgänge ist die Lyse einer Population membrangeschädigter Zellen charakteristisch, während durch Apoptose nur einzelne Zellen absterben. Apoptotische Vorgänge stellen in einem Zellverband das Gegengewicht zur Mitose dar und dienen der Kontrolle der Größe und Funktion dieser Zellpopulation. Als aktiver Prozess wird die Apoptose von einer Signalkaskade gesteuert, die regulierbar ist und auch die Lebensfähigkeit einer Zelle erhalten kann.^[111-113]

Die Zytotoxizität einer Verbindung, die in Kapitel 4 untersucht wurde, kann einerseits auf apoptotischen Vorgängen beruhen, andererseits auf nekrotischen. Da die Apoptose einen durch Genaktivierung und Durchlaufen verschiedener Signalkaskaden kontrollierten Prozess darstellt und auf nekrotische Vorgänge Entzündungsreaktionen erfolgen, ist die Auslösung eines apoptotischen statt nekrotischen Absterbens der Zellen bei einer Zytostatikatherapie wünschenswert.

Allerdings unterscheiden sich Krebszellen häufig von "normalen" Zellen dadurch, dass ihnen wichtige Kontrollpunkte im Zellzyklus fehlen und sie sich dadurch ungehemmt vermehren. Mutationen bewirken eine erhöhte Proliferationsrate und führen zu einem geringeren Differenzierungsgrad der Zellen in neoplastischem Gewebe. Häufig sind mutierte Gene, die die Apoptoseregulation beeinflussen, eine Ursache für Neoplasien. Diese Mutationen führen zur Blockade der Apoptosesignalkaskade und bewirken, dass sich die Zellen den üblichen Todessignalen entziehen können. Bei 50 % der menschlichen Tumore ist z.B. das *p*53-Tumorsupressorgen mutiert. Bei einigen Krebsarten wurden hohe Konzentrationen des apoptosehemmenden Bcl-2-Proteins nachgewiesen. Die Auslösung apoptotischer Vorgänge in Tumorzellen stellt damit einen Schritt zur Wiederherstellung eines "normalen" Zellprogramms dar. Die üblichen die Zellteilung, die eigentliche Ursache, die Störung in den Apoptosemechanismen, bleibt bei den bisher etablierten Therapieschemata noch unberücksichtigt.^[4, 114-116]

Es gibt diverse zellbiologische Unterschiede zwischen apoptotischen und nekrotischen Vorgängen, die als Nachweis für Apoptoseprozesse Verwendung finden können. Ein wichtiges Merkmal für Apoptosevorgänge ist die Bildung charakteristischer DNA- und Chromatinfragmente. Ursache dieser DNA-Fragmentierung ist die Aktivierung einer endogenen zellulären Endonuklease, die die DNA an spezifischen Stellen schneidet. Es entstehen Multimere von etwa 200 bp großen DNA-Fragmenten, die mit Histoproteinen assoziiert sind. Dieser spezifische DNA-Abbau ermöglicht z.B. mittels Gelektrophorese den quantitativen und qualitativen Nachweis von Apoptose in kultivierten Zellen. Weiterhin können apoptotische Zellen durch spezifische Oberflächenveränderungen, die lichtmikroskopisch sichtbar sind (siehe Abbildung 6.1), charakterisiert werden. Ebenso ist die gleichzeitig stattfindende Hypersegmentierung und Fragmentierung des Zellkerns ein deutlicher Hinweis auf das Stattfinden apoptotischer Prozesse.

Diese Zellkernveränderungen lassen sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, Abbildung 6.2) nachweisen. Die DAPI-Färbung zeigt die starke Chromosomenkondensation in der frühen Phase der Apoptose, etwa zur Zeit der Bläschenbildung der Zellwand. DNA-Strangbruch-Assays zum Apoptosenachweis spiegeln dagegen eher die späten apoptotischen Vorgänge wieder, etwa zur Zeit der Bildung der apoptotischen Körperchen bzw. nach der Zelllyse. Abbildung 6.1 zeigt die zeitliche Überlagerung der Oberflächenveränderungen und der ersten Zellkernveränderungen wie z.B. Chromatin-verdichtung und DNA-Fragmentierung.^[109, 111]



Abbildung 6.1: Morphologische Veränderungen während der Apoptose nach [111]

Apoptotische Zellen werden zunächst rund, verlieren ihre Adhäsionsfähigkeit an Substrate und bilden als erstes deutlich sichtbares Merkmal Bläschen, ähnlich wie mitotische Zellen während der Zytokinese. Die Zellen stellen daraufhin ihre Mobilität ein und werden starr. Gleichzeitig beginnt die Ausbildung dünner *microspikes*, gefolgt von Blasenbildung und Abschnürung apoptotischer Körperchen und schließlich der Zelllyse.

In vivo werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktion eliminiert. *In vitro* kann man zu einem sehr späten Zeitpunkt die Lyse der apoptotischen Körperchen beobachten. Ihre Auflösung ähnelt der Nekrose, woher auch die Bezeichnung "sekundäre Nekrose" stammt. Allerdings finden nekrotische Vorgänge typischerweise relativ schnell in Sekunden oder Minuten statt, während die genetisch regulierte Apoptosekaskade wesentlich mehr Zeit benötigt. Allein einige Zwischenstadien benötigen zwischen 6 und 12 Stunden. Von der Bläschenbildung als erstes Anzeichen der Apoptosevorgänge bis zur Zelllyse können 12 bis 24 Sunden vergehen.^[111]

Für verschiedene toxische Metalle wie Cd, V, Cr, Ni, As und deren Komplexverbindungen ist die apoptoseinduzierende Wirkung bereits untersucht worden. Der eigentliche Mechanismus ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Beispielsweise konnte für unterschiedliche Chromverbindungen an verschiedenen Zelllinien eine zeit- und dosisabhängige apoptoseinduzierende Wirkung belegt werden.^[117] Chrom(III)-Komplexe Schiffscher Basen (z.B. $[Cr^{III}salen]^+$) zeigten deutliche Apoptoseeffekte in Lymphozytenzellkulturen.^[71, 118, 119] Wahrscheinlich beruht die apoptoseauslösende Wirkung dieser und ähnlicher Komplexe auf der Bildung von ROS und einer Erhöhung der intrazellulären *p*53-Proteinkonzentration, wie auch auf der Ausbildung von DNA-Strangverknüpfungen und DNA-Protein-Verknüpfungen.

Wie Chrom-Ionen können auch Vanadium- und Blei-Ionen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, unter anderem NF- κ B, AP-1 und *p*53, aktivieren. Für die *p*53-Aktivierung scheinen ROS, insbesondere das Hydroxyl-Radikal OH^{*}, von großer Bedeutung zu sein.

Ein anderer Mechanismus ist für Cadmium-Ionen bekannt. Sie lösen Apoptosevorgänge über erhöhte intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentrationen mit nachfolgender Caspase-3-Aktivierung (Caspasen sind cysteinreiche Aspartat-spezifische Proteasen, die im Apoptosegeschehen eine zentrale Rolle einnehmen) und DNA-Fragmentierung aus. Für Vanadium(V)- und Arsen(III)-Ionen wird häufig eine Blockierung des Zellzyklus beim Übertritt von der G₂- in die M-Phase und damit eine Förderung der Reparaturund Kontrollmechanismen beschrieben.^[71, 117]

6.2 DAPI-Färbung

6.2.1 Theoretische Grundlagen

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, Abbildung 6.2) besitzt eine sehr hohe Affinität zu Doppelstrang-DNA und bindet spezifisch durch Anlagerung an A·Treichen Regionen der kleinen Furche der DNA, wodurch stark fluoreszierende DAPI-DNA-Komplexe entstehen. DAPI liegt dabei hochkant und tritt mit dem Hydratrückgrat der DNA in Wechselwirkung. DAPI und ein Wassermolekül bilden mit vier A·T-Basen einen Komplex, wobei der Indol-Stickstoff eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Thymin-Sauerstoffatom eingeht.

DAPI kann auch in den DNA-Doppelstrang interkalieren. Die durch Interkalation entstandenen Komplexe zeigen jedoch keine Fluoreszenz. Die Komplexe, die DAPI mit Doppel- und Einzelstrang-RNA bilden kann, besitzen im Gegensatz zu den Komplexen, die mit Doppelstrang-DNA entstehen, eine wesentlich geringere Fluoreszenzintensität.^[120] Das UV/Vis-Spektrum von DAPI zeigt drei Maxima bei 222, 259 und 340 nm. Für die Fluorimetrie ist nur das Maximum bei 340 nm von Bedeutung. Wenn DAPI an die DNA bindet, erfährt dieses Maximum einen bathochromen Shift (λ_{UV-max} = 358 nm) und das Emissionsmaximum der freien Verbindung bei 453 nm einen hypsochromen Shift (λ_{Em-max} = 448 nm) mit gleichzeitiger 20-facher Intensitätszunahme.^[120]



Abbildung 6.2: Strukturformel von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid)

In der Literatur wurde die Übereinstimmung zwischen Oberflächenveränderungen, die während der Apoptose ablaufen und den mit DAPI stark anfärbbaren, für apoptotische Vorgänge charakteristischen Zellkernstrukturen gezeigt.^[111] Die DAPI-Färbung macht dabei Morphologieänderungen des Chromatins des Zellkerns sichtbar, wobei die Segmentierung des Zellkerns, die intra-periphere Chromatinkondensation und die Bildung von apoptotischen Körperchen erkannt werden können.^[111, 116] Aufgrund des geringen aparativen und zeitlichen Aufwandes wird diese Form des Apoptosenachweises häufig genutzt.^[121-124] Der eigentliche Ablauf der Färbung ist dabei immer ähnlich und wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert ebenfalls verwendet.

Die bis zur 70 %-igen Konfluenz angezüchteten Zellen wurden mit den zu untersuchenden Verbindungen 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen, fixiert und erneut gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einer Triton-X-100-Lösung behandelt, um die Durchlässigkeit der Nuklei für den Farbstoff zu erhöhen.

Der eigentliche Färbeprozess mit der DAPI-Lösung benötigt nur wenige Minuten, sollte aber möglichst unter Lichtausschluss erfolgen. Nach erneutem Waschen zur Entfernung von Resten der Färbelösung wurden die Zellen auf dem Objektträger mittels VectaShield[®]-Einbettflüssigkeit fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.^[111, 124-126]

6.2.2 Ergebnisse der DAPI-Färbung

Die DAPI-Färbung als ein Nachweis der auftretenden Apoptose bei Inkubation mit den Eisen(diarylsalen)-Komplexen wurde an COS7-Zellen (Nierenfibroblastenzellen der afrikanischen Affenart *Cercopithecus aethiops*, die mit viralen SV-40 DNA-Sequenzen transfiziert wurden) durchgeführt.

Als Positivvergleich wurden zwei Verbindungen ausgewählt, die zwar strukturell wenig Ähnlichkeit mit den Eisen(diarylsalen)-Komplexen besitzen, jedoch über ein ähnliches Wirkprinzip verfügen. Als Vergleich diente einerseits H_2O_2 , dass ebenfalls durch die Produktion von weiteren ROS seine zytotoxische Wirkung entfaltet, andererseits wurde Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) ausgewählt. Ähnlich wie die Anthracyclinantibiotika (siehe Kapitel 8, Abbildung 8.3) kann Juglon als Naphthochinonderivat über Semichinonradikale ROS bilden. Im Vordergrund steht dabei die Entstehung von Superoxid-Anionen und H_2O_2 . In Gegenwart von Eisen-Ionen kann aus dem gebildeten H_2O_2 in einer Fenton-Reaktion (vgl. Kapitel 8, Abbildung 8.2) das hoch zytotoxische, DNA-spaltende Hydroxyl-Radikal gebildet und so Apoptose ausgelöst werden (vgl. Abbildung 6.3).



Abbildung 6.3: Produktion von ROS durch Juglon nach [127]

In hohen Konzentrationen führt Juglon, als potentes Nukleophil, neben der Bildung von ROS zu einer Reaktion mit Thiolgruppen in Proteinen und Glutathion. Der Verbrauch der Glutathionreserven ist dabei insbesondere für die zytotoxische Wirkung Juglons in hohen Konzentrationen verantwortlich.^[127]

Ähnliches wurde auch für andere Naphthochinonderivate beschrieben. DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon) besitzt in einer Konzentration von 10 μM eine proliferationsstimulierende Wirkung auf RINm5F-Zellen, Karzinomzellen, die aus einem Ratten-β-Zell-Pankreastumor^[128] gewonnen wurden. In Konzentrationen ab 30 μM wird die Zellproliferation inhibiert und Apoptose ausgelöst, in Konzentrationen ab 100 μM findet akute Nekrose statt, die durch die Verarmung der Zellen von Glutathion, ATP und NAD⁺ verursacht wird.^[113]



Abbildung 6.4: DAPI-Färbung an COS7-Zellen; zwei Beispiele der Negativkontrolle (A und B), 0.1 % DMSO

Neben den Positivvergleichen wurde zunächst nur die wirksamste Verbindung [Fe^{III}salophen]Cl **(141)**, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurde, getestet. H₂O₂ wurde den Zellen in einer Konzentration von 50 μ M zugesetzt, Juglon in einer Konzentration von 0.5 und 5 μ M, der Eisen(III)-Komplex **(141)** ebenfalls in den Konzentrationen 0.5 und 5 μ M.





Abbildung 6.5: DAPI-Färbung an COS7-Zellen; Positivkontrolle, C und D sind aufgenommen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 μM H₂O₂, 0.1 % DMSO

Die in den Abbildungen 6.4 bis 6.8 dargestellten Fluoreszenzmikroskopbilder wurden im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin) von Herrn MSc. A. Bethke aufgenommen. Da DAPI nur DNA anfärbt, sind auf den Aufnahmen ausschließlich die Zellkerne zu sehen. Das Zytoplasma ist fluoreszenzfrei und daher schwarz.

Abbildung 6.4 **A** und **B** zeigt zwei Beispiele der unbehandelten COS7-Kontrollkulturen. Im Gegensatz zu den unbehandelten Kulturen, wiesen die apoptotischen Zellen der Positivkontrolle (Abbildung 6.5, **C** und **D**), die mit H_2O_2 behandelt wurden, eine deutliche Fragmentierung des Zellkerns auf. Besonders auffällig war die Bildung kleiner Vesikel, die als apoptotische Körperchen interpretiert werden können.



Abbildung 6.6: DAPI-Färbung an COS7-Zellen; Positivkontrolle, nach 24-stündiger Inkubation mit Juglon; E und F 0.5 μM Juglon, 0.1 % DMSO; G und H 5 μM Juglon, 0.1 % DMSO

In Abbildung 6.6 sind COS7-Zellen dargestellt, die 24 Stunden mit 0.5 μ M Juglon (**E** und **F**) bzw. mit 5 μ M Juglon (**G** und **H**) inkubiert wurden. Bei den Zellen, die mit 0.5 μ M Juglon behandelt wurden, waren kaum Anzeichen von apoptotischen Vorgängen erkennbar. Nur wenige Zellkerne zeigten eine charakteristische Fragmentierung.

Im Gegensatz dazu traten bei den Zellen, die mit 5 µM Juglon behandelt wurden, typische Anzeichen von Apoptose in Erscheinung. Es wurde eine deutliche Segmentierung der Zellkerne sichtbar, vereinzelt auch die Bildung von Vesikeln. Z.T. war eine intra-periphere Chromatinkondensation erkennbar, die als charakteristisches Anzeichen von Apoptose gewertet werden kann.





Abbildung 6.7: DAPI-Färbung an COS7-Zellen; I und J sind aufgenommen nach 24stündiger Inkubation mit 0.5 μM [Fe^{III}salophen]Cl (**141**), 0.1 %DMSO

In Abbildung 6.7 sind die Bilder repräsentativer Bereiche der Zellen dargestellt, die 24 Stunden mit 0.5 µM des Eisen(III)-Komplexes [Fe^{III}salophen]Cl **(141)** inkubiert wurden. Auf diesen Bildern werden ebenfalls deutliche Merkmale apoptotischer Zellen sichtbar. Feststellbar sind eine große Anzahl fragmentierter Zellkerne, die Bildung apoptotischer Körperchen und die intra-periphere Chromatinkondensation, die als charakteristische Anzeichen apoptotischer Vorgänge gewertet werden können.



Abbildung 6.8: DAPI-Färbung an COS7-Zellen; **K** und **L** sind aufgenommen nach 24stündiger Inkubation mit 5 μM [Fe^{III}salophen]Cl (141), 0.1% DMSO

Abbildung 6.8 zeigt die Bilder, die nach Inkubation der Zellen mit 5 μ M des Eisen(III)-Komplexes (141) erhalten wurden. Auffällig sind die runde Form der Zellkerne und die Abwesenheit organisierter Zellkernsegmentierungen und -fragmentierungen. Offensichtlich löste bereits die Konzentration von 5 μ M des Eisenkomplexes (141) an COS7-Zellen Nekrose aus.

Interessanterweise besitzen Juglon und der getestete Eisen(III)-Komplex (141) an COS7-Zellen einen ähnlichen IC₅₀-Wert. Der ermittelte IC₅₀-Wert für Juglon betrug 0.8 \pm 0.2 µM und für [Fe^{III}salophen]Cl (141) 0.3 \pm 0.2 µM (vgl. Abschnitt 4.3.1.1). Dennoch waren nach 24-stündiger Inkubation mit 0.5 µM Juglon keine Anzeichen von Apoptose sichtbar, während der [Fe^{III}salophen]Cl-Komplex in derselben Konzentration deutliche Anzeichen von Apoptose hervorrief. Juglon löste an COS7-Zellen erst in einer Konzentration von 5 µM Apoptose aus, während nach Inkubation der Zellen mit dem Eisen(III)-Komplex (141) in dieser Konzentration hauptsächlich nekrotische Zellen gefunden wurden.

6.3 Nachweis von Einzelstrang-DNA (ssDNA)

6.3.1 Theoretische Grundlagen

Formamid denaturiert als mildes Reagenz die DNA lediglich in apoptotischen Zellen. Dabei entstehen lange single-stranded-DNA-Bruchstücke (ssDNA), die mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden können. Die spezifische Reaktivität der Antikörper wird erst durch die Formamid-Behandlung möglich. Dabei ist die spezifische Sensitivität von Formamid für apoptotische Zellen durch die charakteristischen Veränderungen im Chromatingrundgerüst während der Apoptose bedingt. Die auftretende Chromatinkondensation und der Abbau DNA stabilisierender Proteine ermöglichen dabei insbesondere den Nachweis der ssDNA apoptotischer Zellen. So besitzt Formamid z.B. keinerlei Wirkung auf das kondensierte Chromatin der mitotischen Zellkerne, da die phosphorylierten Histone, die für die Mitose charakteristisch sind, im Gegensatz zu den deacetylierten Histonen, die im Apoptosegeschehen auftreten, nicht angegriffen werden. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen bilden nekrotische Zellen vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche, die durch die ssDNA-Antikörper nicht nachgewiesen werden können. Somit kann durch Denaturierung der DNA mit Hilfe von Formamid und nachfolgender Färbung mit monoklonalen Antikörpern zwischen Apoptose und Nekrose deutlich unterschieden werden.^[129-131]

6.3.2 Ergebnisse des ssDNA-Assays

Die Untersuchungen auf apoptoseinduzierende Wirkung an den beiden Leukämiezelllinien LAMA84 und BV173 durch Nachweis von ssDNA wurden von Frau Univ. Doz. Dr. B. Kircher im Labor für Tumor- und Immunobiologie in der Klinischen Abteilung für Hämatologie und Onkologie an der Universitätsklinik für Innere Medizin der Stadt Innsbruck unter Verwendung des ssDNA Apoptosis ELISA Kit (APT225) der Firma Chemcon International durchgeführt. Bei den LAMA84-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie die aus dem peripheren Blut einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) gewonnen wurde, während die BV173-Zelllinie aus dem Blut eines Patienten mit akuter Leukämie etabliert wurde. Beide Zelllinien wurden drei Tage lang mit den Eisen(diarylsalen)-Komplexen in Konzentrationen von 1 bis 50 µM inkubiert. Die Zellkulturen wurden entsprechend aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelte Menge an ssDNA wurde durch die im EZ4U-Antiproliferations-Assay (siehe Kapitel 4.4.2) bestimmte Zelldichte korrigiert. Die erhaltenen Werte für die behandelten Kulturen wurden auf einen Blindwert bezogen. Bei diesem Blindwert handelte es sich um unbehandelte Zellkulturen, denen ein Wert von 1 % als natürliche Apoptoserate zugeordnet wurde. Als Positivkontrolle diente eine Lösung von 30 ng ssDNA/100 µl, die einem Wert von 2 % entspricht. Die Ergebnisse sind für die LAMA84-Zelllinie in Abbildung 6.9 und für die BV173-Zelllinie in Abbildung 6.10 zusammengefasst.

Für die getesteten Verbindungen war eine deutliche Abhängigkeit der apoptoseinduzierenden Wirkung von der Struktur zu erkennen. Für die *meso*-konfigurierten Komplexe *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (**104m**) und *m*[Fe^{II}4'OCH₃] (**97m**) war in Konzentrationen von 1, 5 und 10 μ M keine Apoptose nachweisbar. Erst bei Inkubation der Leukämiezelllinie mit den beiden Eisenverbindungen in einer Konzentration von 50 μ M konnte eine leichte Erhöhung der ssDNA-Konzentration festgestellt werden (1.36 % ssDNA für (**104m**) und 1.67 % für (**97m**)).

Die diastereomere *d,l*-konfigurierte Verbindung *d,l*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (**104d,I**) zeigte dagegen bereits in einer Konzentration von 5 μ M einen dreifachen Anstieg der ssDNA-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen. In einer Konzentration von 10 μ M bzw. 50 μ M war die Apoptoserate um den Faktor 4.9 bzw. 4.3 erhöht. Für die *d,l*[Fe^{III}4'F]Cl-Verbindung (**122d,I**) war ebenfalls eine konzentrationsabhängige Auslösung von apoptotischen Prozessen erkennbar. Eine Konzentration. Die weitere Steigerung der Konzentration des Eisenkomplexes ging mit einer weiteren Erhöhung der Apoptoserate einher. 10 μ M des Eisen(III)-Komplexes führten damit zu einem 5.6-fachen, 50 μ M zu einem 6.3-fachen Auftreten von ssDNA.



Abbildung 6.9: Ergebnisse des ssDNA-Assays an der LAMA84-Leukämiezelllinie

Neben den Diarylsalenverbindungen wurde auch der phenylendiaminüberbrückte Eisen(III)-Komplex [Fe^{III}salophen]Cl **(141)**, der sich in den Zytotoxizitätstests (siehe Kapitel 4) als wirksamste Verbindung erwies, getestet. Er zeigte bereits in einer Konzentration von 1 μ M einen 6.5-fachen Anstieg der ssDNA-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen. Eine Konzentration von 5 μ M zeigte einen 10.6-fachen Anstieg. Nach Inkubation mit 5 μ M dieser Eisen(III)-Verbindung wurden vierfach höhere Konzentrationen an ssDNA erhalten als durch die Positivkontrolle Juglon in der gleichen Konzentration und ebenfalls vierfach höhere Konzentration d,*I*[Fe^{III}4'F]CI-Komplex **(122d,I)**.

Eine weitere Steigerung der Substanzkonzentration führte hingegen zu einem geringeren Auftreten apoptotischer ssDNA (8 % bei 10 μ M und 8.6 % bei 50 μ M).

Diese Abnahme der ssDNA-Konzentration trotz Steigerung der Eisenkomplex-Konzentration lässt sich durch eine Überlagerung apoptotischer und nekrotischer Vorgänge erklären. Da die DNA-Strangbrüche nekrotischer Zellen in diesem Assay nicht erfasst werden können, kommt es zu einer Abnahme der gemessenen ssDNA-Konzentration und damit gleichzeitig zu einer Abnahme der ermittelten Apoptoserate, obwohl die Zellmenge (allerdings durch Nekrose) ebenfalls abnimmt. Charakteristischerweise ließ sich die starke Verringerung der Zellmenge bei der Erhöhung der Eisenkomplex-Konzentration sehr gut im gleichzeitig durchgeführten EZ4U-Antiproliferations-Assay erkennen.



Abbildung 6.10: Ergebnisse des ssDNA-Assays an der BV173-Leukämiezelllinie

Die Ergebnisse an der BV173-Leukämiezelllinie sind mit denen der LAMA84-Zelllinie vergleichbar. Die *meso*-Eisen(diarylsalen)-Komplexe (97m) und (104m) bewirkten keine bzw. eine geringe Apoptoserate.

Die *d,l*-Komplexe zeigten in einer Konzentration von 5 μ M ausgeprägte apoptoseauslösende Eigenschaften. Die ssDNA-Konzentration stieg bei dem *d,l*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl-Komplex (**104d,I**) bei einer Konzentration von 5 μ M auf 4.4 % und bei einer Konzentration von 10 μ M auf ca. 6 % an. Eine Konzentration von 50 μ M bewirkte eine Steigerung der ssDNA-Konzentration auf 4.1 %. Hier überlagerten sich ebenfalls apoptotische Vorgänge und in diesem Assay nicht erfassbare nekrotische Vorgänge. Die *d,l*[Fe^{III}4'F]Cl-Verbindung (**122d,I**) bewirkte in einer Konzentration von 5 μ M einen fast vierfachen Anstieg der ssDNA-Konzentration und in einer Konzentration von 10 μ M sogar einen siebenfachen Anstieg. Eine weitere Steigerung der Konzentration führte wieder zu einer ssDNA-Konzentrationsabnahme. Die Wirkung der *d,l*[Fe^{III}4'F]Cl-Verbindung (**122d,I**) entsprach damit in etwa der Wirkung des Positivvergleichs Juglon.