

Aus dem Charité Centrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin

Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie / Hämatologie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Günter Henze

Habilitationsschrift

Biometallorganische Komplexe als Wirkstoffe zur Überwindung der Zytostatika-Resistenz des Rezidivs der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) im Kindesalter

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Aram Prokop

geboren am 27.3.1966 in Berlin

Eingereicht: Juli 2008

Dekan: Professor Dr. med. M. Paul

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	3
2. Einleitung	3
3. Defekte der Apoptosesignalkaskade bei der ALL im Kindesalter	4
4. Metallorganische Komplexe zur Therapie maligner Erkrankungen	16
5. Eisen-haltige Nukleosidanaloga	17
6. Ferrocenyl-Nukleosidanaloga	29
7. Carbonyl-substituierte Titanocene	38
8. Kupfer-Organokomplexe	106
9. Zusammenfassung und Ausblick	107
10. Literaturverzeichnis	109
10.1. Eigene Veröffentlichungen	109
10.2. Veröffentlichungen anderer Autoren	112
11. Danksagung	116
12. Eidesstattliche Erklärung	117

1. Vorwort

Die vorliegende Habilitation beschreibt die Entdeckung eines neuen Feldes der Zytostatikaentwicklung, der biometallorganischen Zytostatika zur Therapie maligner Erkrankungen, welche resistent gegenüber herkömmlichen Zytostatika sind. Im Mittelpunkt steht die präklinische Evaluation neuartiger biometallorganischer zytostatischer Wirkstoffe zur Therapie des Rezidivs der häufigsten malignen Erkrankung im Kindesalter, der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL). Die Habilitationsschrift gliedert sich in die Analyse der Defekte der Apoptosesignalkaskade in primären Lymphoblasten bei dem Rezidiv einer ALL [1], die Eisen-haltigen Nukleosidanaloga [2], die Ferrocenyl-Nukleosidanaloga [3], die Carbonyl-substituierten Titanocene [4, 5] und die Organo-Kupfer-Komplexe [6]. Eigene Publikationen und die Patentschriften zu den entsprechenden Arbeiten, welche sowohl in Deutschland als auch europäisch und zum Teil schon international angemeldet und erteilt sind, werden in numerischer Reihenfolge zitiert. Für die Abhandlungen wichtige Publikationen anderer Autoren werden in alphabetischer Reihenfolge zitiert.

Die Forschungsprojekte wurden durch diverse Drittmittel von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der José Carreras Leukämienstiftung, KINDerLEBEN e.V., der Kind Philipp-Stiftung und der Dr.-Kleist-Stiftung gefördert. Aufgrund des klinischen Interesses an neuen potenten Wirkstoffen gegen maligne Erkrankungen ist die Ausgründung einer Firma an der Charité zur Weiterentwicklung der Wirkstoffe bis zur Anwendung in der klinischen Phase II a in Vorbereitung.

2. Einleitung

Zur Therapie systemischer maligner Erkrankungen wie Leukämien existieren zurzeit folgende Methoden: Chemotherapie, Radiatio (zur lokalen ZNS-Behandlung) und Immuntherapie (Gadner et al., Bello et al., Larson et al.). Dabei hat die Chemotherapie die bei weitem größte therapeutische Bedeutung (Schrappe et al.).

Obwohl die Prognose maligner Erkrankungen durch permanente Optimierung der Therapieprotokolle ständig verbessert wird, treten aufgrund von Zytostatika-Resistenz der malignen Zellen Rezidive auf, an denen Patienten versterben (Henze et al.). Diese Resistenzen (Hickman) können verschiedene Ursachen haben, wie verminderte Bioverfügbarkeit der Zytostatika (intestinale Resorptionsstörungen, Enzyminduktion, Leberfunktionsstörungen), Expression von ABC-Transportern (Chapuy et al., de Jonge-Peeters et al., Styczynski et al., Abd El-Ghaffar et al.) in malignen Zellen, welche Zytostatika aktiv unter ATP-Verbrauch

ausschleusen können, und Defekte in der Apoptosesignalkaskade [1], durch welche die Induktion des Zytostatika-induzierten Zelltods verhindert wird.

Eine der Herausforderungen der gegenwärtigen Therapie Zytostatika-resistenter maligner Erkrankungen liegt in der Suche nach wirksameren Zytostatika, welche auch in resistenten malignen Zellen Apoptose (programmierten Zelltod) induzieren können. Diese Habilitationsarbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer zytostatischer biometallorganischer Wirkstoffe, welche zelluläre Defekte der Apoptosesignalkaskade in malignen Zellen überwinden können.

3. Defekte der Apoptosesignalkaskade bei der ALL im Kindesalter

Die häufigste bösartige Erkrankung im Kindesalter ist die akute lymphoblastische Leukämie (ALL). Obwohl etwa 80% der erkrankten Kinder geheilt werden können, tritt bei einem Viertel der Patienten ein Rezidiv auf. Von den Rezidivpatienten versterben 60% trotz intensiver Therapie. Der Grund für das Auftreten eines Rezidivs ist bis heute unklar, obgleich einige Risikofaktoren dafür bekannt sind. Neben hoher initialer peripherer Blastenzahl ($> 20.000/\text{ml}$), Alter des Patienten (< 1 Jahr oder > 6 Jahre), Subtyp einer T-ALL und verschiedenen chromosomalen Translokationen (BCR-ABL, MLL-AF4) gilt vor allem das schlechte Ansprechen der Chemotherapie (besonders während der initialen Glukokortikoid-Therapie) als Risikofaktor für das Auftreten eines Rezidiv (Schrappe et al.). Da fast alle Zytostatika und besonders die Glukokortikoide über eine Induktion der Apoptose therapeutisch wirksam sind liegt es nahe, dass in den Zytostatika-resistenten Leukämiezellen die Apoptose-Signalkaskade gestört sein muss.

Apoptose spielt die entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes einer Zellpopulation zwischen Zellproliferation und Zelluntergang und hat deshalb in der Forschung weltweites Interesse erlangt (Hannun). Sowohl während der Embryogenese als auch in adultem Gewebe ist die Apoptose verantwortlich für die Homöostase eines physiologischen Zellsystems (Barinaga). Ist die Homöostase eines Zellverbandes durch einen Apoptosedefekt gestört, hat dies dramatische Folgen für den Organismus. Ist die Apoptose in lymphatischen Zellen gehemmt, können Autoimmun-Erkrankungen und Leukämien bzw. Lymphome entstehen (Thompson et al, Adams et al.).

Ein defekter Ablauf der Apoptose kann somit sowohl die Ursache für eine Erstmanifestation einer ALL darstellen als auch für die Entstehung eines Rezidivs einer ALL verantwortlich sein. Die Auswirkungen eines Defektes der Apoptosesignalkaskade auf die Entstehung eines ALL-Rezidivs ist bis heute nur wenig erforscht. Gerade weil sich die Überlebenschance eines

ALL-Patienten mit dem Auftreten eines Rezidivs nahezu halbiert, ist dieser Zusammenhang von enormer Bedeutung.

Essentiell für die erfolgreiche Therapie der ALL ist die Apoptoseinduktion in den Lymphoblasten durch die verwendeten Zytostatika. Hierbei spielt die mitochondriale Apoptosemaschinerie die zentrale Rolle. Zu den wichtigsten Bestandteilen der mitochondrialen Apoptosekaskade gehören folgende Faktoren:

1. p53, das nach Entstehen eines DNA-Schadens aktiviert wird (Kastan et al., Lowe et al.).
2. Die upstream-Regulatoren mdm-2, p14ARF und p16, die den Zelltod nach DNA-Schädigung via p53 regulieren (Sherr et al.). Die Störung dieses Signalwegs in p14ARF bzw. p16 knock-out Mäusen führt zur Entstehung Therapie-resistenter Lymphome (Sherr).

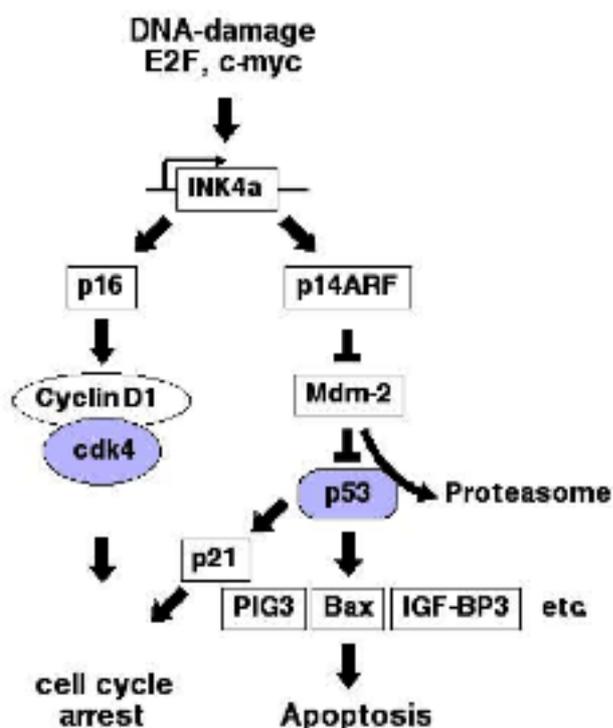


Abb. 1: Der p14ARF/p53 Signalweg

Der INK4a Genlokus kodiert für 2 Genprodukte mit unabhängiger Funktion und Aminosäuresequenz. Dies wird durch die Verwendung von 2 unterschiedlichen Exons 1 (Exon 1 alpha für p16 und Exon 1 beta für p14ARF) ermöglicht. DNA Schädigung oder die deregulierte Aktivierung von Zellzyklus-promovierenden Onkogenen (c-myc, E2F-1) führt zur Aktivierung von p14 ARF (ARF = Alternative Reading Frame) bzw. p16^{CDKN2/INK4A}. Die Expression von p16 führt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Hingegen vermittelt das p14ARF Protein den Abbau von Mdm-2 (Hdm-2) über das Proteasom. Mdm-2 ist ein Inhibitor von p53 der den Abbau des p53 Proteins über das Proteasom vermittelt. Die Inaktivierung von Mdm-2 resultiert dadurch in höheren p53 Protein-Spiegeln die das Spektrum von p53 Signaling-Effekten aktivieren: transkriptionelle Aktivierung von Zelltodsignalwegen, Zellzyklusarrest in G1 und G2/M, DNA Reparatur und transkriptionelle Repression von zelltothemmenden Genen.

3. Proteine der Bcl-2-Familie, welche als Schlüsselregulatoren der Apoptose gelten und die sowohl Apoptose-fördernde, wie z. B. Bax, Bik, Bak etc., als auch Apoptose-hemmende Wirkung, wie z. B. Bcl-2 und Bcl-xL, besitzen können [1]. Ferner bewirken sie über eine Steigerung der Membranpermeabilität der Mitochondrien eine Freisetzung von Cytochrom c, siehe Abb. 2.
4. Caspasen (Cysteinyl-Aspartasen), d.h. Proteasen, die in der Spätphase der Apoptose aktiviert werden und dann entweder als Initiatorproteasen die Apoptosemaschinerie in Gang setzen oder als Exekutionsproteasen die Spaltung verschiedener Substrate bewirken, welche im Endeffekt zur Zerstörung der Zelle führen (Essmann et al.). Caspase-9 ist Bestandteil des mitochondrialen Apoptosoms (siehe Abb. 2).
5. Apaf-1, ein Caspase-aktivierendes Protein, welches durch Bax aktiviert aber durch Bcl-2 sowie Bcl-xl inaktiviert wird (Kroemer et al.) und über die Rekrutierung von Caspase-9 eine Aktivierung der Caspasenkaskade bewirkt .
6. AIF (apoptosis inducing factor), der von aktivierten Mitochondrien während der Apoptose freigesetzt wird, in den Kern transloziert und parallel hierzu andere Mitochondrien Caspase-unabhängig aktivieren kann und hierdurch die mitochondriale Apoptose-Signalkaskade verstärkt (Kroemer et al.).
7. Smac/Diablo, das neben Cytochrom c und AIF der dritte pro-apoptotische Faktor ist, der im Rahmen des Zytostatika-induzierten Zelltods aus Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt wird. SMAC hemmt die IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) und verstärkt hierdurch das Zelltodsignal (Du et al.).

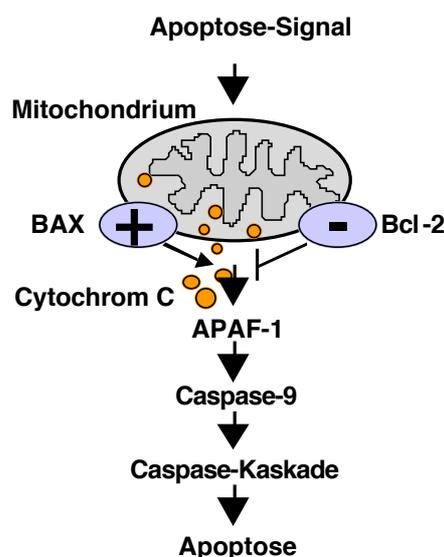


Abb. 2: Die Aktivierung der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade erfolgt über zytoplasmatische Signale wie z.B. Spaltung von Bid zu tBid, Dephosphorylierung von Bad oder über die transkriptionelle Aktivierung des Bax Gens durch p53 und die Translokation von Bax in die Mitochondrienmembran. Neben Cytochrom C werden noch weitere Apoptose-Faktoren aus Mitochondrien freigesetzt: AIF induziert den Zelltod unabhängig von der Aktivierung der Caspase-Kaskade, SMAC/Diablo hingegen amplifiziert die Caspase-Signalkaskade, indem es die IAP-Proteine (=Caspase-Inhibitoren) hemmt.

Defekte in der Apoptosesignalkaskade konnten bereits bei einer Reihe maligner Erkrankungen beobachtet werden (Sturm). Bei dem kolorektalen Karzinom konnte gezeigt werden, dass Bax differentiell exprimiert ist und dass fehlende Bax-Expression oft durch Bax-Mutationen in Folge von Frameshifts des Leserasters verursacht wird. Patienten, deren Karzinom kein Bax exprimieren, z.B. in Folge von loss-of-function Mutationen des Bax-Gens, haben ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zu Bax-Wildtyp-Tumoren (Sturm et al.).

Bei dem multimodal behandelten Ösophaguskarzinom ist das Fehlen von Bax besonders ungünstig bei Patienten mit intaktem p53, so dass ein alternativer Ausfall und zwar entweder von p53 oder von Bax mit schlechtem Ansprechen auf Therapie korreliert. Die multivariate Analyse zeigte, dass Bax hochsignifikant der beste unabhängige prognostische Marker im Vergleich zu allen konventionellen klinischen Prognosefaktoren ist (Sturm et al.).

Die Expression von Faktoren der mitochondrialen Apoptosekaskade haben große Bedeutung bei diversen bösartigen Erkrankungen. Für Bcl-2 und Bax liegen bereits eine Reihe von Daten vor, die in Zelllinien-Systemen hohe Bcl-2 Expression (Anti-Apoptose-Gen) bzw. niedrige Bax-Expression (Apoptose-förderndes Gen) mit Resistenz gegen verschiedene Zelltodstimuli in Verbindung setzen (Findley et al.). Auch eine Mutation von P53 kann eine Resistenz gegen die Apoptoseinduktion hervorrufen, auch wenn dieses ein eher seltenes Ereignis bei der ALL im Kindesalter ist und dort prognostisch keine Rolle spielt [1]. Mdm-2 Überexpression ist hingegen häufig bei der ALL im Kindesalter und ist mit Resistenz und schlechter Prognose assoziiert (Zhou). Es konnte gezeigt werden, dass die Cytochrom c-Freisetzung in primären Lymphoblasten mit einem guten therapeutischen Ansprechen bei der ALL im Kindesalter assoziiert ist (Lüder). Bei der ALL im Erwachsenenalter wurde für die Expressionsspiegel von Caspase-2 und -3 eine prognostische Bedeutung beschrieben (Estrov et al.).

Wir untersuchten diesen Signalweg bei 14 gepaarten Proben (Primärdiagnose ALL vs. ALL-Rezidiv) und 111 ungepaarten Patientenproben (77 mit Primärdiagnose ALL und 34 mit ALL-Rezidiv) mittels Mutationsanalyse der DNA und Proteinanalyse mit Westernblot-Technik. Via Mutationsanalyse untersuchten wir die Gene bax und p53. Wir etablierten erstmals die quantitative Westernblotanalytik für große Patientenzahlen, welche durch die Verwendung interner Standards auf den verschiedenen Nitrocellulose-Membranen ermöglicht wurde. Hiermit untersuchten wir die Expression des proapoptotischen Proteins Bax, dessen Gegenspieler Bcl-2 sowie die Prozessierung der Downstream-Caspase-3, welche irreversibel Apoptose induziert.

1. **Prokop, A.**, Wieder, T., Sturm, I., Eßmann, F., Seeger, K., Wuchter, C., Ludwig, W.-D., Henze, G., Dörken, B., and Daniel, P.T., 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.

Unsere ersten Untersuchungen an Leukämiezellen von Kindern mit einer ALL bestätigen die oben bei soliden Tumoren beschriebenen Befunde und deuten auf eine Beteiligung des p53/Bax/Caspase-3-Signalweges bei der Rezidiventstehung hin.

Bei der Mutationsanalytik zeigte sich zunächst, dass bax- bzw. p53-Mutationen bei der ALL im Kindesalter offensichtlich keinen Einfluss auf die Caspase-3-Prozessierung haben.

Mittels quantitativer Proteinanalytik fanden wir bei der Untersuchung dieses Signalweges bei 14 gepaarten Proben (Primärdiagnose ALL vs. ALL-Rezidiv) und 111 ungepaarten Patientenproben (77 mit Primärdiagnose ALL und 34 mit ALL-Rezidiv) einen Defekt der Caspase-3 Aktivität. Während die Lymphoblasten der Patienten mit Primärdiagnose in etwa der Hälfte der Proben eine spontane Caspase-3-Aktivierung zeigten, war diese Caspase-3-Aktivität nur in einer einzigen Probe der untersuchten ALL-Rezidiv-Patienten nachweisbar. Der Verlust der spontanen Caspase-3-Aktivierung in primären Lymphoblasten korrelierte mit einer verminderten Bax-Expression der Leukämiezellen im Rezidiv. Dieser Zusammenhang war besonders deutlich bei der Untersuchung der gepaarten Proben und zeigte sich auch bei der Untersuchung der größeren Kohorte ungepaarter Proben.

Es lässt sich zusammenfassen, dass im Rezidiv der ALL im Kindesalter, wobei die Prognose im Vergleich zur Ersterkrankung signifikant schlechter ist, in den Lymphoblasten das proapoptische Protein Bax und somit die Bax/Bcl-2-Ratio signifikant erniedrigt ist. Dieses führt zu einer Verhinderung des spontanen Caspase-3-Prozessings, was einen Defekt der Apoptosesignalkaskade bedeutet. Aufgrund eines Bax-Mangels und fehlender Caspase-3-Prozessierung sind die Lymphoblasten im Rezidiv einer ALL gehindert, den apoptotischen Zelltod zu durchlaufen.

4. Metallorganische Komplexe zur Therapie maligner Erkrankungen

Die bisher einzigen Vertreter metallorganischer Wirkstoffe bei der Therapie maligner Erkrankungen verwendeter Zytostatika sind die Platin-Komplexe Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin (Raymond et al., Kelland et al.). Diese schon seit über 30 Jahren und nur zufällig entdeckten Zytostatika wirken durch Interkalation mit der DNA. Sie werden in der zytostatischen Therapie ausschließlich intravenös verabreicht. Bei der Therapie von Leukämien im Kindesalter spielen Platin-Komplexe keine Rolle. Die Platinverbindungen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht auf herkömmlichem Wege Apoptose in malignen Zellen induzieren. Das Protein-Expressionsmuster von mit Platinverbindungen behandelten Zellen unterscheidet sich signifikant von dem der malignen Zellen, in welchen Apoptose mit herkömmlichen Medikamenten anderer Zytostatikagruppen induziert wurde. Metallorganische

Komplexe aller anderen Übergangsmetalle oder der Lanthanide finden bisher keine Verwendung in der zytostatischen Therapie maligner Erkrankungen.

Inhalt dieser Habilitationsschrift ist die Entdeckung mehrerer neuartiger Klassen von biometallorganischen zytostatischen Wirkstoffen, die in der Lage sind, in malignen Zellen Resistenzen gegenüber herkömmlichen Zytostatika zu überwinden und durch Synergie mit diesen die Wirkung handelsüblicher zytostatischer Medikamente signifikant zu verbessern. Erste *in vivo*-Experimente an SCID-Mäusen zeigen eine gute Verträglichkeit und eine Tumorstadium inhibierende Eigenschaft dieser Wirkstoffgruppe. Es handelt sich hierbei um synthetische Wirkstoffe, die im Gegensatz zu den meisten bekannten Zytostatika nie zuvor in der Natur gefunden worden sind. Mit den biometallorganischen Zytostatika ist ein völlig neues hochinteressantes Feld für eine antileukämische und Anti-Tumor-Therapie erschlossen worden.

5. Eisen-haltige Nukleosidanaloga

Im Rahmen methodischer Untersuchungen zur stereoselektiven Herstellung und synthetischen Anwendung chiraler Übergangsmetall- π -Komplexe wurden in der Arbeitsgruppe Schmalz (Universität zu Köln) vor einigen Jahren neue Butadien-Derivate mit einer $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Substruktur hergestellt. Aufgrund der erkannten entfernten strukturellen Ähnlichkeit dieser Verbindungen mit in der onkologischen Therapie verwendeten Nukleosidanaloga wurden diese von mir in Bezug auf ihre Wirkung auf maligne Zellen untersucht. So wurde entdeckt, dass es sich bei den „Eisen-haltigen“ Verbindungen um eine neue Klasse hochwirksamer Zytostatika handelt. Es zeigte sich, dass die Fe-Nuk in verschiedensten malignen Zellen Apoptose induzieren, wobei die Signaltransduktion über die mitochondriale Kaskade vermittelt wird. Die vollsynthetischen Eisen-haltigen Nukleosidanaloga (Fe-Nuk) sind chemisch so strukturiert, dass sie nicht in Nukleinsäuren eingebaut werden können [3]. Die *in vitro*-Daten der Apoptose-Induktion zeigen, dass die Eisen-haltigen Nukleoside in der Lage sind, sowohl in primären Lymphoblasten als auch in Zelllinien Resistenzen gegenüber herkömmlichen Zytostatika zu durchbrechen. Die neuartige Zytostatika-Gruppe wurde als Patent angemeldet, welches bereits international erteilt wurde und bei welchem die Charité Berlin Anmelder ist [2]. Erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen für diese Substanzklasse liegen uns bereits vor [3], wie auch eine Eingrenzung möglicher Wirkmechanismen der Eisen-haltigen Nukleoside. Zu den zytostatisch wirksamen Fe-Nuk zählen folgende Strukturtypen, die synthetisch als reine Stereoisomere zugänglich sind [2, 3].

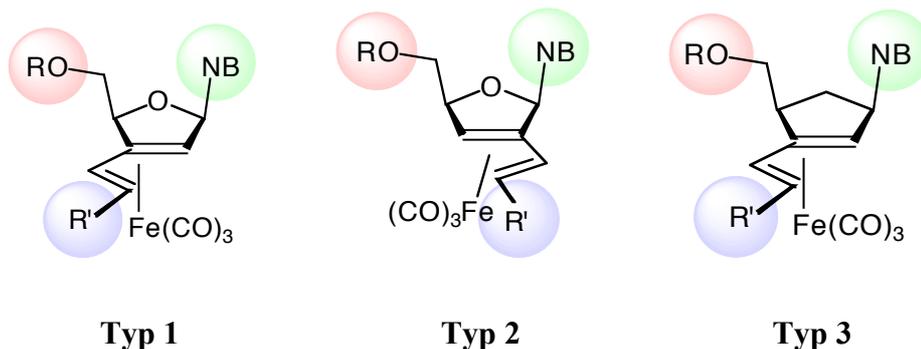


Abb. 3 Grundstrukturen der neuartigen Eisen-haltigen Nucleosidanaloga (Fe-Nuk). NB bedeutet Nucleobase, während R und R' beliebige organische Reste darstellen.

Diese Wirkstoffe zeichnen sich durch eine außergewöhnlich starke Apoptose-Induktion aus, sowohl in primären Lymphoblasten von Kindern mit einer ALL oder einem ALL-Rezidiv als auch in den verschiedenen Zelllinien von Leukämien oder soliden Tumoren. Bisher wurden keine Resistenzen gegenüber diesen neuartigen Zytostatika beobachtet. Das Eisen-haltige Nucleosidanalogen N 69 ist ein typischer Vertreter dieser neuartigen Zytostatika-Klasse.

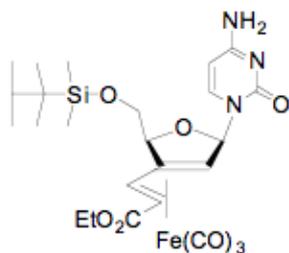


Abb. 4 Chemische Struktur des Eisen-haltigen Nucleosidanalogs N 69, welches einer der wirksamsten Vertreter dieser neuartigen Zytostatikalklasse ist ($LC_{50} = 17 \mu\text{mol/l}$ in Lymphomzellen).

2. Schlawe, D., Majdalani, A., Velcicky, J., Heßler, E., Wieder*, T., **Prokop, A.***, and Schmalz, H-G.*. Iron-containing nucleoside analogs with pronounced apoptosis-inducing activity. *Angewandte Chemie*, **2004**, 116, 1763-1766

Es konnte gezeigt werden, dass die Eisen-haltigen Nukleosidanaloga in der Lage sind, Resistenzen von Tumorzellen gegen andere herkömmliche Zytostatika zu überwinden. Zum Beispiel zeigte die Bax-defiziente Prostatacarzinom-Zelllinie DU 145 (Abb. 5) im Vergleich zu den Bax-exprimierenden Klonen eine ungehinderte Apoptose-Induktion durch das Fe-Nuk N69 (Abb. 6b), während herkömmliche Nukleosidanaloga wie 5-Fluor-Uracil (5-FU) in den Bax-defizienten Zellen deutlich geringer Apoptose induzieren (Abb. 6a).

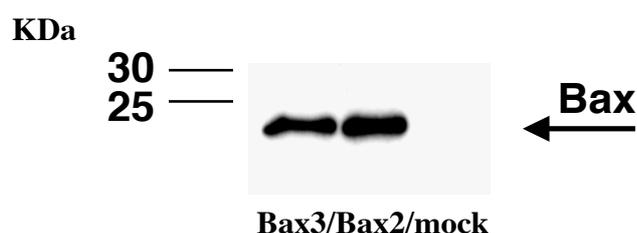


Abb. 5: Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax in den Zellklonen Bax3 und Bax2 von DU145-Zellen (Prostata-Karzinom-Zelllinie). Der Wildtyp (und der mock-Transfektant) dieser Zelllinie sind Bax-frei

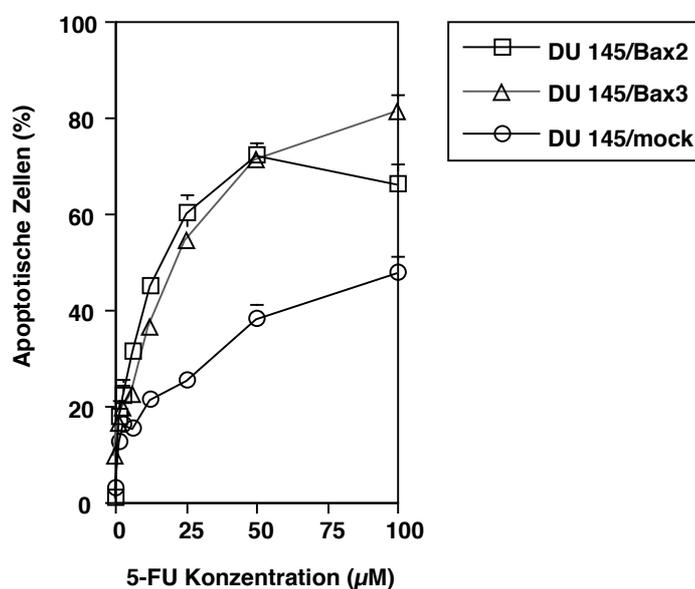


Abb. 6a: Deutlich verminderte Apoptoserate bei Behandlung von Bax-defizienten Prostata-Karzinomzellen (DU145 mock) mit dem herkömmlichen Nukleosidanalogen 5-Fluor-Uracil (5-FU) im Vergleich zur Behandlung Bax-exprimierender Clone derselben Zelllinie (DU145 Bax2 und DU145 Bax3).

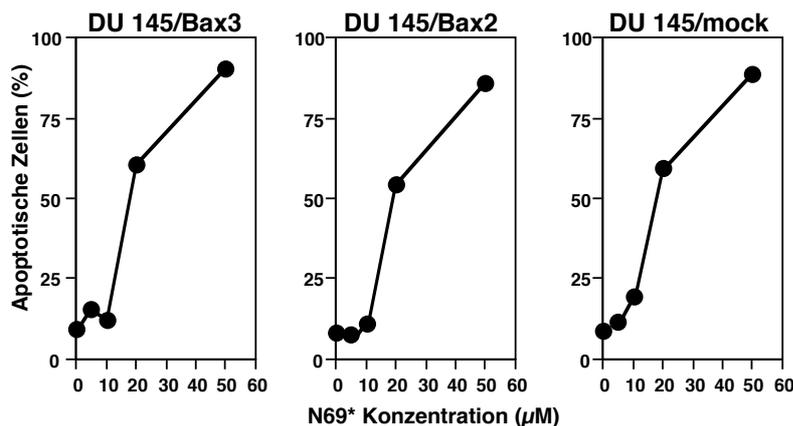


Abb. 6b: Im Vergleich zu Abb. 6a zeigt sich keine Änderung der Apoptoserate bei Behandlung der Bax-freien (DU145 mock) und Bax-haltigen DU145-Zellen mit dem neuartigen Eisen-haltigen Nukleosidanalogen N69

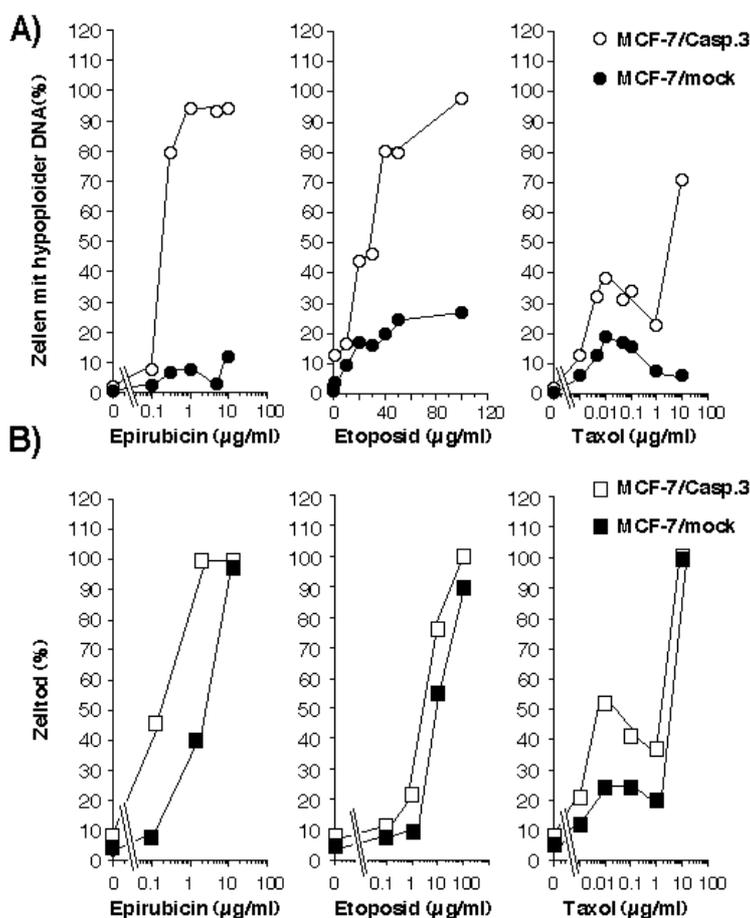


Abb. 7a: Dargestellt ist die Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von der Caspase-3-Expression in Mamma-Karzinom-Zellen (MCF-7) nach Behandlung mit verschiedenen herkömmlichen Zytostatika. A zeigt die Apoptoseinduktion, welche via Durchflusszytometrie als DNA-Fragmentierung gemessen wurde. B stellt die Zytotoxizität in Form von Freisetzung von zellulärer Lactatdehydrogenase dar, welche photometrisch gemessen wurde.

Herkömmliche Zytostatika induzieren Apoptose in malignen Zellen in deutlicher Abhängigkeit von der Caspase-3-Expression (Abb. 7a), da Caspase-3 ein wichtiges Zwischenglied der intrinsischen sowie extrinsischen Signalkaskade ist (Abb. 6). Das Eisenhaltige Nucleosidanalogen N69 (Abb. 7b) induziert Apoptose Caspase-3-unabhängig in Mamma-Karzinomzellen.

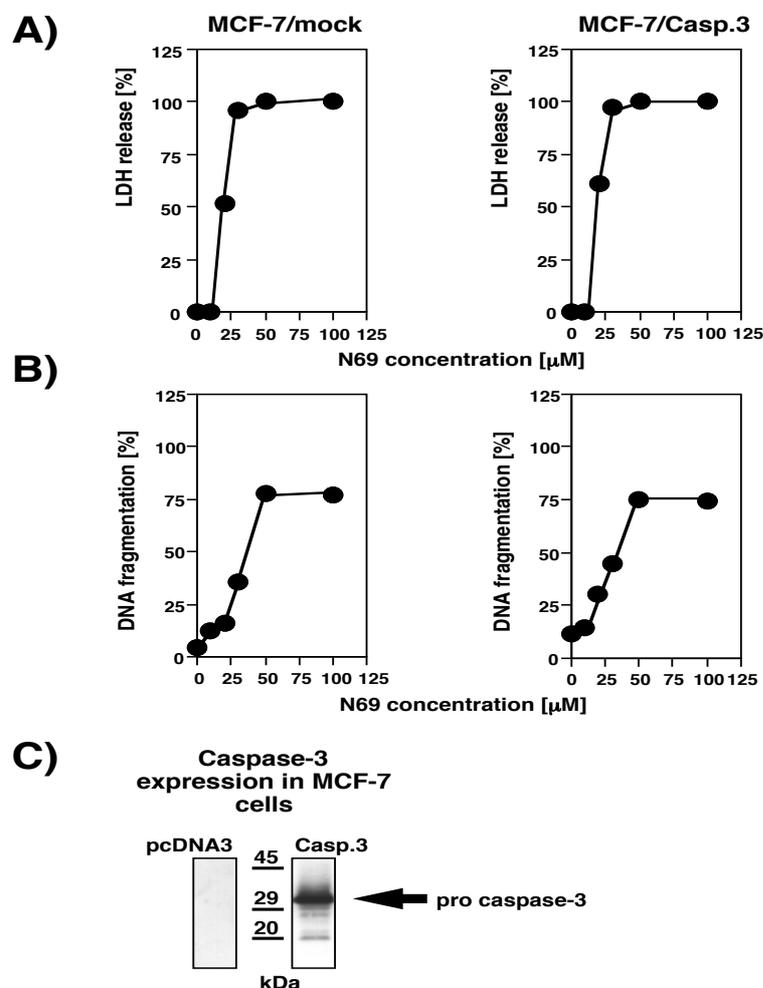


Abb. 7b: Die Apoptoseinduktion nach zytostatischer Behandlung mit dem Eisenhaltigen Nucleosidanalogen N 69 ist unabhängig von der Caspase-3-Expression in Mamma-Karzinom-Zellen (MCF-7). A zeigt die Zytotoxizität in Form von Freisetzung der zellulären Lactatdehydrogenase. B stellt die Apoptoseinduktion dar, welche durchflusszytometrisch als DNA-Fragmentierung gemessen wurde. C zeigt den Nachweis der Caspase-3-Expression via Westernblot-Technik.

Es lässt sich eindrucksvoll darstellen, dass das Eisenhaltige Nucleosidanalogen N 69 in der Lage ist, die bei dem Rezidiv einer ALL im Kindesalter auftretenden Resistenzmechanismen gegen herkömmliche Zytostatika wie die Verminderung der Bax/Bcl-2-Ratio und die fehlende Caspase-3-Prozessierung zu überwinden.

Trotz der starken Apoptose-Induktion in Tumor- und Leukämiezellen zeigt sich bei den Eisenhaltigen Nucleosidanaloga (Fe-Nuk) eine eindrucksvolle Selektivität in der zytostatischen Wirkung im Vergleich der Toxizität bei gesunden Zellen. Wie in Abbildung 7 gezeigt wird, werden primäre Lymphozyten im Vergleich zu den Tumorzellen (BJAB-Zellen

= Burkitt like lymphoma cells) nur wenig geschädigt (etwa nur 25 % nach einer Behandlung über 48 h mit 20 μM Fe-Nuk), während nach nur zwei Tagen Behandlung mit Eisen-haltigen Nukleosidanaloga (hier Verbindung N69) bereits 98 % der Leukämiezellen gestorben sind.

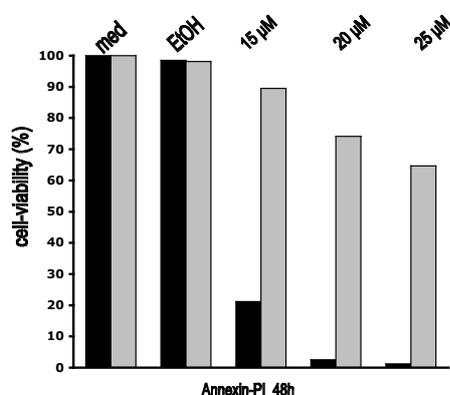


Abb. 8: Dargestellt ist die Viabilität (lebende Zellen in %) von Burkitt-Lymphom-Zellen (BJAB = schwarze Balken) und primären Leukozyten (weiße Balken) unter Behandlung mit dem Eisen-haltigen Nukleosidanalogen N 69 (Konzentration 15, 20, 25 $\mu\text{mol/l}$) über 48 h nach Annexin/PI-Doppelfärbung (med = unbehandelte Zellen, EtOH = Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt wurden). Es zeigt sich eine hohe Selektivität der Wirkung von N 69 gegen maligne Zellen (BAJB).

Die hier vorgestellten *in vitro*-Daten werden durch die Beobachtung ergänzt, dass sich eine niedrige *in vivo*-Toxizität der Eisen-haltigen Nukleoside (Fe-Nuk) bei Mäusen zeigt.

Die Apoptoseinduktion der neuartigen Eisen-haltigen Nukleosidanaloga ist mechanistisch eingehend untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass der Zelltod über die mitochondriale Signalkaskade verläuft.

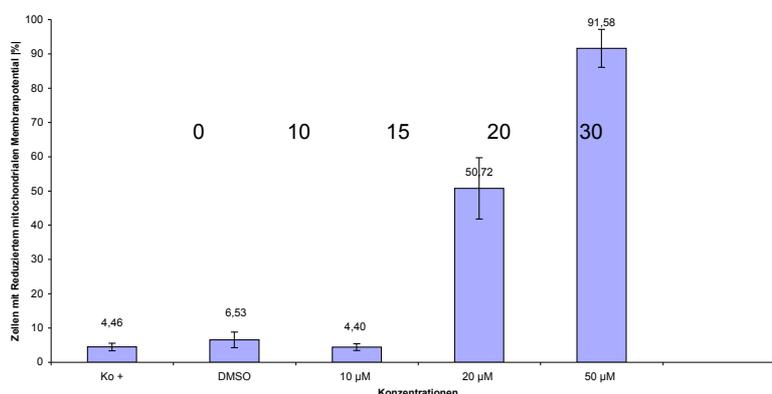


Abb. 9: Ein deutlicher Anstieg von Lymphomzellen (BJAB-Zellen) mit vermindertem mitochondrialem Membranpotential bis über 90% nach Behandlung mit dem Eisen-haltigen Nukleosidanalogen N 69 (Konzentration 10, 20, 50 $\mu\text{mol/l}$) über 48 h (Messung via JC-1-Assay) zeigt die Beteiligung der Mitochondrien bei der Induktion der Apoptose (KM: unbehandelte Zellen, DMSO: Lösungsmittel-Kontrolle).

Ferner konnte eine synergistische Wirkung der Eisen-haltigen Nucleosidanaloga mit herkömmlichen Zytostatika nachgewiesen werden.

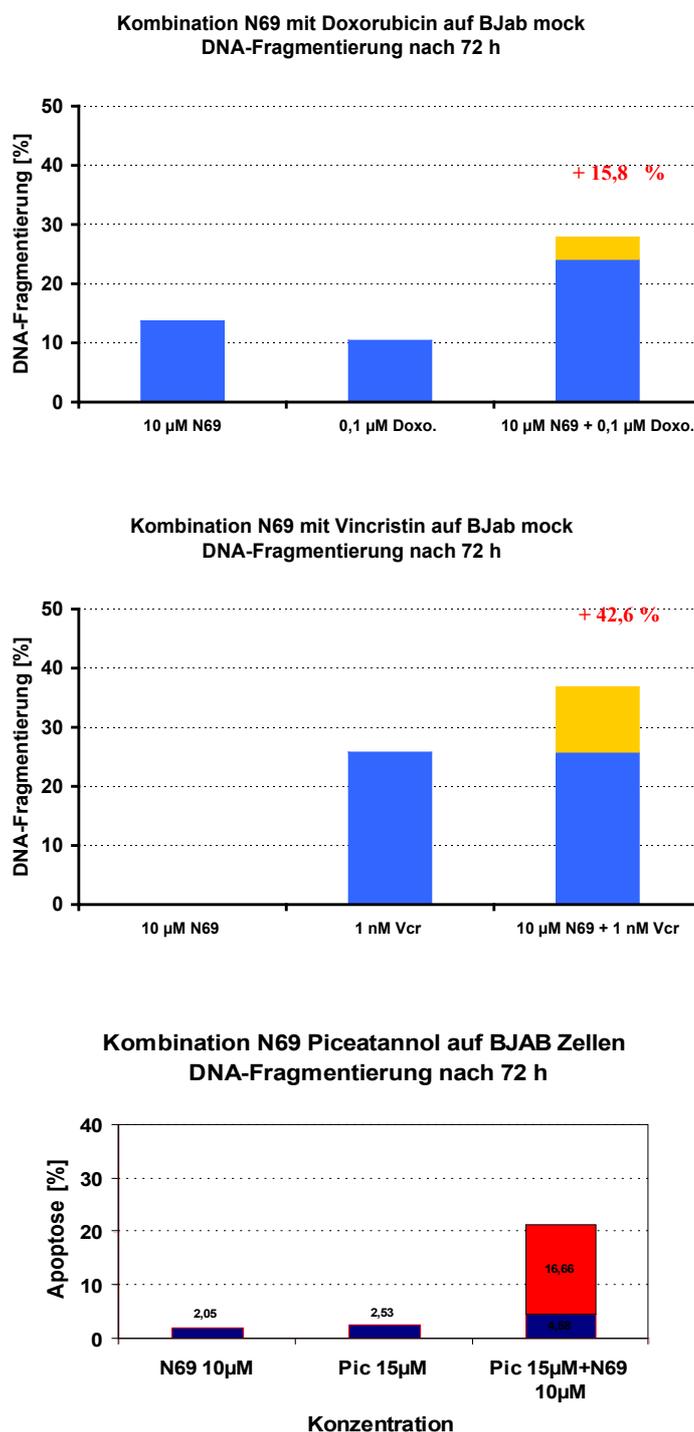


Abb. 10: Das Eisen-haltige Nucleosidanalogen N69 zeigt bezüglich der Apoptoseinduktion eine Synergie mit herkömmlichen Zytostatika wie Doxorubicin (+ 15%) und Vincristin (+ 42%). Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie in *niedrigen* Wirkungskonzentrationen an Lymphomzellen (BJAB), um die *Synergie verdeutlichen* zu können. Den stärksten Synergieeffekt (+ 364%) zeigt N69 mit dem Stilbenanalogon Piceatannol, einem Wirkstoff aus dem Rotwein, der sich in der präklinischen Testphase befindet.

Aufgrund der sehr viel versprechenden präklinischen *in vitro*- und *ex vivo*-Daten der Eisenhaltigen Nukleosidanaloga bezüglich Wirkungsweise, Selektivität, Resistenzüberwindung und Synergieeffekten mit herkömmlichen Zytostatika haben wir uns der Suche nach dem Target dieser neuartigen Wirkstoffklasse zugewandt. Mit der Identifikation des Targets hätte man freien Zugang zur Optimierung einer neuen Generation von Zytostatika.

Zunächst wurde via Fluoreszenzmikroskopie von mit dem Fluoreszenz-markierten Fe-Nuk HIHA 578 inkubierten Lymphomzellen (BJAB) nachgewiesen, dass die Eisenhaltigen Nukleosidanaloga sich im Zytoplasma der malignen Zelle anreichern. Somit kann das Target der Fe-Nuk nicht die DNA im Zellkern sein, welche das Target der bisher einzigen in der Therapie maligner Erkrankungen verwendeten Übergangsmetallkomplexe Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin ist (Kelland).

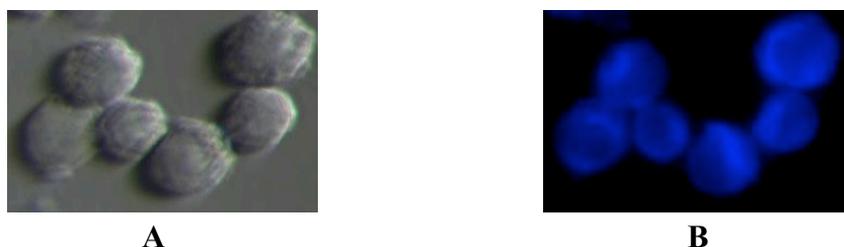


Abb. 11: **A:** Lymphomzellen (BJAB) in der Phasenkontrastaufnahme nach Inkubation mit dem fluoreszierenden Fe-Nuk HIHA 578 über 12 h. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme derselben Zellen unter denselben Bedingungen. Man erkennt deutlich die Anreicherung des Fe-Nuk im Zytoplasma, während der Zellkern ausgespart bleibt.

Zurzeit wird das Target via Immunpräzipitation (Ljubimova et al., Ge et al., Zhang et al., Fujita et al., Low et al.) mit dem Fe-Nuk N 69 gesucht, an welches über einen Linker Biotin gekoppelt ist. Für die Präzipitation wird Streptavidin-beschichtete Agarose verwendet. Das erhaltene Targetprotein soll zunächst elektrophoretisch aufgereinigt und dann mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie nachgewiesen werden.

Erste funktionelle Daten der Eisenhaltigen Nukleosidanaloga (Fe-Nuk) haben wir mittels Genexpressionsanalyse erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation von Lymphomzellen (BJAB) mit N 69 über 16 h die m-RNA des Proteins *Harakiri* 40-fach überexprimiert und die m-RNA von *XIAP* um den Faktor 16 (auf 6.1 %) herunterreguliert wird. Harakiri bindet an Bcl-2 und verhindert so die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 in malignen Zellen. Hierdurch erklärt sich auch die Bax-unabhängige Apoptoseinduktion von N 69, da bei so hohen Harakiri-Spiegeln Bax als Gegenspieler von Bcl-2 für die Apoptoseinduktion offensichtlich nicht mehr benötigt wird. XIAP ist das potenteste antiapoptotische Protein der Familie der inhibitors of apoptosis (IAP), welches die Apoptose durch Inhibition der Caspase-3, -7 und -9 stoppt. Durch ein Herunterregulieren von XIAP ist die äußerst starke Apoptoseinduktion in malignen Zellen sowie die Überwindung von Zytostatika-Resistenzen erklärbar.

6. Ferrocenyl-Nukleosidanaloga

Aufgrund von Problemen der Löslichkeit der Fe-Nuk für die intravenöse und intraperitoneale Applikation bei *in vivo*-Experimenten, ist versucht worden, Magensäure-stabile Derivate zu entwickeln, welche auch oral appliziert werden können. So haben wir in Kooperation mit der AG Schmalz (Universität zu Köln) die Ferrocenyl-Nukleosidanaloga entwickelt [5]. Der Ferrocenyl-Komplex ist bei pH=1 über mehrere Stunden chemisch stabil.

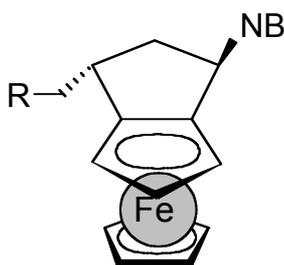


Abb. 12 Grundstruktur der neuartigen Ferrocenyl-Nukleosidanaloga (Fc-Nuk). NB ist eine Nucleobase und R ist eine beliebige organische Struktur

Das im folgenden beschriebene Ferrocenyl-Nukleosidanalogen (Fc-Nuk) *PJ 184* ist eine Leitstruktur dieser neuen Wirkstoffklasse und besitzt die Struktur:

NB = Cytosin und R =

Die LC_{50} von PJ 184 in Lymphomzellen (BJAB) beträgt 30 $\mu\text{mol/l}$. Zur Zytotoxizitätstestung ist der DiSC-Assay verwendet worden (Bosanquet et al., Kaspers et al.), eine übliche Methode bei der *in vitro*-Zytostatika-Resistenz-Testung. PJ 184 ist einer der wirksamsten Vertreter dieser Zytostatikagruppe.

3. James, P., **Prokop, A.***, Neudörfl, J., Eißmann, M., Jesse, P., Henze, G., and Schmalz*, H.-G., Enantioselective Synthesis of Ferrocenyl Nucleoside Analogs with Apoptosis-Inducing Activity, *Org. Lett.*, **2006**, 13: 2763-2766

PJ 184 ist in der Lage, in Melanomzellen (MelHO-Zellen), die wegen einer 30-fachen Bcl-2 Überexpression resistent gegenüber herkömmlichen Zytostatika sind, signifikant Apoptose zu induzieren.

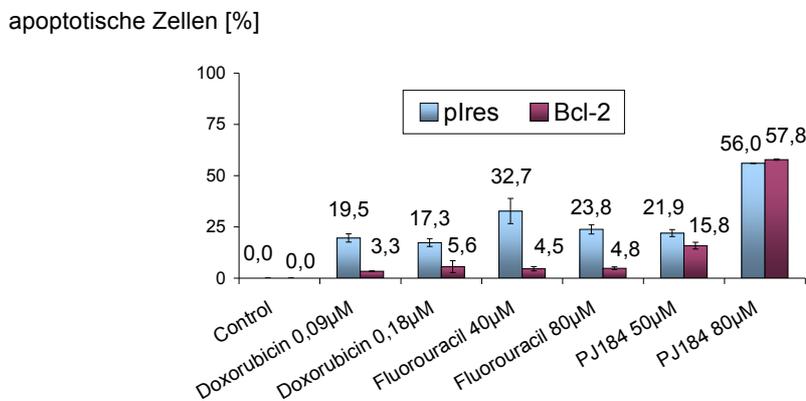


Abb. 13: Das Ferrocenyl-Nukleosidanalogen PJ 184 induziert im Gegensatz zum herkömmlichen Nukleosidanalogen 5-Fluoruracil und dem Anthrazyklin Doxorucin unabhängig von einer 30-fachen Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 Apoptose in Melanomzellen (MelHO-Zellen). Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachwerten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung zeigen.

Die Apoptoseinduktion erfolgt über die intrinsische Signalkakade. Die Beteiligung der Mitochondrien lässt sich mit dem JC-1-Assay nachweisen [14], wobei in malignen Zellen eine Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials nachweisbar ist.

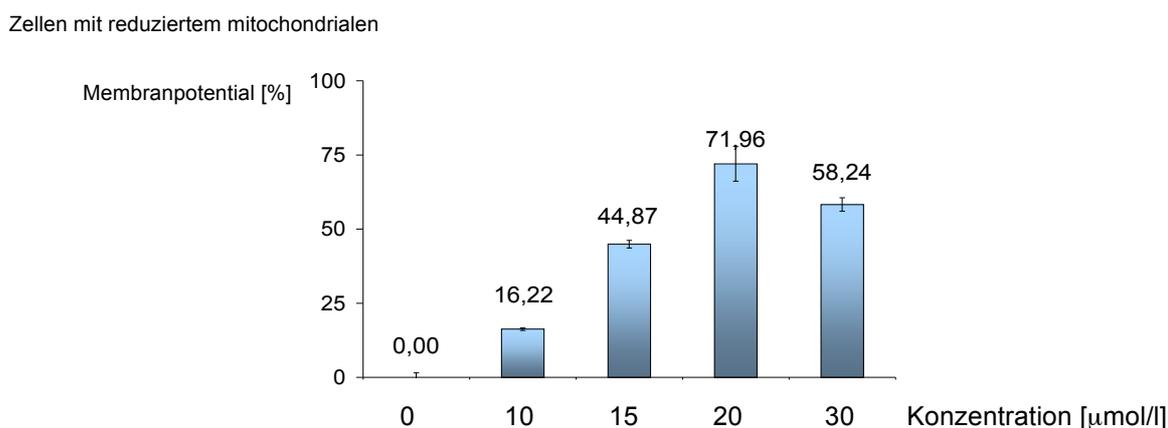


Abb. 14: Ein deutlicher Anstieg von Lymphomzellen (BJAB-Zellen) mit vermindertem mitochondrialem Membranpotential von 0% bis über 70% nach Behandlung mit dem Eisen-haltigen Nukleosid-Analogen PJ 184 (Konzentration 10, 15, 20, 30 µmol/l) über 48 h (Messung via JC-1-Assay) zeigt eine Apoptoseinduktion über die mitochondriale Signalkaskade. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachwerten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung zeigen.

Mit Westernblot-Technik lässt sich zeigen, dass die Ferrocenyl-Nukleosid-Analoga (Fc-Nuk) über die klassische mitochondriale Apoptose-Signalkaskade den Tod maligner Zellen induzieren können. Es kommt zunächst zu einer Prozessierung der Caspase-9, welche ihrerseits die Prozessierung der Caspase-3 bewirkt [8] (Essmann).

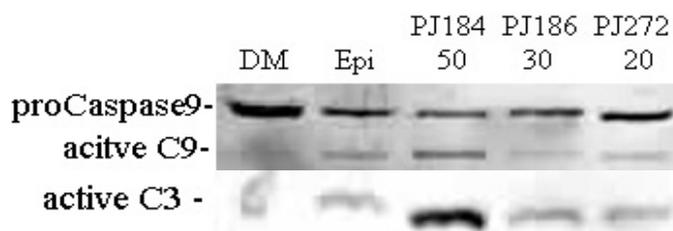


Abb. 15: Die Ferrocenyl-Nukleosidanaloga (hier: PJ 184, PJ 186 und PJ 272) induzieren Apoptose über die mitochondriale Signalkaskade. Man erkennt mittels Westernblot-Technik die Prozessierung der Caspase-9. Unbehandelte Lymphomzellen (BJAB) sind die Null-Kontrolle (DM), während Epirubicin (Epi) als Positiv-Kontrolle dient. Man erkennt die Banden der aktivierten Caspase-9 und Caspase-3.

Dennoch kann die zytostatische Wirkung von PJ 184 im Gegensatz zu herkömmlichen Zytostatika, wie z. B. Doxorubicin, durch Behandlung mit einem Pancaspase-Inhibitor nicht signifikant gehemmt werden.

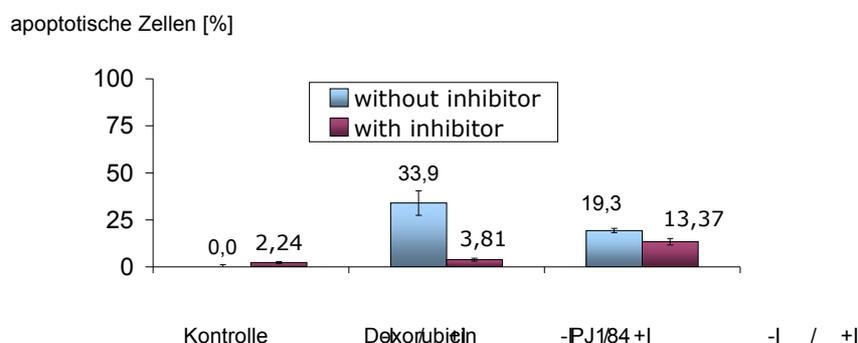


Abb. 16: Die durch das Ferrocenyl-Nukleosidanalogen PJ 184 (15 $\mu\text{mol/l}$) induzierte Apoptose wird im Gegensatz zu der Apoptoseinduktion durch das Anthrazyklin Doxorubicin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) durch den Pancaspase-Inhibitor ZVAD-FMK (100 $\mu\text{mol/l}$) in Lymphomzellen (MelHO-Zellen) nicht signifikant inhibiert. Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachwerten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung zeigen.

Das bedeutet, dass die Caspasen für den Fc-Nuk-vermittelten Zelltod zwar von der malignen Zelle verwendet werden, nicht aber zwingend hierfür notwendig sind. Somit können die Fc-Nuk Zytostatika-Resistenzen von malignen Zellen, die durch Mangel oder Abwesenheit von Caspasen oder Caspasenprozessierung hervorgerufen sind, überwinden.

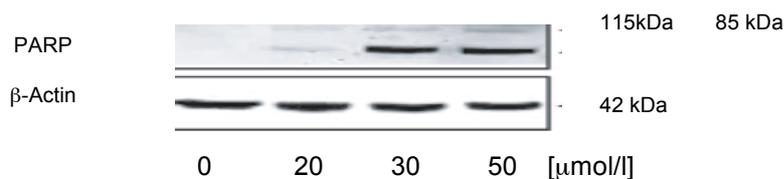


Abb. 17: Das Ferrocenyl-Nukleosidanalogon PJ 184 induziert Apoptose in humanen Lymphomzellen (BJAB). Man erkennt mittels Westernblot-Technik die Spaltung von PARP. Unbehandelte Lymphomzellen weisen keine Prozessierung von PARP auf. Die 85-kDa-Bande fehlt hier. Der Nachweis von β-Actin dient zur Kontrolle des Proteingehalts der einzelnen Proben.

Die Spaltung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), welches ein wichtiges Enzym zur Reparatur von DNA ist, gilt als eindeutiges unumkehrbares Signal der irreversiblen Apoptoseinduktion in der Zelle. Wenn PARP prozessiert ist, stirbt die Zelle via Apoptose. In Abb. 16 ist mit dem Auftreten der 85-kDa-Bande die PARP-Prozessierung und somit die Apoptoseinduktion nach Behandlung der Lymphomzellen mit PJ 184 eindeutig zu erkennen.

Die Ferrocenyl-Nukleosidanaloga sind in der Lage, auch *ex vivo* Resistenzen von primären Leukämiezellen gegen herkömmliche Zytostatika, wie z. B. gegen Anthrazykline zu überwinden. Da Anthrazykline in der Therapie des Rezidivs der ALL im Kindesalter von großer Bedeutung sind, könnte eine künftige klinische Anwendung der Fc-Nuk die Behandlung dieser Erkrankung deutlich verbessern.

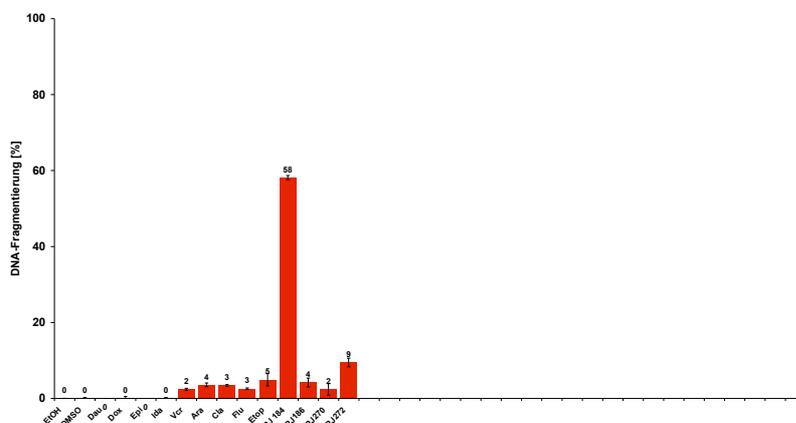


Abb. 18: Das Ferrocenyl-Nukleosidanalogon PJ 184 induziert in primären Lymphoblasten eines Patienten mit einem Rezidiv einer ALL, welche resistent gegenüber Anthrazyklinen (Dauno-, Doxo-, Epi- und Idarubicin) ist, signifikant Apoptose, während herkömmliche Zytostatika wie Vincristin, Cytarabin, Cladribin und Fludarabin und Etoposid hier nur eine geringe Zytotoxizität zeigen. Alle Zytostatika sind in der LC_{50} eingesetzt worden, die zuvor in Zelllinien ermittelt worden ist. Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachwerten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung zeigen.

Auch in multiresistenten Leukämiezellen primär erkrankter ALL-Patienten zeigt sich *ex vivo* eine statistisch signifikante Überlegenheit der Fc-Nuk gegenüber den herkömmlichen in der Therapie verwendeten Zytostatika in der Apoptoseinduktion.

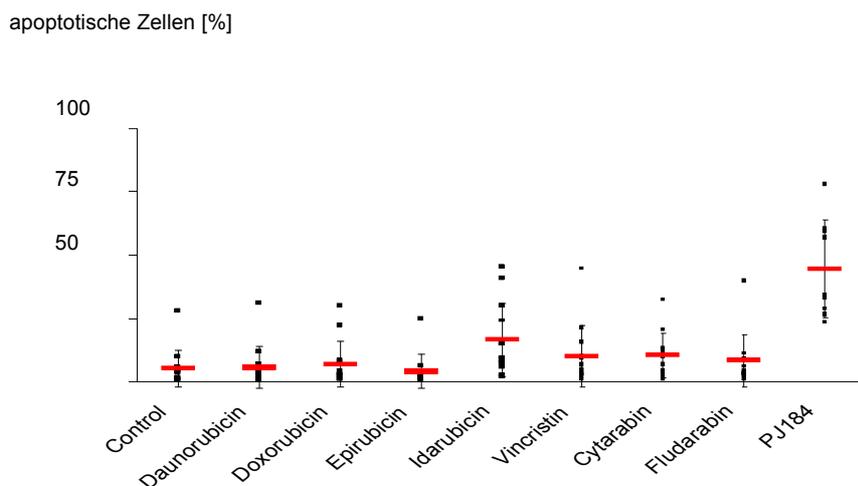


Abb. 19: Das Eisen-haltige Nukleosidanalogen PJ 184 induziert signifikant ($p < 0.001$) Apoptose in multiresistenten primären Leukämiezellen (13 Patienten). Alle verwendeten Zytostatika sind in der Konzentration der zuvor in Zelllinien ermittelten LC 50 eingesetzt worden.

Dabei ist die unerwünschte Nebenwirkung der Schädigung von primären humanen Leukozyten durch Eisen-haltige Nukleosidanaloga via Apoptoseinduktion im Bereich der üblichen Zytostatika, die für die Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden.

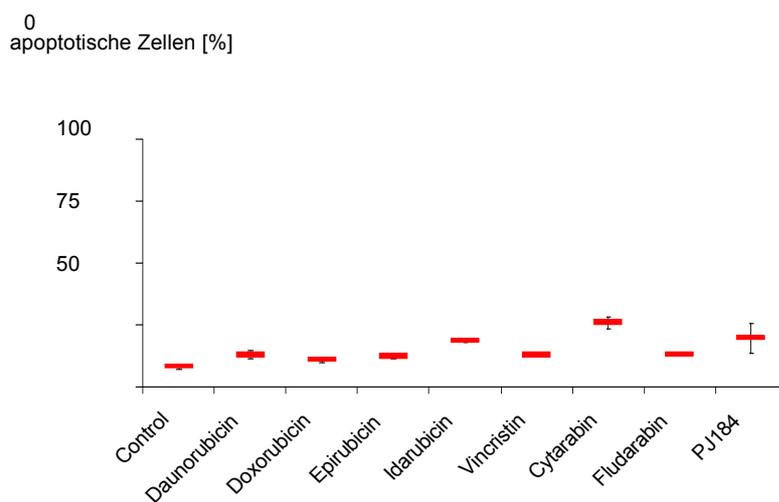


Abb. 20: Die unerwünschte Nebenwirkung der Apoptoseinduktion in primären Leukozyten durch das Eisen-haltige Nukleosidanalogen PJ 184 befindet sich im Bereich der herkömmlichen in der Therapie maligner Erkrankungen verwendeten Zytostatika. Es sind Leukozyten von 13 gesunden Testpersonen untersucht worden. Alle verwendeten Zytostatika sind in der Konzentration der zuvor in Zelllinien ermittelten LC 50 eingesetzt worden.

Erste *in vivo*-Experimente in SCID-Mäusen zeigen eine gute Verträglichkeit der Ferrocenyl-Nukleosidanaloga (Fc-Nuk) bei intraperitonealer und oraler Applikation. Allerdings wird dabei bisher kein ausreichender Serumspiegel von Fc-Nuk erreicht, der eine signifikante anti-Tumor- oder antileukämische Wirkung bewirken könnte. Deshalb wird zurzeit eine geeignete Formulierung für den Wirkstoff gesucht. Hierfür geeignet zu sein scheinen Liposomen (Ichihara et al.) oder Nanopartikel.

7. Carbonyl-substituierte Titanocene

Eine weitere neu entdeckte hochwirksame biometallorganische Wirkstoffklasse ist die der Carbonyl-substituierten Titanocene (C-Ti), welche in zwei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden kann, die der Amide (A) und die der Ketone (B) [6, 7].

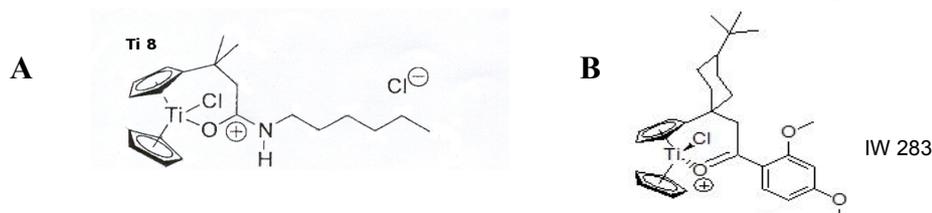


Abb. 21: Struktur der Carbonyl-substituierten Titanocene, wobei Ti 8 ein Vertreter der Amide ist und IW 283 in die Gruppe der Ketone gehört.

Die Carbonyl-substituierten Titanocene zeichnen sich durch eine ausgeprägte Proliferationshemmung in malignen Zellen aus.

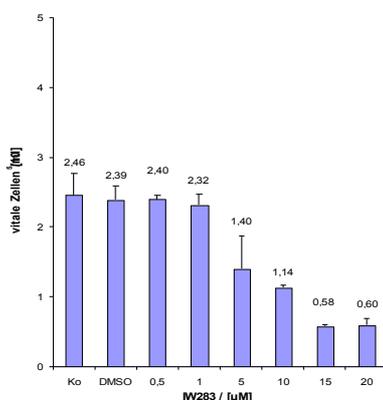


Abb. 22: Proliferationshemmung in Lymphomzellen (0.6×10^5 BJAB-Zellen/ml) durch IW 283 in verschiedenen Konzentrationen nach 24 h. Die unbehandelten Lymphomzellen (K_0 und DMSO) sind nach 24 h proliferiert (2.4×10^5 Zellen/ml), während IW 283 ab einer Konzentration von $5 \mu\text{mol/l}$ die Proliferation von BJAB-Zellen signifikant (bis zu 100 % ab $15 \mu\text{mol/l}$ IW 283) inhibiert.

4. **Prokop, A., Selig, A., Franke, D., Gansäuer, A.;** Carbonyl-substituierte Titanocene, 17.11.2006, *German patent* DE 10 054 690.3-44; 19.11.2007, PCT/EP2007/062511; 19.11.2007, US 11/942,659

5. Gansäuer, A., Winkler, I., Worgull, D., Lauterbach, T., Franke, D., Selig, A., Wagner, L., **Prokop, A.**; Carbonyl-substituted Titanocenes: A novel class of cytostatic compounds with high antitumor and antileukemic activity. *Chemistry Eur. J.*, **2008**,14: 4160-4163

Auch die Wirkung der Carbonyl-substituierten Titanocene (C-Ti) erfolgt über Apoptoseinduktion [6, 7] via der mitochondrialen Signalkaskade. Die irreversible Induktion der Apoptose kann durch Messung der DNA-Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden [4, 10, 12, 13, 14, 15, 16].

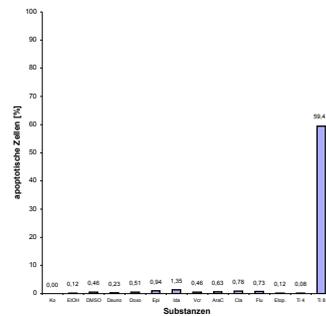


Abb. 23: Das Carbonyl-substituierte Titanocen Ti 8 induziert Apoptose in primären Lymphoblasten eines Patienten mit einem Rezidiv einer ALL, welche resistent gegenüber herkömmlichen Zytostatika wie Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Vincristin, Cytarabin, Fludarabin und Etoposid sind. Alle Zytostatika sind in der LC50 eingesetzt worden, die zuvor in Zelllinien ermittelt worden ist. Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie.

Die C-Ti sind in der Lage, *ex vivo* in primären Lymphoblasten Resistenzen gegen herkömmliche Zytostatika zu überwinden und in den Leukämiezellen signifikant Apoptose auszulösen. Bei der Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung der fluoreszierenden Verbindung IW 293 zeigt sich, dass sich C-Ti im Gegensatz zu den in der Therapie maligner Erkrankungen verwendeten Platinverbindungen im Zytoplasma der Zelle anreichern. Auch hier ist also nicht die DNA das Target des Wirkstoffs.

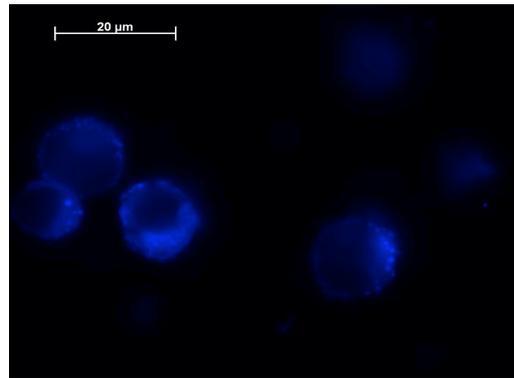


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Lymphomzellen (BJAB) zeigen nach Inkubation über 24 h mit dem fluoreszierenden Titanocen IW 293 eine Anreicherung der Substanz in Kompartimenten des Zytoplasmas von Lymphomzellen (BJAB). Der Zellkern bleibt deutlich ausgespart.

Bei dem Vergleich der Zytotoxizität der C-Ti im Vergleich zu primären Leukozyten zeigt sich eine ausgeprägte Selektivität gegenüber malignen Zellen.

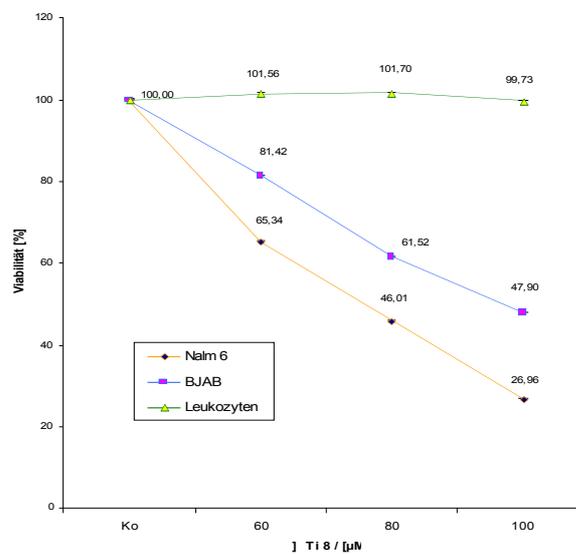


Abb. 25: Viabilität von primären humanen Leukozyten bleibt im Vergleich zu der von Lymphomzellen (BJAB) und Leukämiezellen (Nalm-6) nach Behandlung mit Ti 8 über 24 h nahezu unbeeinträchtigt. Eine selektive Wirkung von Ti 8 gegen maligne Zellen ist deutlich erkennbar. Gemessen wurde die Viabilität im Casy cell counter.

Erste *in vivo*-Experimente bei SCID-Mäusen mit einem humanen Lymphom (BJAB-Zellen) zeigen bei oraler Applikation als Mikrokristallsuspension in Olivenöl über nur 5 d eine gute Verträglichkeit bis zu einer Dosis von 50 mg/kg KG und eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums (Abb. 26).

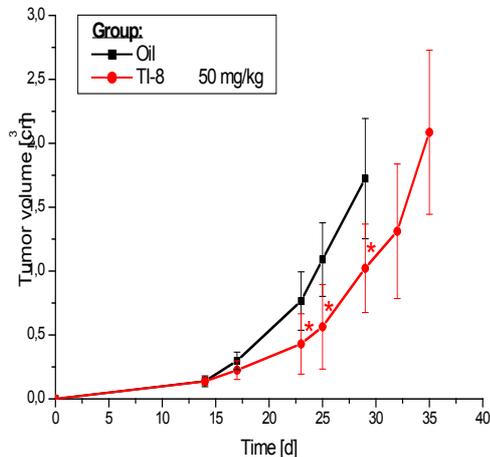


Abb. 26: Ti 8 wurde SCID-Mäusen mit einem humanen Lymphom (BJAB-Zellen) in der Leistenregion (Kontrollgruppe: n = 10, Tumorgruppe: n = 6) als Mikrokristall-Suspension in Olivenöl 1 x tgl. 50 mg/kg KG von Tag 14 bis Tag 18 oral appliziert. Die schwarze Kurve zeigt das Tumorwachstum der nur mit reinem Olivenöl behandelten Tiere (Kontrollgruppe). Die rote Kurve zeigt eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums (Man-Whitney-U-Test) bei Therapie mit TI 8.

Bei humanen Lymphomzellen (BJAB), welche *in vitro* Resistenzen gegen Doxorubicin erlangt haben, konnte gezeigt werden, dass Carbonyl-substituierte Titanocene (C-Ti) diese Resistenzen überwinden und die malignen Zellen in die Apoptose treiben können.

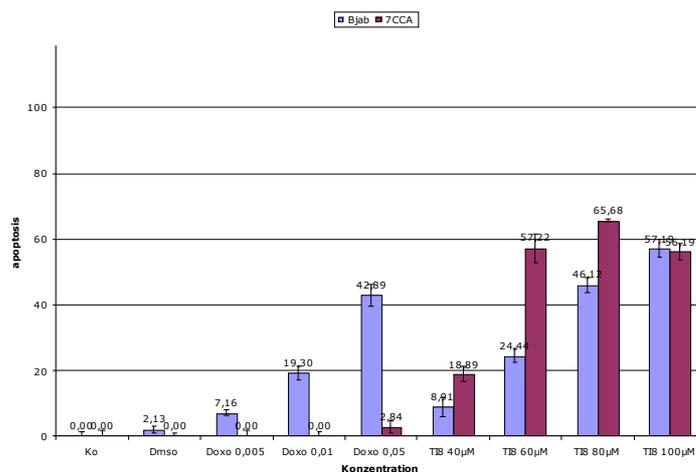
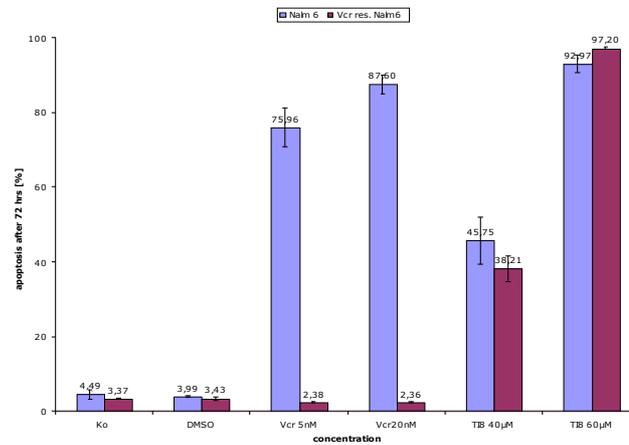


Abb. 27: Mit Ti 8 wurden humane Lymphomzellen (BJAB-Zellen = hellblaue Balken) und Lymphomzellen (BJAB 7CCA), die gegen Doxorubicin eine Resistenz erworben haben (dunkle Balken), über 72 h behandelt. Dann wurde durchflusszytometrisch die Apoptoseinduktion gemessen. Es zeigt sich dass Ti 8 in den Doxorubicin-resistenten Lymphomzellen signifikant Apoptose induziert. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachwerten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung zeigen.

Ebenso werden durch C-Ti *in vitro*-Resistenzen gegen Vincristin in humanen Leukämiezellen (Nalm-6) überwunden.

A



B

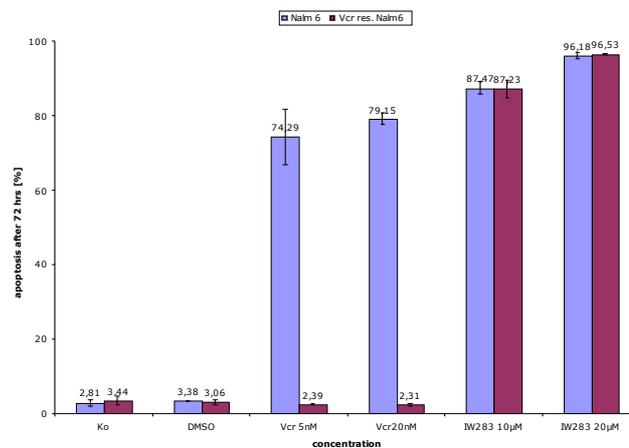


Abb. 28: Mit Ti 8 (A) bzw. Ti 283 (B) wurden humane Leukämiezellen (Nalm-6-Zellen = hellblaue Balken) und Nalm-6-Zellen mit Vincristin-Resistenz (dunkle Balken) über 72 h behandelt. Dann wurde die Apoptoseinduktion via DNA-Fragmentierung durchflusszytometrisch gemessen. Es zeigt sich dass Ti 8 in Vincristin-resistenten Lymphomzellen signifikant Apoptose induziert. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachwerten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung zeigen.

Die C-Ti wirken *in vitro* (Nalm-6-Zellen) synergistisch mit den herkömmlichen Zytostatika Vincristin, Doxorubicin und Cytarabin, welche in der Therapie der Therapie-resistenten ALL oder der des Rezidivs der ALL im Kindesalter verwendet werden.

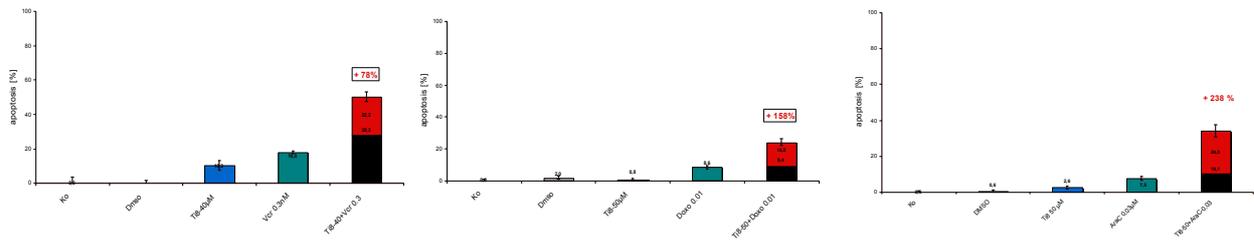
A Ti 8 + Vincristin**B** Ti 8 + Doxorubicin**C** Ti 8 + Cytarabin

Abb. 29: Das C-Ti Ti 8 zeigt bezüglich der Apoptoseinduktion eine Synergie mit herkömmlichen Zytostatika wie Vincristin (A: + 78%), Doxorubicin (B: + 158%) und Cytarabin (C: + 238%). Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie in *niedrigen* Wirkungskonzentrationen an Leukämiezellen (Nalm-6), um die *Synergie verdeutlichen* zu können.

Auch mit biometallorganischen Wirkstoffen anderer Zytostatikagruppen gibt es deutliche Synergie-Effekte der Carbonyl-substituierten Titanocene (C-Ti), wie hier mit dem Eisenhaltigen Nucleosidanalogen N69. Das deutet darauf hin, dass C-Ti und Fe-Nuk an unterschiedlichen Targets der Zelle binden müssen.

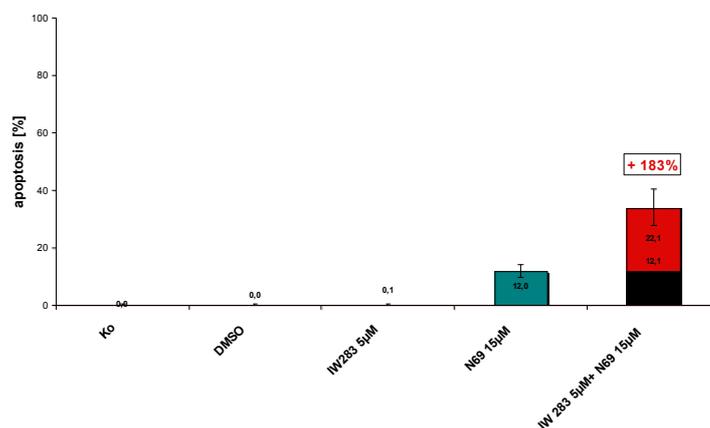


Abb. 30: Das C-Ti IW 283 zeigt bezüglich der Apoptoseinduktion eine Synergie mit dem Eisenhaltigen Nucleosidanalogen N 69 (+ 183%). Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie in *niedrigen* Wirkungskonzentrationen an Leukämiezellen (Nalm-6), um die *Synergie verdeutlichen* zu können.

8. Kupfer-Organokomplexe

Vor kurzem haben wir eine neue biometallorganische Wirkstoffklasse von Kupfer-Organokomplexen (Cu-K) entdeckt [17], die erstaunliche antileukämische und anti-Tumor-Eigenschaften besitzt. Aus Patent-rechtlichen Gründen können hier nur einzelne Daten ohne die Strukturen der Wirkstoffe gezeigt werden. Sie wirken ebenfalls über die intrinsische Apoptoseinduktion in der malignen Zelle und überwinden eine Daunorubicin- und Doxorubicin-Resistenz in primären Lymphoblasten *ex vivo*.

DNA-Fragmentierung [%]

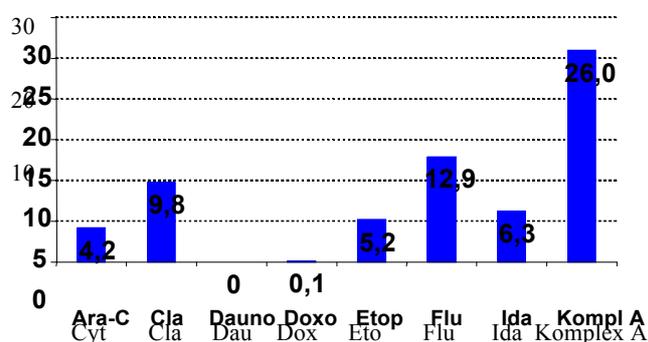


Abb. 31: Der Kupfer-Komplex A induziert Apoptose in primären Lymphoblasten eines Patienten mit einem Rezidiv einer ALL, welche resistent gegenüber Daunorubicin und Doxorubicin ist. Die Apoptoseinduktion durch Komplex A ist deutlich höher als die durch die herkömmlichen Zytostatika Cytarabin, Cladribin, Etoposid, Fludarabin und Idarubicin induzierte Apoptose. Alle Zytostatika sind in der LC50 eingesetzt worden, die zuvor in Zelllinien ermittelt worden ist. Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie.

Die Kupfer-Organokomplexe zeigen Synergien mit herkömmlichen Zytostatika wie Cytarabin in Lymphomzellen (BJAB).

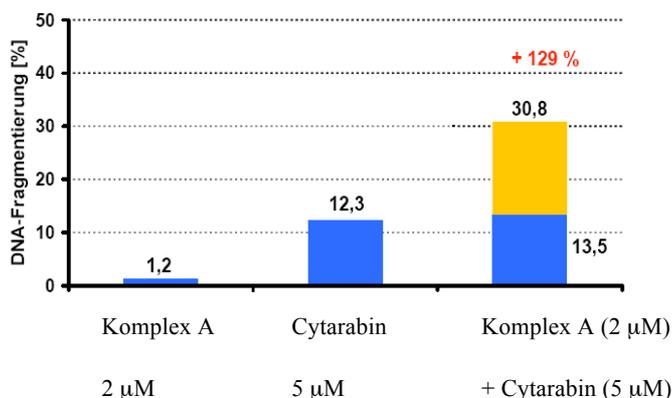


Abb.: 32 Komplex A zeigt bezüglich der Apoptoseinduktion eine Synergie mit Cytarabin in Lymphomzellen (+ 129%). Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung via Durchflusszytometrie in niedrigen Wirkungskonzentrationen, um die Synergie verdeutlichen zu können.

In vivo ist eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums nach oraler Therapie mit Kupfer-Komplex A über nur 5 Tage nachweisbar, wobei die Verträglichkeit gut war und mit Ausnahme eines transienten minimalen Gewichtsverlusts der Tiere keine Nebenwirkungen beobachtet wurden.

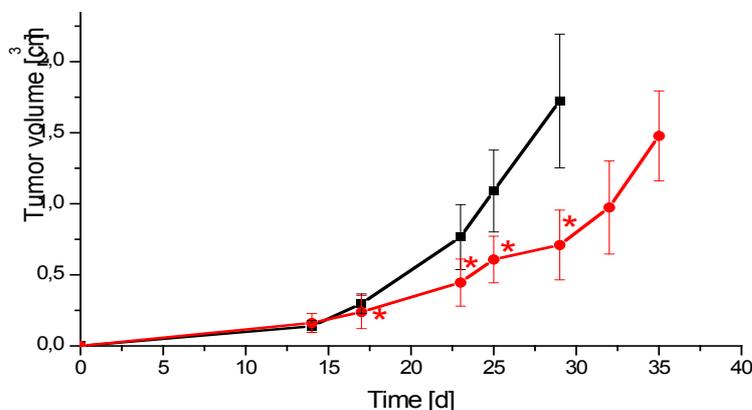


Abb. 33: Komplex A wurde SCID-Mäusen mit einem humanen Lymphom (BJAB-Zellen) in der Leistenregion (Kontrollgruppe: n = 10, Tumorgruppe: n = 6) als Mikrokristall-Suspension in Olivenöl 1 x tgl. 10 mg/kg KG von Tag 14 bis Tag 18 oral appliziert. Die schwarze Kurve zeigt das Tumorwachstum der nur mit reinem Olivenöl behandelten Tiere (Kontrollgruppe). Die rote Kurve zeigt eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums (Man-Whitney-U-Test) bei Therapie mit Komplex A.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Bisher existieren als Metall-haltige Zytostatika zur Chemotherapie lediglich drei Platin-Komplexe, von denen *Cisplatin* ein anorganisches Salz und *Carboplatin* bzw. *Oxaliplatin* metallorganische Komplexverbindungen sind. Obwohl diese Wirkstoffe bei der Therapie solider Tumore wie Neuroblastom, Osteosarkom atypischer Rhabdoidtumore oder diverser Hirntumore eine wichtige Rolle spielen, werden sie bis heute nicht in der antileukämischen Therapie im Kindesalter verwendet. Die Wirkung entfalten die Platin-Verbindungen über Bindung an die DNA im Zellkern der malignen Zelle.

Die vorgelegte Habilitationsschrift beschreibt vier neuartige biometallorganische antileukämische bzw. anti-Tumor-Wirkstoff-Klassen, welche in der Lage sind, *in vitro* und *ex vivo* Resistenzen von Leukämie- und Tumorzellen gegenüber herkömmlichen in der Therapie eingesetzten Zytostatika zu überwinden und die malignen Zellen in die Apoptose treiben. Diese können bei der Apoptoseinduktion die bei dem Rezidiv der ALL im Kindesalter in den Lymphoblasten auftretenden Apoptosedefekte umgehen. Es handelt sich dabei um metallorganische Komplexverbindungen (small molecules), welche andere Übergangsmetalle als Platin im Zentrum enthalten: Eisen-haltige Nukleosidanaloga (**Fe**), Ferrocenyl-

Nukleosidanaloga (**Fe**), Carbonyl-substituierte Titanocene (**Ti**) und Kupfer-Organokomplexe (**Cu**).

Die Eisen-haltigen Nukleosidanaloga (Fe-Nuk) wirken über eine Induktion des Proteins Harakiri, welches an das antiapoptotische Protein Bcl-2 bindet und damit dessen Wirkung neutralisiert. Ferner wird durch Fe-Nuk die Expression des wichtigsten Apoptoseinhibitors XIAP herunterreguliert. Das führt zu einer Sensibilisierung der malignen Zelle gegen herkömmliche Zytostatika. Deshalb lassen sich *in vitro* zahlreiche Synergien der Fe-Nuk mit üblichen Zytostatika nachweisen. Apoptosedefekte in primären Lymphoblasten des ALL-Rezidivs im Kindesalter, wie Erniedrigung der Bax/Bcl-2-Ratio und Verlust des spontanen Caspase-3-Prozessings werden durch Fe-Nuk überwunden. Fe-Nuk können ebenso wie Ferrocenyl-Nukleosidanaloga (Fc-Nuk) nicht in die DNA eingebaut werden und reichern sich im Zytoplasma der malignen Zelle an. Die Fc-Nuk sind im Gegensatz zu den Fe-Nuk Magensäure-resistent, so dass diese auch oral appliziert werden können. *In vivo* sind die Fc-Nuk bei oraler Applikation gut verträglich. Zurzeit wird an der Optimierung der Formulierung gearbeitet. Ferner suchen wir mittels Immunpräzipitation und anschließender MALDI-TOF-Massenspektroskopie das Target der beiden Wirkstoffklassen.

Die Carbonyl-substituierten Titanocene (C-Ti) überwinden *in vitro* und *ex vivo* zahlreiche Resistenzen maligner Zellen gegenüber herkömmlichen Zytostatika. Ferner existieren zahlreiche Synergien sowohl mit üblichen Zytostatika als auch mit Vertretern anderer von uns neu entwickelter biometallorganischer Wirkstoffklassen. Zudem zeigt sich *in vitro* und *ex vivo* eine ausgeprägte Selektivität der C-Ti gegenüber malignen Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen wie humanen Leukozyten. *In vivo* lässt sich eine signifikante Wachstumsinhibition maligner Zellen durch C-Ti und eine gute Verträglichkeit bei oraler Applikation beobachten.

Die Kupfer-Organokomplexe (Cu-K) bilden die neueste Wirkstoffgruppe biometallorganischer Verbindungen. Da das Europäische Patent erst im Jahr 2008 eingereicht worden ist und das Einreichen dieser Habilitationsschrift in die Frist des Prioritätsjahres fällt, können zu diesem Zeitpunkt nur Auszüge der Daten mitgeteilt werden. Es handelt sich hierbei um eine Wirkstoffklasse, die maligne Zellen mit hoher Selektivität über die mitochondriale Signalkaskade in die Apoptose treibt. Die Verbindungen wirken synergistisch mit herkömmlichen Zytostatika und Radiatio, während sie gesunde Zellen vor Bestrahlung zu schützen vermögen. Die antileukämische und anti-Tumor-Wirkung sowie die gute Verträglichkeit der Cu-K sind bereits *in vivo* nachgewiesen worden.

Die neu entdeckten biometallorganischen Wirkstoff-Klassen zeigen eine Überwindung der Resistenzmechanismen in primären Lymphoblasten der ALL im Kindesalter und in verschiedensten primären Kulturen humaner solider Tumore. Sie sind damit den herkömmlichen in der Therapie des ALL-Rezidivs verwendeten Zytostatika bei *in vitro*- und *ex vivo*-Testungen deutlich überlegen. Erste *in vivo*-Untersuchungen in SCID-Mäusen zeigen eine deutliche Inhibition maligner Zellen und eine gute Verträglichkeit der Wirkstoffe. Alle vier neuen biometallorganischen Wirkstoffklassen sind über Patente geschützt. Ziel ist es, diese Komplexe unter Einbindung einer Firma zu zytostatischen Medikamenten weiter zu entwickeln. Hierzu müssen die Wirkstoffe zunächst unter GMP-Bedingungen synthetisiert und die präklinischen Untersuchungen vervollständigt werden. Parallel müssen die Targets identifiziert werden. Mit der Kenntnis der Targets wird sich ein vollkommen neues Feld künftiger Zytostatika eröffnen, da die Variationsbreite allein schon wegen der Anzahl der verschiedenen Übergangsmetalle außerordentlich groß ist. Wie durch die Untersuchungen an verschiedensten resistenten Zelllinien vor allem auch solider Tumore zu erkennen ist, ist eine künftige Anwendung der biometallorganischen Zytostatika keinesfalls auf die antileukämische Therapie beschränkt sondern bedeutet vielmehr einen Durchbruch in der Chemotherapie, wo zurzeit mit Ausnahme der drei Platin-Komplexe nahezu ausschließlich Naturstoffe und deren chemische Derivate [9, 11] verwendet werden.

Alle hier neu entdeckten biometallorganischen Wirkstoffklassen haben deshalb bei verschiedenen Firmen Interesse geweckt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine Weiterentwicklung der Wirkstoffe angestrebt wird. Ein weiteres Modell zur Wirkstoff-Weiterentwicklung ist die Ausgründung einer eigenen Firma an der Charité Berlin, welche zurzeit in Vorbereitung ist.

10. Literaturverzeichnis

10.1. Eigene Veröffentlichungen

1. Prokop, A., Wieder, T., Sturm, I., Eßmann, F., Seeger, K., Wuchter, C., Ludwig, W.-D., Henze, G., Dörken, B., and Daniel, P.T., 2000, 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*, 14: 1606-1613.

2. Schmalz, H-G., Wieder, T., Daniel, P. T. and Prokop, A., Substances for use in therapy of diseases that are caused by highly proliferative cells. 2002, *PCT*, No. WO 02/080923 A1

3. Schlawe, D., Majdalani, A., Velcicky, J., Heßler, E., Wieder*, T., Prokop, A.*, and Schmalz, H-G.*, 2004 Iron-containing nucleoside analogs with pronounced apoptosis-inducing activity. *Angewandte Chemie*, 116, 1763-1766

4. Velcicky, J., Lanver, A., Lex, J., Prokop, A.*, Wieder, T.*, Schmalz, H.-G.*.: Transition-Metal-Mediated Synthesis of Novel Carbocyclic Nucleoside Analogues with Antitumoral Activity. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 5087-5110.

5. James, P., Prokop, A.*, Neudörfl, J., Eißmann, M., Jesse, P., Henze, G., and Schmalz*, H.-G., Enantioselective Synthesis of Ferrocenyl Nucleoside Analogues with Apoptosis-Inducing Activity, *Org. Lett.*, 2006,

6. Prokop, A., Selig, A., Franke, D., Gansäuer, A., Carbonyl-substituierte Titanocene, Deutsche Patentanmeldung 10 2006 054 690.3-44

7. Gansäuer, A., Winkler, I., Worgull, D., Lauterbach, T., Franke, D., Selig, A., Wagner, L., Prokop, A.; Carbonyl-substituted Titanocenes: A novel class of cytostatic compounds with high antitumor and antileukemic activity. *Chemistry Eur. J.*, 2008, 14: 4160-4163

8. Wieder, Th., Eßmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dörken, B., and Daniel, P. T., 2001, 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*, 97: 1378- 1387.

9. Wieder, T., Prokop, A., Bagci, B., Essmann, F., Bernicke, D., Schulze-Osthoff, K., Dörken, B., Schmalz, H.G., Daniel, P.T. and Henze, G., 2001, Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary leukemic lymphoblasts. *Leukemia*, 15: 1735-42.

10. Schmalz, H-G., Wieder, T., Velcicky, J. and Prokop, A., New derivatives of nucleosides inducing apoptosis for use in therapy of diseases that are caused by highly proliferative cells. 2003, *German patent*, No. DE 10305575.4

11. Prokop, A., Wieder, T. and Riepl, H., Derivates of Tryptanthrine for use in therapy of diseases that are caused by highly proliferative cells. 2003, *German patent*, No. DE 10315654.2

12. Prokop, A., Wrasidlo, W., Lode, L., Herold, R., Lang, F., Henze, G., Dörken, B., Wieder, T. and Daniel, P. T., Induction of apoptosis by enediyne antibiotic calicheamicin $\text{C}11$ proceeds through a caspase-mediated mitochondrial amplification loop in an entirely Bax-dependent manner. *Oncogene*, 2003, 22 (57): 9107-20.

13. Diller, R. A., Riepl, H. M., Rose, O. Frias, C., Henze, G. and Prokop, A., Synthesis of demethylxanthohumol, a new potent apoptosis inducing agent from hops, *Chemistry & Biodiversity*, 2005, 2: 1331-1338

14. Diller, R.A., Riepl, H.M., Rose, O., Frias, C., Henze, G., and Prokop, A., Ability of Prenylflavanones present in hops to induce apoptosis in a mitochondrial dependent manner in human Burkitt Lymphoma cell line BJAB, *Plant. Med.*, 2007, 73: 755-761

15. Shults, E.E., J. Velder, J., Schmalz, H.-G., Chernov, S.V., Rubalova, T.V., Gatilov, Y.V., Henze, G., Tolstikov, G.A., and Prokop, A., Gram-scale synthesis of pinusolide and its antileukemic potential, *BMCL*, 2006, 16: 4228 - 4232

16. Seifert, G., Jesse, P., Laengler, A., Reindl, T., Lüth, M. Lobitz, S., Henze, G., Prokop*, A. and Lode* H. N. Molecular mechanisms of Mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro, *Cancer Letters*, 2008, 264: 218-228

17. Prokop, A. and Tatarskiy, V.. Kupfer-Organokomplexe, deren Verwendung als Antitumormittel und zum Schutz gesunden Gewebes vor ionisierender Strahlung, *European patent* No: EP 08 151 840.9., 2008

10.2. Veröffentlichungen anderer Autoren

Abd El-Ghaffar H.A., Aladle D.A., Farahat S.E., Abd El-Hady N. (2006) P-glycoprotein (P-170) expression in acute leukemias. *Hematology*, 11(1):35-41.

Adams, G. M., and S. Cory (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322

Barinaga, M. (1998) Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science*; 281: 1303-4.

Bello C, Sotomayor EM (2007); Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximab and beyond; *Hematology*; 233-42

Bosanquet AG, Bosanquet MI. (2000), Ex vivo assessment of drug response by differential staining cytotoxicity (DiSC) assay suggests a biological basis for equality of chemotherapy irrespective of age for patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 14(4):712-5

Bosanquet AG, Copplestone JA, Johnson SA, Smith AG, Povey SJ, Orchard JA, Oscier DG.(1999), Response to cladribine in previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia identified by ex vivo assessment of drug sensitivity by DiSC

Chapuy B, Koch R, Radunski U, Corsham S, Cheong N, Inagaki N, Ban N, Wenzel D, Reinhardt D, Zapf A, Schweyer S, Kosari F, Klapper W, Truemper L, Wulf GG (2008); Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration; *Leukemia*; 1-11

de Jonge-Peeters SD, Kuipers F, de Vries EG, Vellenga E (2007); ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance; *Crit Rev Oncol Hematol.*;62(3):214-26

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33

Essmann, F., Wieder, T., Otto, A., Müller, E.C., Dörken, B., and Daniel, P.T. (2000) 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*; 346: 777-83.

Estrov, Z., P.F. Thall, M. Talpaz, E. H. Estey, H.M. Kantarjian, M. Andreeff, D. Harris, Q. Van, M. Walterscheid and S.M. Kornblau (1998) Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 92: 3090

Findley, H.W., L. Gu, M. Yeager and M. Zhou (1997) Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xL and Bax correlates with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood ALL. *Blood* 89: 2986

Fujita M, Lee BS, Khazenzon NM, Penichet ML, Wawrowsky KA, Patil R, Ding H, Holler E, Black KL, Ljubimova JY (2007), Brain tumor tandem targeting using a combination of monoclonal antibodies attached to biopoly(beta-L-malic acid), *J Control Release*, 122(3):356-63

Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeier, C., und Ritter J., (2006), *Pädiatrie Hämatologie und Onkologie*: 471-484

Ge Y, Rikihisa Y. (2007), Identification of novel surface proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by affinity purification and proteomics. *J Bacteriol.*, 189(21):7819-28

Hannun, Y.A. (1997) Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*; 89: 1845-53.

Henze, G., Fengler, R. und Stackelberg, A. (2002). ALL-Rezidiv-GPOH-Studien-Protokoll ALL-REZ 2002 zur Therapie des Rezidivs der akuten lymphoblastischen Leukämie, Charité Universitätsmedizin Berlin,

Hickman, J.A. (1996) Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer*; 32A: 921-6.

Ichihara H, Nagami H, Kiyokawa T, Matsumoto Y, Ueoka R, Chemotherapy using hybridliposomes along with induction of apoptosis (2008), *Anticancer Res.*, (2B):1187-95.

Kaspers GJ. (2005), Use of the differential staining cytotoxicity assay to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med.*, 110:49-57

Kastan, M.B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein and R.W. Craig (1991) Participation of p53 protein in cellular response to DNS damage. *Cancer Res* 51: 6304

Kelland, L. (2007); The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy; *Nature Reviews Cancer* 7, 573-584

Kroemer, G., and J.C. Reed (2000) Mitochondrial control of death. *Nat. Med.* 6: 513

Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, Löwenberg B, Estey EH, Dombret H, Theobald M, Voliotis D, Bennett JM, Richie M, Leopold LH, Berger MS, Sherman ML, Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR (2005); Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence; 104(7):1442-52

Ljubimova JY, Fujita M, Khazenzon NM, Lee BS, Wachsmann-Hogiu S, Farkas DL, BlackKL, Holler E. (2008), Nanoconjugate based on poly(malic acid) for tumor targeting, *Chem Biol Interact*, 171(2):195-203

Low WK, Dang Y, Schneider-Poetsch T, Shi Z, Choi NS, Rzasa RM, Shea HA, Li S, Park K, Ma G, Romo D, Liu JO. (2007), Isolation and identification of eukaryotic initiation factor 4A as a molecular target for the marine natural product Pateamine A. *Methods Enzymol.*, 431:303-24

Lowe, S. W., S. Bodis, A. McClatchey, L. Remington, H.E. Ruley, D.E. Fisher, D.E. Housman and T. Jachs (1994) p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266: 807

Lüder H. Meyer, Manon Queudeville, Sarah M. Eckhoff, Ursula Creutzig, Dirk Reinhardt, Leonid Karawajew, Wolf-Dieter Ludwig, Karsten Stahnke, and Klaus-Michael Debatin (2008) Intact apoptosis signaling in myeloid leukemia cells determines treatment outcome in childhood AML, *Blood Neoplasia*, 1 March 2008, Vol. 111, No. 5, pp. 2899-2903

Lüder Hinrich, Meyer, Leonid Karawajew, Martin Schrappe, Wolf-Dieter Ludwig, Klaus-Michael Debatin, and Karsten Stahnke (2008) Cytochrome c-related caspase-activation determines treatment response and relapse in childhood precursor B-cell ALL, *Blood Neoplasia*, 1 June 2006, Vol. 107, No. 11, pp. 4524-4531.

Raymond E, Faivre S, Coudray AM, Louvet C, Gespach C. (2001); Preclinical studies of oxaliplatin in combination chemotherapy; *Bull Cancer.*; 88 Spec No:S26-34.

Schrappe, Reiter, A. und Riehm, H. (2000). ALL BFM 2000 GPOH-Studien-Protokoll zur Therapie der Akuten lymphoblastischen Leukämie, Medizinische Hochschule Hannover.

Sherr, C., and J. Weber (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Gen Develop* 10: 94

I. Sturm, C. H. Kohne, G. Wolff, H. Petrowsky, T. Hillebrand, S. Hauptmann, M. Lorenz, B. Dörken and P. T. Daniel (1999) Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol*; 17: 1364-74.

Styczynski J, Wysocki M, Debski R, Czyzewski K, Kolodziej B, Rafinska B, Kubicka M, Koltan S, Koltan A, Pogorzala M, Kurylak A, Olszewska-Slonina D, Balwierz W, Juraszewska E, Wieczorek M, Olejnik I, Krawczuk-Rybak M, Kuzmich M, Kowalczyk J, Stefaniak J, Badowska W, Sonta-Jakimczyk D, Szczepanski T, Matysiak M, Malinowska I, Stanczak E, Wachowiak J, Konatkowska B, Gil L, Balcerska A, Maciejka-Kapuscinska L. (2007) Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133(11):875-93.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267: 1456-62.

Zhang X, Yang F, Shim JY, Kirk KL, Anderson DE, Chen X. (2007), Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett.*, 255(1):95-106

Zhou, M. L. Gu, T. Abshire, A. Homans, A. Billett, A. Yeager and H. Findley (2000) Incidence and prognostic significance of MDM2 oncoprotein overexpression in relapsed childhood ALL. *Leukemia* 14: 61-67

11. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem langjährigen Kooperationspartner und Freund Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz für die vielen fruchtbaren und erfolgreichen Jahre gemeinsamer Forschung bedanken, in denen eine Tür zu neuen Feldern biometallorganischer zytostatischer Wirkstoffe geöffnet wurde. Dieses Feld wurde bereichert durch die vertrauensvolle Kooperation mit Prof. Dr. Dr. Valeriy Tatarskiy und dessen Frau Svetlana Zadolinnaya, welche sogar eine erste klinische Anwendung ermöglichte. Der Horizont dieses neuen Feldes zytostatischer Wirkstoffe wurde durch die Resultate der erfolgreichen freundschaftlichen Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Gansäuer erweitert. Nun besteht die Chance, mit den Kooperationspartnern der DFG-Forschergruppe FOR 630 dieses Feld großflächig zu bearbeiten und für künftige Patienten die Grundsteine für wirksamere Medikamente gegen bösartige Erkrankungen zu legen.

Meinen Patienten und deren Eltern danke ich für die Kraft und Energie, die sie mir durch ihre beispiellose, vorbildliche Tapferkeit und andauernde Hoffnung zuteil werden ließen, um diese Forschungsleistung erbringen zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. Günter Henze möchte ich für das Vertrauen und die Ermöglichung der Gründung meiner Arbeitsgruppe „Experimentelle Onkologie“ in der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie / Hämatologie der Charité nicht nur deshalb danken, weil meine Forschungsschwerpunkte „biometallorganische Wirkstoffe“ und „Naturstoffe“ für einen ausgewiesenen Kinderonkologen zunächst eher fachfremd hätten erscheinen können. Bei allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, die zu dem ausgezeichneten, keimfreien Klima im Labor beigetragen haben, bedanke ich mich für ihr großes persönliches Engagement in der Krebs-Forschung.

Meinen Eltern danke dafür, dass sie in frühen Jahren Kristallisationskeime für mein Interesse an den Naturwissenschaften und der Forschung gesetzt haben. Sie ließen mich in meinem „Labor“ gewähren, obwohl dies manchmal nicht einfach war.

Meiner Frau Ursula Schwarz-Prokop und unseren Kindern Timon, Andor und Aileen, die für mich als Familie immer ein Rückhalt und eine Motivation gewesen sind, möchte ich für die zahlreichen Entbehrungen danken, die sie für diese Arbeit in den Zeiten erbracht haben, wo ich kaum oder nur bedingt ansprechbar gewesen bin, da ich mich gerade mit nahezu alltäglichen menschlichen Problemen wie Apoptosesignalkaskade, Caspaseinhibitoren, Targetidentifikation biometallorganischer Wirkstoffe, mitochondriales Membranpotential, Genexpressionsanalyse und Überwindung von Zytostatika-Resistenz in Lymphoblasten beschäftigt habe.

12. Eidesstattliche Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité Berlin

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift