

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

DISSERTATION

Synthetische metallorganische Verbindungen als Apoptoseinduktoren

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Wagner

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
 2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Westermann
 3. Prof. Dr. med. N. Graf

Datum der Promotion: 07.09.2012

Zusammenfassung

ALL und AML sind die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindesalter. Die Behandlung besteht aus einer Polychemotherapie im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes. Eine besondere therapeutische Hürde stellt dabei die Resistenz von an einem Tumorrezidiv erkrankten Patienten gegenüber den konventionellen Chemotherapeutika dar. Cisplatin und dessen Analoga sind eine in der Krebstherapie bewährte Klasse, die jedoch mit vielen Nebenwirkungen behaftet ist und bis heute in der Leukämie-Therapie im Kindesalter keine Anwendung findet. Im Fokus der Forschung stehen aktuell unter anderem metallorganische Verbindungen wie beispielsweise Eisen, Ruthenium oder Titanium-Komplexe. Das Ziel ist, neue Wirkstoffe zu entwickeln, die gezielt in den malignen Zellen Apoptose induzieren und dabei idealerweise nebenwirkungsärmer sind als die bisher eingesetzten Substanzen.

In dieser Arbeit habe ich die biologische Aktivität Carbonyl-substituierter Titanocene und deren Wirkung auf maligne Zellen untersucht. Es wurden 17 verschiedene Verbindungen auf ihr anti-proliferatives und zytotoxisches Potential untersucht und eine erste Struktur-Wirkungs-Beziehung aufgestellt. Die Versuche erfolgten *in vitro* mit verschiedenen Tumorzelllinien, *ex vivo* mit humanen Lymphozyten und *in vivo* im Mausmodell. Elf der untersuchten Substanzen zeigten eine deutliche Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung. Auch in Lymphoblasten von an AML oder ALL erkrankten Kindern zeigten die getesteten Verbindungen teilweise eine Überlegenheit gegenüber den in der Therapie eingesetzten Substanzen. Die beiden potentesten Substanzen (IW283 und IW293) wurden bezüglich des jeweiligen Apoptosepathways untersucht. Beide entfalten ihre Wirkung FADD-unabhängig über den mitochondrialen Pathway. IW283 wurde zusätzlich im Mausmodell getestet. Es zeigte bei einer verhältnismäßig starken Toxizität im Gastrointestinaltrakt die Fähigkeit, das Tumorwachstum um 30% im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verlangsamen. Mit der fluoreszierenden Substanz IW293 wurde untersucht, wo die Verbindung intrazellulär angereichert wird. Außerdem wurde an einer gegen Doxorubicin resistenten Zelllinie gezeigt, dass in Tumorzellen Resistenzen gegen herkömmliche Zytostatika von IW283 und IW293 überwunden werden können.

Schlagwörter: Titanocene, Apoptose, ALL, AML, Krebs, Resistenz

Abstract

ALL is the most frequent malignancy in childhood. Therapeutic regimen is a composition of polychemotherapy as part of a multimodal therapy concept. One of the main obstacles that prevent successful therapy are mechanisms of resistance of cancer cells against certain established drugs. Cisplatin and its analogues are a tried and tested class of antitumor agents, though its shortcomings consist of severe side effects as well as instability and short half-life in the human body. Various research teams are currently focusing on different organometallic compounds such as iron, ruthenium or titanium-complexes substituted with various ligands modulating the efficacy. Pharmacological studies aim at identifying new lead compounds that induce apoptosis specifically in malignant cells. Higher efficacy and availability are ideally less prone to evoke adverse effects than today's clinically approved substances.

In my thesis I investigated the biological activity of carbonyl-substituted titanocenes and their effect on malignant cells. 17 different compounds were tested in respect of their anti-proliferative and cytotoxic potential. A first structure-response-relationship was established. We conducted *in vitro* experiments with different human cancer cell lines, *ex vivo* experiments with human leukemia cells and finally *in vivo* studies in mice. Eleven of the tested substances induced apoptosis to a considerable degree and showed a remarkable ability to inhibit proliferation. *Ex vivo* some of the compounds proved superior to substances used in current chemotherapy.

Two of the most promising titanocenes (namely IW283 and IW293) were studied in regards to the apoptotic pathway induced by these substances. Both substances acted independently from FADD and apoptosis is induced via the mitochondrial pathway.

In addition to mechanistic studies, IW283 was tested in a mouse model, using BJAB-xenografts. While showing relatively high cytotoxicity in the gastrointestinal tract, the agent was able to slow down tumor progression by 30% in comparison to the untreated control. The fluorescent compound IW293 was used to determine the intracellular target. By means of a doxorubicin resistant cell line (BJAB 7-CCA) I showed that both IW283 and IW293 induce apoptosis in resistant cells.

Of the tested titanocenes especially IW283 and IW293 showed very promising results and further research should be done to tap the full potential of these substances.

Keywords: Titanocenes, apoptosis, cancer, ALL, AML, resistance

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 ALL und AML im Kindesalter	2
1.1.1 Therapie	3
1.1.2 Therapieresistenzen	5
1.2 Titanocene	5
1.3 Apoptose	8
1.3.1 Definition	8
1.3.2 Apoptosesignalwege	9
1.3.3 Caspasen	11
1.3.4 Apoptose in der Therapie maligner Erkrankungen	11
1.3.5 Ziel der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Geräte	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.4 Zytostatika	15
2.1.5 Kommerzielle Kits	16
2.1.6 Puffer	16
2.1.7 Western Blot	17

2.1.8	Nährmedien	17
2.1.9	Antikörper	18
2.1.10	Zellen	18
2.1.11	Mäuse	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellbiologische Methoden	21
2.2.2	Biochemische Methoden	23
2.2.3	Apoptose und Zytotoxizitätsassays	26
2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	30
2.2.5	Tierversuche	31
2.2.6	Datenauswertung und Statistik	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Übersicht IW-Substanzen	33
3.1.1	Amide	34
3.1.2	Ketone	34
3.1.3	Struktur-Wirkungs-Beziehung	35
3.2	IW283 und IW293	38
3.2.1	Proliferationshemmung	38
3.2.2	Vitalität	39
3.2.3	DNA-Fragmentierung	40
3.2.4	Annexin-Propidiumjodid-Doppelfärbung	41
3.2.5	MCF-7, NALM 6	42
3.2.6	Doxorubicin-resistente Zellen	44
3.3	<i>Ex vivo</i> Versuche	46
3.3.1	Patientenmaterial	46
3.3.2	Selektivität	49
3.4	<i>In vivo</i> Versuche am Mausmodell	51
3.4.1	Tierversuche zur Tumorreduktion	51
3.5	Mechanistische Untersuchungen	53
3.5.1	Westernblot	53
3.5.2	Extrinsischer Apoptosesignalweg	55
3.5.3	Mitochondrialer Apoptosesignalweg	57

3.6	Weitere Faktoren des mitochondrialen Signalweges	60
3.6.1	MelHo bcl2/pIRES	60
3.6.2	smac/DIABLO	64
3.6.3	Fluoreszenz/Mitochondrien	70
4	Diskussion	77
4.1	Struktur-Wirkungs-Beziehung	77
4.2	Vergleich mit anderen Titanocenen	79
4.2.1	Vergleich mit Cisplatin	80
4.3	Apoptose oder Nekrose?	81
4.3.1	Einfluss von Bcl-2	83
4.4	Target/Signalweg	84
4.5	Wege in die Zelle	87
4.6	Resistenz gegenüber Doxorubicin	89
4.7	<i>Ex vivo</i> -Versuche	90
4.7.1	Untersuchungen zur Selektivität	90
4.7.2	Patientendaten	91
4.8	<i>In Vivo</i> -Versuche	92
4.8.1	IW283 im Mausmodell	92
4.9	Ausblick	94
	Literaturverzeichnis	96

Abbildungsverzeichnis

1.1	Cisplatin	6
1.2	Titanocendichlorid	6
1.3	Morphologische Veränderungen bei Apoptose und Nekrose	9
1.4	Apoptosesignalweg	10
3.1	Strukturformeln Amidsubstituierte Titanocene	36
3.2	Strukturformeln Ketonsubstituierte Titanocene	37
3.3	Proliferationshemmung von BJAB-Zellen durch IW283 und IW293	39
3.4	Vitalität BJAB. IW283 bzw. IW293	39
3.5	Morphologische Apoptosezeichen. Lichtmikroskopie.	40
3.6	DNA-Fragmentierung BJAB. IW283 bzw. IW293	41
3.7	Annexin-Propidiumjodid-Doppelfärbung	42
3.8	DNA-Fragmentierung Nalm	43
3.9	DNA-Fragmentierung MCF 7	44
3.10	DNA-Fragmentierung Doxorubicin-resistente Zellen	45
3.11	<i>Ex vivo</i> Apoptoseinduktion ALL und AML	47
3.12	<i>Ex vivo</i> Apoptoseinduktion ALL	48
3.13	DNA-Fragmentierung BJAB und humane Lymphozyten. IW283 und IW293.	49
3.14	Proliferationshemmung BJAB und humane Lymphozyten. IW283 und IW293.	51
3.15	Tierversuch Tumorreduktion	52
3.16	Westernblotanalyse der Caspase-3-Prozessierung	53
3.17	Westernblotanalyse der PARP-Prozessierung	54
3.18	Nachweis β -Actin	54
3.19	DNA-Fragmentierung BJABmock und FADD dn durch IW283	55
3.20	DNA-Fragmentierung BJABmock und FADD dn durch IW293	56

3.21	JC-1	58
3.22	Westernblotanalyse der Caspase-9-Prozessierung	59
3.23	Cytochrom C-Release nach Inkubation mit 15 μ M IW283	59
3.24	DNA-Fragmentierung MelHO Bcl-2 und pIRES durch IW283	61
3.25	Proliferationshemmung MelHO Bcl-2 und pIRES durch IW283	62
3.26	DNA-Fragmentierung MelHO Bcl-2 und pIRES durch IW293	63
3.27	Proliferationshemmung MelHO bcl-2 und pIRES durch IW293	64
3.28	Proliferation Jurkat IW283	65
3.29	Vitalität Jurkat IW283	66
3.30	DNA-Fragmentierung Jurkat IW283	67
3.31	Proliferation Jurkat IW293	68
3.32	Vitalität Jurkat IW293	69
3.33	DNA-Fragmentierung Jurkat IW293	70
3.34	Fluoreszenzmikroskopie Kontrolle	71
3.35	Fluoreszenzmikroskopie 20 μ M IW293	71
3.36	Fluoreszenzmikroskopie 40 μ M IW293	72
3.37	Fluoreszenzmikroskopie Mitotracker Kontrolle	73
3.38	Fluoreszenzmikroskopie Mitotracker 20 μ M IW293 3 Stunden	74
3.39	Fluoreszenzmikroskopie Mitotracker 20 μ M IW293 24 Stunden	74
3.40	Fluoreszenzmikroskopie Mitotracker 40 μ M IW293 3 Stunden	75
3.41	Fluoreszenzmikroskopie Mitotracker 40 μ M IW293 24 Stunden	76
4.1	Struktur-Wirkungsbeziehung IW109, 206 und 283	78
4.2	Strukturformeln IW293 und IW283 im Vergleich	78

Tabellenverzeichnis

3.1	Amidsubstituierte Titanocenkomplexe	34
3.2	Ketonsubstituierte Titanocenkomplexe	35
3.3	Mann-Whitney-Test Bjab/BJAB 7-CCA	45
3.4	Wilcoxon-Test Patienten gesamt	47
3.5	Wilcoxon-Test Patienten ALL	49
3.6	Mann-Whitney-Test ZZ BJAB/Lymphozyten	50
3.7	Mann-Whitney-Test BJAB mock/FADD IW283	56
3.8	Mann-Whitney-Test ZZ BJAB mock/FADD IW293	57
3.9	Mann-Whitney-Test ZZ MelHo IW283	61
3.10	Mann-Whitney-Test Proli MelHo IW283	62
3.11	Mann-Whitney-Test ZZ MelHo IW293	63
3.12	Mann-Whitney-Test Proliferation MelHo IW293	64
3.13	Mann-Whitney-Test Proliferation Jurkat IW283	65
3.14	Mann-Whitney-Test Vitalität Jurkat IW283	66
3.15	Mann-Whitney-Test ZZ Jurkat IW283	67
3.16	Mann-Whitney-Test Proliferation Jurkat IW293	68
3.17	Mann-Whitney-Test Vitalität Jurkat IW293	69
3.18	Mann-Whitney-Test ZZ Jurkat IW293	70

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\psi_m$	Mitochondriales inneres Transmembranpotential
AIF	Apoptosis inducing factor
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BH	Bcl-2 Homology Domain
BIR	Baculovirus IAP Repeat; Name der konservierten Domänen der IAP-Familie
BJAB	Burkittlike Lymphoma Zelllinie
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CML	Chronische myeloische Leukämie
CpG-Inseln	genomische Regionen mit statistisch erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
Cyt C	Cytochrom C

DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFF45	DNA Fragmentation Factor (45 kDa); humaner Inhibitor von CAD
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FACS	Fluorescent-Activated Cell Sorting
FADD	Fas associated death domain
FITC	Fluorescein-iso-thiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
HRP	Horseradish peroxidase
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimid-azolyldicyanin-iodid
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
MDR	Multiple Drug Resistance
MRP	Multiple Drug Resistance Protein
NaN ₃	Natriumazid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Programmed Cell Death
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodide
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RZF RING	Zink-Finger
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SZT	Stammzelltransplantation
tBid	truncated Bid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VDAC	Voltage-dependent Anion Channel

1 Einleitung

Maligne Erkrankungen sind nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Dabei sind die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindesalter Leukämien. Die Leukämie (von altgriechisch leukos „weiß“ und haima „das Blut“) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden System und zeichnet sich durch eine starke Vermehrung von Leukozyten bzw. deren funktionsuntüchtigen Vorstufen aus. Die entarteten Zellen haben die Fähigkeit verloren, ihr eigenes Wachstum in einer für den Gesamtorganismus sinnvollen Weise zu regulieren. Das Krankheitsbild wurde 1845 fast zeitgleich und unabhängig voneinander von dem schottischen Pathologen John Hughes Bennett, dem Franzosen Alfred Donné und Rudolf Virchow beschrieben, wobei letzterer die Bezeichnung „Leukämie“ prägte. Durch die Knochenmarksinfiltration kommt es zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung, was zu einer Anämie und Thrombozytopenie führen kann. Auch parenchymatöse Organe wie Leber und Milz können infiltriert werden. Ziel der pharmakologischen Behandlungsstrategien in der Krebstherapie ist daher die Proliferationshemmung und gezielte Apoptoseinduktion der malignen Zellen durch die jeweiligen Chemotherapeutika. Verschiedene Resistenzmechanismen der bösartigen Zellen schränken den Erfolg der Chemotherapie stark ein und verschlechtern so die Prognose der Patienten. Dies erklärt den Bedarf an neuartigen Substanzen, die in der Lage sind, diese Resistenzen zu überwinden.

Die Arbeitsgruppe um Professor Gansäuer des Kekulé-Instituts für Chemie und Biochemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn synthetisierte eine völlig neue Gruppe von Titan-Komplexen, die in Vorversuchen eine sehr viel versprechende zytotoxische Wirkung zeigte. Die einzelnen Vertreter der Stoffklasse der Titanocene wurden mit verschiedenen Substituenten versehen und mir zur Testung auf Tumorzelllinien unterschiedlicher Ätiologie überlassen. Die synthetisierten Verbindungen zeigen unterschiedlich starke biologische Wirkung und haben möglicherweise auch unterschiedliche Wirkmechanismen. Das

chemopräventive bzw. chemotherapeutische Potential der metallorganischen Verbindungen sowie die Struktur-Wirkungs-Beziehung wurden in humanen Zelllinien und in primären Lymphoblasten von Kindern mit verschiedenen ALL- und AML-Subtypen *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Zusätzlich wurde der antileukämische Effekt der Wirkstoffe mit Zytostatika verglichen, die therapeutisch in der Klinik angewendet werden. Der *in vitro* potenteste Vertreter der synthetisierten Titanocene wurde darüber hinaus im Mausmodell auf Wirksamkeit und Toxizität getestet. Um die Wirkmechanismen der Substanzen zu verstehen, wurde mit Hilfe von genetisch veränderten Zellen untersucht, über welchen Signaltransduktionsweg die Apoptosekaskade initiiert wird. Erste Versuche, die Zielstruktur der Substanzen zu identifizieren, erfolgten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

1.1 Akute lymphoblastische und akute myeloische Leukämie im Kindesalter

Die Leukämie ist mit vier Erkrankungen pro 100000 Einwohner < 15 Jahre und einem Anteil von 33% die häufigste der malignen Neuerkrankungen im Kindes- und Jugendalter¹. Mit 80% ist die Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) die häufigste Leukämieform in dieser Altersgruppe. Pro Jahr erkranken ca. 550 bis 600 Kinder in Deutschland an einer ALL, etwa 16% dieser Kinder erleiden ein Rezidiv. Die Inzidenz ist etwa fünfmal höher als bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) (0,7/100 000). Das Alter bei Erstdiagnose beträgt bei der ALL im Median 4,7 Jahre, bei der AML 7,9 Jahre. Die Altersverteilung zeigt bei der ALL einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr, bei der AML einen geringen Häufigkeitsgipfel in den ersten zwei Lebensjahren und anschließend einen leichten Anstieg in der Inzidenz vom 13. Lebensjahr an. Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt 1,2:1 bei der ALL und 1,1:1 bei der AML. Während die durchschnittliche Überlebensdauer bei der Erkrankung an ALL vor Entwicklung der heutigen Chemotherapie-regimes etwa 4 Monate betrug, liegt die 5-Jahresüberlebensrate nach Erstdiagnose heute bei ca. 87%. Während die Erkrankung noch in den 1970er Jahren fast immer tödlich verlaufen ist², ist heute durch moderne Diagnostik und standardisierte, kombinierte Chemotherapie eine Heilung von ca. 80% der an einer ALL erkrankten Kinder möglich, bei Kindern mit AML können ca. 55 - 60% geheilt werden³. Meilensteine, die zu einer Verbesserung des

Therapieerfolges beigetragen haben, waren unter anderem die ZNS-Prophylaxe sowie die Reinduktion nach Erreichen einer initialen Remission⁴. Die Prognose ist teilweise sehr viel schlechter, wenn die Kinder nicht gut auf die Chemotherapie ansprechen, an schwer zu behandelnden Unterformen leiden oder initial sehr hohe Leukozytenzahlen aufweisen. Im Falle eines Rezidivs der Erkrankung liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei 35 - 40%^{5,6}. Der Grund für das Auftreten eines Rezidivs ist bis heute letztlich unklar. Die Therapie wird risikoadaptiert mit geprüften Polychemotherapieelementen (Induktion, Konsolidierung, Reintensivierung, Erhaltungstherapie) durchgeführt⁷. Sie hat das Ziel, durch frühe Therapieintensivierung einer Resistenzentwicklung vorzubeugen. Die Klassifikation der Erkrankung erfolgt auf der Basis der Morphologie (FAB-Klassifikation: L1, L2, L3 und M0 - M7), der Zytochemie, des Immunphänotyps und der zyto- und molekulargenetischen Befunde.

1.1.1 Therapie

Die ALL im Kindesalter wird seit ca. 40 Jahren mit Chemotherapie und Bestrahlung behandelt. Die Stratifizierung der Therapie erfolgt anhand einer Kombination prognostischer Faktoren, die bei Diagnosestellung erfasst werden. International werden neben seltenen molekulargenetischen Veränderungen vor allem die initiale Leukozytenzahl, der Befall des Zentralnervensystems, das Alter und das Ansprechen auf die Therapie, daneben von einigen Gruppen der Immunphänotyp und die Ploidie als wichtigste Risikofaktoren angesehen. Die Translokationen t(9;22) und t(4;11) gelten als Qualifikationsmerkmale für eine Intensivchemotherapie einschließlich allogener Stammzelltransplantation. Eine unzureichende frühe Therapieantwort wird durch die intrinsische *in vivo* Resistenz beschrieben. Diese Patientengruppe ist zwar biologisch heterogen, zeigt aber ein recht homogenes Rezidivverhalten. Der Nachweis von Hyperdiploidie (> 50 Chromosomen) und des Fusionsgens TEL-AML1 gelten als prognostisch günstige Parameter. Die Therapiequalität ist für die Prognose entscheidend; daher sind die genannten Faktoren nur bei Anwendung adäquater, intensiver Therapiemodalitäten gültig. In der ALL-BFM 2000 Studie wurde die Wertigkeit der minimalen Resterkrankung (MRD) zur Therapiestratifizierung geprüft. Als MRD wird die Anzahl von residualen Blasten bezeichnet, die nach Induktions- und Konsolidierungsphase im Knochenmark persistieren. Das MRD-Niveau korreliert nach Flohr et al. mit dem Rezidivrisiko⁸.

1.1.1.1 Chemotherapie

Die in der Krebstherapie verwendeten Chemotherapeutika verhindern oder verzögern die Proliferation der Tumorzellen und können anhand ihrer Wirkungsweise in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet Alkylantien, DNA-Interkalantien, Mitosehemmer, Topoisomeraseinhibitoren und Antimetabolite. Hinzu kommen neuere Zytostatikaklassen wie Hormone, monoklonale Antikörper, Zytokine und Signaltransduktionshemmer. Alkylierende Substanzen sind mit zwei oder mehr funktionellen Gruppen versehen und können so zwei DNA-Stränge vernetzen. Auf diese Weise wird verhindert, dass die DNA während der Zellteilung korrekt repliziert werden kann. Alkylantien können die DNA-Struktur auch aufbrechen und somit unbrauchbar machen. Auch Platinanaloga sorgen für eine Quervernetzung der DNA durch kovalente Bindung des Platinatoms an zwei Nukleinbasen. Interkalantien binden nicht-kovalent an die DNA und verhindern die Anbindung der Polymerasen, welche zur Replikation und Transkription der Erbsubstanz dienen. Die wichtigsten Interkalantien sind die Anthracycline, die durch Einlagerung in die DNA zur Radikalbildung und zu DNA-Strangbrüchen führen. Mitosehemmer („Spindelgifte“) binden an das Tubulin, ein Eiweißmakromolekül, welches zur Zellteilung notwendig ist. Topoisomeraseinhibitoren unterbinden die Replikation der DNA, indem sie die Enzyme Topoisomerase I und II, die für gezielte und reversible Unterbrechungen der DNA-Stränge verantwortlich sind, hemmen. Durch die Hemmung kommt es zu irregulären, nicht behebbaren DNA-Brüchen und spontanen Vernetzungen. Antimetabolite, auch Nukleosidanaloga genannt, werden als fehlerhafte Bausteine in die DNA oder RNA eingebaut oder verhindern den Einbau der korrekten Bausteine, und führen so zum Abbruch der Replikation oder durch fehlerhaftes Ablesen zu einer gestörten DNA-Reparatur. Die Folge ist wie bei den anderen Zytostatika eine Störung der Zellteilung und des Zellstoffwechsels. Besonders sich schnell teilende Zellen reagieren empfindlich auf Störungen der DNA-Replikation, des Spindelaufbaus oder der Energiebereitstellung. Zytostatika entfalten ihre Wirkung also vornehmlich auf rasch proliferierenden Zellen. Die Nebenwirkungen sind enorm und häufig therapielimitierend.

Die Chemotherapie zur Behandlung der ALL und der AML im Kindesalter besteht im wesentlichen aus vier tragenden Elementen, in denen die Abfolge und die Dosierung der verschiedenen Medikamente exakt festgelegt ist, wobei die Steuerung sich an bestimmten Richtwerten orientiert. Die Durchführung orientiert sich an den Empfehlungen des jeweils gültigen Therapieprotokolls. Dabei spielt die Kombination verschiedener Chemotherapeutika

als Polytherapie eine bedeutende Rolle. Die wichtigsten Substanzen in der ALL-Therapie sind Prednison, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin, Dexamethason, Doxorubicin und Thioguanin. Grundsätzlich kommt nur eine Auswahl der genannten Substanzen in festgelegter Abfolge zum Einsatz. Die Erhaltungstherapie wird anhand der Leukozyten- bzw. Lymphozytenzahl gesteuert: Angestrebt wird eine Leukozytenzahl von 2000 - 3000/mm³ und eine Lymphozytenzahl von >300/mm³. Das Ziel der Therapie ist die komplette Remission, also der Zustand, bei dem morphologisch (mikroskopisch) keine malignen Zellen im Knochenmark oder peripher nachweisbar sind, basierend auf dem „total cell kill“-Konzept⁹. Es sollen alle malignen Zellen getötet werden, da schon eine kleine Population entarteter Zellen zu einem Rezidiv der Erkrankung führen kann. Neben einer aggressiven Chemotherapie spielt die supportive Therapie eine große Rolle um die Nebenwirkungen in Grenzen zu halten. Außerdem ist eine gute psychosoziale Betreuung der Patienten und deren Familien von immenser Bedeutung für den Therapieerfolg.

1.1.2 Therapieresistenzen

Für eine Therapieresistenz sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Generell muss unterschieden werden zwischen einer primären bzw. intrinsischen Resistenz und einer sekundären, erworbenen Resistenz, die durch die entsprechende Therapie induziert wurde¹⁰. Beschrieben sind neben alternativen ABC-Transportern wie dem P-Glykoprotein und den MDR-assoziierten Proteinen (MRP), die durch aktives Ausschleusen Substanzen am Erreichen ihres intrazellulären Targets hindern¹¹, beispielsweise auch DNA-Topoisomerasen. Auch die intrazelluläre Kompartimentierung, Detoxifizierung über Glutathion-S-Transferasen, Phosphorylierungen über Proteinkinase C, DNA-Reparatursysteme und Defekte bzw. eine Modulation der Apoptosekaskade¹² spielen eine Rolle in der Entwicklung von Resistenzen.

1.2 Titanocene

Seit der Entdeckung der zytostatischen Aktivität von Cisplatin (s. Abb. 1.1) in den 1960er Jahren¹³ wurden viele metallorganische Verbindungen auf ihre Wirksamkeit gegen Krebs untersucht. Dies ist nicht zuletzt auf den herausragenden Erfolg von Cisplatin zurückzuführen¹³⁻¹⁶, das im klinischen Bereich eine breite Anwendung in der Behandlung verschiedenster maligner Erkrankungen (Ovarialcarcinome, Cervix- und Endometriumcarcinome, Hodencarci-

nome, Blasenkarzinome, Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sowie als Zweitlinientherapie in der Behandlung von Mammacarcinomen) findet¹⁷.

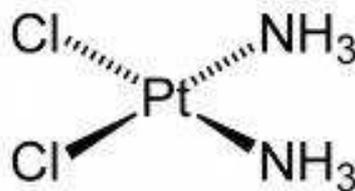


Abbildung 1.1: Strukturformel von Cisplatin

Der Einsatz von platinhaltigen Verbindungen ist nicht zuletzt durch die ausgeprägte Myelotoxizität und Nephrotoxizität begrenzt, so dass der Ersatz oder zumindest die Ergänzung durch nebenwirkungsärmere und ebenso effektive – oder effektivere – Substanzen wünschenswert ist. Titanverbindungen stehen, neben anderen Metallkomplexverbindungen wie Eisen-, Platin-, Gallium- und Rutheniumkomplexen¹⁸⁻²¹ schon lange im Mittelpunkt chemischer Untersuchungen.

Von den Titanverbindungen haben sich besonders Derivate von Titanocendichlorid (s. Abb. 1.2) als vielversprechend erwiesen. Neben Eisen- und Rutheniumverbindungen zeigen auch Vanadium, Niob und Molybdän-Verbindungen, aber auch Hauptgruppen-Metallocene von Zinn und Germanium eine gewisse Aktivität gegen Krebszellen, die jedoch nicht an die von Titanocendichlorid heranreicht.

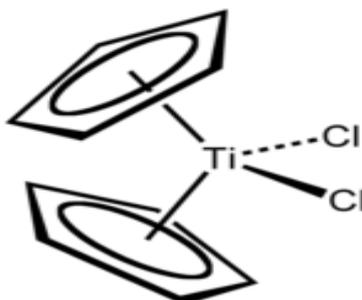


Abbildung 1.2: Strukturformel von Titanocendichlorid.

Titanocendichlorid wurde, laut Köpf-Maier und Köpf, aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten zu cis-Platin auf seine zytostatischen Eigenschaften untersucht²². Im Anschluss daran erfolgten klinische Studien bis in die Phase II²³. Aufgrund zu geringer Aktivität der Substanz wurde jedoch keine Phase-III-Studie unternommen. Es konnte gezeigt werden,

dass Titanocendichlorid gegen eine Vielzahl von Krebsarten wirksam ist, darunter Lungen-, Darm- oder Brusttumore, und dabei keine Myelotoxizität und keine Nephrotoxizität aufweist. Weiterhin ist die Substanz auch aktiv in cis-Platin resistenten Krebszellen²⁴. Noch vor Titanocendichlorid wurde Budotitan in klinischen Studien untersucht. Nach cis-Platin war es der zweite metallorganische Komplex, der in klinischen Studien auf seine zytostatischen Wirksamkeit untersucht wurde. Bereits nach der ersten Phase wurden die Studien allerdings beendet, da die schnelle Hydrolyse ein zu großes Problem darstellte²⁵. Um neue, bessere Präparate herzustellen, ist es wichtig deren Wirkungsmechanismus zu kennen. Dieser ist für cis-Platin bekannt, der Wirkmechanismus der Titanocene ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch Gegenstand wissenschaftlicher Debatte. Bevor jedoch der Wirkmechanismus untersucht werden kann, müssen Titanocene zur Verfügung stehen, die ausreichende biologische Aktivität zeigen. Diese ist abhängig von der chemischen Struktur der Substanzen. Um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung aufstellen zu können, müssen viele unterschiedliche Titanocenderivate untersucht werden. Um diese in kurzer Zeit synthetisieren zu können, ist es wichtig, eine sinnvolle Synthesestrategie zu haben. Bisher war der Zugang zu funktionalisierten Titanocenen dadurch eingeschränkt, dass für jede neue Substanz ein andere Syntheseroute beschränkt werden musste. Die Arbeitsgruppe um Professor Gansäuer des Kekulé-Instituts für organische Chemie in Bonn entwickelte eine modulare Synthesestrategie, mit deren Hilfe es möglich ist, in kurzer Zeit eine Vielzahl verschiedener Titanocen-Komplexe herzustellen. Die Methode basiert auf der Verwendung titanocenhaltiger Carbonsäurechloride²⁶. In jedem Schritt kann, durch Austausch eines Edukts gegen eine anders substituierte Verbindung, eine neue Substanz erhalten werden. Iris Winkler, die die in dieser Arbeit verwendeten Titanocene hergestellt hat, beschreibt die Synthese in ihrer Dissertation aus dem Jahr 2009²⁷. Ihre Strategie erlaubt Modifikationen auch noch nach der Metallierung, d.h. nach der Darstellung der bisher als für weitere Modifikationen zu empfindlich geltenden Titanocene. Als lagerfähige und in großen Mengen herstellbare Zwischensubstanzen dienen Titanocene, welche über eine Carboxylat-Funktion verfügen. Durch die modulare Synthese ist es nicht nur möglich, in kurzer Zeit viele neue Verbindungen herzustellen, sondern vor allem wird die Diversifikation an den gewünschten Stellen ermöglicht. So können die Polarität, die elektronischen und sterischen Eigenschaften sowie die dreidimensionale Gestalt der Titanocene variiert werden. Die Untersuchung der biologischen bzw. zytostatischen Aktivität der von Iris Winkler dargestellten Titanocene ist Gegenstand dieser Arbeit. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in

Kooperation mit Gansäuer et al. bereits veröffentlicht²⁸.

Um die Substanzen für *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo*-Versuche verwenden zu können, ist es wichtig, über ein möglichst gering toxisches Lösungsmittel zu verfügen. Laut Iris Winkler löst Dichlormethan die dargestellten Titanocene am besten, allerdings hat diese Substanz kanzerogene Wirkung²⁹ und ist daher nicht als Lösungsmittel geeignet. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein besser verträgliches Solvenz und vermag die Titanocene ebenfalls zu lösen. Wasser wäre zwar als Lösungsmittel vorzuziehen, jedoch ist die Löslichkeit der Titanocene darin gering bis gar nicht gegeben. Auch in 0,9%iger Kochsalzlösung lösen sich die Ketone nur in geringem Umfang, sind aber zumindest stabil.

1.3 Apoptose

1.3.1 Definition

Die Apoptose (griechisch *αποπτωσις* – von „apo“ = „weg“ und „ptosis“ = „Fall“) ist eine Form des programmierten Zelltods³⁰. Dabei läuft ein genetisches Programm zur Selbsttötung der Zelle ab³¹. Apoptotische Vorgänge spielen eine wichtige Rolle bei der physiologischen Embryonal- und Lymphozytenentwicklung, ebenso wie bei der Erhaltung der Gesamtzellzahl im adulten Organismus, die durch das Gleichgewicht von Zellerneuerung und Zelltod reguliert ist³². Eine Störung von Apoptose und Zellhomöostase kann zur Entwicklung von Autoimmun- und malignen Erkrankungen führen³³.

Durch typische morphologische Veränderungen der Zelle läßt sich die Apoptose von Autophagie und Nekrose abgrenzen³⁴. Apoptose ist gekennzeichnet durch die Kernkondensation und -fragmentierung, die Formierung von Apoptosekörperchen und die Fragmentierung der chromosomalen DNA^{33,35,36}. Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, die *in vivo* durch spezialisierte „Fresszellen“ (Phagozyten) aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt hierbei die Zellmembran intakt. Während die Apoptose ein energieverbrauchender Vorgang ist und somit vom ATP-Gehalt der Zelle abhängig ist, kann Nekrose unter anderem durch eine ATP-Depletion der Zelle hervorgerufen werden³⁷. Die Nekrose ist außerdem *in vivo* zumeist von einer inflammatorischen Reaktion begleitet, was bei Apoptose im Allgemeinen nicht beobachtet wird (Vgl. Abb. 1.3).

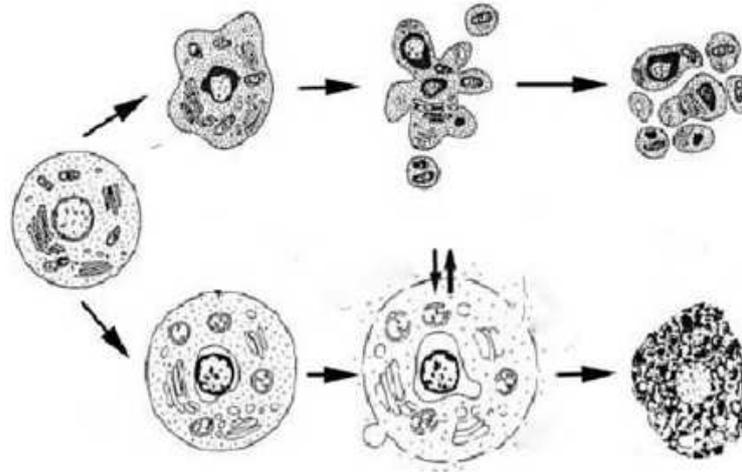


Abbildung 1.3: Morphologische Veränderungen bei Apoptose und Nekrose, aus Van Cruchten 2002³⁸. Während es bei der Apoptose nach der Kernkondensation zu einer Abschnürung von Vesikeln kommt (oben), ist die Nekrose gekennzeichnet durch die Zunahme der Permeabilität bzw. Zerstörung der Zellmembran.

Der Ablauf der Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Neben physiologischen Triggern können beispielsweise auch unphysiologische Faktoren wie ionisierende Strahlung^{39,40}, synthetische Chemotherapeutika bzw. Zytostatika^{41,42} und natürliche Verbindungen wie beispielsweise Stilbene⁴² eine Rolle spielen.

1.3.2 Apoptosesignalwege

Es werden im wesentlichen zwei Hauptsignalwege der Apoptose unterschieden. Zum einen spricht man vom extrinsischen, über sogenannte Todesrezeptoren vermittelten Signalweg⁴³, zum anderen vom intrinsischen Signalweg, der durch intrazelluläre Signale eingeleitet wird^{44–47}. Beide sind energieabhängig und können in drei Phasen eingeteilt werden: *Initiierung*, *Entscheidung* und *Ausführung*^{48,49}. Die Abbildung 1.4 stellt die Abläufe schematisch dar.

1.3.2.1 Extrinsischer Weg/Todesrezeptor

Die Initiierung des extrinsischen Signalwegs erfolgt durch die Bindung von sogenannten Todesliganden an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie (z.B. FAS/CD95, TNFR1). Anschließend erfolgt die Aktivierung der Caspase-Kaskade über Caspase 8 (*Entscheidungsphase*). Die Caspasen (Caspase = Cysteinyl-Aspartate-Specific-Protease) sind für die *Ausführung* der Apoptose verantwortlich.

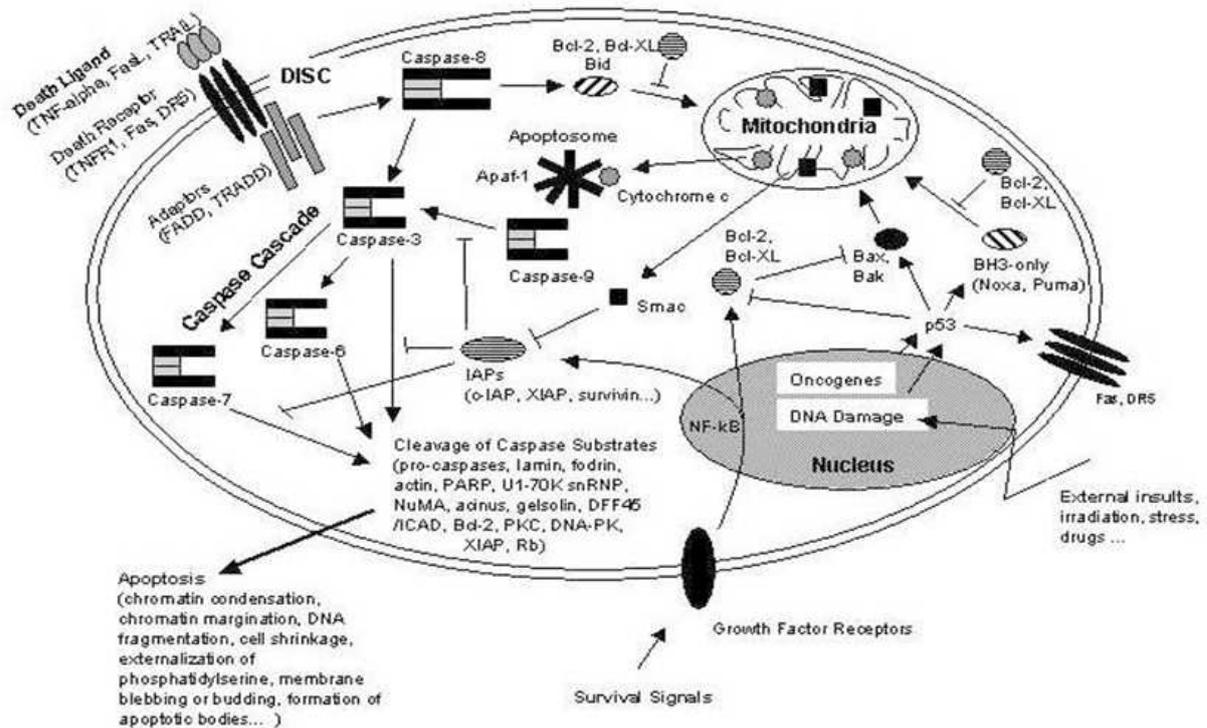


Abbildung 1.4: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg nach Gewies 2003. Die obige Abbildung stellt die beiden Signalwege graphisch dar. Während es beim extrinsischen Signalweg nach Bindung des Todesliganden an den entsprechenden Rezeptor über Caspase zu einer Initiierung der Caspase-Kaskade und schließlich zur Apoptose kommt, verläuft der intrinsische Weg über die Mitochondrien, wobei Cytochrome C und Smac eine wichtige Rolle spielen. Es kommt schließlich über Caspase 9 zu einer Aktivierung von Caspase 3/der Caspase-Kaskade und zur Ausführung der Apoptose.

1.3.2.2 Intrinsischer Weg

Der intrinsische Signalweg wird durch intrazellulär erzeugte Signale initiiert. Sie sind unter anderem das Ergebnis von zellulärem Stress, der beispielsweise durch Wachstumsfaktorentzug entsteht oder durch DNA-Schädigung, die unterschiedliche Ursachen haben kann (beispielsweise UV-Strahlung, Zytostatika oder ROS-Überproduktion). Als Mediatoren fungieren Proteine wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen, die die Signale an die Mitglieder der BCL-2-Genfamilie weiterleiten, die für die Kontrolle der Apoptose auf mitochondrialer Ebene verantwortlich ist⁴⁹⁻⁵¹. Im Mittelpunkt der Ereigniskaskade der Entscheidungsphase stehen die Mitochondrien. Die Mitglieder der BCL-2-Familie leiten pro- und antiapoptotische Signale direkt an die Mitochondrien weiter und regulieren so deren Permeabilität. Bei einem Übergewicht von proapoptotischen Signalen kommt es zur Freisetzung von apoptogenen Faktoren ins Zytoplasma. Zu diesen gehört neben smac/DIABLO auch

Cytochrom C, welches eine ATP/dATP-abhängige Konformationsänderung des apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktors APAF-1 begünstigt. Dieser oligomerisiert daraufhin und bildet zusammen mit Procaspase 9 einen apoptotischen Signalkomplex, das Apoptosom. Durch das Apoptosom erfolgt dann die Aktivierung der Caspasen. Bei beiden Signalwegen kommt es zum Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Beim extrinsischen Signalweg erfolgt dies erst spät während der Apoptose und ist eher ein Resultat der Apoptose als ihr Auslöser.

1.3.3 Caspasen

Die Caspasen sind für die *Ausführung* der Apoptose verantwortlich, die bei beiden apoptotischen Signalwegen mit den gleichen biochemischen und morphologischen Veränderungen einhergeht. Sie lassen sich in Initiatoren (Caspase 2, 8 und 9) und Effektoren (Caspase 3, 6 und 7) einteilen. Die Effektorcaspasen aktivieren einerseits sekundäre Zielproteine (z. B. andere Caspasen oder CAD) durch limitierte Proteolyse, andererseits beteiligen sie sich aktiv beim Abbau von Lamin und Actin. Bei Aktivierung der Caspasen können sich die beiden oben beschriebenen Signalwege überschneiden. Sie stellt eine Entscheidung über den Zelltod dar, die als nicht mehr umkehrbar beschrieben wird^{49,52}.

1.3.4 Apoptose in der Therapie maligner Erkrankungen

Proliferationshemmung und Apoptoseinduktionsrate sind entscheidende Kriterien für die Wirksamkeit von Zytostatika. Die spezifische Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika ist Ziel antineoplastischer Therapiekonzepte und wird durch viele Studien mit einer effektiven Therapie in Zusammenhang gebracht⁵³. Für die therapeutische Anwendung wünscht man sich Zytostatika mit hoher spezifischer Apoptoseinduktion⁵⁴⁻⁵⁶, da so unter anderem die Schädigung der nicht in Proliferation befindlichen Zellen durch Nekrose minimiert werden kann⁵⁷.

Die Deregulation physiologischer apoptotischer Signalwege resultiert in *in vitro* und auch klinischer Resistenz gegenüber einer zytostatischen Therapie⁵⁸⁻⁶¹. Während bei vielen soliden Tumoren, besonders bei Tumoren epithelialen Ursprungs, die Apoptose nicht der Hauptmechanismus für ein gutes Therapieansprechen ist, ist sie bei hämatologischen Erkrankungen von großer Bedeutung für den Therapieerfolg^{33,54}. Aktueller Forschungsschwerpunkt ist unter anderem die Entwicklung von Medikamenten mit spezifischen Apoptosetargets, von denen man sich ein großes Wirkpotential verspricht^{56,62}.

1.3.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Substanzen hinsichtlich ihres zytotoxischen und zytostatischen Potentials zu untersuchen, um so in der Zukunft möglicherweise Wirkstoffe entwickeln zu können, die andere Wirkmechanismen bzw. Targets haben als die heute in der klinischen Routine eingesetzten und so bei Patienten, die schlecht oder gar nicht auf konventionelle Zytostatika ansprechen, die erwünschte Wirkung zeigen. Besonders Patienten, die an einem Rezidiv erkrankt sind, könnten hiervon profitieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Multiskan Ascent	Thermo, Waltham, USA
CASY@CellCounter	Schärfe System, Reutlingen
Brutschrank Hera Cell 150	Thermo, Waltham, USA
Chemigenius-2-Bio-Imaging Systems	Syngene, Cambridge, UK
Cleanbench LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad, München
Power Pac HC	Biorad, München
Inversmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Axioskop2 mit Fluoreszenz-Option	Zeiss, Jena
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tissue Grind Comp SZ19	Kontes, New Jersey, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen 25, 75, 150 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg
6-, 12-, 96-Loch-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
15ml, 50ml Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
CASY@cups	Schärfe System, Reutlingen

Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schnell Bioscience Inc, Dassel
Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
PAP-Pen	Kisker, Steinfurt

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Formaldehyd $\geq 37\%$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
RNase A	Qiagen, Hilden
Propidiumiodid	Serva, Heidelberg
Bicoll Separating Solution	Biochrome AG, Berlin
Bovine Serum Albumin	Sigma, Saint Louis, USA
DMSO	Serva, Heidelberg
ECL Western Blotting Detection	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
Super Signal West Pico ECL-Substrate	Pierce, Rockford, USA
Penicillin (1000 U/ml) / Streptomycin (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Biochrome AG, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, München
JC-1 Molekulare Probes	Invitrogen, Karlsruhe
Cycloheximid	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Serva, Heidelberg
DNA-Molecular Weight Marker (Rainbow, full range)	Amersham Biosciences, Freiburg
DNA-Molecular Weight Marker (wide range)	Sigma, Saint Louis, USA
Ponceau-Rot	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Merck, Darmstadt
FKS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
CASY @ton-Messlösung	Schärfe System, Reutlingen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
APS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostik, Mannheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
bisBenzimid H 33258	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin-Lösung 0,1%, P8920	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
PFA, P6148	Sigma-Aldrich, München
MitoTracker®Green FM	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Acrylamid (Rotiphorese (Gel 40))	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt

2.1.4 Zytostatika

17 Vertreter der Carbonyl-substituierten Titanocene wurden von der Arbeitsgruppe Gansäuer des Kekulé-Institutes in Bonn synthetisiert und mir zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um folgende Verbindungen: IW95, IW106, IW109, IW146, IW168, IW206, IW242, IW251, IW270, IW275, IW276, IW282, IW283, IW293, IW340, IW383, DW280. Außerdem habe ich während meiner Arbeit mit den in der folgenden Tabelle aufgelisteten Zytostatika gearbeitet.

<i>Zytostatikum</i>	<i>Zytostatikaklasse</i>	<i>Herkunft</i>
Cytarabin	Nukleosidanalogen	cell pharm GmbH
Fludarabin	Nukleosidanalogen	MedacSchering GmbH
Daunorubicin	Anthracyclin	Pfizer Pharma GmbH
Doxorubicin	Anthracyclin	cell pharm GmbH
Epirubicin	Anthracyclin	cell pharm GmbH
Idarubicin	Anthracyclin	Pfizer GmbH
Vincristin	Mitosehemmer	Salutas
Etoposid	Topoisomerase II-Hemmer	Gry Pharma

2.1.5 Kommerzielle Kits

Cytotoxicity Detection Kit	Roche, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	PIERCE, Illinois, USA
Phosphatidylserine Detection Kit	IQ Products, Groningen, Niederlande
Mitochondria / Cytosol Extraction Kit	Biovision, Mountain View, USA

2.1.6 Puffer

2.1.6.1 Isolierung mononukleärer Zellen

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

2.1.6.2 Proteinpräparation

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

2.1.6.3 SDS-PAGE

Sammelgel (5%)	5% Acrylamid 0,1875 M Tris 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED
Trenngel (16%)	16% Acrylamid 0,375 M Tris 0,1% SDS 0,1% APS 0,04% TEMED

Probenpuffer(5x)	260mM Tris/ HCL, pH 6,8 40% (v/v) Glycerin 12,5% (v/v) β -Mercaptoethanol 400 mM DTT 0,004% (w/v) Brompehenolblau 2% (w/v) SDS
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris (Base) 2 M Glycin 1% (w/v) SDS

2.1.7 Western Blot

Transferpuffer	480 mM Tris (Base) 300 mM Glycine Ponceau-Rot-Lösung 0,5%(w/v) Ponceau-Rot 1% (v/v) Essigsäure
Waschpuffer (1x PBST)	1x PBS 0,05% Tween 20
Blockierpuffer	5%(w/v) Magermilchpulver 1x PBST 0,001% (w/v) NaN_3
Strippuffer	0,1 M β -Mercaptoethanol 0,2 M Glycin 0,05% (v/v) Tween 20

2.1.8 Nährmedien

RPMI 1640	supplementiert mit 10% FKS, 1% Pe- Invitrogen, Karlsruhe nicillin/Streptomycin
DMEM	supplementiert mit 10% FKS, 0,4 mg/ml Geneticin Invitrogen, Karlsruhe
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO, 90% (v/v) FKS

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-Caspase-3	1:500	Sigma, Saint Louis, USA
Anti-Caspase-9	1:2000	R& D, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-PARP	1:2000	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Cyt C	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
Anti- β -Actin	1:5000	Sigma, Saint Louis, USA

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-Mouse IgG HRP	1:2500	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Rabbit IgG HRP	1:200	Promega, Minneapolis, USA
Anti-Goat IgG HRP	1:3000	Calbiochem, Merck, Darmstadt

2.1.10 Zellen

2.1.10.1 BJAB

BJAB Zellen sind humane Burkitt-like-Lymphom-Zellen und stammen ursprünglich von einem afrikanischen Patienten. Diese Suspensionszellen verfügen über ein Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne, welches über den CD95/Fas-Signalweg die Induktion der Apoptose vermittelt. Es wurden die Zelllinien BJAB-Mock und BJAB FADD^{-/-} verwendet. BJAB-Mock Zellen sind mit einem pcDNA3-Primer ohne FADD^{dn}-Gen transfiziert. Die Expression des funktionalen FADD ist unverändert. BJAB FADD^{-/-} Zellen sind mit pcDNA3-FADD^{-/-} transfiziert. Sie exprimieren eine dominant-negative FADD-Mutante, der die N-terminale DED-Domäne fehlt⁶³. Durch Überexpression der negativ-dominanten Mutante FADD^{dn} wird die Apoptose-Induktion über den CD95/Fas-Signalweg verhindert, so dass bei den BJAB FADD^{-/-} Zellen eine Apoptoseinduktion über diesen Weg ausgeschlossen werden kann. BJAB-Zellen können unter bestimmten Bedingungen auch adhären werden, im Organismus können solide Tumore ausgebildet werden.

2.1.10.2 BJAB 7-CCA

Um die potentielle Resistenzüberwindung durch die untersuchten Titanocene beurteilen zu können, wurde eine gegen Doxorubicin resistente Zelllinie gezüchtet. Hierzu wurden BJAB mock-Zellen 2 - 3 mal wöchentlich passagiert und dabei mit aufsteigenden Konzentrationen von Doxorubicin inkubiert. Die erste Behandlung erfolgte mit 0,001 $\mu\text{mol/ml}$ Doxorubicin, Maximaldosis war 1 $\mu\text{mol/ml}$. Die Zellen wurden bei jeder Passage behandelt, vorausgesetzt, die Proliferation und Vitalität der Zellen war ausreichend, um die Behandlung zu tolerieren. Die Einschätzung dieser Parameter erfolgte nach morphologischen Gesichtspunkten und mittels CASY®CellCounter. Sobald die Vitalität trotz Behandlung in zwei aufeinanderfolgenden Passagen bei über 80% lag, wurde die Dosis gesteigert.

2.1.10.3 Nalm 6

Die Suspensions-Zelllinie Nalm 6 wurde aus humanen leukämischen B-Vorläufer-Zellen etabliert. Die Zellen stammen aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen Mannes mit einem ALL-Rezidiv im Jahr 1976⁶⁴. Diese Zelllinie wurde von der AG Seeger, Charité, Campus Virchow zur Verfügung gestellt.

2.1.10.4 Jurkat

Die Zelllinie Jurkat ist eine humane leukämische T-Zelllinie. Sie wurde aus peripherem Blut eines 14-jährigen Jungen mit dem ersten Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) im Jahr 1976 etabliert. Die Zellen wachsen als Einzelzellen oder in Zellverbänden in Suspension⁶⁵. Jurkatzellen wurden mit einem leeren Plasmid (Jurkat neo) und mit einem smac-Gen enthaltenden Plasmid (Jurkat smac) transfiziert. Dieses Zelllinienpaar wurde von Prof. Dr. Simone Fulda, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

2.1.10.5 MelHO

Diese Zelllinie wurde aus einem primären humanen Melanom etabliert. Die Zellen stammen von einer Patientin aus dem Jahr 1976. Es handelt sich um epithel-ähnliche adhärente Zellen mit langen, schmalen, oft verzweigten Zellkörpern⁶⁶. MelHO wurde stabil transfiziert mit dem Vektor pIRES (MelHO pIRES) und mit dem Bcl-2 Gen in pIres (MelHO_{bcl-2}). Die MelHO_{bcl-2} Zellen zeigen eine starke Überexpression des Bcl-2 gegenüber den MelHO pIRES

Zellen. Dieses Zelllinienpaar wurde der AG Prokop von PD Dr. Eberle, Charité, Campus Benjamin Franklin zur Verfügung gestellt.

2.1.10.6 MCF7

Die Etablierung der MCF-7 Zellen erfolgte aus humanen Mammacarcinom-Zellen (Adenoakanthom). Die Zellen wurden aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin mit metastasiertem Mammacarcinom nach Radio- und Hormontherapie im Jahr 1970 isoliert. Das Wachstum ist einschichtig adhärent mit einer epithel-ähnlichen Zellform⁶⁷. Die MCF-7 Zellen sind Caspase-3 defizient. Hieraus ergibt sich ein Apoptosedefekt, welcher diese Zelllinie sehr resistent gegen Chemotherapeutika macht. Diese Zelllinie stammt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

2.1.10.7 Primäre Zellen

Im Rahmen der „ALL-REZ-BFM 2002-Studie“ sind primäre Zellen von Patienten mit dem Rezidiv einer ALL und von Patienten mit ALL untersucht worden. Es handelt sich um Knochenmarkaspirate oder Blut aus Venenpunktionen. Die Proben stammen von Patienten, die in der Abteilung Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité Berlin behandelt werden oder wurden. Die primären Leukämiezellen von Patienten wurden in den ex vivo-Experimenten nach positivem Votum der Ethikkommission der Charité Berlin vom Jahre 2000 im Einklang mit den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki verwendet. Außerdem wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden gewonnen.

2.1.11 Mäuse

Für die Toxizitätsversuche mit IW283 wurden immunkompetente A/J-Mäuse verwendet. Es handelte sich um weibliche Tiere im Alter zwischen 6 und 14 Wochen. Für die Tumorreduktionsversuche wurden NOD/SCID-Mäuse verwendet. Diese Tiere sind durch ein angeborenes Defizit der T- und B-Lymphozytenfunktion charakterisiert, weshalb Xenotransplantate nicht abgestoßen werden. Die Tierversuche sind gemäß der Antragsnummer IC113-G0225/04 durchgeführt worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung aller Zellen im entsprechenden Medium erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit. Suspensionszellen wurden in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640-Medium kultiviert. Zusätzlich enthält das Medium 10% Hitze-inaktiviertes FCS (fetal calf serum), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,56 g/l L-Glutamin. Adhärente Zellen wurden in komplettiertem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) gehalten, supplementiert durch den Zusatz von 10% Hitze-inaktiviertem FCS und 100 U/ml Geneticin. Zellpassagierungen erfolgten dreimal pro Woche. Adhärente Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA für 3-5 min bei 37°C abgelöst. Alle Suspensionszellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf 3×10⁵ Zellen/ml eingestellt, um standardisierte Wachstumsbedingungen zu erreichen. Für die Apoptoseassays wurden die Zellen direkt vor der Substanzzugabe auf 10⁵ Zellen/ml verdünnt. Adhärente Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf 10⁵ Zellen/ml eingestellt und ausplattiert um das An-wachsen vor Substanzzugabe zu ermöglichen. Die verschiedenen Zelllinien wurden jeweils in einer ansteigenden Konzentrationsreihe mit der jeweiligen Substanz behandelt und für die verschiedenen Versuche bis zu 72 h bei 37°C 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen vital eingefroren. Die Zellen wurden geerntet, einmal gewaschen und für 5 min bei 300 g und 4°C pelletiert. Je 10⁷ Zellen wurden langsam in 1 ml vorgekühltes Einfriermedium in ein Kryoröhrchen aufgenommen und zunächst für eine Stunde auf -20°C gekühlt. Erst danach wurden die Röhrchen zur kurzzeitigen Aufbewahrung in den -80°C Freezer bzw. für längere Lagerungszeiten in den Tank mit flüssigem Stickstoff verbracht. Beim Auftauen wurde die Zellsuspension im 37°C Wasserbad zügig aufgetaut, in ein 15 ml Röhrchen überführt und 10 ml 37°C warmes Medium tropfenweise hinzugefügt. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit Medium. Ab der fünften Passage wurden die aufgetauten Zellen für Versuche verwendet.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmungen

Für die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen wurde der CASY®CellCounter eingesetzt. Vor Versuchsbeginn bzw. nach Inkubation definierter Dauer der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Wirkstoffe wird eine bestimmte Menge der Zellsuspension in isotone Kochsalzlösung überführt und am oben genannten Gerät vermessen. Das Messprinzip beruht auf der elektronischen Pulsflächenanalyse. Sie ermöglicht durch elektrische Pulse die Detektion sowohl der Partikelzahl/Volumen-Verhältnisse als auch der charakteristischen Änderungen der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran. Daraus kann die Anzahl des Debris, der toten Zellen und der vitalen Zellen sowie die Zellgröße ermittelt werden⁶⁸. Alle Zelllinien wurden mit jeweils speziell angepassten Parametern vermessen. Für die Messungen wurden je 100 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton in einem CASYcup im CASY®CellCounter untersucht. Bei zu hohen Zellzahlen erfolgte eine Verdünnung. Vereinzelt wurde die Lebendzellzahl per Trypanblaufärbung unter dem Mikroskop ausgezählt. Lebende Zellen schleusen den blauen Farbstoff aus und erscheinen farblos, tote Zellen bleiben blau angefärbt. Die jeweilige Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,4% Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden die vier geeichten Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl ergibt sich aus folgender Formel:

$$Z = N \times 2 \times 10^4 \quad (2.1)$$

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

2.2.1.4 Isolierung mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Lymphoblasten)

Bei der Isolierung mononukleärer Zellen macht man sich die unterschiedliche Dichte der Blutzellen zu Nutze und trennt diese mittels Dichtezentrifugation. Vollblutproben oder Knochenmarkpunktate von Patienten bzw. Vollblut von 3 verschiedenen gesunden Probanden wurden mit RPMI1640 auf ein durch fünf teilbares Volumen aufgefüllt. Dann wurden in einem Redcap-Röhrchen befindliche 4 ml Ficoll vorsichtig mit 5 ml Blut (oder Knochenmarkpunktat) überschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte mit 657 g für 18 min bei 20°C bei 4/5 Beschleunigung und ohne Bremse. Die Zellen mit hoher Dichte, wie die Erythrozyten und die Granulozyten, wandern durch die Zentrifugation zum Röhrchenboden.

Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten sammeln sich aufgrund der niedrigeren Dichte im Buffycoat an. Der Buffycoat wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Anschließend wurde nach zweimaligem Waschen mit RPMI1640 eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 3 ml Erythrozytenlysepuffer für 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 20 ml Medium wurde die Lyse gestoppt und nach nochmaligem Waschen mit RPMI1640 wurde die Zellzahl mit einem CASY®CellCounter ermittelt. Zur Durchführung der modifizierten Zellzyklusanalyse wurden die isolierten mononukleären Zellen in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte nach 60 h Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinpräparation

Für den Proteinnachweis durch Westernblot werden Proteinsuspensionen benötigt, die weitestgehend frei sind von Zellmembranen. Die im folgenden beschriebene Proteinpräparation dient der Herstellung solcher Proteinsuspensionen für die Westernblotanalysen. Mindestens jeweils 5×10^6 mit einer der untersuchten Substanzen behandelten Zellen und Kontrollgruppenzellen wurden für die Proteinpräparation geerntet, einmal mit PBS gewaschen und dann bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert, wobei alle 15 min gevortext wurde. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 10000 g und 4°C stellt der Überstand die Proteinlösung des Totallysates der Zellen dar.

2.2.2.2 Mitochondrien-/Zytosolfraktionierung

Die Auftrennung von zytosolischen und mitochondrialen Proteinen wurde mit dem „Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit“ (Biovision, USA) durchgeführt⁶⁹. Die Zellyse wird bei dieser Methode durch das Oberflächendetergenz DTT und durch mechanische Kräfte erreicht. Die Mitochondrien bleiben dabei intakt, so dass durch Zentrifugation die Mitochondrienfraktion von der im Überstand befindlichen zytosolischen Fraktion getrennt werden kann. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Zellen wurden nach Zytostatikabehandlung durch Zentrifugation mit 600 g für 5 min bei 4°C pelletiert. Für

akkurate Ergebnisse waren 7×10^5 Zellen pro Probe nötig. Nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Pellets in 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer, der DTT und Proteaseinhibitoren enthält, resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem „Tissue Grinder“ (Kontes, USA) homogenisiert. Lichtmikroskopisch wurde die Zellmembranzerstörung überprüft. Ca. 2/3 der Zellen sollen zerstört sein. Das entstandene Homogenisat wurde anschließend 10 min bei 700 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 10.000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand stellt die zytosolische Fraktion dar. Das Pellet, also die mitochondriale Fraktion, wurde in 100 µl Mitochondrien Extraktionspuffer resuspendiert und 10 s gevortext.

2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, USA) durchgeführt⁷⁰. Als Grundlage dient die Biuret-Reaktion, hier wird durch Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ umgewandelt. Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) bildet in alkalischem Medium einen 2:1 Komplex mit Cu^+ -Ionen. Dabei entsteht ein roter Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. 10 µl Proteinextrakt wurden mit 200 µl Reaktionslösung (Reagenz A/Reagenz B: 50/1) in einer Mikrotiterplatte vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch die Extinktion gemessen. Eine BSA-Konzentrationsreihe diente als Standardreihe.

2.2.2.4 Proteinauftrennung mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht⁷¹. Die Proteine werden durch β -Mercaptoethanol und Natrium-Dodecyl-Sulfate (SDS) denaturiert und mit einer negativ geladenen Hülle umgeben. In einem Polyacrylamidgel wandern die Proteine dann in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. In einer Mini-Proteom-2-Gelkammer wurden 1,5 mm dicke Gele gegossen. Die Sammelgele enthielten 5% Polyacrylamid, die Trenngele 16%. Eine Ausnahme bildeten die Gele für den PARP-Protein-Nachweis, hier wurden 0,75 mm dicke 5%ige Sammelgele und 8%ige Trenngele verwendet. Die Proteine wurden in Probenpuffer bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend wurden nach Abkühlung 30 µg Protein pro Tasche auf die Gele aufgetragen. Alle nicht benötigten Geltaschen wurden mit Probenpuffer beladen. Die Proteinauftrennung erfolgte für 10 min bei 120 V und dann bei 160 V für ca. 60 min. Die Molekulargewichte

wurden durch Vergleich der Wanderungstrecke der mitgeführten Standardproteine („DNA-Molecular-Weight-Marker“) ermittelt.

2.2.2.5 Western Blot

Zum Transfer von Peptiden auf die Oberfläche von Nitrozellulosemembranen wurde das Semidry-Blotting-Verfahren verwendet. Zunächst wurden vier Stücke Whatman Filterpapier und eine Nitrozellulosemembran für 10 min in 1x Transferpuffer eingeweicht, dann wurden sie zusammen mit dem SDS-Gel in der Blotting-Apparatur zu einem „Sandwich“ gebaut, und zwar von der Anode zur Kathode hin (Sandwich: zwei Stück Whatman Filterpapier, Membran, Gel, zwei Stück Whatman Filterpapier). Vor dem Anlegen des elektrischen Feldes mit der Stromstärke 1 mA/cm^2 Membran für 60 min wurden Luftblasen und überschüssiger Puffer entfernt. Die Moleküle wandern aus dem SDS-Gel auf die Oberfläche der Membran. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen erfolgt zwischen den meisten Proteinen und der Membranoberfläche eine Bindung.

2.2.2.6 Membranfärbung mit Ponceau

Die Kontrolle des Blottingvorgangs wurde mittels Ponceaufärbung durchgeführt. Die Ponceau-Lösung färbt alle Proteine unspezifisch und reversibel an. Die sichtbar werdenden Proteinbanden erlauben eine Abschätzung, wo auf der Membran sich wie viel Protein befindet. Die Membranen wurden mit Ponceau-Lösung bei leichtem Schütteln für 3 min gefärbt und dann mit zweifach destilliertem Wassers so lange bei leichtem Schütteln gewaschen, bis das Wasser klar war. Dann erfolgte die fotografische Dokumentation. Die anschließende Entfärbung wurde durch 10 minütige Inkubation in Waschpuffer (PBST) erreicht.

2.2.2.7 Immundetektion

Das Prinzip der Immundetektion beruht auf einem zweifachen Antikörpersystem. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Zielprotein, der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper bindet an die schwere Proteinkette des Primärantikörpers. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und Luminol, Substraten der Peroxidase, kommt es zur Lumineszenz, welche detektiert werden kann. Die mit Proteinen besetzte Nitrozellulosemembran wurde zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung inkubiert, um eine unspezifische Proteinbindung an den freien Stellen der Membran zu verhindern. Die darauf

folgende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte je nach Herstellerangaben eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Um ungebundene Primärantikörpermoleküle zu entfernen, wurde die Membran anschließend dreimal für 10 min unter leichtem Schütteln mit Waschpuffer gewaschen. Dann folgte die Sekundärantikörperinkubation, wiederum für 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Um die Lumineszenzsignale mit dem Chemigenius-2-Bio-Imaging-System detektieren zu können, wurde die Membran nun nach Zugabe von 2 ml ECL 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ wurde „Super Signaling“ ECL verwendet, wobei 3 ml Lösung und eine Inkubationszeit von 3 min notwendig sind. Das Chemigenius-System besteht aus einer Dunkelkammer, einer hochauflösenden Digitalkamera und speziellen Lichtfiltern.

2.2.3 Apoptose und Zytotoxizitätsassays

2.2.3.1 Zytotoxizitätsbestimmung mit Lactat-Dehydrogenase-Release-Assay

Die Oxidation von Laktat zu Pyruvat wird durch Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert. Die Freisetzung dieses zytosolischen Enzyms in den Zellüberstand ist der Messparameter zur Bestimmung der Zytotoxizität. Als klinischer Laborparameter zeigt sie eine Zellschädigung an. Der Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Hierbei erfolgt zuerst eine Reduktion von NAD^+ zu NADH während der Umwandlung von Laktat zu Pyruvat. Anschließend überträgt der Katalysator Diaphorase ein Wasserstoffproton auf das schwach gelb gefärbte Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazoliumchlorid. Das dabei entstehende Formazansalz ist rot gefärbt und wird im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch bestimmt. Diese Methode wurde mit dem „Cytotoxicity Detection Kit“ von Roche (Mannheim) durchgeführt, die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers. Nach Inkubation mit einem Wirkstoff wurden je 100 μl der resuspendierten Zellsuspension in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Zusätzlich zur Kontroll-Gruppe wurde eine Max-Kontrolle eingeführt. Hierzu wurden 100 μl Zellsuspension der Kontrollgruppe mit 0,1% Triton X-100 lysiert, um den maximal möglichen LDH-Ausstoß der Zellen zu ermitteln. Alle Zellen wurden 5 min mit 370 g bei 4°C zentrifugiert und anschließend 20 μl des Überstandes und 80 μl PBS in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurden 100 μl Reaktionsgemisch hinzugefügt und die Platte für 5 min im Dunkeln inkubiert, bevor die

photometrische Messung bei 492 nm erfolgte. Der Wert der Max-Kontrolle wurde als 100% Zytotoxizität definiert. Zur Berechnung der Zytotoxizität wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{S - M - Ko - M}{Max - M - Ko - M} \times 100 \quad (2.2)$$

(S = Messwert einer Probe (Sample); Ko = Kontrolle, zellfreier Überstand einer unbehandelten Zellsuspension; M = Nährmediumkontrolle, enthält nur Medium ohne Zellen; Max = Maximalwert, entspricht einer Kontrollprobe, die durch Triton X-100 lysiert wurde.)

2.2.3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird auch als „Fluorescence-Activated Cell Sorting“ (FACS) bezeichnet. Die Messungen erfolgen auf Einzelzellniveau. Bei der FACS-Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung durch einen Argonlaserstrahl geführt. Diese Technologie eignet sich für die Detektion von folgenden Parametern: Der „Forward Scatter“ ist ein Parameter für das absorbierte Licht und ermöglicht die Berechnung der Zellgröße, der „Side Scatter“ stellt das reflektierte oder gebrochene Licht dar und ergibt die relative optische Dichte, welche proportional zur Granularität ist. Die dritte Messgröße ist die Fluoreszenz, das emittierte Licht der Zellen. Durch Bandpassfilter können in drei Fluoreszenzkanälen (FL1 = 537 nm, FL2 = 597 nm, FL3 = 650 nm) die unterschiedlichen Emissionsspektren der verschiedenen verwendbaren Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Die Messdatenausgabe erfolgt in Histogrammen und Punktwolkendiagrammen, auch Dotplots genannt. In den Histogrammen stellt die x-Achse die Lichtintensität dar und die y-Achse die Zellzahl. Bei den Dotplots repräsentieren die x- und y-Achse jeweils einen Lichtsignal-Parameter. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle.

2.2.3.3 Modifizierte Zellzyklusanalyse

In der Endphase der Apoptose kommt es zur DNA-Fragmentierung. Die DNA wird durch Nukleasen zwischen den Histonproteinen zerschnitten, so dass Bruchstücke von 180 Basenpaaren oder einem Mehrfachen davon entstehen. Durch die in der Endphase der Apoptose permeabilisierte Zellmembran kommt es dann zum Verlust von DNA-Fragmenten. Dies zeigt sich bei einer DNA-Färbung an einem verminderten DNA-Gehalt (Hypoploidie), im Vergleich zu einer Zelle in der G0/G1-Phase. Man spricht von SubG1-Zellen. Hypoploide Zellen

wurden durchflusszytometrisch nach Propidiumiodidfärbung detektiert, wie von Nicoletti beschrieben⁷¹. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen der Titanocen-Derivate behandelt. Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation mit 300 g bei 4°C geerntet. Anschließend wurde mit kaltem PBS gewaschen und dann mit PBS/2% (v/v) Formaldehyd auf Eis für 30 min fixiert. Darauf folgte die DNA-Fällung durch 15 min Inkubation mit Ethanol/PBS (2:1,v/v). Nach Pelletierung wurden die Zellen in 40 mg/ml RNase A enthaltendem PBS resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden die Proben in 50 µg/ml Propidiumiodid enthaltendem PBS aufgenommen. Die Messungen erfolgten an einem FACScan. Die hypoploide DNA ist im Fluoreszenzhistogramm auf der FL3-Achse unterhalb der diploiden DNA detektierbar. Anhand der Relation der AUC der hypoploiden DNA zu der AUC der gesamten detektierbaren DNA kann der relative Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation berechnet werden. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Apoptoserate ausgegeben, welche der gemessenen Hypodiploidie (Sub-G1) gleichgesetzt wird.

2.2.3.4 AnnexinV-Propidiumiodid-Doppelfärbung

In der frühen Phase der Apoptose kommt es unter anderem zur morphologischen Veränderung der Plasmamembran. Es erfolgt die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran auf die äußere Oberfläche^{72,73}. Das AnnexinV ist in der Lage, calciumabhängig an Phospholipide zu binden. Wird das Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran präsentiert, dann bindet AnnexinV mit hoher Affinität. Durch die Konjugation des AnnexinV mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Fluorescein-isothiocyanat“ (FITC) ist es möglich, diese Zellen durchflusszytometrisch zu detektieren. Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid ermöglicht es, mit dieser Methode Apoptose und Nekrose zu unterscheiden. Das Propidiumiodid dient zur Überprüfung der Membranintegrität. Zellen mit signifikantem FITC-AnnexinV Fluoreszenzsignal wurden als AnnexinV positiv (An+) definiert und Zellen, die diese Fluoreszenz nicht aufweisen, sind AnnexinV negativ (An-). Entsprechend gibt es Propidiumiodid positive (PI+) und Propidiumiodid negative (PI-) Zellen. An+/PI- Zellen werden als frühapoptotische Zellen angesehen⁷⁴. An+/PI+ Zellen dagegen sind nekrotisch oder in einer späten Phase der Apoptose, in der die Plasmamembran nicht mehr intakt ist. Die Versuchsdurchführung ist wie folgt: Die behandelten Zellen wurden 5 min bei 300 g und

4°C zentrifugiert und in 200 µl 1x Calcium-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl FITC-Annexin wurde 30 min auf Eis in Dunkelheit inkubiert. Zu allen Proben wurden 4 ml 1x Calcium-Puffer gegeben. Nach Zentrifugation wurden die Pellets in 200 µl 1x Calcium-Puffer aufgenommen und mit 10 µl Propidiumiodid (1 µg/ml) gefärbt. Die Proben wurden innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch am FACScan gemessen.

2.2.3.5 Mitochondriale Membranpotentialanalyse mit JC-1

Die Aktivierung der Mitochondrien ist ein frühes Ereignis in der Apoptose-Signaltransduktion. Eine wesentliche Eigenschaft der Mitochondrien ist das Vorhandensein eines elektrochemischen Gradienten zwischen ihrer inneren und der äußeren Membran. Der Protonen und der pH-Gradient entstehen hauptsächlich aufgrund einer aktiven, asymmetrischen Verteilung von Protonen zwischen Intermembranraum und Matrix. Im wesentlichen ist das Membranpotential dem Protonengradienten gleichzusetzen. Dieses Potential bildet auch die Grundlage der Methode, bei der kationische lipophile Farbstoffe, wie z.B. JC-1, in der Matrix akkumulieren können. Mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) ist eine Detektion der mitochondrialen Membranpotentialänderung möglich^{75,76}. Monomeres JC-1 zeigt eine grüne Fluoreszenz (525 nm). Das JC-1 akkumuliert potentialabhängig in der Matrix der Mitochondrien ($\Delta\psi_m$). Bei hohem Membranpotential und damit starker Akkumulation verändert sich das Emissionsspektrum von grün (~525 nm) nach rot (~590 nm). Kommt es zur Membrandepolarisierung, nimmt die rote Fluoreszenz ab und die grüne Fluoreszenz (525 nm) verstärkt sich. Die mitochondriale Depolarisierung im Frühstadium der Apoptose geht daher mit einer Abnahme roter Fluoreszenz einher, die mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden kann. Bei der durchflusszytometrischen Messung lassen sich Zellen mit niedrigem mitochondrialem $\Delta\psi_m$ und somit verminderter Fluoreszenz in FL2 im FACScan nachweisen. Der prozentuale Anteil dieses Signals im Vergleich zur Mediumkontrolle wird zur Auswertung verwendet. Zur Vorbereitung für die Messung wurden die behandelten Zellen 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 500 µl Phenolrot-freiem und FKS-freiem RPMI-Medium aufgenommen und mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml JC-1 für 30 min bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 200 µl eiskaltem PBS aufgenommen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb einer Stunde.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Darstellung mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an BJAB-Zellen. Die Zellen, sowohl die Kontrollgruppen als auch die mit einer bestimmten Wirkstoffdosis behandelten, wurden für eine definierte Dauer inkubiert. Anschließend wurden sie 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und danach in 2%igem Paraformaldehyd fixiert. Aus der fixierten Zellsuspension wurden mit einer Pipette je 20 µl in vorher mit einem PAP-Pen gemalte Kreise auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gegeben. Nach schonender Trocknung wurden die Präparate in eine Glasküvette mit PBS gestellt. Das PBS wurde nach jeweils 10 min zweimal gewechselt um so die Fixierlösung zu entfernen. Danach schloss sich ggf. eine Färbung mit Bisbenzimid und Waschen in PBS an. Die Präparate wurden dann sanft getrocknet und luftblasenfrei in Glycerin eingedeckt. Bis zum Mikroskopieren wurden die Präparate dunkel und kühl aufbewahrt. Mikroskopiert wurde unter Benutzung der Software Axiovision, Filtersatz 09 (Anregung 450 - 490 nm, Emission 515 nm).

2.2.4.1 Mitochondrienanfärbung

Für die Anfärbung der Mitochondrien wurde der MitoTracker Green FM von Invitrogen verwendet. Zunächst wurde das Produkt in DMSO gelöst und so eine 1 mM Stocklösung hergestellt. Diese wurde für den Versuch weiter verdünnt um eine Konzentration von 100 nM zu erhalten. Für das Färben von Suspensionszellen wie BJAB-Zellen besteht die Möglichkeit, entweder fixierte oder unfixierte Zellen zu verwenden. Beide Möglichkeiten sollen hier kurz beschrieben werden. Um unfixierte Suspensionszellen zu färben, werden die einzelnen Proben zunächst zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird nun vorsichtig in vorgewärmtem Medium, das die entsprechende Menge Mitotracker enthält, resuspendiert. Es folgt eine weitere Zentrifugation, das so entstandene Pellet wird anschließend in vorgewärmtem, frischem Medium resuspendiert. Um die Zellen nach der Färbung zu fixieren, werden sie in frischem, vorgewärmtem Medium gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und ersetzt durch frisches, 37°C warmes Medium, das 3,7% Formaldehyd enthält. Es folgt eine 15-minütige Inkubation. Nach der Fixierung werden die Zellen mehrere Male in PBS gewaschen und auf Objektträger aufgetropft. Fixierte Zellen werden nach der Fixierung in PBS gewaschen und anschließend 15 min in PBS mit 100 nM Mitotracker inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und auf Objektträger aufgebracht.

2.2.5 Tierversuche

Um die Toxizität der Substanz IW283 *in vivo* zu testen, wurden drei immunkompetente A/J-Mäuse mit einer Dosis von 100 mg/kgKG behandelt. Als Kontrolle dienten drei unbehandelte Tiere. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen. Die Substanz wurde intraperitoneal (i.p.) verabreicht, im Anschluss wurden die Tiere täglich gewogen und das Gewicht sowie der allgemeine Zustand dokumentiert. Die verstorbenen Tiere wurden sezirt und die entnommenen Organe histopathologisch untersucht.

Die anschließenden Versuche zur Tumorreduktion wurden von der Firma EPO in Berlin durchgeführt. Acht NOD/SCID-Mäusen wurden zunächst 1×10^7 BJAB-Zellen (83. Passage) injiziert, um ein Lymphom wachsen zu lassen. Ab palpablem Tumolvolumen wurde die Behandlung mit 50 mg/kgKG IW283 begonnen. Das Titanocen wurde in 10% DMSO gelöst und mit 0.5% Tween 80 und physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Substanz wurde i.p. an Versuchstag 13, 21 und 26 verabreicht. Das Gewicht sowie der Zustand der Tiere wurde dokumentiert. Nach Versuchsende wurden die Mäuse getötet und die Organe makroskopisch und histologisch untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte NOD/SCID-Mäuse.

2.2.6 Datenauswertung und Statistik

Alle Versuche, die in der vorliegenden Arbeit erwähnt werden, wurden mindestens zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Die Diagramme wurden mit Microsoft-Excel erstellt und beinhalten die Datensätze aller jeweils durchgeführten Versuche. Die Fehlerbalken der Diagramme bezeichnen jeweils eine Standardabweichung.

Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte mit der Cellquest Pro Software. In den Histogrammen der modifizierten Zellzyklusanalyse wurde die „Area under the curve“ ermittelt, bei den Dotplots der Analyse der mitochondrialen Membranpotentials und der Annexin/PI-Doppelfärbung die Verteilung der Punkte in den jeweiligen Quadranten. Die einzelnen Punkte stellen jeweils eine Zelle dar. Für die Darstellung eines Histogramms oder Dotplots der FACS-Messungen wurde ein Repräsentant einer Dreifachmessung ausgewählt.

Für die Darstellung der Ergebnisse der Westernblots wurden repräsentative Membranen ausgewählt. Mindestens ein Wiederholungsversuch zeigte ähnliche Banden wie die zur Darstellung ausgewählte Membran.

Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS 12.0 verwendet. Im Falle eines Vergleichs zweier Zelllinien wurden die einzelnen Ergebnisse mit Hilfe des U-Testes von

Mann-Whitney hinsichtlich der statistischen Bedeutsamkeit ihrer Unterschiedlichkeit untersucht. Der nonparametrische U-Test vergleicht die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben und ist das verteilungsfreie Pendant zum parametrischen T-Test für unabhängige Stichproben. Da bestimmte Voraussetzungen für parametrische Verfahren, wie beispielsweise die Normalverteilung, durch die Stichproben nicht als erfüllt angenommen werden können, ist der U-Test die Methode der Wahl⁷⁷. Die Unterschiedlichkeit wird bei einer exakten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant und von $p \leq 0,01$ als sehr signifikant erachtet.

Im Falle der *ex vivo* Versuche mit Patientenzellen wurde die Wirkung der unterschiedlichen Behandlung mittels des Vorzeichenrangtestes von Wilcoxon auf die statistische Bedeutsamkeit überprüft. Dieser Test überprüft, ob sich zwei abhängige Stichproben in ihrer zentralen Tendenz unterscheiden, wobei auch die Größe des Unterschieds von der paarigen Messung berücksichtigt wird. Wie der schon beschriebene Mann-Whitney-Test ist auch der Wilcoxon-Test ein verteilungsfreies Verfahren und wurde aufgrund der relativ geringen Stichprobengröße, die damit keine Überprüfung der Voraussetzung parametrischer Tests zulässt, angewandt⁷⁷. Die Unterschiedlichkeit wird auch hier bei einer exakten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant und von $p \leq 0,01$ als sehr signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse meiner Versuche zusammengefasst. Zunächst wird ein Überblick über alle von mir getesteten Substanzen gegeben sowie eine Aussage über eine mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehung gemacht werden. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse für zwei der untersuchten Vertreter der Klasse der Titanocene detailliert dargestellt, wobei es sich um die beiden wirksamsten Verbindungen, das Amid IW283 und das Keton IW293, handelt. Für diese beiden Wirkstoffe werden die Wirkungen *in vitro*, *ex vivo* und für IW283 auch *in vivo* beschrieben. Darüber hinaus werde ich mich genauer mit verschiedenen mechanistischen Untersuchungen befassen, um den Apoptosesignalweg der Substanzen zu identifizieren.

3.1 Übersicht IW-Substanzen

Es wurden 17 verschiedene Carbonyl-substituierte Titanocene bezüglich ihrer biologischen Wirkung auf maligne Zellen getestet. Bei allen untersuchten Substanzen wurde für eine Konzentrationsreihe neben der Proliferationshemmung die Apoptoseinduktionsrate mit der modifizierten Zellzyklusanalyse bestimmt. Außerdem erfolgte jeweils eine Zytotoxizitätstestung, um den nekrotischen Zelltod zu quantifizieren. Dies wurde mittels eines LDH-Release-Assay nach 2 h bzw. 48 h bzw. einer Annexin-Propidiumiodid-Doppelfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten realisiert. Bei einigen der untersuchten Substanzen konnte eine hohe konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen werden.

Da sich die Wirkung der Zytostatika über spezifische Apoptoseinduktion in den malignen Zellen entfaltet, ist es sinnvoll, diesen Effekt und damit die Selektivität der Verbindungen zu messen und nicht wie üblich, die unspezifische Zytotoxizität anzugeben, die durch LC50 Werte beschrieben wird. Deshalb wurde bei der Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Titanocene die Konzentration AC50 ermittelt, bei der in 50% der Lymphomzellen die Apoptose induziert wird. Da nur die gewünschte selektive Wirkung erfasst wird, ist die AC50

stets höher als der entsprechende LC50 Wert.

Bei allen aktiven Substanzen, d.h. bei allen Substanzen, die in BJAB-Zellen eine Apoptoserate von mindestens 50% induzierten, trat in der AC50 eine starke Proliferationshemmung auf. Die Werte der Wachstumshemmung lagen zwischen 58% und 100%. Der Anteil an nekrotischen Zellen lag bei der AC50 der jeweiligen Substanzen zwischen 3% und 32%.

3.1.1 Amide

Während IW146 *in vitro* kaum Wirkung bzw. Apoptoseinduktion hervorruft, erwiesen sich sowohl IW293 (Abb. 3.1f) als auch IW242 (Abb. 3.1e) als Apoptoseinduktoren im relativ niedrigen μM -Bereich. Die Ergebnisse für alle getesteten Amide sind in Tab. 3.1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1: Amidsubstituierte Titanocene. Dargestellt ist die prozentuale Wachstumshemmung nach 24-stündiger Inkubation mit der Wirkstoffkonzentration, bei der in 50% der eingesetzten Zellen Apoptose induziert wurde. In der nächsten Spalte finden sich die Prozentwerte der nekrotischen Zellen nach Behandlung mit der selben Wirkstoffkonzentration. Die letzte Spalte zeigt, ob der jeweilige Wirkstoff eine Wirkung auf *ex vivo*-Zellen hat.

Verbindung	AC50[μM]	Wachstumshemmung bei AC50 [%]	Nekrose bei AC50 [%]	Wirkung auf <i>ex vivo</i> Tumorzellen
IW146	∅Apoptoseinduktion			Nicht untersucht
IW242	50	80	12 - 32	Wirksam
IW251	50	58	Keine Ergebnisse	Nicht untersucht
IW275	Über 100	90	Keine Ergebnisse	Nicht untersucht
IW293	30	95	6 - 22	Wirksam
DW280	∅Apoptoseinduktion			Nicht untersucht

3.1.2 Ketone

Auch die getesteten Ketonverbindungen zeigten deutlich unterschiedliche Aktivität. Die in der niedrigsten Konzentration wirksame Verbindung ist IW283 (Abb. 3.2h). Die Ergebnisse aller untersuchten Ketone sind in Tab. 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Ketonsubstituierte Titanocenkomplexe. Dargestellt ist die prozentuale Wachstumsinhibition nach 24-stündiger Inkubation mit der Wirkstoffkonzentration, bei der in 50% der eingesetzten Zellen Apoptose induziert wurde. In der nächsten Spalte finden sich die Prozentwerte der nekrotischen Zellen nach Behandlung mit der gleichen Wirkstoffkonzentration. Die letzte Spalte zeigt, ob der jeweilige Wirkstoff eine Wirkung auf *ex vivo*-Zellen hat.

Verbindung	AC50[μM]	Wachstums- inhibition bei AC50 [%]	Nekrose bei AC50 [%]	Wirkung auf <i>ex vi- vo</i> Tumorzellen
IW95	∅Apoptose- induktion			Nicht untersucht
IW106	∅Apoptose- induktion			Nicht untersucht
IW109	ca. 100	100	15	Wirksam
IW168	∅Apoptose- induktion			Nicht untersucht
IW206	50	100	3 - 10	Wirksam
IW270	Über 100			Nicht untersucht
IW276	Über 100			Nicht untersucht
IW282	25	100	6	Nicht untersucht
IW283	12.5	100	4	Wirksam
IW383	80	100	Nicht untersucht	Nicht untersucht
IW340	∅Apoptose- induktion			Nicht untersucht

3.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Betrachtet man die Struktur der verschiedenen untersuchten Titanocene (siehe Abb. 3.1 und 3.2) sowie die in Tabelle 3.1 und 3.2 dargestellten Daten, so zeigt sich eine klare Abhängigkeit der biologischen Wirksamkeit von der Struktur der einzelnen Titanocene. Insgesamt fällt auf, dass die Amide generell eine geringere Aktivität als die Ketone zeigten. Während bei den Ketonen der 2,4-Dimethoxyphenylrest zu der besten Wirksamkeit führt, zeigten die Amide erst nach Einführung langer Alkylketten, gegebenenfalls mit terminaler Arylsubstitution, eine hohe Apoptoseinduktion (3.1e, 3.1f).

Insgesamt scheinen aromatische Gruppen eine niedrige AC50 zu begünstigen. Nur Derivate von Resorcindimethylether weisen eine hohe Aktivität auf. Aus Anisol, Veratrol und den Trimethoxybenzolen gebildete Ketone besitzen signifikant niedrigere AC50 Werte.

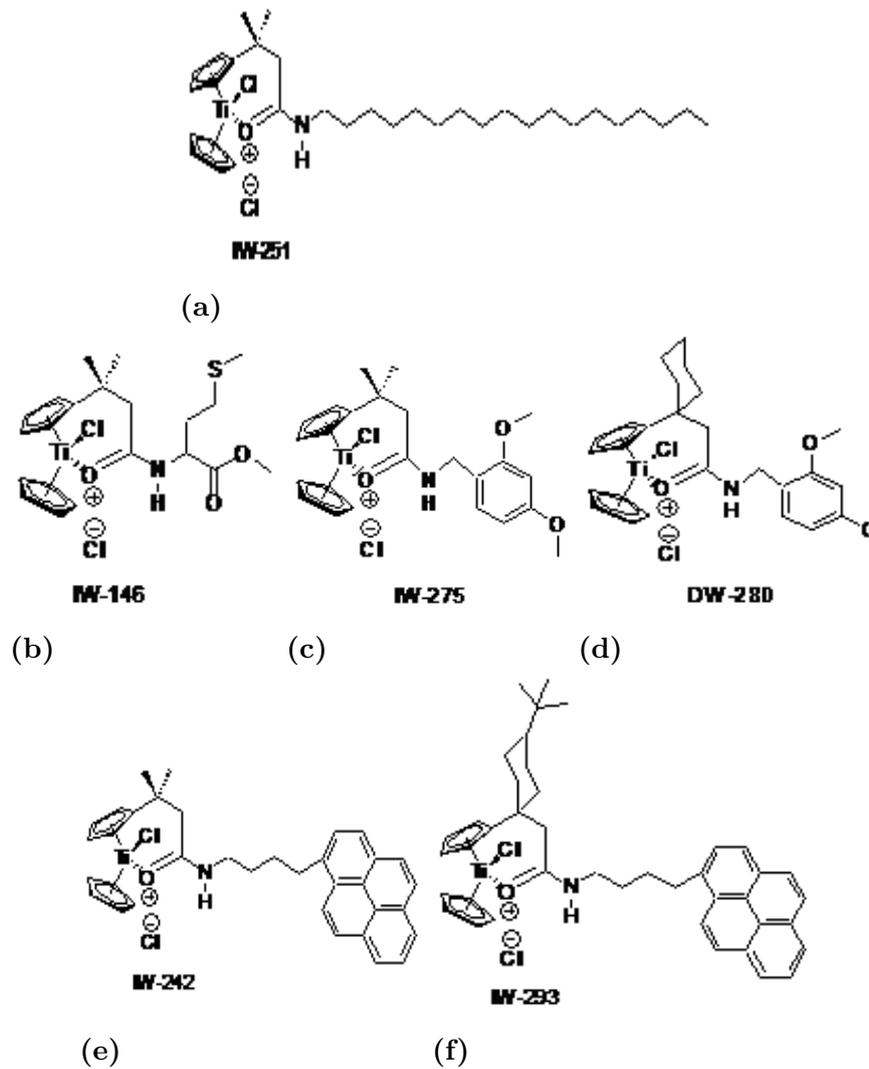


Abbildung 3.1: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten amidsubstituierten Titanocene. Die mit IW gekennzeichneten Titanocene wurden von Iris Winkler synthetisiert, DW280 von Dennis Worgull. Die Nummern der einzelnen hergestellten Substanzen wurden fortlaufend vergeben. Quelle: Iris Winkler, Kekulé-Institut Bonn

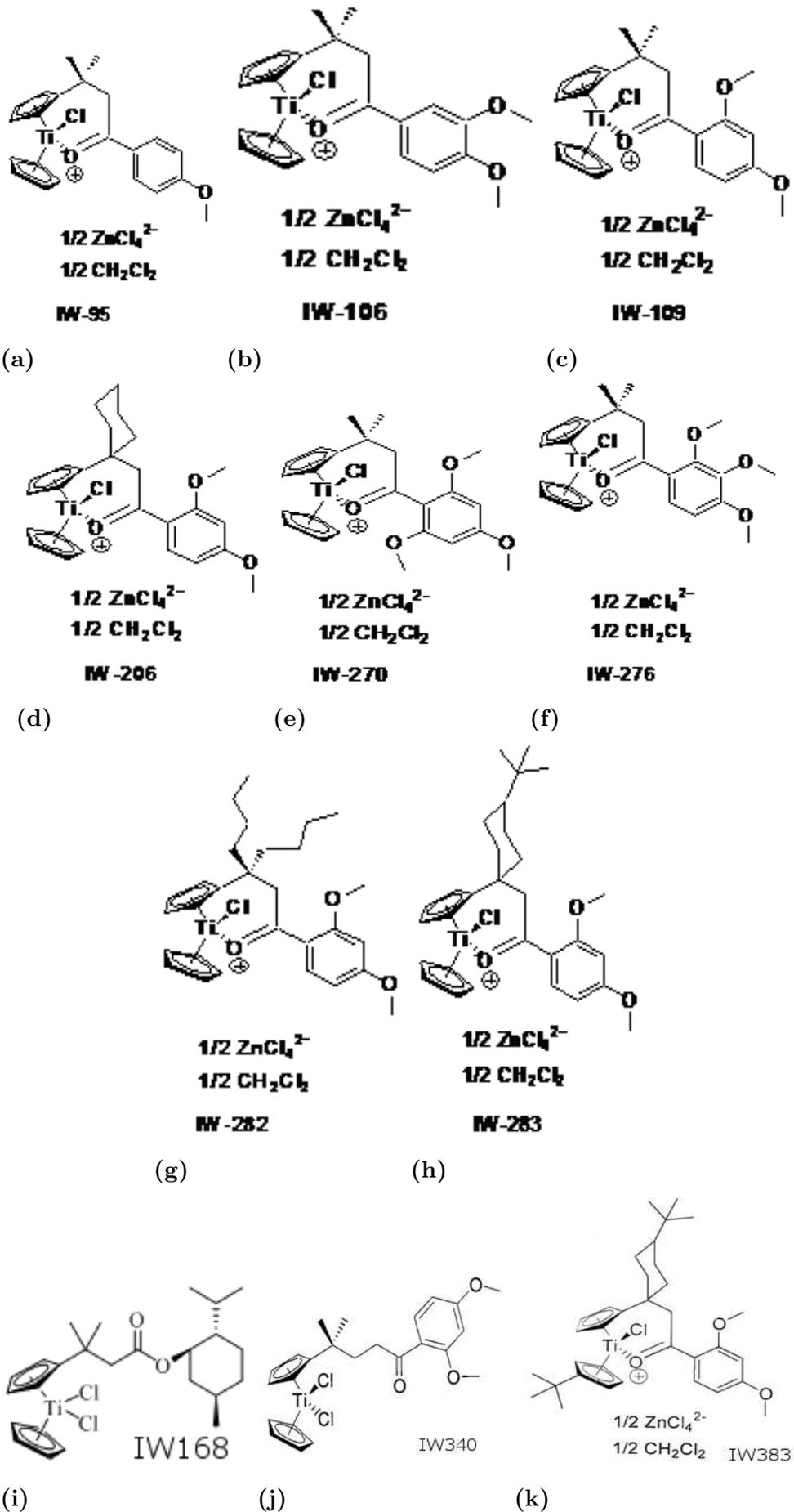


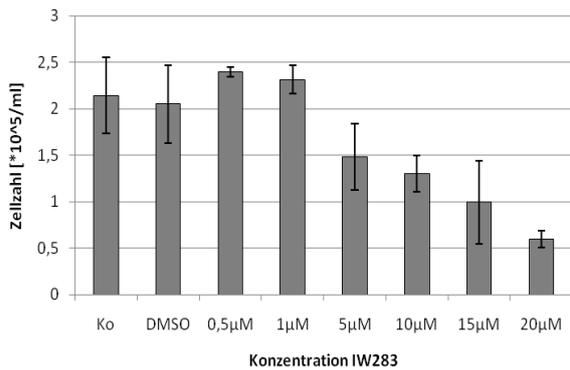
Abbildung 3.2: Strukturformeln der untersuchten ketonsubstituierten Titanocene. Quelle: Iris Winkler, Kekulé-Institut Bonn

Substanzen mit einer großen Gruppe in Nachbarschaft zum Cyclopentadienyl-Ring zeigen im Vergleich zu Verbindungen mit kleineren Substituenten eine stärkere Wirksamkeit. Die gem-Dimethylgruppe in Nachbarschaft zum Cyclopentadienylliganden in den Komplexen IW109 (Abb. 3.2c) und IW242 (Abb. 3.1e) erweist sich als nicht ideal. Die beobachteten Aktivitäten dieser Komplexe gegen die BJAB-Zelllinie sind zwar interessant aber keineswegs ausreichend. Die Einführung des Cyclohexylrestes in IW206 (Abb. 3.2d) bewirkt eine merkliche Steigerung der Aktivität der Verbindungen. Dieser Effekt konnte durch Einführung des 4-tert-Butyl-Cyclohexylsubstituenten noch weiter gesteigert werden. Verbindung IW283 besitzt den niedrigsten AC50 Wert der Stoffe, die von Iris Winkler hergestellt⁷ und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Keton IW383 verfügt im Vergleich zu IW283 über eine zusätzliche räumlich große Substitution. Der AC50 Wert steigt darauf um das über sechs-fache auf 80 μM . Keton IW282 besitzt ebenfalls einen sperrigen di-n-Butylsubstituenten und liegt nach ersten orientierenden Versuchen in der Aktivität zwischen IW293 und IW283.

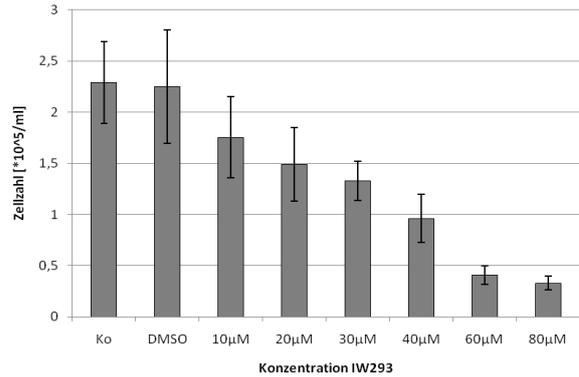
3.2 IW283 und IW293

3.2.1 Proliferationshemmung

Die Proliferation von BJAB-Zellen wird sowohl durch Behandlung mit IW283 als auch durch die Inkubation mit IW293 konzentrationsabhängig gehemmt. Während sich die Zellzahl der Kontrollen nach 24 h etwas mehr als verdoppelt hat, ist bei den mit den beiden Wirkstoffen behandelten Proben eine deutliche Verminderung der Zellzahl zu beobachten (vgl. Abb. 3.3). Bei einer Konzentration von 15 μM IW283 ist die Zellzahl unter die initial eingesetzte Zellzahl ($10^5/\text{ml}$) gesunken (Abb. 3.3a). Auch durch die Behandlung mit IW293 sinkt die Zellzahl unter die Ausgangszellzahl (Abb. 3.3b), allerdings erst bei einer Wirkstoff-Konzentration von 40 μM .



(a)

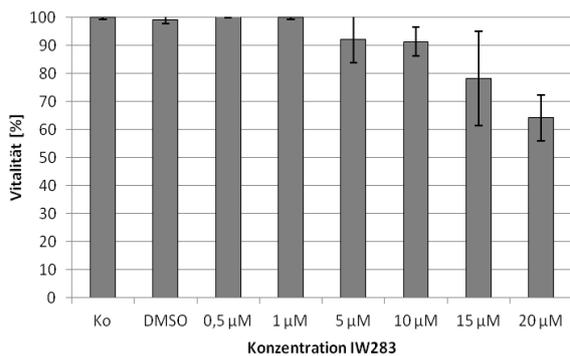


(b)

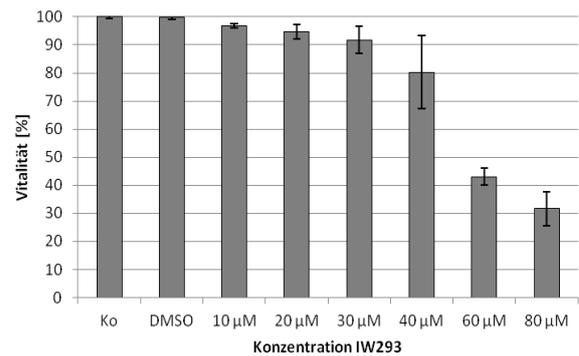
Abbildung 3.3: Mittelwerte der Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit IW283 (Abb. 3.3a) bzw. IW293 (Abb. 3.3b). Fehlerbalken \pm 1 SD. Beide Substanzen induzieren konzentrationsabhängig eine Proliferationshemmung und Frühapoptose. In den beiden niedrigsten Konzentrationen von IW283 ist die Zellzahl höher als in den Kontrollen.

3.2.2 Vitalität

Abbildung 3.4a zeigt die Vitalität nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit IW283. Bei einer Konzentration von 5 μM misst man die erste Reduktion des Anteils der vitalen Zellen auf 87,96% im Vergleich zu 95,44% bei der Kontrolle, bei der Maximalkonzentration von 20 μM ist die Vitalität auf 61,25% gesunken. Setzt man die Kontrolle gleich 100 % wie in Abbildung 3.4a dargestellt, liegen die entsprechenden Werte bei 92,2 % bzw. 64,2 %.



(a)



(b)

Abbildung 3.4: Mittelwerte der Vitalität nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit IW283 bzw. IW293, Fehlerbalken \pm 1 SD. Dargestellt ist der Konzentrationsbereich von 0,5 μM bis 20 μM IW283 (3.4a) bzw. 10 μM bis 80 μM IW293 (3.4b). Bei beiden Substanzen kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Vitalitätsminderung durch Frühapoptose.

Auch die Behandlung der Zellen mit IW293 führt zu einer deutlichen Vitalitätsminderung

gegenüber der Kontrolle, wie Abb. 3.4b verdeutlicht. Das untersuchte Konzentrationspektrum reicht hier von 10 bis 80 μM .

3.2.3 DNA-Fragmentierung

Die Proliferationshemmung verzögert die Vermehrung der malignen Zellen. Es ist jedoch unerlässlich, die Zellen nicht nur in ihrer Proliferation zu hemmen, sondern auch Apoptose zu induzieren. Mikroskopische Untersuchungen geben Hinweise auf die Form des Zelltodes. Mit aktiven Vertretern der Titanocene behandelte BJAB Zellen zeigten die eingangs beschriebenen charakteristischen morphologischen Merkmale der Apoptose. Formverlust, Zellschrumpfen und „blebbing“ waren bei allen wirksamen Substanzen deutlich erkennbar. Abbildung 3.5 zeigt diese Zeichen exemplarisch an der Substanz IW283 (15 μM).

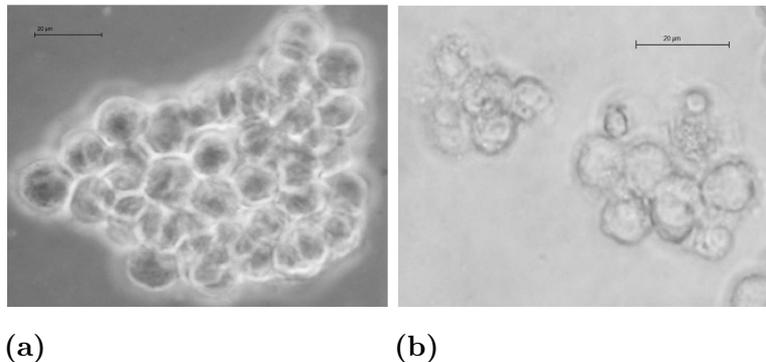
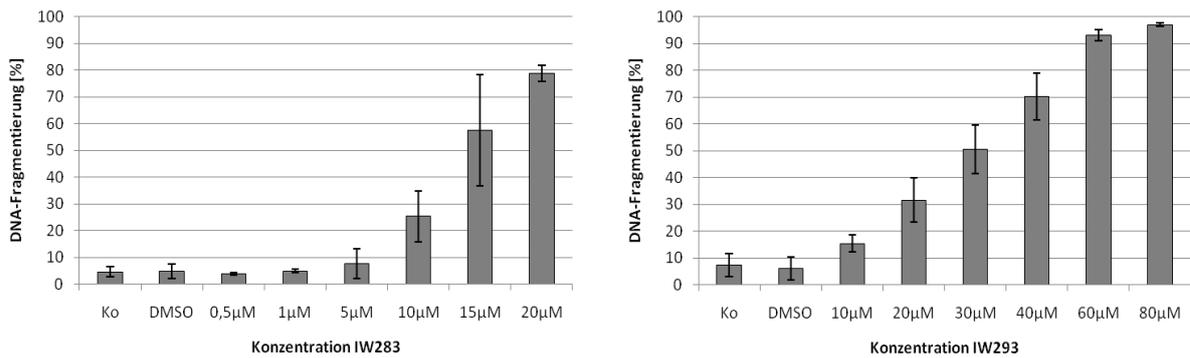


Abbildung 3.5: Kontrollgruppe (3.5a) und mit IW283 behandelte Zellen (3.5b) nach 24-stündiger Inkubation. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen. Während die unbehandelte Kontrolle eine Zellkolonie bildet, ist der Zellverband der mit IW283 inkubierten Zellen gesprengt. Bei einigen Zellen beobachtet man ein sogenanntes "Blebbing".

In Ergänzung zur mikroskopischen Betrachtung der Apoptose ist die modifizierte Zellzyklusanalyse eine quantitative Methode zum Apoptosenachweis, mit der das Apoptoseinduktionspotential der untersuchten Titanocene auf BJAB Zellen *in vitro* ermittelt wurde. Mit einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Substanz sollte der jeweilige Wirkungsbereich bestimmt und eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung hergestellt werden.



(a)

(b)

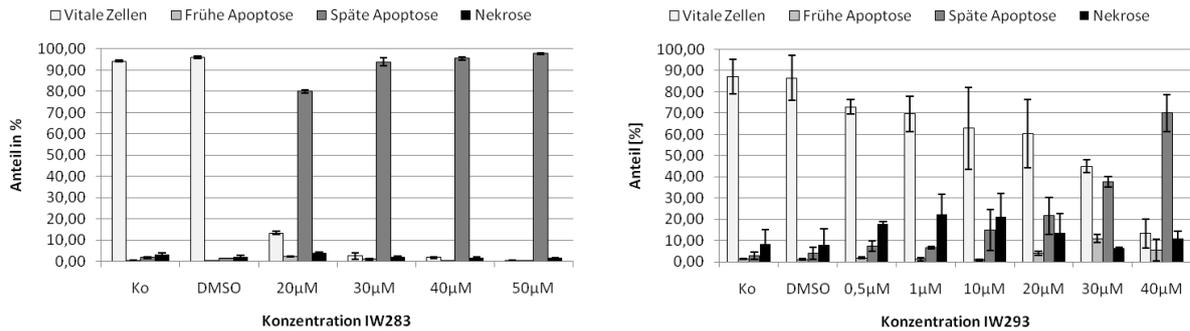
Abbildung 3.6: Mittelwerte der DNA-Fragmentierung [%] nach 72-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD. Beide Substanzen erzeugen konzentrationsabhängig eine zunehmende DNA-Fragmentierung in den eingesetzten Zellen. Während die DNA-Fragmentierung in der getesteten Minimaldosis von 5 µM IW283 sogar leicht geringer ist als in der Negativkontrolle, nimmt sie mit steigender Dosis deutlich zu. Bei IW293 beobachtet man bis zu der Dosis von 60 µM ein nahezu proportionales Wachstum. Der Unterschied zwischen 60 µM und 80 µM IW293 ist verhältnismäßig gering.

Für IW283 zeigte sich in der maximal eingesetzten Konzentration von 20 µM eine DNA-Fragmentierung von 74,1% nach Abzug der Kontrolle, in der kleinsten eingesetzten Dosis von 5 µM waren es 3,16% nach Abzug der Kontrolle. Das untersuchte Dosisspektrum von IW293 reichte von minimal 20 µM (hier zeigte sich eine DNA-Fragmentierung von 24,18%) bis 80 µM. Die Maximaldosis induzierte eine DNA-Fragmentierung von 89,55% nach Abzug der Kontrolle.

Für die beiden Substanzen IW283 und IW293 konnte nach 24-stündiger Inkubation eine deutliche Proliferationshemmung sowie eine Verminderung der Vitalität gezeigt werden. Nach 72-stündiger Inkubation wurde jeweils eine im Vergleich zur mitgeführten unbehandelten Kontrolle signifikant höhere DNA-Fragmentierung gemessen.

3.2.4 Annexin-Propidiumjodid-Doppelfärbung

Das Messprinzip beruht auf der Translokation des Phosphatidylserins von der Innenseite zur Außenseite der Zellmembran im Frühstadium der Apoptose. Die Abb. 3.7 zeigt die Ergebnisse der AnnexinV/PI-Doppelfärbung nach 48 h Inkubation mit IW283 (3.7a) und IW293 (3.7b). Zur quantitativen Auswertung wurden die Daten in Balkendiagrammen dargestellt.



(a)

(b)

Abbildung 3.7: APD nach 48-stündiger Inkubation mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD. In den hohen untersuchten Konzentrationen von IW283 beobachtet man einen sprunghaften Anstieg der spätapoptotischen Zellen, während sowohl frühapoptotische als auch nekrotische Zellen kaum vorhanden sind. Bei IW293 beobachtet man hingegen einen konzentrationsabhängigen Abfall der vitalen Zellen sowie eine Zunahme der spätapoptotischen Zellen. Die Anzahl der als nekrotisch gewerteten Zellen ist in den Konzentrationen von 1 und 10 µM am höchsten. Die Anzahl der frühapoptotischen Zellen ist im Vergleich zu den anderen untersuchten Konzentrationen bei 30 µM IW293 am höchsten.

Die Frühapoptose liegt bei allen Konzentrationen von IW283 bei durchschnittlich 0,83%, die Werte der Spätapoptose/Nekrose steigen mit zunehmender Wirkstoffkonzentration auf maximal 97,77%. Für IW293 ist der Anteil der nekrotischen Zellen insgesamt höher, es ist aber auch zu bemerken, dass die Kontrollproben bereits rund 8% nekrotische Zellen aufweisen. Der höchste Anteil an spätapoptotischen Zellen wird in den Proben der Maximaldosis von 40 µM IW293 erreicht und beträgt 69,96%.

3.2.5 MCF-7, NALM 6

Auch Zelllinien anderer Tumorentitäten wurden mit den getesteten Substanzen behandelt. Sowohl IW283 als auch IW293 induzierten Apoptose in den Zelllinien Nalm 6 und MCF 7.

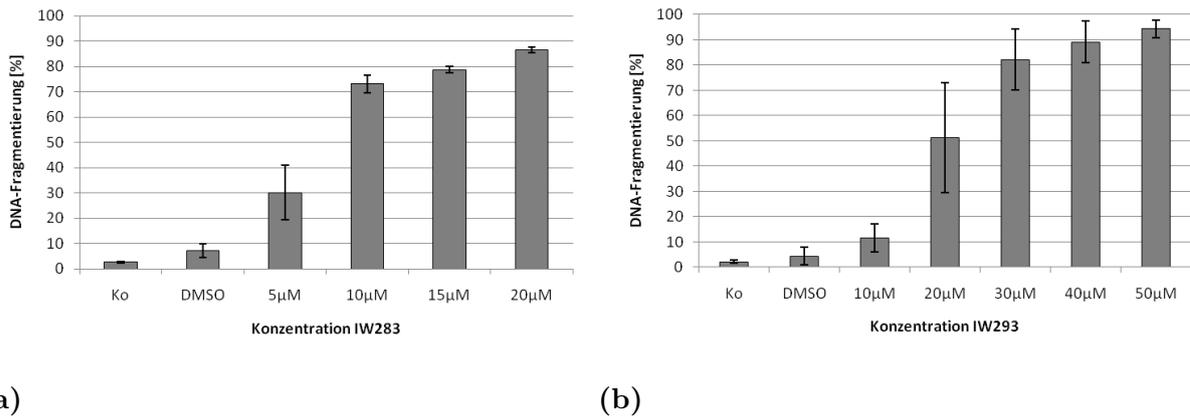


Abbildung 3.8: Mittelwerte der DNA-Fragmentierung [%] nach 72-stündiger Inkubation von Nalm 6 mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken ± 1 SD. Beide Substanzen induzieren konzentrationsabhängig unterschiedlich hohe DNA-Fragmentierungsrate. Die untersuchte Konzentrationsreihe reicht bei IW283 von 5 bis 20 μM , bei IW293 von 10 bis 50 μM . Die Maximaldosis von 50 μM IW293 induziert in über 90% der eingesetzten Zellen eine DNA-Fragmentierung.

Man erkennt bei beiden Substanzen eine konzentrationsabhängige Wirkung. Abb. 3.8a illustriert dies für IW283. Die DNA-Fragmentierung steigt von 30,18% (5 μM) über 73,10% (10 μM) und 78,70% (15 μM) auf 86,42% bei der getesteten Maximalkonzentration von 20 μM . Auch die durch IW293 induzierte DNA-Fragmentierung steigt konzentrationsabhängig: 11,58% bei 10 μM , 51,17% bei 20 μM , 82,15% bei 30 μM , 89,13% bei 40 μM und 94,35% bei 50 μM (vgl. Abb. 3.8b). Die genannten Werte stellen die korrigierte DNA-Fragmentierung dar, bei der die prozentuale DNA-Fragmentierung der Lösungsmittel-Kontrollproben subtrahiert wurden.

Abb. 3.9 zeigt die durch IW283 bzw. IW293 induzierte DNA-Fragmentierung bei der Zelllinie MCF7. Die Zellen wurden unter anderem mit der höchsten untersuchten Konzentration der Titanocene von 100 μM behandelt. IW283 induzierte eine mittlere Apoptoserate von 92,44% (Abb. 3.9a), bei IW293 sind es 60,49% (Abb. 3.9b) nach 72-stündiger Inkubation.

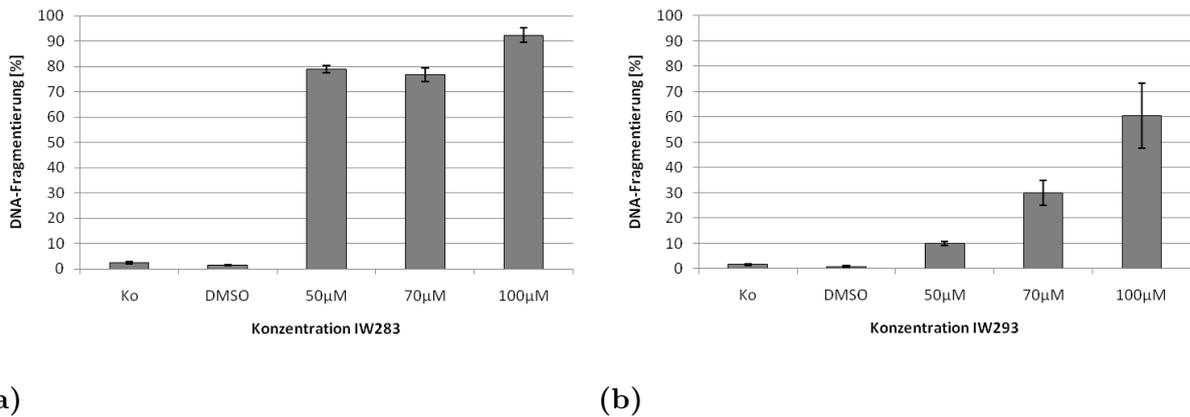


Abbildung 3.9: Mittelwerte der DNA-Fragmentierung [%] nach 72-stündiger Inkubation von MCF-7 mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken ± 1 SD. Nach Inkubation mit IW293 ist die DNA-Fragmentierung insgesamt geringer, man beobachtet jedoch einen konzentrationsabhängigen Anstieg.

Die normalisierten Werte sind bei 100 μM IW283 ein Wert von 91,04%, bei 100 μM IW293 von 59,55%. Es ist hervorzuheben, dass IW283 in den niedrigeren Konzentrationen von 50 μM (77,65% nach Abzug der Kontrolle) und 70 μM (75,46% nach Abzug der Kontrolle) höhere DNA-Fragmentierungswerte erzeugt als IW293. Bei 50 μM zeigt sich hier nach Abzug der Kontrolle ein Mittelwert der DNA-Fragmentierung von 9,13%, bei 70 μM sind es 28,96%.

3.2.6 Doxorubicin-resistente Zellen

Um die Wirkung von IW283 auf gegen Zytostatika resistent gewordene Zellen zu untersuchen, wurde eine Doxorubicin-resistente Zelllinie aus BJAB-Zellen etabliert, die Zelllinie BJAB 7-CCA. Abbildung 3.10 illustriert die durch Doxorubin bzw. IW283 induzierte DNA-Fragmentierung. Die Zelllinien BJAB 7-CCA und BJAB wurden vergleichend untersucht.

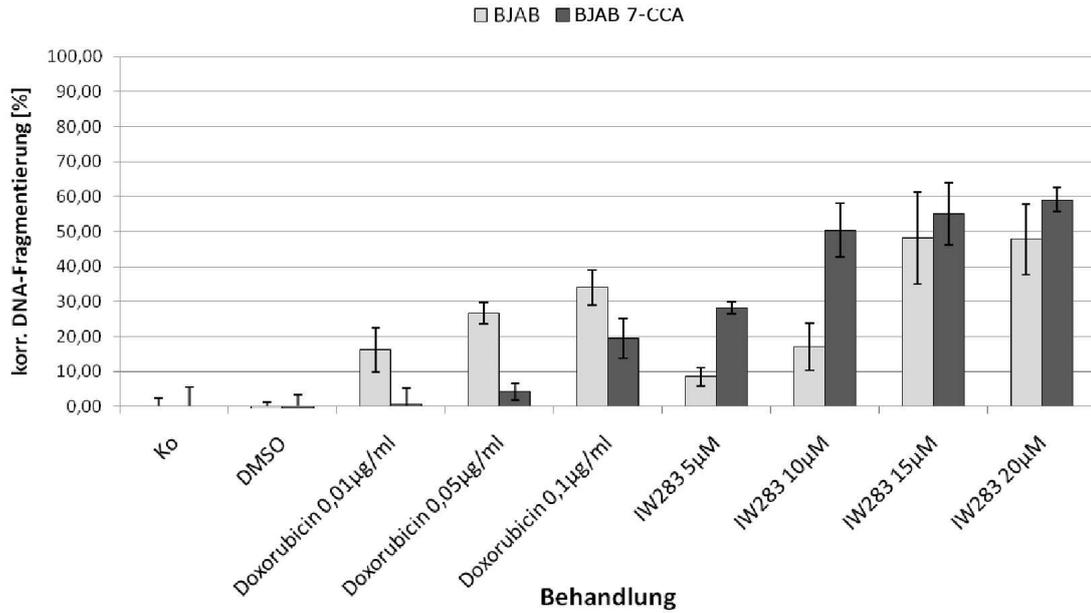


Abbildung 3.10: Mittlere korrigierte DNA-Fragmentierung durch Doxorubicin und IW283. Die dunklen Balken zeigen die DNA-Fragmentierung in Doxorubicin-resistenten Zellen. Nach Behandlung mit Doxorubicin zeigt sich im Vergleich mit BJAB-Zellen eine geringere DNA-Fragmentierung, nach Behandlung mit IW283 ist die DNA-Fragmentierung höher als in den BJAB-Zellen.

Tabelle 3.3: Mann-Whitney-Test ZZ Bjab/BJAB 7-CCA zur Bestimmung der statistischen Bedeutsamkeit der Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,508	,546
DMSO	,965	1,000
0,01 µg/ml Doxorubicin	,001	,000
0,05 µg/ml Doxorubicin	,001	,000
0,1 µg/ml Doxorubicin	,001	,000
5 µM IW283	,050	,100
10 µM IW283	,000	,000
15 µM IW283	,465	,537
20 µM IW283	,019	,019

Es ist zu beobachten, dass die Zelllinie BJAB 7-CCA nach der Behandlung mit Doxorubicin eine geringere DNA-Fragmentierung aufweist als die Zelllinie BJAB. Bei der Behandlung beider Zelllinien mit IW283 zeigt sich eine statistisch signifikant höhere DNA-Fragmentierung bei der Zelllinie BJAB in den Konzentrationen 10 µM und 20 µM (Vgl. Tab. 3.3). Bei 5 µM ist die DNA-Fragmentierung bei den BJAB-Zellen zwar höher, das exakte Signifikanzniveau beträgt jedoch ($p=0,1$), so dass nicht von einem statistisch signifikanten Unterschied gesprochen

werden kann. Die Behandlung mit 15 μM IW283 erzeugt in den Doxorubicin-resistenten Zellen in einem höheren Maß Apoptose als in BJAB-Zellen, der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Außerdem fällt auf, dass die Behandlung von BJAB-Zellen mit IW283 in der Konzentration von 15 μM eine minimal höhere DNA-Fragmentierung bewirkt als die Behandlung mit 20 μM IW283 (48,70% zu 48,40%), wobei bei 15 μM auch eine etwas höhere Standardabweichung vorliegt.

3.3 *Ex vivo* Versuche

3.3.1 Patientenmaterial

Für die Versuche mit Patientenzellen erfolgte die modifizierte Zellzyklusanalyse nach 60 h mit den Anthracyclinen Daunorubicin (8,9 μM), Doxorubicin (8,6 μM), Epirubicin (8,6 μM), Idarubicin (1,9 μM), dem Mitosehemmer Vincristin (0,54 μM), den Nukleosidanaloga Cytarabinosid (20,5 μM), Fludarabin (12,9 μM), und dem Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid (8,5 μM) und verschiedenen Vertretern der untersuchten Titanocene (IW109-80 μM , IW206-80 μM , IW283-40 μM , IW293-40 μM , IW242-60 μM). Die Konzentrationen der genannten Zytostatika entsprechen der LC50 der *in vitro* Ergebnisse mit BJAB-Zellen (persönliche Mitteilung Dr. med. Dr. rer. nat. A. Prokop).

Abbildung 3.11 zeigt die Apoptosinduktion bei primären Leukämiezellen von insgesamt 26 an AML bzw. ALL erkrankten Patienten unter Einsatz einiger in der Therapie der Leukämie verwendeter Zytostatika sowie fünf verschiedener Titanocene. Die Abbildung gibt einen ersten Überblick über die Empfindlichkeit primärer Leukämiezellen. Bei teilweise limitiertem Probenmaterial konnten nicht alle Proben mit allen zu untersuchenden Substanzen behandelt werden. Bei der AML wurde mit lediglich vier Patienten keine ausreichend große Stichprobe erreicht um tiefer gehende Analysen anzustellen. Während die Substanzen IW109 und IW242 keine statistisch signifikant bessere Wirkung zeigen, wurde bei IW206 zumindest im Vergleich zur Kontrolle sowie zu Daunorubicin, Doxorubicin, Fludarabin und Etoposid eine statistisch signifikant höhere DNA-Fragmentierung gemessen (Vgl. Tab. 3.4). Die DNA-Fragmentierung durch IW293 unterscheidet sich statistisch signifikant von allen untersuchten Zytostatika bis auf Etoposid. IW283 zeigte die höchste DNA-Fragmentierung, der Unterschied im Vergleich zu den anderen Substanzen ist bis auf Etoposid und Fludarabin statistisch hoch signifikant.

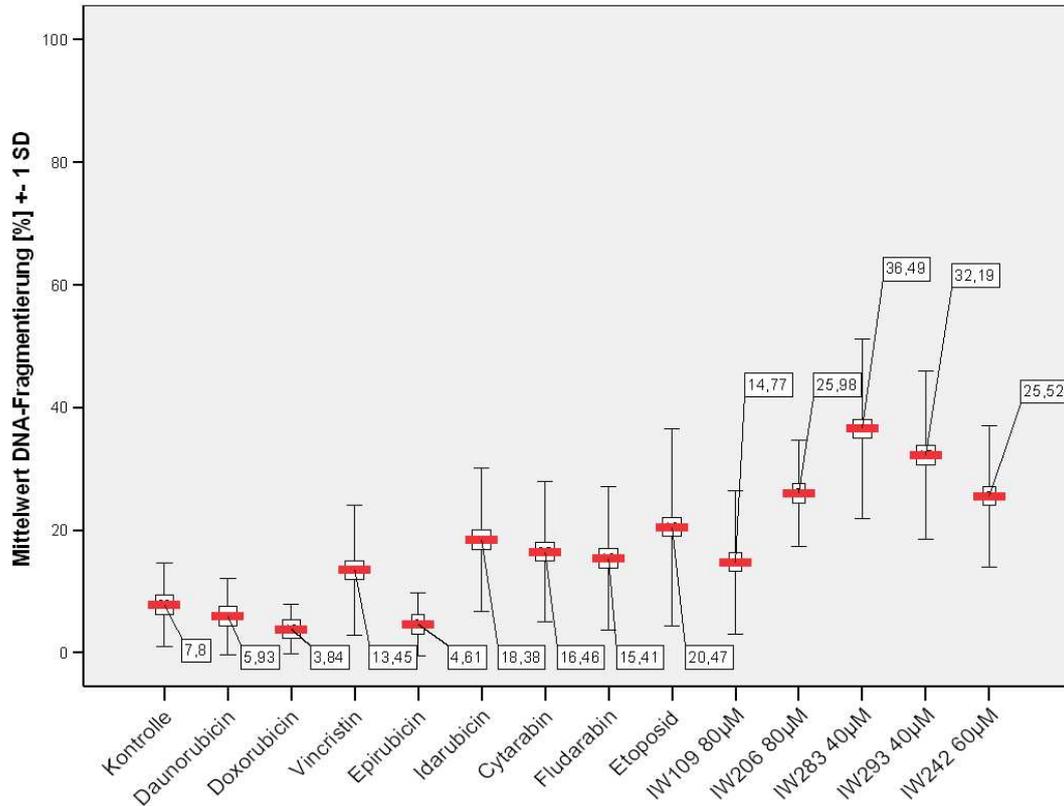


Abbildung 3.11: Mittlere DNA-Fragmentierung durch Zytostatika und IW-Substanzen. Primäre Lymphoblasten von 26 Probanden. Untersucht wurden verschiedene Zytostatika sowie 5 unterschiedliche Titanocene. Die beiden Substanzen, die die höchste DNA-Fragmentierungsrate induzierten sind IW83 und IW293 mit 36,49 bzw. 32,19%.

Tabelle 3.4: Wilcoxon-Test zur Untersuchung der statistischen Signifikanz möglicher Unterschiede. Dargestellt sind die p-Werte der asymptotischen Signifikanz (2-seitig) beim Vergleich von IW-Substanzen mit verschiedenen etablierten Zytostatika.

Substanz	IW283	IW293	IW109	IW206	IW242
Kontrolle	,000	,001	,068	,028	,655
Daunorubicin	,000	,001	,068	,028	,180
Doxorubicin	,003	,005	,068	,043	,180
Vincristin	,001	,001	,273	,075	xxx
Epirubicin	xxx	xxx	,109	,068	,180
Idarubicin	,011	,006	,465	,249	,180
Cytarabin	,001	,004	,465	,075	,655
Fludarabin	,069	,038	,144	,043	,655
Etoposid	,327	,214	,715	,043	,180
IW283	xx	,510	xxx	xxx	xxx
IW293	,510	xxx	xxx	xx	xxxx

Wie Abbildung 3.12 verdeutlicht, wurde bei den Zellen der an ALL erkrankten Patienten

eine mittlere Apoptoseinduktion von über 36% bei den mit IW283 behandelten Proben detektiert. IW293 erzeugt in 33,84% der Zellen eine DNA-Fragmentierung. Die herkömmlichen Chemotherapeutika induzieren weniger Apoptose (2,81% bis 19,21%). Die Abbildung zeigt die mittlere DNA-Fragmentierung der verschiedenen Proben aus mehreren Versuchen. Es wird nicht die korrigierte Fragmentierung nach Abzug der Fragmentierung der unbehandelten Kontrolle dargestellt, sondern für jede Probe der tatsächliche Wert gezeigt.

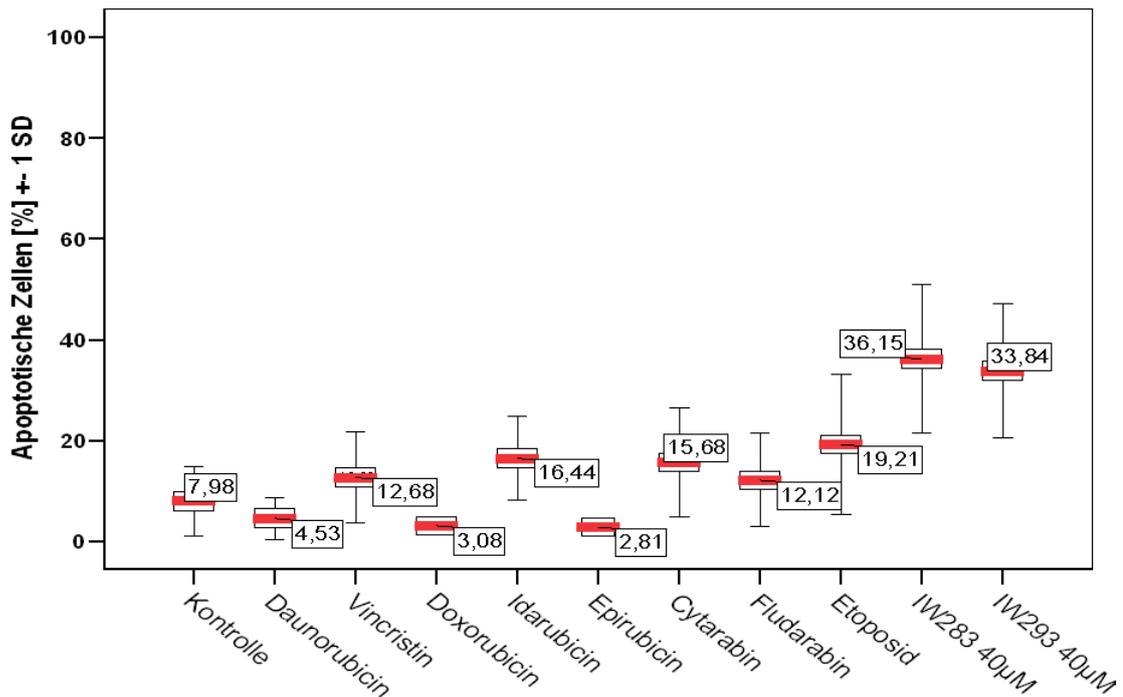


Abbildung 3.12: *Ex vivo* Apoptoseinduktion: DNA-Fragmentierung von primären Lymphoblasten von 22 ALL-Patienten.

Die Unterschiede in der Fragmentierung sind bei den beiden IW-Substanzen im Vergleich zu Doxorubicin, Daunorubicin, Vincristin, und Cytarabin hoch signifikant, IW283 wirkt auch im Vergleich zu Fludarabin statistisch signifikant besser auf die untersuchten Zellen. Der Unterschied zu der Behandlung mit Etoposid ist für beide Substanzen statistisch nicht signifikant (vgl. Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Wilcoxon-Test zur statistischen Untersuchung der Unterschiede zwischen IW283 bzw. IW293 und verschiedenen etablierten Zytostatika für die Versuche mit primären Lymphoblasten von 22 ALL-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen p-Werte der asymptotischen Signifikanz (2-seitig).

Substanz	Ko.	Dauno.	Doxo.	Vin.	Ida.	Cyt.	Flud.	Etop.	IW293
IW283	,001	,001	,005	,002	,007	,002	,046	,249	,534
IW293	,003	,003	,008	,008	,021	,010	,075	,173	xxx

3.3.2 Selektivität

Um die Wirkung von IW283 und IW293 auf gesunde primäre Lymphozyten zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen behandelt und die Ergebnisse mit denen der parallel behandelten BJAB-Zellen verglichen.

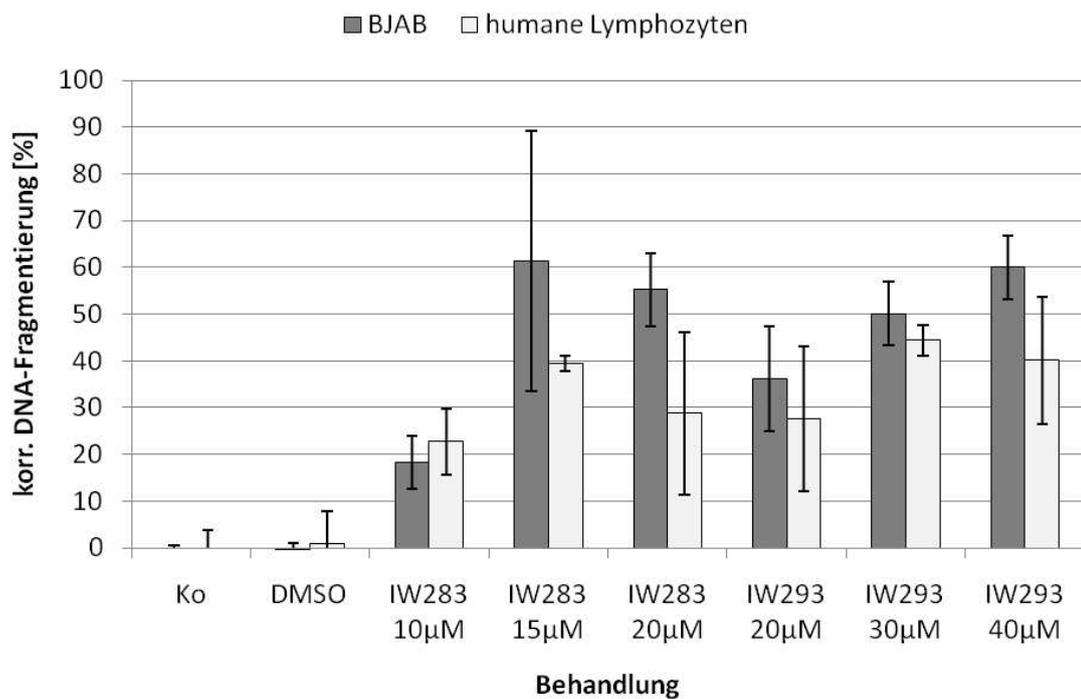


Abbildung 3.13: DNA-Fragmentierung von BJAB-Zellen und humanen Lymphozyten gesunder Probanden nach 72-stündiger Inkubation mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken: +/- 1 SD.

Tabelle 3.6: Mann-Whitney-Test ZZ Bjab/Lymphozyten zur Bestimmung der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen beiden Zellarten.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,749	,272
DMSO	1,000	1,000
10 μ M IW283	,262	,310
15 μ M IW283	,050	,100
20 μ M IW283	,006	,004
20 μ M IW293	,150	,180
30 μ M IW293	,275	,400
40 μ M IW293	,006	,004

Abbildung 3.13 stellt die Ergebnisse der modifizierten Zellzyklusanalyse für IW283 und IW293 in einem Diagramm dar. Man sieht deutliche Unterschiede zwischen der Wirkung der Substanz auf die Lymphomzellen und der auf die humanen Lymphozyten von gesunden Probanden. Während sich die beiden Kontrollen (Negativ-Kontrolle sowie DMSO-Kontrolle) nicht statistisch signifikant unterscheiden, besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Zellarten, wenn sie jeweils mit der Maximaldosis der untersuchten Substanzen behandelt wurden. Die DNA-Fragmentierung ist bei BJAB-Zellen bis auf eine Ausnahme höher als bei den primären humanen Lymphozyten gesunder Probanden. Bei der Behandlung mit IW283 fällt auf, dass die Konzentration von 10 μ M in humanen Lymphozyten eine höhere DNA-Fragmentierung auslöst als in BJAB-Zellen, jedoch ist der Unterschied nicht statistisch signifikant. Bei 15 μ M IW283 ist die DNA-Fragmentierung bei den Lymphozyten geringer als bei BJABs. Es fällt allerdings auf, dass sie mit durchschnittlich 49,33% höher ist als bei der Konzentration von 20 μ M (38,7%). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (vgl. Tabelle 3.6).

Für IW293 lässt sich sagen, dass die Substanz bei beiden Zellarten Apoptose auslöst, bei humanen Lymphozyten jedoch in geringerem Ausmaß als bei BJAB-Zellen. Der Unterschied ist nur nach Behandlung mit 40 μ M IW293 statistisch signifikant.

Abbildung 3.14 illustriert die Proliferation der beiden untersuchten Zellarten nach 24-stündiger Inkubation mit IW283 bzw. IW293.

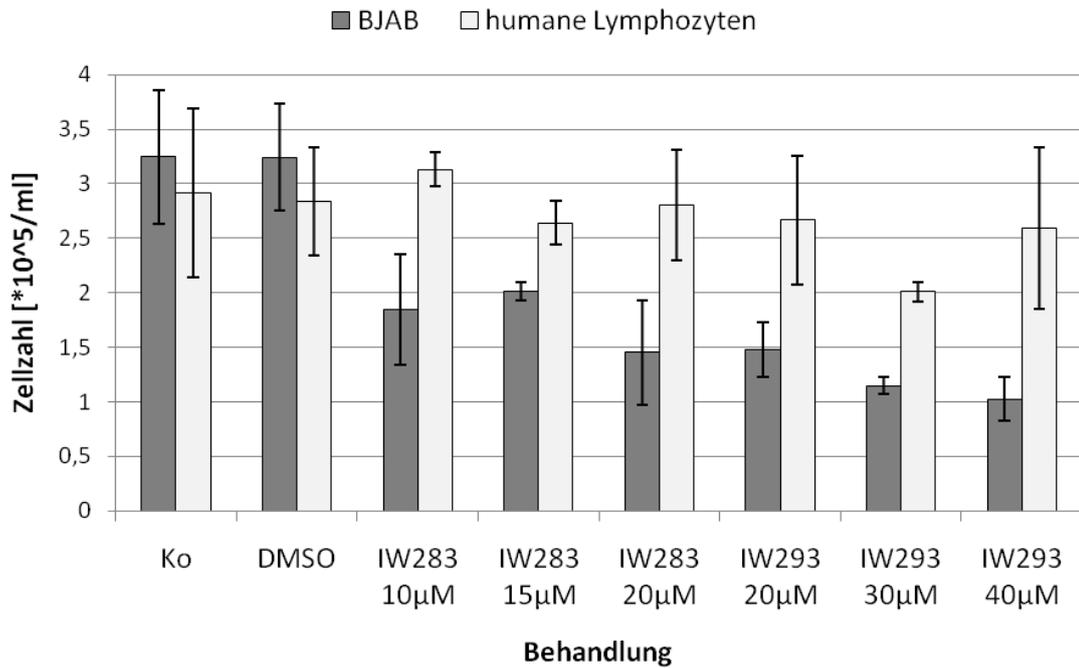


Abbildung 3.14: Proliferationshemmung von BJAB-Zellen und humanen Lymphozyten gesunder Probanden nach 24-stündiger Inkubation mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken: +/- 1 SD.

Beide Substanzen hemmen die Lymphomzellen in ihrer Proliferation, während sich die Zahl der primären normalen Lymphozyten nicht verringert. Diese Zellen proliferieren nicht mehr, eine Verringerung der Zellzahl wäre ein Zeichen für einen durch die eingesetzten Substanzen induzierten Zelltod.

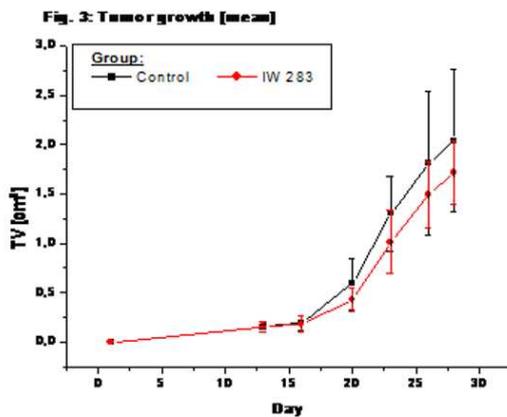
3.4 *In vivo* Versuche am Mausmodell

Um die Wirkung von IW283 auf den lebenden Organismus zu evaluieren, wurden nach Untersuchungen hinsichtlich der Selektivität und Toxizität *in vitro/ex vivo* mit dieser Substanz Tierversuche durchgeführt. Auch bei den Tierexperimenten im Mausmodell erfolgten zunächst orientierende Toxizitätstestungen.

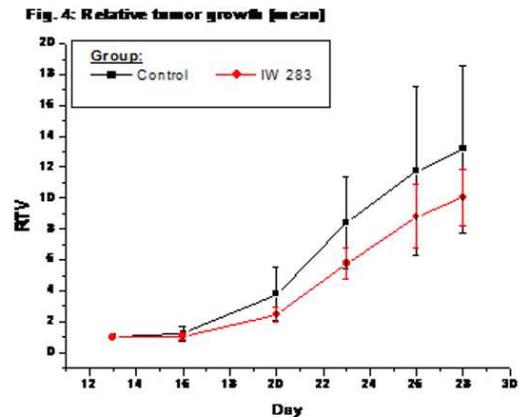
3.4.1 Tierversuche zur Tumorreduktion

Nach einer Zytotoxizitätstestung, die durch die Firma EPO in Berlin Buch durchgeführt wurde, erfolgte ein Versuch zur Tumorreduktion durch IW283. Nach Anwachsen des induzierten Lymphoms (es wurden 10^7 BJAB-Zellen injiziert) wurde den acht behandelten Mäusen

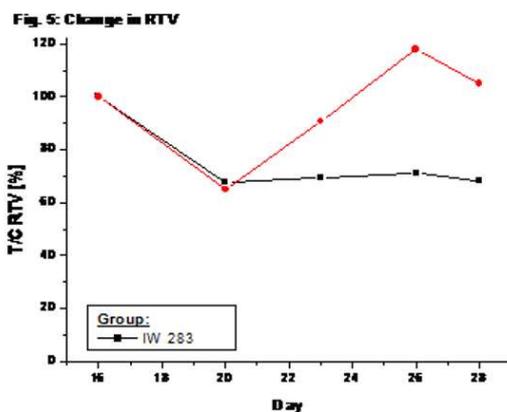
IW283 in einer Konzentration von 50 mg/kg KG i.p. verabreicht. Die Tiere tolerierten diese Konzentration gut, nach einer initialen Gewichtsabnahme blieb das Gewicht konstant und die Tiere erhielten ihren Allgemeinzustand. Zwei Tiere verstarben 2 bzw. 3 Tage nach der Applikation der ersten Dosis. Nach dem Tod der Tiere wurden die weiteren Gaben auf 30mg/kg KG reduziert. Das Tumorumfang betrug bei Versuchsende 70% des Tumorumfangs der unbehandelten Kontrollgruppe. Betrachtet man die prozentuale Veränderung des Tumorumfangs (Abb. 3.15c) beider Gruppen, so fällt auf, dass bei beiden das Tumorumfang zunächst abnimmt. In der Kontrollgruppe steigt es im Verlauf auf 120%. In der mit IW283 behandelten Gruppe sieht man einen Abfall auf ca. 70% nach 4 Tagen, im Anschluss bleibt das Tumorumfang auf diesem Niveau relativ konstant.



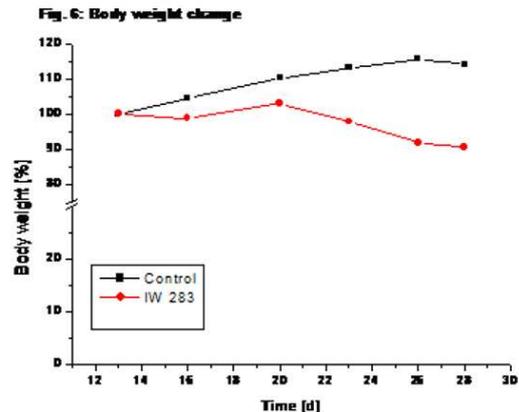
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 3.15: Tierversuche Tumorreduktion im Mausmodell. Abb. zeigt 3.15a das mittlere Tumorumfang, Abb. 3.15b das mittlere relative Tumorumfang, 3.15c die Veränderung des relativen Tumorumfangs [%] und 3.15d das Körpergewicht der Tiere [%].

Bei der makroskopischen Untersuchung der beiden frühzeitig verstorbenen Tiere fielen eine hellrot fleckige Leber sowie eine kleine Milz auf.

3.5 Mechanistische Untersuchungen

Nach der Beobachtung, dass durch einige der untersuchten Titanocene Apoptose induziert wird, bestand das Forschungsinteresse darin, herauszufinden, über welche Mechanismen die Apoptoseinduktion in den Zellen herbeigeführt wird. Um dies zu realisieren standen verschiedene Untersuchungen zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.5.1 Westernblot

Um einen von der Durchflusszytometrie unabhängigen Nachweis der Apoptose zu erbringen, wurden die bisher dargestellten Daten mittels Westernblot validiert. Die Caspase-3 ist das wichtigste und universellste ausführende Enzym der Apoptose^{78,79}. Der verwendete Antikörper für den Caspase-3-Nachweis bindet spezifisch an die kleine Untereinheit (p17) der Caspase. Die Procaspase ist durch den verwendeten Antikörper nicht detektierbar.

Das DNA-Reparatur-Protein PARP ist eines der häufigsten in der Endphase der Apoptose prozessierten Enzyme⁸⁰ und wird ebenfalls spezifisch durch einen Westernblot nachgewiesen.

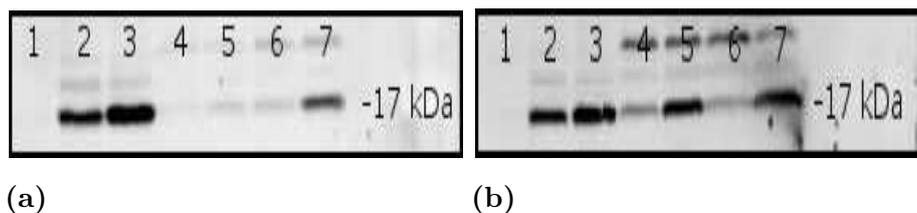


Abbildung 3.16: Westernblotanalyse der Caspase-3-Prozessierung. a) (1)Ko, (2)Epirubicin 24 h Inkubation, (3) Epirubicin 36 h, (4) IW283 10 μ M 24 h, (5) IW283 10 μ M 36 h, (6) IW283 20 μ M 24 h, (7) IW283 20 μ M 36 h. b) (1) Ko, (2) Epirubicin 24 h Inkubation, (3) Epirubicin 36 h, (4) IW293 20 μ M 24 h, (5) IW293 20 μ M 36 h, (6) IW293 40 μ M 24 h, (7) IW293 40 μ M 36 h.

Bei den Proteinen der unbehandelten Zellen ist keine Bande vorhanden, dort wurde die Caspase-3 nicht prozessiert. Abb. 3.16a und 3.16b zeigen deutliche Spaltungsbanden nach Behandlung mit IW283 bzw. IW293. Bei IW283 erscheint die Bande der höheren Wirkstoffkonzentration (20 μ M) deutlicher, außerdem fällt auf, dass die Banden bei 36 h Inkubation stärker sind als nach 24 h. Die stärkste Bande ist bei 20 μ M nach 36 h Inkubation zu sehen.

Das Protein PARP ist im aktiven Zustand 116 kDa groß und wird durch Caspasen während der Exekution der Apoptose durch Prozessierung deaktiviert. Die entstehenden 85 kDa großen Fragmente als auch das native Protein sind mit dem verwendeten Antikörper detektierbar. Allerdings sind die 116 kDa Banden nur sehr schwach sichtbar. Abb. 3.17a illustriert, dass die Behandlung mit IW283 in den Konzentrationen 10 μM und 20 μM sowohl nach 24 h als auch nach 36 h zu einer deutlichen PARP-Spaltung führt. Das gleiche trifft zu auf die Behandlung mit IW293 in den Konzentrationen 20 μM und 40 μM , wie in Abb. 3.17b zu sehen ist.

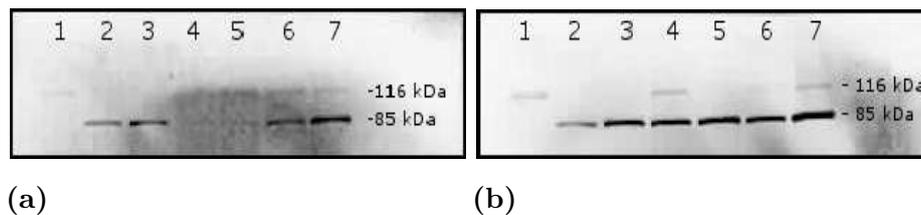


Abbildung 3.17: Westernblotanalyse der PARP-Prozessierung. a) (1) Ko, (2) Epirubicin 24 h Inkubation, (3) Epirubicin 36 h, (4) IW283 10 μM 24 h, (5) IW283 10 μM 36 h, (6) IW283 20 μM 24 h, (7) IW283 20 μM 36 h. b) (1) Ko, (2) Epirubicin 24 h Inkubation, (3) Epirubicin 36 h, (4) IW293 20 μM 24 h, (5) IW293 20 μM 36 h, (6) IW293 40 μM 24 h, (7) IW293 40 μM 36 h.

Abbildung 3.18 zeigt exemplarisch die gleichmäßige Proteinbeladung der in Abb. 3.16b und 3.17b gezeigten Nitrozellulosemembranen.

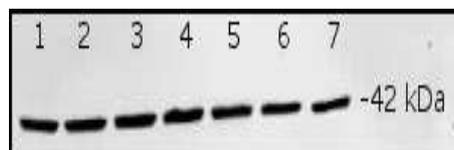


Abbildung 3.18: Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung der Zellulosemembranen in Abb. 3.16 durch β -Actin. (1) - (7) idem zu Abb. 3.16

Die Versuche zum Nachweis einer spezifischen Apoptoseinduktion hatten alle ein positives Ergebnis. Es wurden sowohl frühe (Phosphatidylserinpräsentation an der Außenseite der Membran) als auch zentrale (Caspase-3-Prozessierung) und späte (PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung) Merkmale der Apoptose gefunden.

3.5.2 Extrinsischer Apoptosesignalweg

3.5.2.1 BJAB mock/FADD dn

Die meisten Chemotherapeutika induzieren Apoptose via extrinsischem oder intrinsischem Signalweg. Eine Möglichkeit, den extrinsischen Pathway nachzuweisen, ist, die durchlaufene

Apoptose auf ihre Abhängigkeit von der FADD zu überprüfen. Die FADD ist für die Weiterleitung des Apoptosesignals in das Zellinnere verantwortlich und daher unentbehrlich für den extrinsischen Apoptoseweg^{81,82}. In einem BJAB Zellmodell, bei dem eine Zelllinie eine doppelt negative Mutante für FADD (BJAB FADDdn) ist und eine zweite Zelllinie FADD normal exprimiert (BJAB mock), wurde diese Abhängigkeit untersucht.

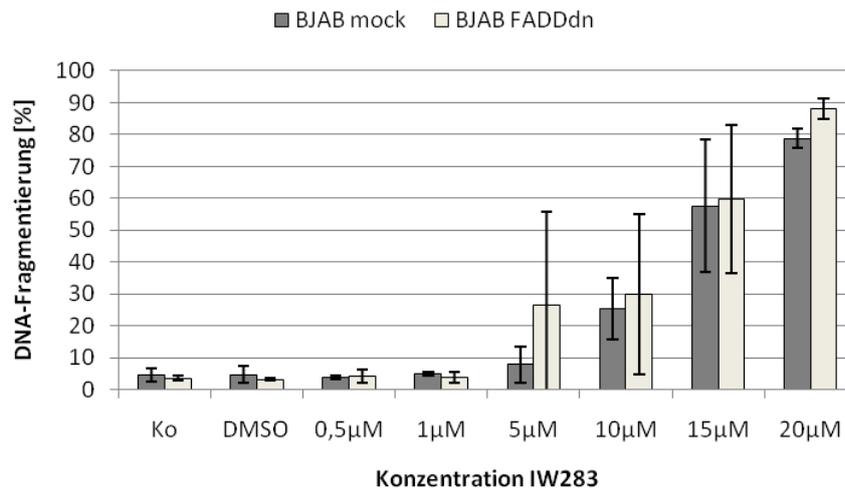


Abbildung 3.19: Mittlere DNA-Fragmentierung nach 72-stündiger Inkubation von BJAB mock bzw. FADD dn Zellen mit IW283. Fehlerbalken +/- 1 SD. Dargestellt ist die Konzentrationsreihe von 0,5 bis 20 µM IW283. Es ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der DNA-Fragmentierung in beiden Zelllinien zu beobachten.

Tabelle 3.7: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen BJAB mock/FADD in der DNA-Fragmentierung nach Behandlung mit IW283. Dargestellt sind die jeweiligen p-Werte.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,631	,699
DMSO	,528	,699
0,5 µM IW283	,121	,200
1 µM IW283	,121	,200
5 µM IW283	,078	,093
10 µM IW283	,873	,937
15 µM IW283	,631	,699
20 µM IW283	,050	,100

Die maximale erreichte DNA-Fragmentierung in der BJAB mock Zelllinie beträgt im Mittel 74% nach Abzug des Wertes der allein mit DMSO behandelten Kontrolle, in der BJAB

FADD dn Zelllinie wurden maximal 84,92% DNA-Fragmentierung gemessen (nach Abzug der DMSO-Kontrolle). In der Maximaldosis von 20 μM zeigt sich ein statistisch marginal signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. Die entsprechenden p-Werte sind in Tab. 3.7 dargestellt.

Der untersuchte Konzentrationsbereich für das insgesamt weniger wirksame IW293 reicht bis 40 μM . In der Maximaldosis wurde eine mittlere DNA-Fragmentierung von 64,06% in BJAB mock und 68,55% in BJAB FADD dn erreicht, jeweils nach Abzug der DMSO Kontrolle (vgl. Abb. 3.20).

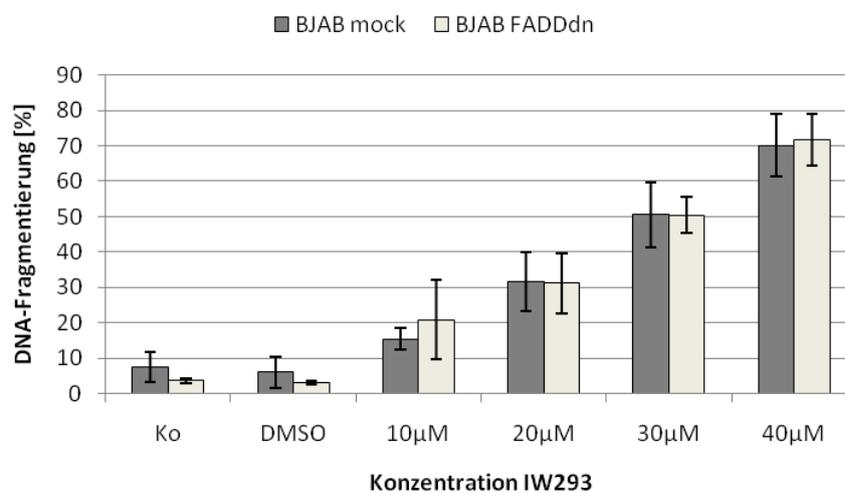


Abbildung 3.20: Mittlere DNA-Fragmentierung nach 72-stündiger Inkubation von BJAB mock bzw. FADD dn Zellen mit IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD. Es ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der DNA-Fragmentierung bei Wirkstoffkonzentrationen von 10 bis 40 μM zu beobachten.

Tabelle 3.8: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz beim Vergleich der Zellzyklusanalyse von BJAB mock und BJAB FADDdn-Zellen nach Behandlung mit IW293.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,239	,272
DMSO	,674	,776
10 μM IW293	,059	,066
20 μM IW293	,289	,328
30 μM IW293	,289	,328
40 μM IW293	,239	,272

In den in Abbildung 3.19 und 3.20 dargestellten Konzentrationsbereichen von IW283 und IW293 konnte, außer bei der Konzentration 20 μM IW283, kein statistisch signifikanter

Unterschied zwischen den induzierten Apoptoseraten in BJAB mock und BJAB FADD dn festgestellt werden (vgl. Tab. 3.7 und Tab. 3.8). Es ist also davon auszugehen, dass die Apoptoseinduktion von IW283 und IW293 unabhängig ist vom extrinsischen Signaltransduktionsweg.

3.5.3 Mitochondrialer Apoptosesignalweg

Es gilt nun, den intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweg genauer zu untersuchen. Charakteristische Merkmale dieses Pathways sind vor allem der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol und die Caspase-9-Prozessierung.

3.5.3.1 JC-1

Ob es zum Zusammenbruch des Membranpotentials durch die Behandlung mit den beiden untersuchten Titanocenen kommt, wurde durchflusszytometrisch mit der JC-1-Färbung ermittelt. Bei dieser Methode wird die Reduktion des Membranpotentials durch die Abnahme der Intensität der Fluoreszenz 2 (590 nm) gemessen. Abb. 3.21 zeigt, dass es sowohl bei IW283 als auch bei IW293 nach 48 h zu einem deutlichen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kam. Der Anteil der Zellen mit reduziertem mitochondrialen Membranpotential ist in Abb. 3.21a (IW283) maximal 89,65% der Zellpopulation und wird bei der Wirkstoffkonzentration von 50 μM erreicht. Bei IW293 liegt dieser Anteil nach Abzug der Kontrolle bei maximal 75,77%, und zwar bei der Konzentration von 60 μM (Abb. 3.21b).

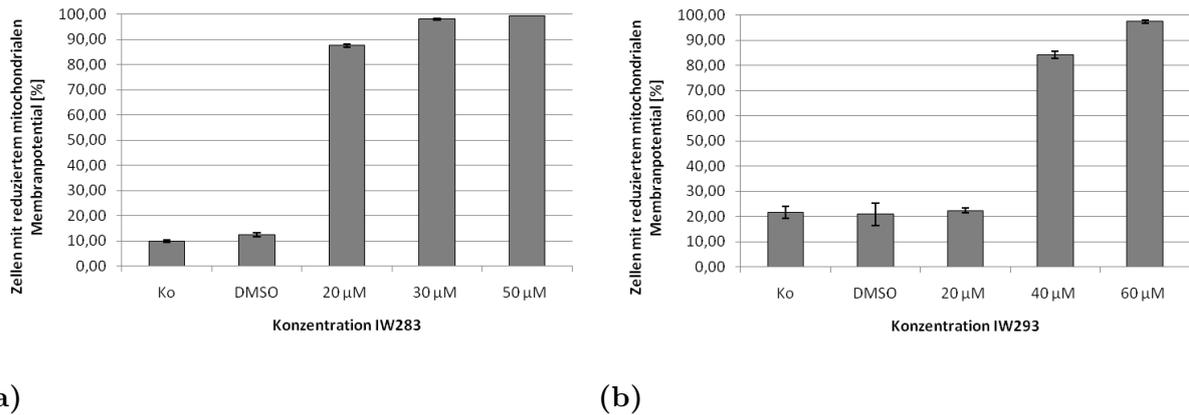


Abbildung 3.21: Änderung des mitochondrialen Membranpotentials in BJAB-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit IW283 bzw. IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD. Während nach der Behandlung mit 20 µM IW283 ein sprunghafter Anstieg der Zellen mit reduziertem Membranpotential zu erkennen ist, sind die Balken bei 30 bzw. 50 µM IW283 nahezu auf dem gleichen Niveau. Bei IW293 beobachtet man einen deutlicheren Anstieg zwischen 20 und 40 µM als zwischen 40 und 60 µM IW293.

Da der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auch sekundär und unabhängig von dem Apoptosepathway oder während der Nekrose erfolgen kann, wurden noch weitere Hinweise auf den intrinsischen Pathway untersucht. Die spezifischeren Nachweise der intrinsischen Apoptose sind die bereits erwähnten Westernblotanalysen der Caspase-9-Prozessierung sowie der Cytochrom C-Ausschüttung.

3.5.3.2 Caspase-9-Prozessierung

Der wichtigste Hinweis auf den mitochondrialen Pathway ist der Nachweis der Caspase-9-Prozessierung durch Westernblotanalyse. Das Apoptosom ist der zentrale Komplex des mitochondrialen Signalwegs. Nach dessen Bildung wird durch eine Konformationsänderung die Caspase-9 prozessiert⁸³.

Abb. 3.22 zeigt, dass eine Caspase-9-Prozessierung nach Behandlung mit IW283 (3.22a) und IW293 (3.22b) über 24 h und 36 h detektiert wurde (Spalten 4 - 7). Die Kontrolle mit unbehandeltem Zelllysat enthält nur Procaspase-9 (Spalte 1).

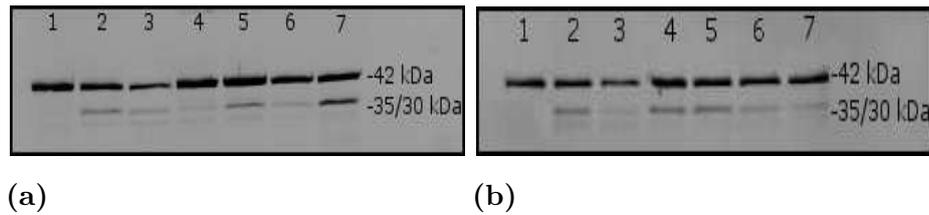


Abbildung 3.22: Westernblotanalyse der Caspase-9-Prozessierung. a) (1) Ko, (2) Epirubicin 24 h Inkubation, (3) Epirubicin 36 h, (4) IW283 10 μM 24 h, (5) IW283 10 μM 36 h, (6) IW283 20 μM 24 h, (7) IW283 20 μM 36 h. b) (1) Ko, (2) Epirubicin 24 h Inkubation, (3) Epirubicin 36 h, (4) IW293 20 μM 24 h, (5) IW293 20 μM 36 h, (6) IW293 40 μM 24 h, (7) IW293 40 μM 36 h.

Bei beiden Substanzen wird deutlich, dass die Intensität der Epirubicin-Banden nach 24 h größer ist als nach 36 h. Für die Substanz IW283 gilt, dass es nach 36 h zu einer vermehrten Caspase-9-Prozessierung kommt (Abb. 3.22a). IW293 ruft in der Konzentration von 20 μM eine stärkere Caspase-9-Prozessierung hervor als bei 40 μM , wobei die Inkubationszeit von 24 h oder 36 h keinen Einfluss hat (Abb. 3.22b).

3.5.3.3 Cytochrom C-Release-Nachweis

Dieser Nachweis wurde nur für IW283 geführt. Die Trennung der intakten Mitochondrien vom Zytosol und anschließende Auftrennung der zytosolischen Fraktion und Immundetektion des Cytochrom C mit spezifischen Antikörpern ermöglicht es zu erkennen, ob es nach Inkubation mit IW283 zu einer Ausschüttung von Cytochrom C in das Zytosol kommt.

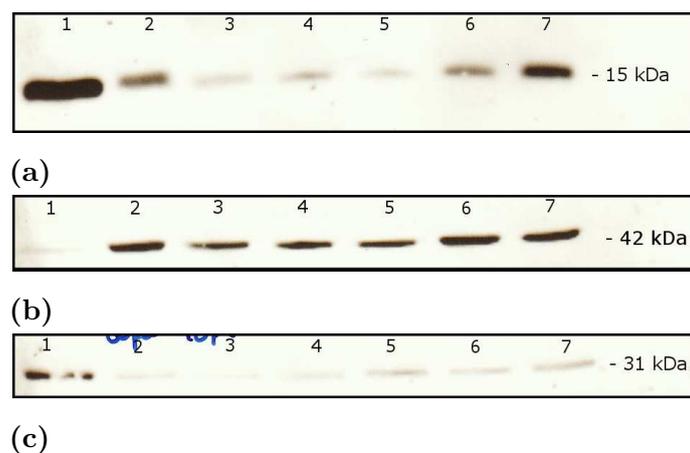


Abbildung 3.23: Westernblotanalyse des Cytochrom C-Release. (1) Ko Mitochondriale Fraktion, (2) Cytosol 80 μl , (3) Cytosol 40 μl , Cytosol mit (4) DMSO, (5) Fludarabin, (6) IW283 15 μM 9h, (7) IW283 15 μM 12h. Abbildung 3.23a zeigt den Cytochrom C-Release, Abbildung 3.23b die gleichmäßige Proteinbeladung durch β -Actin, und Abb. 3.23c erbringt den Nachweis über den Porin-Gehalt der einzelnen Proben.

Auf die Membran in Abb. 3.23 wurde die mitochondriale Fraktion (Spalte 1) zur Kontrolle, gefolgt von den zytosolischen Fraktionen (Spalten 2 - 7), aufgetragen. Alle zytosolischen Spalten zeigen Cytochrom C-Banden, wobei die Intensität der Banden bei den mit IW283 behandelten Proben deutlich höher ist als bei der Negativ- und Positivkontrolle (Kontrolle bzw. Lösungsmittelkontrolle und Fludarabin). Dass die Cytochrom C-Bande der Positivkontrolle (30 μ M Fludarabin) deutlich schwächer ist als die der IW283-behandelten Proben, könnte an der Inkubationsdauer von nur 12h liegen, in der Fludarabin seine Wirkung noch nicht voll entfaltet hat. Die β -Actin-Ladekontrolle zeigt, dass in allen Spalten gleich viel Protein aufgetragen wurde. Um eine Verunreinigung der zytosolischen Fraktion durch die mitochondriale Fraktion auszuschließen, wurden auf derselben Membran die Porin-Banden mit anti-Porin(VDAC)-Antikörpern detektiert. Porin ist ein Intermembranprotein der Mitochondrien und dürfte deshalb nicht in der zytosolischen Fraktion vorhanden sein. Die mitochondriale Kontrollspalte (1) zeigt eine deutliche Porin-Bande, die in den Spalten der zytosolischen Fraktionen fehlt bzw. nur sehr schwach sichtbar wird. Die Auftrennung der Fraktionen erfolgte also mit einer leichten Verunreinigung des Zytosols.

3.6 Weitere Faktoren des mitochondrialen Signalweges

Dieser Abschnitt behandelt weitere Faktoren des mitochondrialen Apoptosepathways. Die Analyse einzelner pro- oder antiapoptotischer Faktoren kann Erkenntnisse über die Wirkungsweise eines Agens bringen. Durch Überexpression eines antiapoptotischen Faktors können maligne Zellen gegen Chemotherapeutika unempfindlicher werden. Ist allerdings der Apoptosemechanismus eines Wirkoffs unabhängig von diesem Faktor, können diese Resistenzen durchbrochen werden.

3.6.1 MelHo bcl2/pIRES

Bcl-2 ist das bekannteste antiapoptotische Protein des intrinsischen Apoptose-Pathways. Ein Mel-Ho Zelllinienpaar diente als Modellsystem zur Untersuchung der Bedeutung des Bcl-2 bei der durch die Titanocene bedingten Apoptose.

3.6.1.1 IW283 auf MelHo bcl-2 und pIRES

Abbildung 3.24 illustriert die konzentrationsabhängige DNA-Fragmentierung nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von IW283.

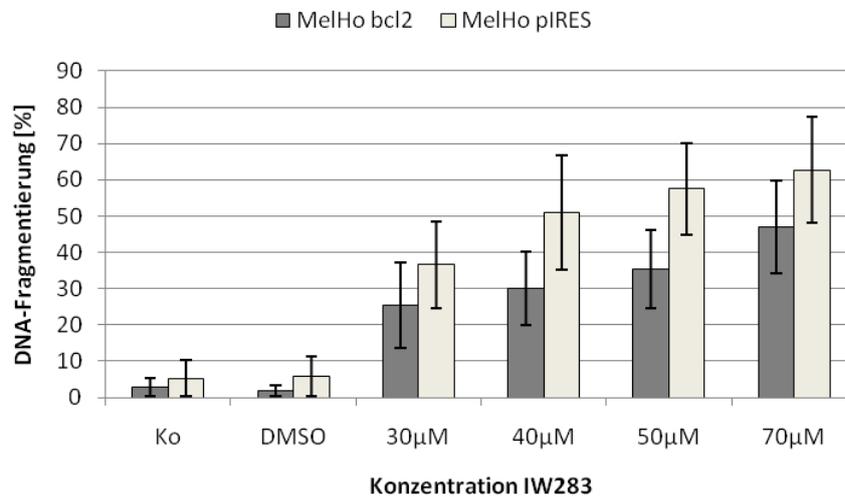


Abbildung 3.24: Mittlere DNA-Fragmentierung nach 72-stündiger Inkubation von MelHO Bcl-2 bzw. pIRES Zellen mit IW283. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.9: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen DNA-Fragmentierungswerte von MelHo bcl2 und pIRES nach Behandlung mit IW283.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,891	,931
DMSO	,014	,031
30 µM IW283	,031	,031
40 µM IW283	,005	,004
50 µM IW283	,003	,002
70 µM IW283	,055	,065

Während sich die beiden Zelllinien in der modifizierten Zellzyklusanalyse bei den Wirkstoffkonzentrationen 30 µM, 40 µM und 50 µM signifikant unterscheiden (vgl. Tab. 3.9), zeigt sich bei der Maximalkonzentration von 70 µM kein statistisch signifikanter Unterschied. In dieser Konzentration ist die DNA-Fragmentierung somit unabhängig von der Bcl-2-Expression.

Im Gegensatz zu der DNA-Fragmentierung zeigte sich bei der Proliferationshemmung in keiner der getesteten Konzentrationen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien (vgl. Tab. 3.10).

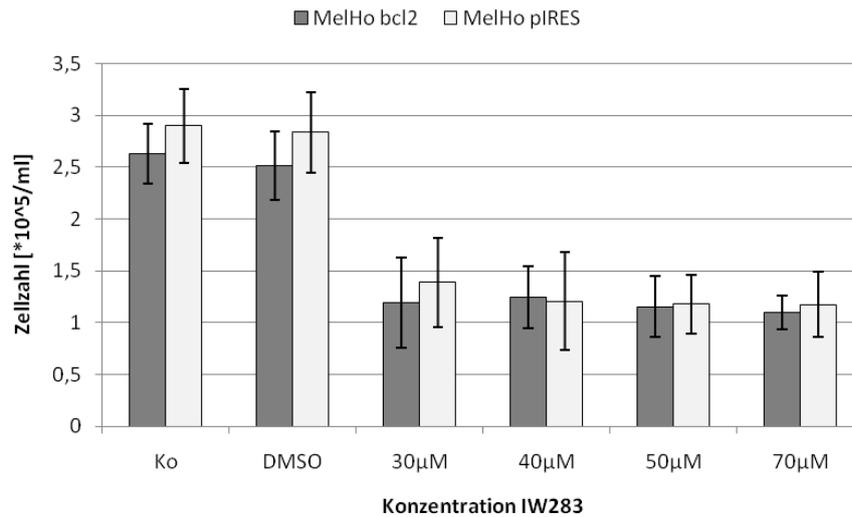


Abbildung 3.25: Mittlere Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation von MelHO Bcl-2 bzw. pIRES Zellen mit IW283. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.10: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Proliferationswerte von MelHo bcl-2 und pIRES nach Behandlung mit IW283.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,085	,094
DMSO	,093	,094
30 µM IW283	,144	,151
40 µM IW283	,596	,605
50 µM IW283	,930	,931
70 µM IW283	,521	,589

Die Zellzahl sinkt nach 24-stündiger Inkubation mit der maximalen Wirkstoffkonzentration von 70 µM IW283 auf $0,907 \times 10^5$ /ml (MelHo bcl-2) bzw. $1,176 \times 10^5$ /ml (vgl. Abb. 3.25).

3.6.1.2 IW293 auf MelHo bcl2 und pIRES

Abbildung 3.26 verdeutlicht die konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion von IW293.

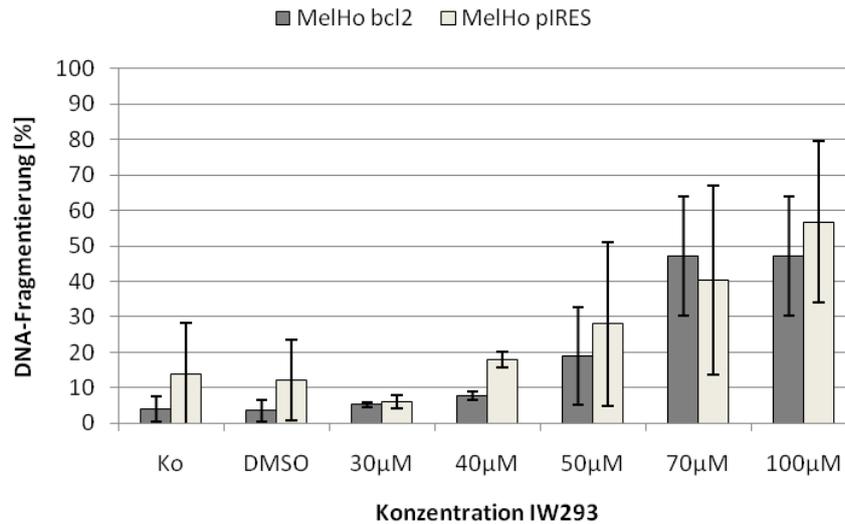


Abbildung 3.26: Mittlere DNA-Fragmentierung nach 72-stündiger Inkubation von MelHO Bcl-2 bzw. pIRES Zellen mit IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.11: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen DNA-Fragmentierungswerte von MelHo bcl-2 und pIRES nach Behandlung mit IW293.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,275	,400
DMSO	,151	,266
30 µM IW293	,127	,200
40 µM IW293	,275	,400
50 µM IW293	1,000	1,000
70 µM IW293	,729	,755
100 µM IW293	,966	,981

Die DNA-Fragmentierung bei der untersuchten Maximaldosis von 100 µM IW293 beträgt 43,11% bei MelHo bcl-2 bzw. 42,86% bei MelHo pIRES. Weder in den Kontrollproben noch in einer der Wirkstoffkonzentrationen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der DNA-Fragmentierung (vgl. Tab. 3.11). Die Apoptoseinduktion ist somit unabhängig von der Bcl-2-Expression.

Auch in der Proliferationshemmung (vgl. Abb. 3.27) zeigt sich in keiner der Wirkstoffkonzentrationen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien, sie ist somit ebenso unabhängig von der Expression von Bcl-2.

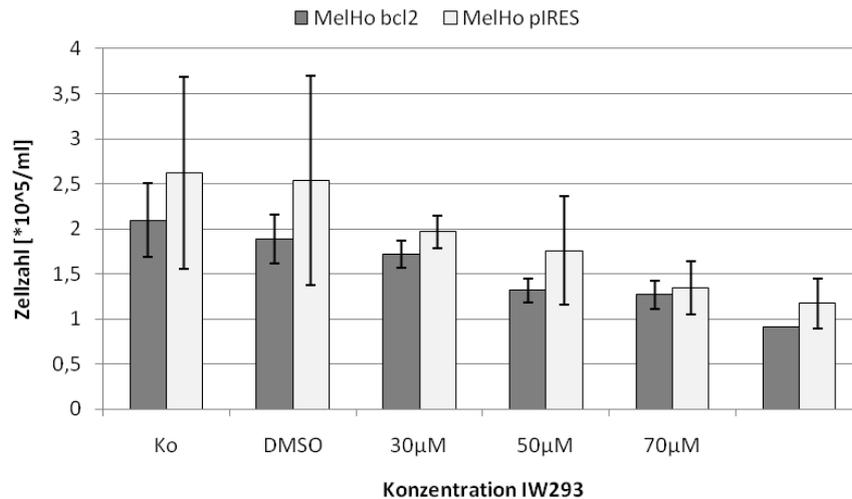


Abbildung 3.27: Mittlere Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation von MelHO Bcl-2 bzw. pIRES Zellen mit IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.12: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Proliferationswerte von MelHo bcl2 und pIRES nach Behandlung mit IW293.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,085	,094
DMSO	,093	,094
30 µM IW293	,144	,151
40 µM IW293	,596	,605
50 µM IW293	,930	,931
70 µM IW293	,521	,589

3.6.2 smac/DIABLO

Das proapoptotische Protein smac/DIABLO ist in der Lage, die Caspase-inhibierende Wirkung der IAPs zu unterbinden. Um den Einfluss des Proteins auf die Apoptoseinduktion durch die untersuchten Substanzen zu ermitteln, wurden Jurkat-Zellen eingesetzt. Bei diesem Zell-Paar handelt es sich um Jurkat smac und Jurkat neo Zellen, die sich durch ihre smac-Expression unterscheiden: Jurkat smac Zellen überexprimieren das genannte Protein, Jurkat neo haben eine unveränderte Smac-Expression. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit IW283 und IW293 dargestellt.

3.6.2.1 IW283 auf Jurkat neo und Jurkat smac

Die durch IW283 provozierte Proliferationshemmung ist sowohl konzentrationsabhängig als auch unabhängig von der Smac-Expression der Zellen, wie Abbildung 3.28 verdeutlicht.

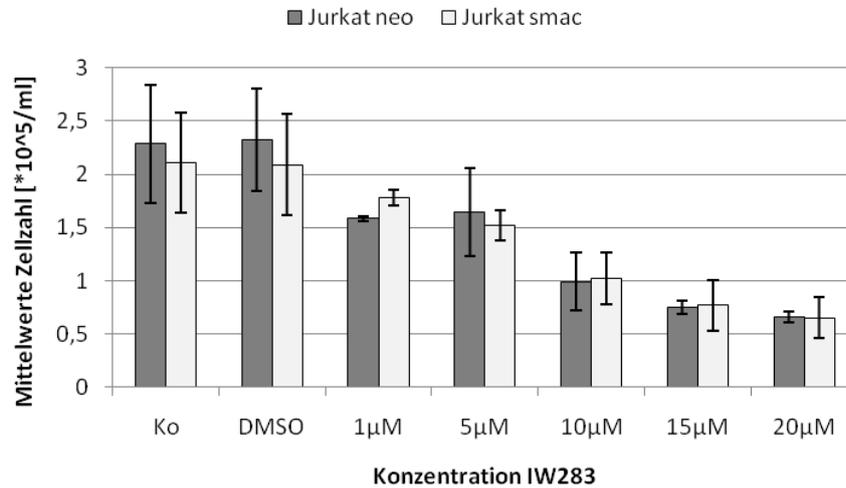


Abbildung 3.28: Mittelwerte der Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation von Jurkat-Zellen mit IW283. Fehlerbalken +/- 1 SD. Dargestellt ist der Konzentrationsbereich von 1 bis 20 µM. Man beobachtet einen konzentrationsabhängigen Abfall der Zellzahl.

Tabelle 3.13: Mann-Whitney-Test zur Bestimmung des statistischen Signifikanzniveaus des Unterschiedes in der Proliferation zwischen Jurkat neo und Jurkat smac nach Inkubation mit IW283.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,8895	,931
DMSO	,402	,436
1 µM IW283	,050	,100
5 µM IW283	,749	,818
10 µM IW283	,757	,796
15 µM IW283	1,000	1,000
20 µM IW283	,423	,485

Auffällig ist die unterschiedliche Zellzahl bei der Konzentration von 1 µM. Hier zeigt sich eine asymptotische Signifikanz von $p=0,05$. Die exakte Signifikanz beträgt jedoch $p=0,1$, so dass nicht von einem statistisch signifikanten Unterschied gesprochen werden kann. Auch fällt auf, dass die Zellzahl nach Behandlung mit der genannten Wirkstoffkonzentration unter die initial eingesetzte Zellzahl von 10^5 Zellen/ml sinkt. Alle anderen Konzentrationen zeigen

keine statistisch signifikant unterschiedliche Proliferationshemmung.

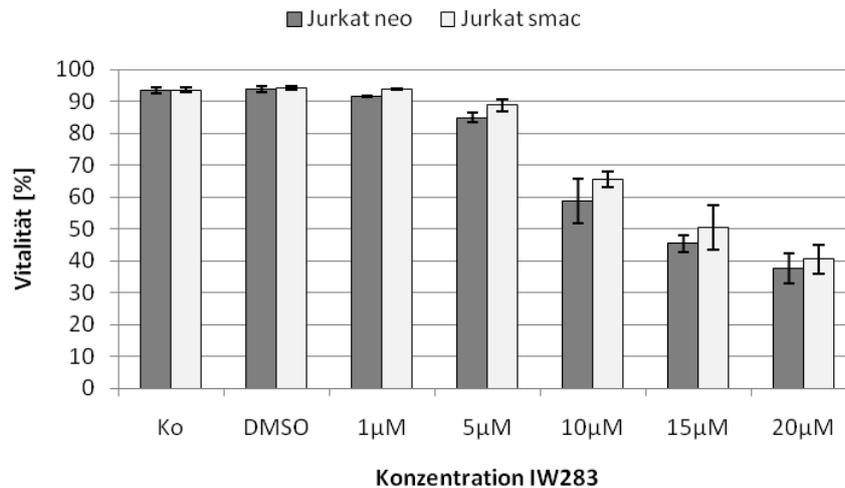


Abbildung 3.29: Mittelwerte der Vitalität [%] nach 24-stündiger Inkubation mit IW283. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.14: Mann-Whitney-Test zur Untersuchung der statistischen Signifikanz des Unterschiedes in der Vitalität nach Inkubation von Jurkat neo und Jurkat smac Zellen mit IW283.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,508	,546
DMSO	,233	,258
1 µM IW283	,050	,100
5 µM IW283	,010	,009
10 µM IW283	,047	,050
15 µM IW283	,150	,180
20 µM IW283	,337	,394

Die Vitalitätsminderung ist konzentrationsabhängig. Bei einer Ausgangsvitalität von 93,37% (Jurkat neo) bzw. 93,64% (Jurkat smac) sinkt die Vitalität deutlich auf 37,70% (Jurkat neo) bzw. 40,47% (Jurkat smac). Für die Wirkstoffkonzentrationen 5 µM und 10 µM zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Die exakte Signifikanz bei 5 µM beträgt $p=0,009$, bei 10 µM $p=0,05$.

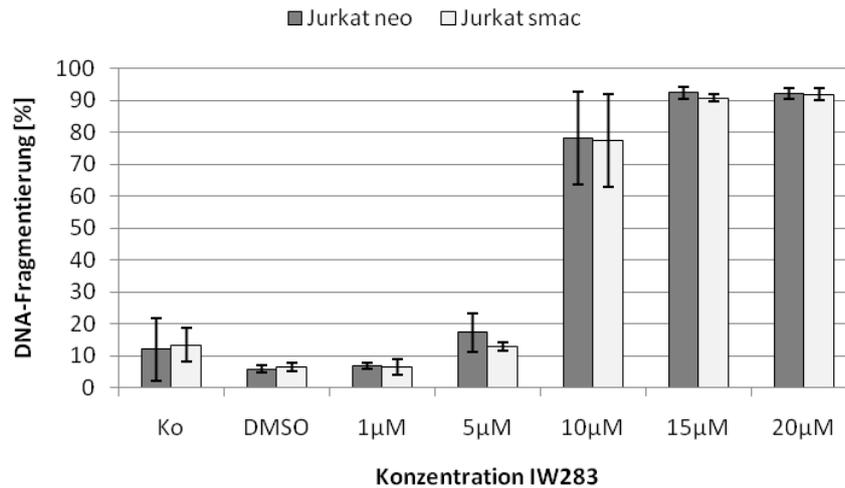


Abbildung 3.30: Mittelwerte der DNA-Fragmentierung [%] nach 72-stündiger Inkubation mit IW283. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.15: Mann-Whitney-Test zur Analyse der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen Jurkat neo und smac in der modifizierten Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit IW283.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,880	,931
DMSO	1,000	1,000
1 µM IW283	,317	,700
5 µM IW283	,319	,394
10 µM IW283	,402	,436
15 µM IW283	,749	,818
20 µM IW283	,337	,394

Es zeigt sich wiederum eine dosisabhängige Wirkung. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zeigt sich in der DNA-Fragmentierung nach Behandlung mit IW283 nicht.

3.6.2.2 IW293 auf Jurkat neo und Jurkat smac

Auch das Amid IW293 wurde auf Jurkatzellen untersucht. Wie Abbildung 3.31 verdeutlicht, bewirkt auch diese Substanz eine deutliche konzentrationsabhängige Proliferationshemmung nach 24-stündiger Inkubation. Da die Zellzahl in der höchsten Dosierung unter der initial eingesetzten liegt, findet auch bereits nach 24 Stunden ein Zelltod statt. Statistisch besteht kein signifikanter Unterschied in der Wirkung von IW293 auf die beiden genannten Zelllinien.

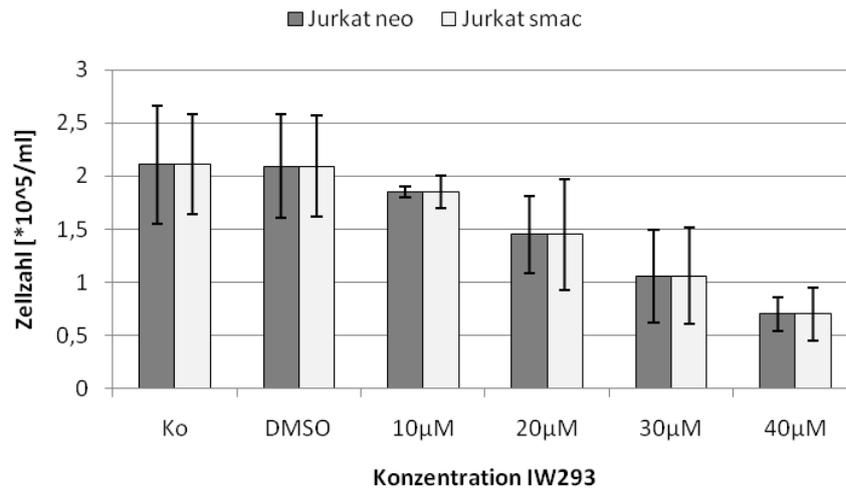


Abbildung 3.31: Mittelwerte der Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.16: Mann-Whitney-Test zur Analyse der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen Jurkat neo und smac bezüglich der Proliferation nach Inkubation mit IW293.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,895	,931
DMSO	,402	,436
10 µM IW293	,050	,100
20 µM IW293	,691	,730
30 µM IW293	,453	,489
40 µM IW293	,078	,093

Für die Vitalität/Viabilität nach Behandlung mit IW293 zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Jurkat neo und Jurkat smac in der Konzentration von 10 µM (asymptotische Signifikanz $p=0,05$, exakte Signifikanz $p=0,1$). Auch hier zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität beider Zelllinien, wie Abb. 3.32 verdeutlicht.

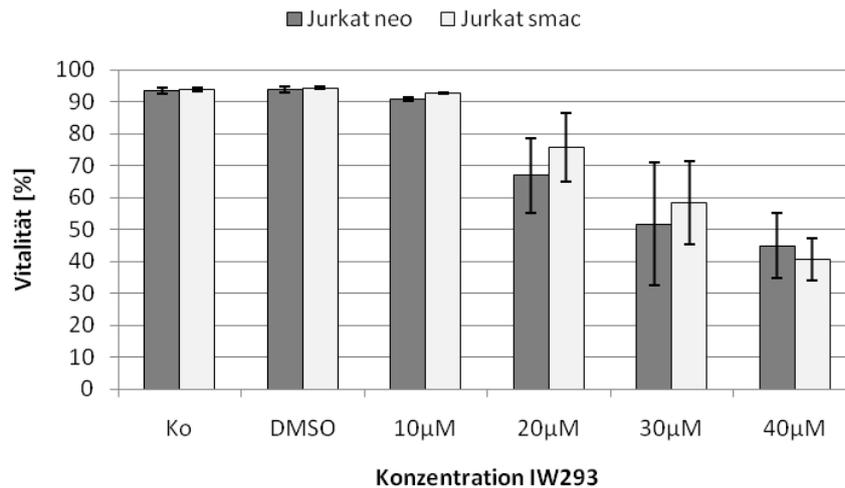


Abbildung 3.32: Mittelwerte der Vitalität [%] nach 24-stündiger Inkubation mit IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.17: Mann-Whitney-Test zur Analyse der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen Jurkat neo und smac bezüglich ihrer Vitalität nach Inkubation mit IW293.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,354	,387
DMSO	,200	,222
10 µM IW293	,050	,100
20 µM IW293	,122	,136
30 µM IW293	,508	,546
40 µM IW293	,522	,589

Abb. 3.33 veranschaulicht die DNA-Fragmentierung nach 72-stündiger Inkubation mit IW293. Außerdem steigt der Anteil der DNA-Fragmentierung mit dem Anstieg der Dosis von IW293. Ein statistisch hochsignifikanter Unterschied zwischen Jurkat neo und smac ergibt sich in der Konzentration von 40 µM IW293 (asymptotische Signifikanz $p=0,004$, exakte Signifikanz $p=0,002$).

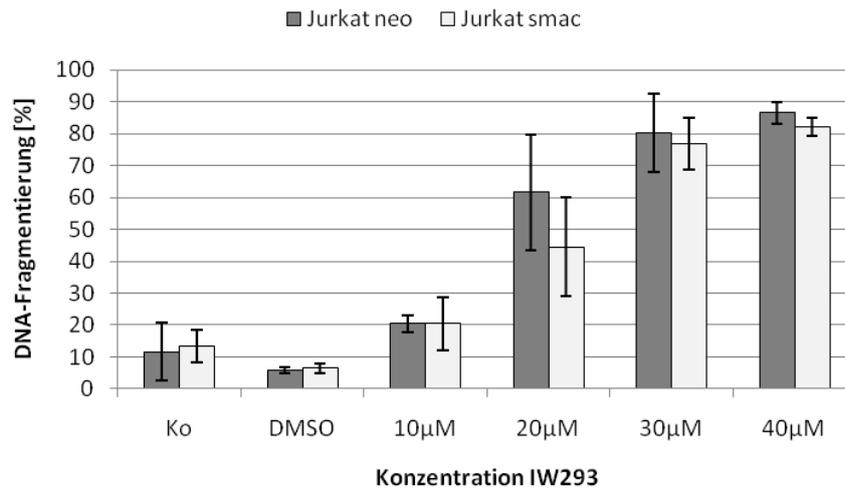


Abbildung 3.33: Mittelwerte der DNA-Fragmentierung [%] nach 72-stündiger Inkubation mit IW293. Fehlerbalken +/- 1 SD.

Tabelle 3.18: Mann-Whitney-Test zur Analyse der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen Jurkat neo und smac in der modifizierten Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit IW293.

Treatment	asymptotische Signifikanz (2-seitig)	exakte Signifikanz [2*(1-seit. Sig.)]
Ko	,880	,931
DMSO	,317	,730
10 µM IW293	,513	,700
20 µM IW293	,102	,113
30 µM IW293	,825	,863
40 µM IW293	,004	,002

Die Wirkung von IW283 und IW293 ist somit unabhängig von der smac-Konzentration der jeweiligen Zellen.

3.6.3 Fluoreszenz/Mitochondrien

Die Substanz IW293 hat dank ihres ausgedehnten π -Elektronen-Systems die Eigenschaft zu fluoreszieren. Diese Eigenschaft kann man sich zu Nutze machen, um zu untersuchen, wo in der Zelle die Substanz ihre Wirkung entfaltet, und um durch die Verteilung der Substanz innerhalb der Zelle Rückschlüsse auf die Wirkungsweise zu ziehen. Die Abbildung 3.34 zeigt die unbehandelte Kontrolle. Nachfolgend sind die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 20 μ M bzw. 40 μ M IW293 dargestellt (Abb. 3.35 und 3.36).

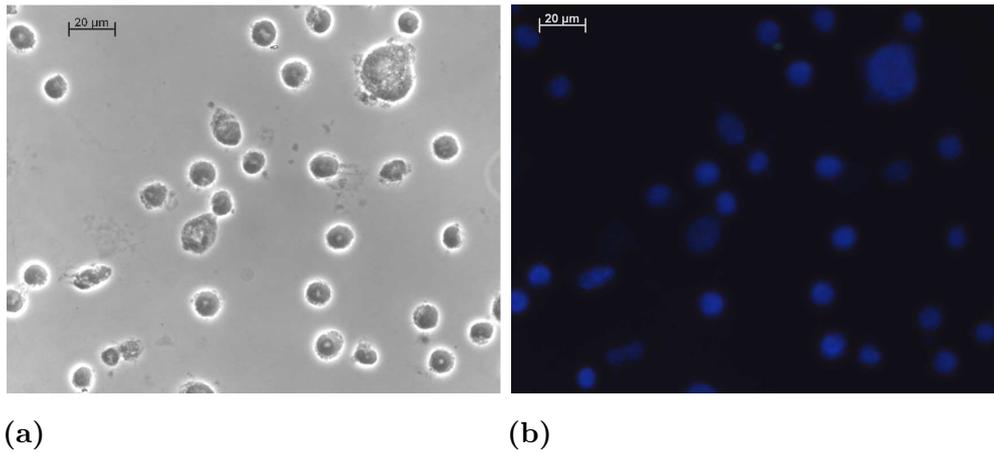


Abbildung 3.34: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen der Kontrollprobe nach 24-stündiger Inkubation. BJAB-Zellen. Abb. 3.34a zeigt die Phasenkontrastaufnahme, Abb. 3.35b zeigt die Autofluoreszenz, 413ms Belichtung.

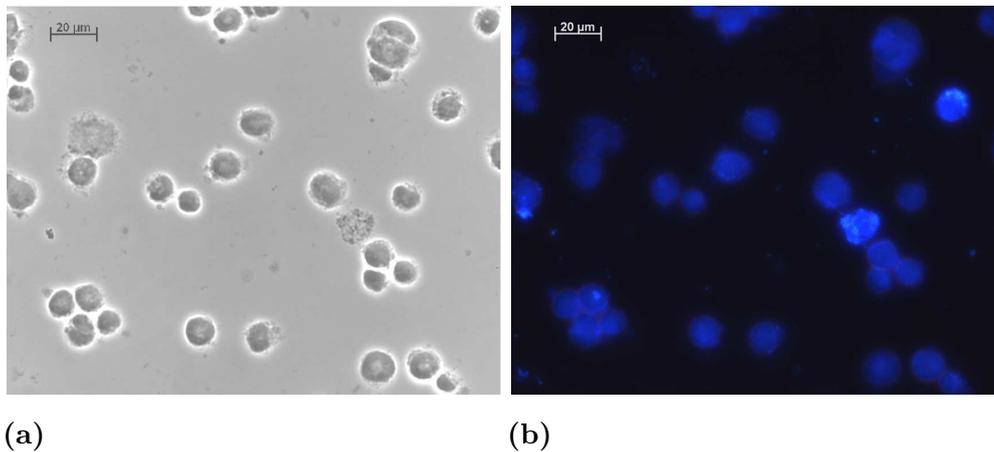


Abbildung 3.35: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit 20 µM IW293. Abb. 3.35a zeigt die Phasenkontrastaufnahme, die Abb. 3.35b die Autofluoreszenz, 413ms Belichtung.

Die Abb. 3.36 verdeutlicht, dass die Substanz nicht in den Zellkern gelangt, sondern vielmehr im Zytoplasma vorliegt, teilweise in scheinbar vesikulärer Form, wie in der Detailaufnahme 3.36d gut zu erkennen ist. Eine direkte Wechselwirkung mit der DNA scheint somit nicht stattzufinden.

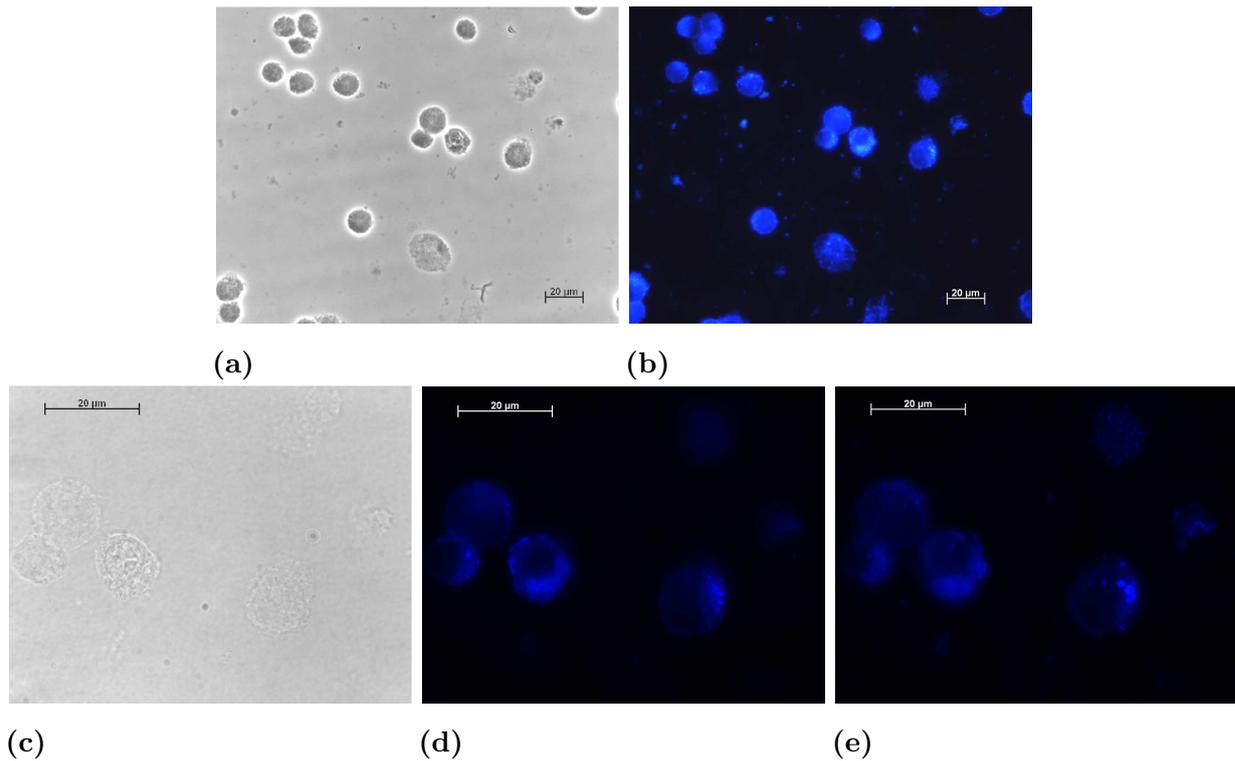


Abbildung 3.36: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit 40 μM IW293. Abb. 3.36a und 3.36c zeigen die Phasenkontrastaufnahmen in unterschiedlicher Vergrößerung, Abb. 3.36b, 3.36d und 3.36e die fluoreszenzmikroskopischen Bilder.

Es wurde bereits gezeigt, dass IW293 seine Wirkung über den intrinsischen Apoptosesignalweg entfaltet. Um zu untersuchen, ob IW293 direkt an den Mitochondrien wirkt, wurden diese mit dem MitoTracker green FM spezifisch angefärbt. Abb. 3.37 zeigt die unbehandelte Kontrolle vor und nach Färbung mit dem MitoTracker. Bei insgesamt eher schwacher Anfärbung wird deutlich, dass eine stärkere Grünfärbung außerhalb des Zellkerns die gefärbten Mitochondrien anzeigt.

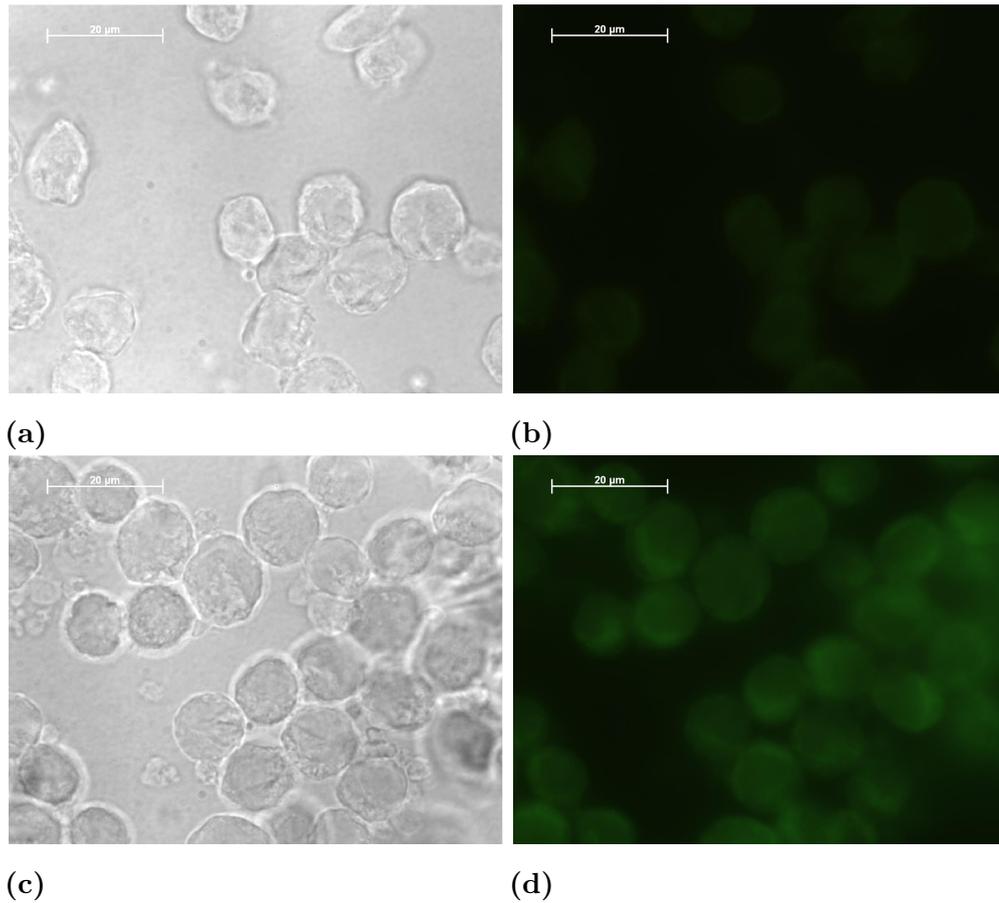


Abbildung 3.37: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen nach Fixierung (3.37a und 3.37b) und anschließender Färbung (3.37c und 3.37d).

In den Abbildungen 3.38 und 3.39 ist zu sehen, dass die angefärbten Mitochondrien ein anderes Muster aufweisen als die „Vesikel“ von IW293. Außerdem wird deutlich, dass eine längere Inkubationszeit auch eine stärkere Fluoreszenz hervorruft.

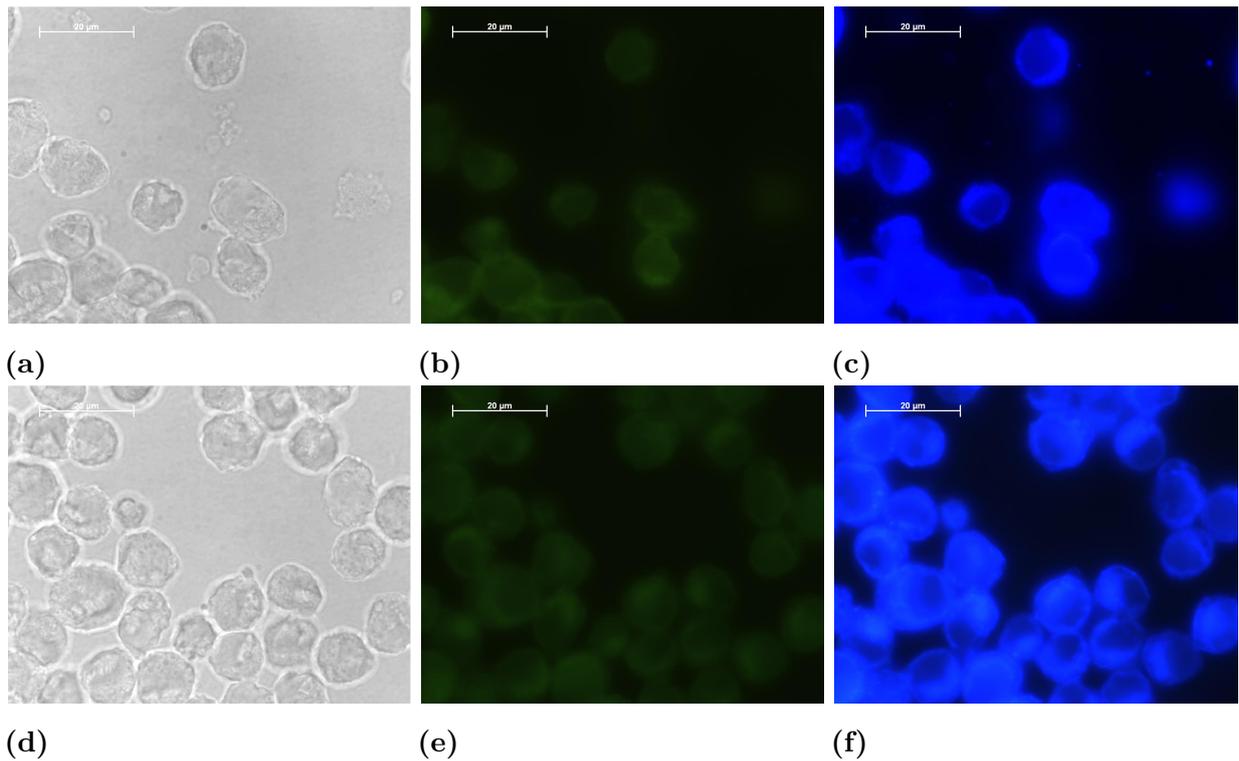


Abbildung 3.38: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 3-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit 20 μM IW293 und anschließender Fixierung (3.38a - 3.38c) bzw. Fixierung und Färbung (3.38d - 3.38f).

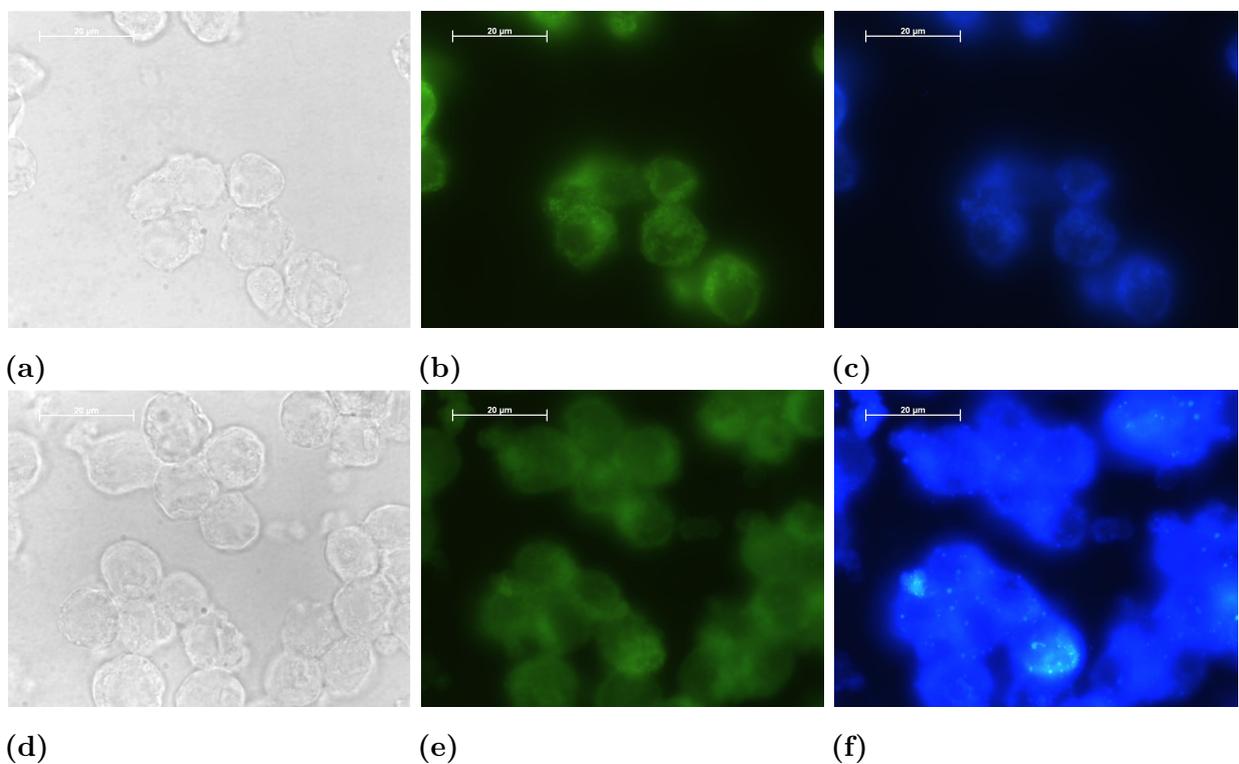


Abbildung 3.39: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit 20 μM IW293 und anschließender Fixierung (3.39a - 3.39c) bzw. Fixierung und Färbung (3.39e - 3.39f).

Auch bei der höheren Wirkstoffdosis von 40 μM IW293 wird deutlich, dass die längere Inkubationszeit (24 h vs. 3 h) ein stärkeres Fluoreszenzmuster bewirkt (vgl. Abb. 3.40 und 3.41). Es zeigt sich außerdem, dass die Substanz in der nicht mit dem MitoTracker behandelten Probe stärker zu fluoreszieren scheint als nach der Färbung. Die gefärbten Mitochondrien stellen sich, wie schon in den anderen Abbildungen gezeigt, anders dar als die intrazelluläre Substanz IW293.

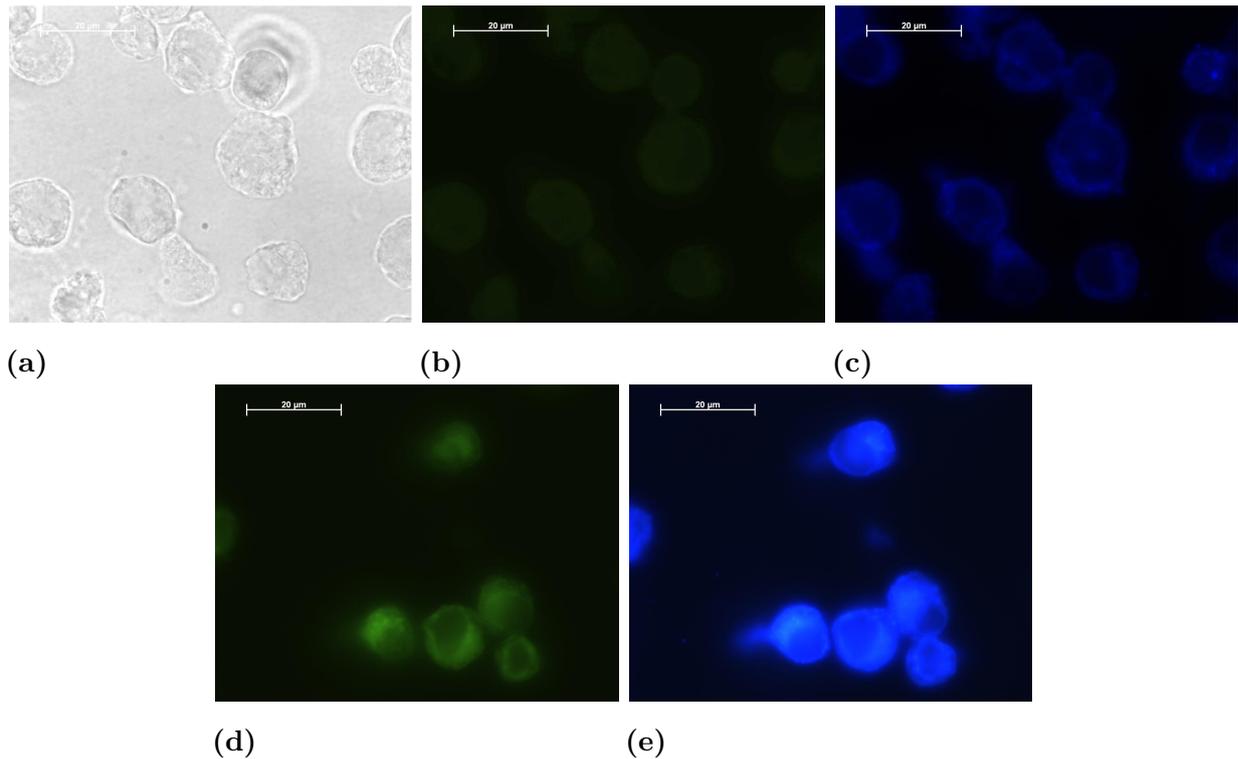


Abbildung 3.40: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 3-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit 40 μM IW293 und anschließender Fixierung (3.40a - 3.40c) bzw. Fixierung und Färbung (3.40d und 3.40e).

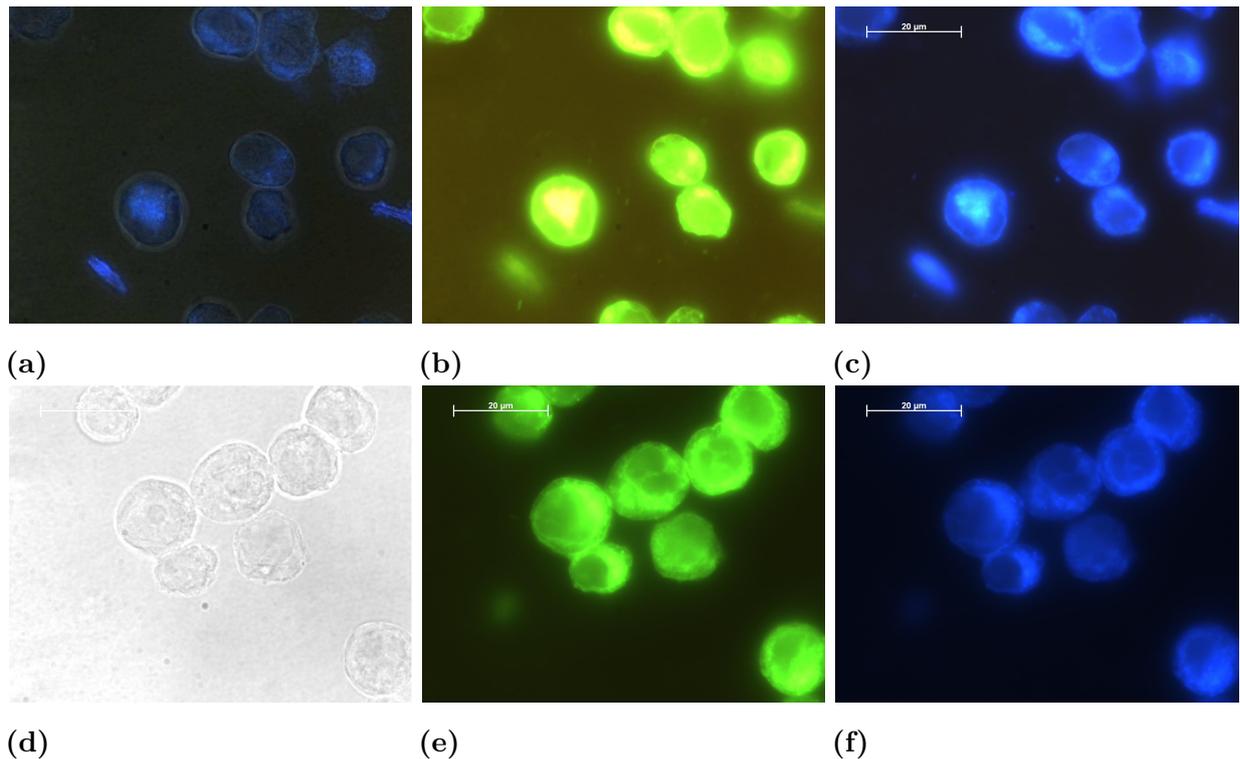


Abbildung 3.41: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubation von BJAB-Zellen mit 40 µM und anschließender Fixierung (3.41a - 3.41c) bzw. Fixierung und Färbung (3.41d - 3.41f).

Dadurch, dass die Färbung der Mitochondrien sehr schnell verblasst und teilweise durch die sehr stark leuchtenden IW293-Teile überstrahlt wird, kann zum unmittelbaren Wirkort von IW293 keine eindeutige Aussage gemacht werden. Die Vermutung, dass die Substanz IW293 nicht direkt an den Mitochondrien angreift, liegt jedoch nahe. Ob IW293 intrazellulär in seiner ursprünglichen Form vorliegt, ist unklar. Es kann daher keine sichere Aussage darüber gemacht werden, ob IW293 als Gesamtkomplex wirksam ist, oder möglicherweise ein Metabolit für die Wirkung verantwortlich ist. Weiterhin bleibt unklar, ob die Fluoreszenz den tatsächlichen Wirkort widerspiegelt oder die Apoptoseinduktion durch einen zum Messzeitpunkt bereits abgespaltenen, nicht fluoreszierenden Teil von IW293 hervorgerufen wird.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Titanocene auf maligne Zellen untersucht. Ziel war es einerseits, wirksame, d.h. Zelltod-induzierende Substanzen zu finden sowie eine Struktur-Wirkungs-Beziehung aufzustellen. Andererseits sollte untersucht werden, ob die wirksamen Substanzen möglicherweise den aktuell in der Krebstherapie eingesetzten überlegen sind und der jeweils zugrunde liegende Wirkmechanismus beleuchtet werden. Es konnten mehrere biologisch aktive Titanocene identifiziert werden, wobei sich IW283 und IW293 als die beiden wirksamsten erwiesen. In *ex vivo*-Versuchen waren diese beiden Substanzen wirksamer als die in der Therapie der ALL und AML eingesetzten Zytostatika.

4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Zunächst wurden die mir von Iris Winkler (Kekulé-Institut für organische Chemie, Bonn) zur Verfügung gestellten 17 unterschiedlichen carbonyl-substituierten Titanocene jeweils in einer Konzentrationsreihe von 1 bis 100 μM auf BJAB-Zellen getestet. Die Ergebnisse für die einzelnen Substanzen sind in Tabelle 3.1 und 3.2 zusammengefasst. Das Keton IW340 (Vgl. Abb. 3.2j) und der Ester-substituierte Komplex IW168 (Abb. 3.2i) sind nicht wirksam. Da dies die beiden einzigen Substanzen sind, die nicht über eine kationische Koordination am Titan verfügen, ist zu vermuten, dass diese für die biologische Aktivität essentiell ist. Das Amid IW242 (Abb. 3.1e) induzierte bei 50 μM in 50 % der eingesetzten Zellen Apoptose, erzeugte jedoch auch eine hohe Anzahl an nekrotischen Zellen. Dies traf vor allem bei kurzen Inkubationszeiten von 2 und 4 Stunden zu (Daten in der Arbeit nicht gezeigt), was auf eine hohe Zytotoxizität schließen lässt. IW293 zeigte diese frühe Zytotoxizität nicht und induzierte bereits bei 30 μM in 50 % der Zellen Apoptose. Insgesamt waren die dargestellten Ketone wirksamer als die amidsubstituierten Titankomplexe.

Anhand der unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Substanzen lässt sich in der Zusammenschau der Ergebnisse eine erste Struktur-Wirkungs-Beziehung aufstellen. Betrachtet

man die Strukturformeln der untersuchten Titanocene, so fällt auf, dass mit zunehmend größeren Substituenten in Nachbarschaft zum Cyclopentadienyling die biologische Aktivität der Substanzen steigt. Abbildung 4.1 veranschaulicht dies, wobei IW109 die geringste und IW283 die höchste biologische Aktivität zeigte.

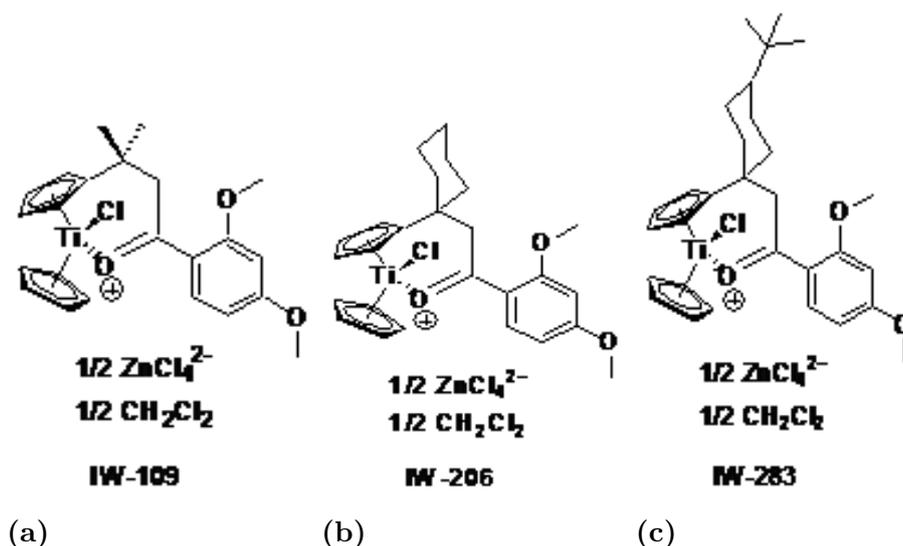


Abbildung 4.1: Strukturformeln IW109, IW206 und IW283

Das Keton IW282 (Abb. 3.2g) besitzt ebenfalls einen sperrigen di-n-Butylsubstituenten und liegt in der apoptotischen Aktivität zwischen IW293 und IW283. Um eine hohe biologische Aktivität zu erzielen, scheint also eine sterisch möglichst große und unpolare Gruppe in Nachbarschaft zum Cyclopentadienylliganden sehr vorteilhaft zu sein. Für die beiden wirksamsten Substanzen, IW283 und IW293 gilt, dass sie über den gleichen Substituenten verfügen, wie in der folgenden Abbildung 4.2 nochmals dargestellt.

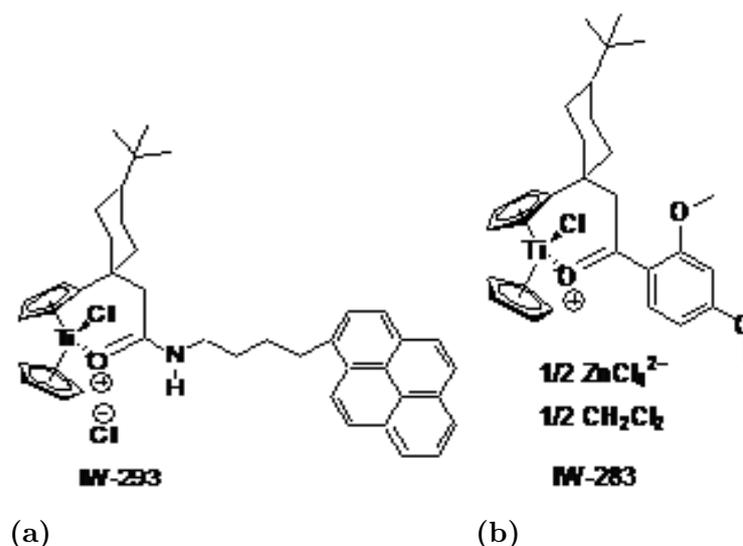


Abbildung 4.2: Strukturformeln IW293 und IW283 zur Veranschaulichung des Substituenten, der möglicherweise ausschlaggebend ist für die biologische Aktivität.

4.2 Vergleich mit anderen Titanocenen

Seit Jahren beschäftigen sich verschiedene Gruppen aus dem Bereich der Tumorforschung mit der biologischen Aktivität von Titanocenen^{13,22,25,28,84–113}. Die Komplexe IW283 (Abb. 3.2h) und IW293 (Abb. 3.1f) gehören zu den Komplexen mit der höchsten bisher in der Literatur beschriebenen Wirksamkeit gegen maligne Zellen^{19,97,107,114–117}.

Verbindung IW283 besitzt eine der höchsten zytotoxischen Aktivitäten, die in der Literatur für die biologische Wirkung der Titanocene berichtet wurden. Es wird jedoch nicht wie üblich der IC50 gezeigt, sondern ein AC50-Wert. Dieser Wert beschreibt die Konzentration, bei der in 50 % der eingesetzten Zellen Apoptose induziert wurde. Der reale IC50 ist wahrscheinlich schon in niedrigeren Konzentrationen als den hier genannten erreicht, da auch der unspezifische Zelltod sowie die Proliferationshemmung und eine Verminderung der Vitalität eine Rolle spielen und den Wert günstig beeinflussen. Geht man davon aus, dass eine gegebene Substanz ihre zytostatische Wirkung vornehmlich über eine Proliferationshemmung und weniger über die direkte Apoptoseinduktion erzielt, läge der AC 50 deutlich höher als der IC50. Erzielt eine Substanz ihre Wirkung ausschließlich über Apoptoseinduktion, wären AC50 und IC50 identisch. Da häufig jedoch beide Mechanismen eine Rolle spielen und auch die in meiner Arbeit vorgestellten Titanocene eine deutliche Proliferationshemmung und Verminderung der Viabilität induzieren, ist die AC50 nicht mit der IC50 gleichzusetzen. Der direkte Vergleich mit anderen Titanocenen ist somit schwierig. Außerdem ist die jeweilige Zelllinie, an der die Untersuchungen vorgenommen wurden, von großer Bedeutung, da sich die Empfindlichkeit der verschiedenen Zellen je nach Zelllinie deutlich unterscheidet¹¹⁸. Titanocendichlorid und verschiedene substituierte Titanocene wurden in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelllinien untersucht, wobei die hier verwendeten nur einen Bruchteil ausmachen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der vorgestellten Titanocenverbindungen auf die humanen Zelllinien BJAB (Lymphom), Jurkat (T-ALL), MelHo (Melanom), MCF-7 (Mammakarzinom), Nalm 6 (ALL), doxorubicinresistente BJAB sowie gesunde humane Leukozyten und primären Leukämiezellen von an ALL bzw. AML erkrankten Kindern und Jugendlichen untersucht. Als einzige Zelllinie lassen sich MCF-7-Zellen direkt mit den Ergebnissen anderer Gruppen vergleichen. Wenngleich für die anderen Zelllinien kein direkter Vergleich möglich ist, so lässt sich dennoch abschätzen, inwieweit die jeweiligen Substanzen biologisch aktiv sind und in welchem Konzentrationsbereich die von mir untersuchten Titanocene etwa einzuordnen sind. Take gelang die Synthese verschiedener Titanocen-Verbindungen^{93,95}, die alle eine hohe

biologische Aktivität zeigen. Titanocen Y hat bei Versuchen mit LLC-PK-Zellen (Prostatacarcinom) einen IC₅₀ Wert von 21 μM ⁹⁴, für TitanocenC wird ein IC₅₀ von 5.5 μM beschrieben, womit diese Substanz fast so wirksam ist wie Cisplatin, das in Tests mit LLC-PK-Zellen einen IC₅₀ von 3.3 μM zeigte¹¹⁰. IW283 hat auf BJAB-Zellen einen AC₅₀ von 12 μM . Bei adhären Zellen wie MCF-7 und MelHo liegt dieser Wert geringfügig höher bei etwa 30 - 40 μM . Hierbei ist zu bemerken, dass für IW283 auf MCF-7 Zellen die kleinste untersuchte Konzentration 50 μM war (vgl. Abb. 3.9a). Es scheint, dass IW283 bereits in niedrigeren Dosierungen Apoptose in MCF-7-Zellen auszulösen vermag. Bei IW293 liegt der AC₅₀ bei BJAB-Zellen bei 30 μM , bei MCF-7 bei etwa 90 μM , also deutlich höher als der von IW283 und auch höher als der IC₅₀ von durch andere Gruppen synthetisierte Wirkstoffe. Gao und Melendez erreichten auf MCF-7 Zellen mit ihren Amid-substituierten Titanocenen, für deren Synthetisierung sie die von Gansäuer et al. beschriebene Syntheseroute beschriften²⁶, einen IC₅₀ im micromolaren Bereich¹¹². Der niedrigste IC₅₀ lag bei 24 μM . Dieser Wert ist vergleichbar mit dem von Olszewski et al. für MCF-7 gezeigten IC₅₀ von 21,6 μM TitanocenC.

4.2.1 Vergleich mit Cisplatin

Während in der Literatur die Wirkung der verschiedenen Titanocene häufig mit der von Cisplatin bzw. Titanocendichlorid verglichen wird, wurden in der vorliegenden Arbeit keine direkt vergleichenden Untersuchungen mit diesen Substanzen durchgeführt. Zwar wurden im Rahmen der *ex vivo* Versuche andere bekannte Zytostatika unterschiedlicher Klassen (Doxo-, Dauno- und Epirubicin als Vertreter der Anthracycline, Vincristin als Mitosehemmer, Etoposid als Hemmer der Topoisomerase, Fludarabin und Cytarabin als Antimetabolite) eingesetzt, Cisplatin fehlt jedoch in der Reihe (vgl. Abb. 3.11 und 3.12), da es hauptsächlich in der Therapie solider Tumoren eingesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patientenzellen von an ALL oder AML erkrankten Kindern und Jugendlichen untersucht, so dass primär die zur Behandlung dieser Erkrankungen eingesetzten Zytostatika im Vergleich zu den von mir getesteten Titanocenen untersucht wurden. Da die untersuchten Substanzen auch auf soliden Tumorzelllinien zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung zeigen, wäre ein direkter Vergleich mit Cisplatin durchaus interessant. Aufgrund der vorliegenden Versuche ist bisher jedoch keine Aussage zu treffen, ob die hier vorgestellten Wirkstoffe, ähnlich wie andere in der Literatur beschriebene, Titanocendichlorid und/oder Cisplatin überlegen sind. Aus den Arbeiten anderer Gruppen ist bekannt, dass die dort getesteten Substanzen zum Teil eine deutlich

stärkere zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung haben als Cisplatin^{94,110,118,119}. Bereits Titanocendichlorid zeigte eine potentere Wirkung als Cisplatin, wie beispielsweise bereits eine Arbeit von Harstrick et al. aus dem Jahr 1993 zeigt. In Versuchen mit multiresistenten humanen Ovarialcarcinomzelllinien konnten Harstrick et al. im Vergleich mit Cisplatin eine fast 10 mal geringere Resistenz dieser Zellen gegenüber Titanocendichlorid zeigen. Diese Beobachtung wurde durch *in vivo*-Experimente bestätigt, in denen Titanocendichlorid einen sehr viel stärkeren inhibitorischen Effekt auf humane Ovarialcarcinom-Xenografts hatte als Cisplatin⁸⁷.

4.3 Apoptose oder Nekrose?

Einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Titanocene zeigten einen deutlichen antiproliferativen und zytotoxischen Effekt auf die eingesetzten Zellen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die beiden wirksamsten Verbindungen sind IW283 und IW293, aber auch IW242, IW282, IW383 und IW206 wirkten deutlich antiproliferativ und zytotoxisch. In den Untersuchungen zur Proliferationshemmung von BJAB-Zellen wurde für die Substanzen IW283 und IW293 bei 15 μM bzw. 40 μM nach 24 h eine Zellzahl gemessen, die unter der initial eingesetzten lag. Es ist also davon auszugehen, dass es neben einer Proliferationshemmung nach 24-stündiger Inkubation mit dem jeweiligen Wirkstoff zum Zelltod kommt. In der unbehandelten Kontrolle wurde im Gegensatz hierzu eine deutliche Zunahme der Zellzahl beobachtet. Dies gilt für die Jurkat-Zellen: auch hier sinkt die Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit Konzentrationen ab 15 μM IW283 unter die Ausgangszellzahl. Auch die niedrige Vitalität der übrigen Zellen (vgl. Abb.3.29) unterstützt meine Hypothese, dass es bereits nach 24 Stunden zum Zelltod kommt. Olszewski et al. zeigten 2010 eine deutliche Proliferationshemmung von NCI-H526 SCLC- und MCF-7-Zellen durch TitanocenC, die bei der mitgeführten Kontrolle nicht transformierter Colonozyten nicht auftrat¹¹⁸.

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose, da letztere für ein potentiell in der Onkologie einsetzbares Therapeutikum ungünstig wäre^{55,120–123}. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck die durchflusszytometrische Methode der modifizierten Zellzyklusanalyse eingesetzt. Sie beruht auf der Spaltung der DNA in der Endphase der Apoptose, der DNA-Fragmentierung. Dieses Merkmal ist jedoch nicht maximal spezifisch, denn es

wurde schon in onkotischen und nekrotischen Zellen DNA-Fragmentierung gezeigt³⁸. Um sichere Aussagen treffen zu können, ob Apoptose induziert wird, müssen zusätzliche Methoden angewandt werden, die andere morphologische und biochemische Veränderungen während der Apoptose detektieren.

Zunächst wurden die Zellen mit Annexin-Propidiumjodid doppelt gefärbt, ebenso wie die Zellzyklusanalyse eine durchflusszytometrische Methode^{124,125}. Im Anschluss an die Messung lassen sich die Daten als Punktwolke darstellen, das Messfeld ist in vier Quadranten geteilt: Zellen, die im linken unteren Quadranten detektiert wurden, zeigen keine Annexin V und keine PI Färbung (An-/PI-). Es handelt sich um vitale Zellen. Bei Zellen im rechten unteren Quadranten wurde das Phospholipid Phosphatidylserin durch AnnexinV an der Außenmembran angefärbt (An+) bei gleichzeitig intakter Membran (PI-). Zellen mit An+/PI- sind frühapoptotisch. Im linken oberen Sektor sind die Zellen An-/PI+ und werden als nekrotisch definiert. Bei Zellen des rechten oberen Quadranten kann nicht sicher unterschieden werden, ob es sich um spätapoptotische oder nekrotische Zellen handelt (An+/PI+). Bei den Versuchen mit IW283 und IW293 wurden auch im oberen rechten Quadranten relativ viele Ereignisse registriert (vgl. Abb. 3.7). Es ist wahrscheinlich, dass sich die mit 40 μM und 50 μM IW283 behandelten Proben schon in der Endphase der Apoptose befinden und somit als Spätapoptose/Nekrose durch AnnexinV/PI detektiert werden. Gerade in der Zellkultur ist es jedoch schwierig zu differenzieren, ob es ausschließlich zu Apoptose oder auch zu Nekrose kommt, da die physiologische „Entsorgung“ der Apoptosekörperchen durch Phagozyten entfällt. So kommt es schließlich zur Nekrose, wenn die Zellmembran der Apoptosevesikel zerstört ist¹²⁶. Da die Annexin-Propidiumjodid-Doppelfärbung nach 48-stündiger Inkubation mit IW283 und IW293 erfolgte, ist es möglich, dass die Substanzen zu diesem Zeitpunkt noch nicht ihre volle biologische Aktivität entfaltet haben. Es kann jedoch auch sein, dass der Aktivitätshöhepunkt schon früher stattfindet. Für Titanocendichlorid ist beispielsweise beschrieben, dass sich die volle biologische Wirkung erst nach 72 h entfaltet¹²⁷. Untersuchungen zur Kinetik von IW283 und IW293 sowie der anderen hier untersuchten substituierten Titanocene sind aktuell ausstehend, aber von großer Bedeutung.

Als spezifischer Nachweis der Apoptose wurde ein Westernblot zum Nachweis der Caspasen-Aktivierung durchgeführt. Sowohl die Spaltung der Caspase 3 als auch die Caspase 9- und PARP-Prozessierung konnten für die Substanzen IW283 und IW293 nachgewiesen werden, womit der Zelltod durch Nekrose zwar nicht ausgeschlossen werden kann, aber aufgrund der

zellbiologischen Beobachtung unwahrscheinlich erscheint. Die Ergebnisse meiner Versuche weisen vielmehr darauf hin, dass die genannten Substanzen spezifisch Apoptose in den untersuchten Zellen induzieren. Auffällig war, dass bei IW293 die längere Inkubationszeit von 36 h eine vermehrte Spaltung von Caspase 3 zu bewirken scheint, während die Modulation der Wirkstoffkonzentration keinen deutlichen Unterschied in der Bandenstärke hervorruft.

Interessant ist die Beobachtung, dass die untersuchten Substanzen trotz fehlender Proliferation in den Zellen Apoptose hervorrufen, weshalb zu vermuten ist, dass zellteilungsunabhängige Wirkmechanismen eine Rolle spielen.

4.3.1 Einfluss von Bcl-2

Als Modell zur Untersuchung, inwieweit das anti-apoptotische Protein Bcl-2 einen Einfluss auf die von den untersuchten Substanzen induzierte Apoptose hat, wurde ein Zelllinienpaar mit normaler Bcl-2-Expression (MelHo pIRES) und Bcl-2-Überexpression (MelHo Bcl-2) eingesetzt. Bei diesen Zellen handelt es sich um die Proliferationshemmung der MelHo-Zellen durch IW283 ist in allen Konzentrationen unabhängig von der Expression von Bcl-2. Interessant ist die Beobachtung, dass die Proliferationshemmung nicht konzentrationsabhängig ist, zumindest nicht in den untersuchten Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 30 μM IW283 unterscheidet sich die mittlere Zellzahl bei beiden Zelllinien kaum von der mittleren Zellzahl der mit der Maximaldosis behandelten Proben. Hierzu muss gesagt werden, dass die untersuchten Konzentrationen höher gewählt wurden als beispielsweise für BJAB-Zellen, da sich die adhärennten Zellen in Titrationsversuchen der Arbeitsgruppe (Daten hier nicht gezeigt) als weniger sensitiv erwiesen. Die Zellzahl sinkt nicht unter die initial eingesetzte, was ein Zeichen dafür ist, dass die Zellen zwar in der Proliferation gehemmt werden, aber noch kein Zelltod eintritt. Außerdem wurde beobachtet, dass sich die Zellzahl der beiden DMSO-Kontrollen statistisch signifikant unterscheidet (vgl. Tab. 3.9), während in den behandelten Proben in keiner der untersuchten Konzentrationen ein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen war. Im Gegensatz zu IW283 ist die Proliferationshemmung von MelHo-Zellen durch IW293 konzentrationsabhängig. Mit steigenden Wirkstoffkonzentrationen sinkt die Zellzahl weiter. Vor allem bei den Ergebnissen für IW293 fallen die hohen Standardabweichungen ins Auge. Auch bei der Zellzyklusanalyse fällt auf, dass es in den höheren Konzentrationsbereichen zu größeren Abweichungen kommt. Als mögliche Ursache nehme ich an, dass für die einzelnen Versuchsreihen Zellen mit unterschiedlicher Passagezahl

eingesetzt wurden, was möglicherweise einen Einfluss auf die Reaktion auf die Behandlung hat. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Apoptoseinduktion in Bcl-2 normal bzw. überexprimierenden Zellen bestand für IW293 in keiner der untersuchten Konzentrationen. Somit werden Bcl-2-induzierte Resistenzen in Melanomzellen von IW293 überwunden, was von großer medizinischer Bedeutung sein könnte.

Auch Cuffe et al. bzw. O'Connor et al. zeigten, dass die von ihnen untersuchten Titanocene in Bcl-2 überexprimierenden Prostatacarcinomzellen, die darüber hinaus eine Resistenz gegenüber Cisplatin zeigten, Apoptose induzierten^{94,110}. Insgesamt war die Apoptoseinduktion im Vergleich zu den Prostatacarcinomzellen mit normalem Bcl-2 Level zwar geringer, jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden⁹⁴. Im Vergleich zu Cisplatin und Titanocendichlorid erreichten alle drei von O'Connor et al. untersuchten Titanocenkomplexe höhere Apoptoseraten bei einer Dosis von 50 μ M. In Bcl-2 normal bzw. überexprimierenden Zellen liegt die Apoptoseinduktionsrate von 50 μ M IW283 etwas höher als in den Versuchen von O'Connor et al., die von 50 μ M IW293 minimal darunter. Da es sich jedoch um Zelllinien unterschiedlichen Ursprungsgewebes handelt und es keine vergleichenden Studien zur Chemosensitivität dieser beiden Zelllinien gibt, ist ein direkter Vergleich der genannten Ergebnisse nicht möglich. Beiden Untersuchungen ist gemein, dass die Apoptoserate in den Bcl-2 überexprimierenden Zellen geringer ist, die Substanzen jedoch trotzdem in der Lage sind, Apoptose zu induzieren.

4.4 Target/Signalweg

Um den Wirkmechanismus einer Substanz zu entschlüsseln, ist es von großem Vorteil, den Angriffspunkt zu kennen. Zur Entschlüsselung des jeweils vorliegenden Apoptosesignalwegs wurden zunächst Versuche mit dem Zelllinienpaar BJAB mock/BJAB FADD dn durchgeführt. FADD ist essentiell für den extrinsischen Signalweg. Sowohl bei IW293 als auch bei IW283 wurde für die Zelllinien BJAB mock und BJAB FADD dn keine statistisch signifikanter Unterschied in der Apoptoseinduktion beobachtet. Dies bedeutet, dass der Todesrezeptor-pathway bei der von IW283 und IW293 induzierten Apoptose offenbar nicht involviert ist. Bei Abhängigkeit der Apoptose-Induktion vom Todesrezeptor müsste bei nicht vorhandenem funktionellen FADD die Apoptoserate stark vermindert sein⁸², was bei beiden Wirkstoffen nicht der Fall ist. Im Gegenteil ist die Apoptoseinduktion interessanterweise in den FADD

nicht exprimierenden Zellen sogar durchschnittlich etwas höher, der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Der extrinsische Signalweg spielt für die Apoptoseinduktion durch IW283 und IW293 offenbar keine Rolle. Es wurden daher Merkmale des intrinsischen, mitochondrialen Signalwegs näher untersucht. Für beide Substanzen wurde mittels Westernblot die Aktivierung von Caspase 9 und durch die mitochondriale Membranpotentialanalyse mit JC-1 einen deutlichen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt, womit zwei von drei wichtigen Ereignissen des intrinsischen Apoptosesignalwegs identifiziert werden konnten. Das dritte Merkmal, die Cytochrom C-Freisetzung, habe ich mit den durchgeführten Versuchen nicht nachweisen aber auch nicht ausschließen können. Um diese Fragestellung eindeutig zu beantworten, können sensitivere Messmethoden zum Einsatz kommen. Hier käme beispielsweise ein Proteinnachweis im Nahinfrarotbereich in Betracht, aber auch immunfluoreszenzbasierte Methoden sind denkbar. Ferner könnte die Signaltransduktion auch über die Proteine AiF oder smac Diablo erfolgen, welche ebenfalls mittels Westernblot nachgewiesen werden könnten.

Zusammen mit der gezeigten Unabhängigkeit der Apoptoseinduktion von FADD wurde für IW283 somit der intrinsischen Apoptosesignalweg nachgewiesen. Für IW293 wurde der Nachweis der Cytochrom C-Freisetzung nicht geführt, da aber auch die Wirkung von IW293 unabhängig von FADD ist und sowohl ein deutlicher Verlust des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC-1 als auch die Spaltung von Caspase 9 nachgewiesen wurden, wird auch für diese Substanz der intrinsische Weg der Apoptosekaskade angenommen. Für andere in der Literatur beschriebene Titanocene wird ein Caspase-unabhängiger Mechanismus angenommen, wie beispielsweise O'Connor 2006 für Titanocendichlorid sowie die Verbindungen Titanocen Y und Titanocen B auf Prostatacarcinomzellen zeigte⁹⁴. Trotz des Nachweises der mitochondrialen Cytochrom-C-Freisetzung wurde keine korrespondierende Aktivierung der Caspase-Kaskade beobachtet, was durch eine fehlende Apoptose-Inhibition durch den Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD demonstriert wurde. Ob für IW283 und IW293 zusätzlich auch ein Caspase-unabhängiger Mechanismus eine Rolle spielen könnte, müsste noch untersucht werden, beispielweise auch durch eine Blockade der Caspasekaskade durch zVAD^{128,129}.

Die genaue molekulare Zielstruktur auf subzellulärer Ebene konnte für die in dieser Arbeit untersuchten Titanocenkomplexe nicht ermittelt werden. Für verschiedene Metalloocene wie Titanocen-, Vanadium-, Niob- und Molybdändichlorid ist bekannt, dass eine Inhibition der Topoisomerase II erfolgt¹¹⁹, eine maximale Inhibition dieses Enzyms wurde bei 2.0 mM

Titanocendichlorid beobachtet. Die Annahme, dass die Topoisomerase ein Target von Titanocendichlorid ist¹¹⁸, wird unterstützt von der Beobachtung, dass die Zellen vornehmlich in der G2M-G1 Interphase verharren. Ein Phänomen, das auch für andere zytostatische Substanzen, als deren Zielstruktur die Topoisomerase II gesichert ist, zutrifft¹³⁰. Auch die Studie von Olszewski et al. aus dem Jahr 2011 kommt zu dem Schluss, dass Helicasen wie Topoisomerasen I und II sowie MCM4 die Hauptangriffspunkte von TitanocenC darstellen und es in der Folge zum Zellzyklusarrest kommt. Außerdem konnte die Gruppe durch eine Genexpressionanalyse die durch Behandlung mit TitanocenC bedingte Herabregulierung von HIST1H4 core Histonen zeigen¹¹⁸.

Nach ersten Untersuchungen mit Titanocendichlorid Anfang der 1980er Jahre wurde die Wechselwirkung von Titanocenen mit der DNA eingehend untersucht^{85,131}. Köpf-Maier konnte in verschiedenen Versuchen zeigen, dass sich die Substanz in den Nukleinsäure-reichen Regionen der Zelle anreichert¹³²⁻¹³⁴. Die Metalle akkumulierten hauptsächlich im nukleären Heterochromatin und in geringerem Maß in Ribosomen und im Nucleolus. Dies legt eine direkte Interaktion mit der DNA nahe. Nach einmaliger Applikation von 40 mg/kg KG Titanocendichlorid beobachtete Köpf-Maier die ersten nukleären Veränderungen in Form von Chromatinverdichtung, segmentierten Nuklei und Strukturveränderungen des Nucleolus nach 12 Stunden¹³⁵. Auch Vera et al. zeigten 2004 eine deutliche Bindung von Ti(IV) an die DNA nach 46 h, wobei möglicherweise die starke Affinität von Titanium zu Phosphatgruppen eine bedeutende Rolle spielt⁹². Wichtig für die Bindung zwischen Titan-Komplexen und DNA ist auch der pH-Wert: Guo et al. zeigten 2001, dass zwar stabile Addukte zwischen Titanocendichlorid und den Phosphoestern der Nucleotide gebildet werden, jedoch gilt dies nur für pH-Werte unter 4. Bei einem pH über 7 konnten nur geringe Reaktionen zwischen DNA und Titanium(IV) beobachtet werden. Auch hier wird beschrieben, dass die Affinität zu den Phosphatgruppen bedeutsam ist für die biologische Aktivität einer Substanz¹³⁶. Für IW293 wird hingegen postuliert, dass die Substanz nicht direkt im Nucleus der untersuchten Zellen angreift, sondern sich im Zytoplasma anreichert. Diese Beobachtung trifft zumindest für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungszeitpunkte nach 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden zu. Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung von Köpf-Maier, die für die Leber beschreibt, dass sich Titanium zuerst im Zellkern, dann im Nucleolus, später in den Lysosomen und schließlich in den biliären Canaliculi nachweisen lässt^{137,138}. Da in der vorliegenden Arbeit keine kürzere Inkubationszeit als 3 Stunden gewählt wurde, lässt sich nicht sicher ausschließen,

dass die Substanz nicht zuerst mit dem Nucleus interagiert und erst später im Zytoplasma vorliegt. Betrachtet man das Fluoreszenzmuster zu den verschiedenen Messzeitpunkten, so erscheint es möglich, dass IW293 sich in den Lysosomen anreichert. Eine Beobachtung, die sich mit einer Studie von Köpf-Maier aus dem Jahr 1990 deckt - bereits damals konnte gezeigt werden, dass sich das Titanium in den Lysosomen anreichert¹³⁴. Um den genauen Ort der Anreicherung bzw. den direkten Angriffspunkt des Wirkstoffes zu ermitteln, sind für die hier gezeigten Verbindungen jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Ein erster Versuch, den Wirkort zu ergründen, wurde unternommen, indem die Mitochondrien spezifisch gefärbt wurden, da für IW293 der mitochondriale Signalweg angenommen wurde. Zwar weisen die durch den Mitotracker angefärbten Mitochondrien ein anderes Fluoreszenzmuster auf als die Substanz selbst, jedoch ist zu anzumerken, dass die Färbung sehr schnell verblasste. Außerdem war die Fluoreszenz teilweise vom stark fluoreszierenden IW293 „überstrahlt“. Zur genaueren Bestimmung der Wirkortes wäre beispielsweise der Einsatz eines konfokalen Lasermikroskops hilfreich und wünschenswert. Außerdem sollten zur Untersuchung der Kinetik weitere Messzeitpunkte gewählt werden. Ob die Substanz nach dem Eindringen in die Zelle noch in ihrer ursprünglichen Form intakt ist oder ob nur der fluoreszierende dissoziierte Ligand mit der Pyrenfunktion innerhalb der Zelle vorliegt, ist unklar.

4.5 Wege in die Zelle

Wie genau die jeweilige Substanz bzw. das biologisch wirksame Agens in die Zelle gelangt, ist bisher ungeklärt und von mir nicht untersucht. In der Literatur werden zahlreiche Möglichkeiten diskutiert. Verschiedene mechanistische Untersuchungen zeigen plausible Hinweise, dass Ti (IV) über Transferrin-vermittelte Endozytose in die Zelle gelangt^{97,136,139-143}. Sadler konnte zeigen, dass humanes Transferrin (hTf) in der Lage ist Titan-Ionen zu binden^{144,145}, Tinoco und Valentine zeigten, dass Transferrin Titanocen sogar stärker bindet als Eisen¹⁴⁶. Transferrin besitzt zwei Eisen-Bindungsstellen, die im Serum nur zu 30 % mit Eisen-Ionen beladen sind. Häufig findet man bei Tumoren eine Überexpression von Transferrin-Rezeptoren¹⁴⁷, so dass die Bindung von Titanocen an das Serum-Transferrin therapeutisch genutzt werden könnte. Titan-Ionen können aus dem Blut (pH 7.4) an den Eisen-Bindungsstellen des Transferrins gebunden werden und bei niedrigerem pH im Inneren der Zelle (5.0-5.5) wieder abgegeben werden¹⁴³. Hernández et al. zeigten 2008 in einer Studie mit verschiedenen substituierten Ti-

tanocenen, dass Adenosintriphosphat (ATP) die Freisetzung der Titan-Spezies begünstigt¹⁴⁰. Wie die Titan-Ionen in der Zelle weiter transportiert werden, ist jedoch unklar.

Ein weiteres Serumprotein ist Albumin, das wie Transferrin in der Leber gebildet wird und unter anderem dem Transport von wasserunlöslichen Stoffen im Blut dient. Albumin verfügt über vielfältige Bindungsstellen, die beispielsweise Metallionen, aber auch hydrophobe Liganden binden können. Tinoco et al. konnten 2008 nachweisen, dass Albumin ebenfalls in der Lage ist, Titan-Verbindungen zu komplexieren^{142,148}. Der Transport der Titan-Spezies erfolgt bei Transferrin unter Verlust der Cyclopentadienyl-Liganden, hier wäre die jeweilige Titan-Verbindung daher als Precursor zu sehen. Bei Albumin hingegen kann er unter Erhalt der Cyclopentadienyl-Liganden erfolgen, es wäre also möglich, dass die intakte Substanz in die Zelle gelangt.

Fraglich ist auch, ob der tatsächliche Wirkstoffgehalt in der Zelle die zentrale Rolle spielt für die Effizienz der Apoptoseinduktion. Cuffe et al. beschrieben 2010 eine für zwei unterschiedliche Prostatacarcinomzellen unterschiedlich hohe Aufnahme von vier verschiedenen Titanocenen. Nach 6-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Wirkstoffen wurde mittels atomic absorption spectrometry der Titanium-Gehalt in den Zellen bestimmt und es zeigte sich, dass zwei der untersuchten Titanocene verstärkt in PwR-1E-Zellen aufgenommen wurden, während die beiden anderen Titanocene in der anderen Zelllinie in größerer Konzentration nachgewiesen wurden. Wie genau es zu dieser Beobachtung kommt, ist unklar. Die Autoren gehen allerdings nicht davon aus, dass die unterschiedliche Wirkstoffaufnahme in die Zelle von zentraler Bedeutung für die unterschiedlich starke Apoptoseinduktion in der jeweiligen Zelllinie ist¹¹⁰. Ebenso wie der jeweilige Wirkmechanismus ist möglicherweise auch der Aufnahmeweg in die Zelle für jede substituierte Substanz individuell unterschiedlich. Hernández et al. synthetisierten verschiedene Ti(IV)-Komplexe, von denen drei wasserlösliche Titanocen-Aminosäure-Komplexe sind. Neben Untersuchungen zur Zytotoxizität – wiederum im Vergleich zu Titanocendichlorid – wurden Experimente zur Titanium-Aufnahme in die Zelle durchgeführt. Es fiel auf, dass nach kürzerer Wirkstoffexposition der Titan-Gehalt in der Zelle größer war als nach verlängerter Exposition. Dies spricht dafür, dass die Zelle, in diesem Fall Caco-2, in der Lage ist, die Substanz zu metabolisieren bzw. aus der Zelle zu entfernen. Bei der eingesetzten Substanz handelt es sich um eine tetranukleäre, inerte und wasserstabile Struktur, die nicht von Transferrin gebunden wird¹²⁷. In wie weit eine ähnliche Beobachtung für IW283 oder IW293 zutrifft, ist derzeit offen. Bisher wurden keine

Versuche zum intrazellulären Ti-Gehalt nach Inkubation mit den untersuchten Wirkstoffen unternommen.

4.6 Resistenz gegenüber Doxorubicin

Um zu überprüfen, ob die getesteten Substanzen einen zytotoxischen Effekt auf gegenüber bestimmten Zytostatika resistente Zellen haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine gegen Doxorubicin resistente BJAB-Zelllinie etabliert (vgl. Abschnitt 2.1.10.2) und im Anschluss vergleichende Versuche mit unveränderten BJAB-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.2.6 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Titanocene in den resistenten Zellen in höherem Maße Apoptose induzieren als in den nicht resistenten BJAB-Zellen. Der zugrundeliegende Resistenzmechanismus ist bisher jedoch nicht aufgeklärt. In bisher unveröffentlichten Studien mit den hier verwendeten Zellen durch Lisa Kater und Susanne Strauß (AG Prokop) konnte gezeigt werden, dass die resistenten Zellen im Vergleich zu unbehandelten BJAB-Zellen eine Unterexpression von Caspase 3 zeigen. Eine vermehrte Expression von p-Glykoprotein konnte nicht nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Wyler et al. sowie Nitta et al. von 1997, die beide ebenfalls keine Expression von MDR1/p-Glykoprotein nachweisen konnten^{149,150}. Seemann et al. wiesen im Gegensatz dazu für die Doxorubicin-resistente Harnblasencarcinomzelllinie RT112/D21 eine höhere P-Glykoproteinproduktion nach. Die genannte Zelllinie zeigte außerdem eine Kreuzresistenz gegenüber Epirubicin und Vinblastin, nicht aber gegenüber Cisplatin und Methotrexat¹⁵¹. Ein ähnliches Resultat zeigt die Studie von Guo et al., ebenfalls aus dem Jahr 1997: 75 % der gegen Doxorubicin resistenten Zelllinie BIU-87/ADMR zeigten eine positive Reaktion auf monoklonale Antikörper gegen p-Glykoprotein im Gegensatz zur Ursprungszelllinie BIU-87(Harnblasencarcinom). Untersuchungen zum intrazellulären Wirkstoffgehalt gaben außerdem Anlass dazu, von einem verstärkten aktiven Ausschleusen der Substanz auszugehen¹⁵². Wylers Doxorubicin-resistente Zelllinie 8226/DOXint5 zeigte eine verminderte Topoisomerase II alpha Expression sowie eine erhöhte Expression des Multidrug resistance Proteins MRP. Beides wurde für die BJAB-7CCA-Zellen nicht untersucht.

Die Ergebnisse der hier dargestellten Experimente sind dennoch interessant, da bei fehlender bzw. verminderter Apoptoseinduktion durch Doxorubicin immerhin eine deutliche Wirkung durch IW283 und IW293 gezeigt werden konnte. Nitta et al., die ein ähnliches Verfahren wie

von mir verwendete zur Resistenzselektion gegen Cisplatin angewendeten, konnten für OCUM-2M (humanes szirrhöses Magencarcinom) bzw. die resistente Tochterzelllinie Unterschiede in der modalen Chromosomenanzahl und des DNA index zeigen und nahmen an, dass der Resistenzmechanismus möglicherweise unter anderem auf eine Entgiftung durch Glutathion zurückzuführen ist¹⁵⁰.

Während der genaue Wirkmechanismus von IW283 und IW293 noch ungeklärt ist, liegt nun zumindest die Vermutung nahe, dass ein anderer Wirkmechanismus als bei Doxorubicin zugrunde liegt bzw. eine Resistenz gegenüber Doxorubicin durch die genannten Titanocene überwunden werden kann.

4.7 *Ex vivo*-Versuche

Die *ex vivo*-Versuche wurden einerseits mit Leukozyten gesunder Probanden durchgeführt, die parallel zur Leukämiezelllinie Nalm 6 mit den entsprechenden Substanzen behandelt wurden und andererseits mit primären Zellen von an ALL bzw. AML erkrankten Kindern und Jugendlichen. Bei Versuchen mit letzteren wurde die Wirkung verschiedener Zytostatika mit der unterschiedlicher Titanocene verglichen.

4.7.1 Untersuchungen zur Selektivität

Obwohl alle der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aus primären Zellen humaner Krebserkrankungen etabliert wurden, sind sie nicht mit den primären Zellen der jeweiligen Erkrankung zu vergleichen. Während der langjährigen Zellkultur kommt es zu zahlreichen Mutationen. Während sich die Zellkulturzellen durch eine gute Proliferation und hohe Vitalität auszeichnen, teilen sich die primären Leukämie-Zellen nur in geringem Ausmaß und die Vitalität nimmt stetig ab. Um die Vitalität der primären Zellen über einen längeren Zeitraum zu erhalten, können beispielsweise sog. Feederzellen eingesetzt werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht der Fall war, da die Expertise in der Arbeitsgruppe nicht verfügbar war. Die Versuche wurden mit humanen Leukozyten von gesunden Versuchspersonen und der Zelllinie BJAB durchgeführt. Es fällt auf, dass sich die Zellzahl der Leukozyten sogar vermehrt. Möglicherweise liegt dieser Beobachtung eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf die einzelnen Wells zugrunde, jedoch wurde diese Phänomen in verschiedenen Versuchswiederholungen beobachtet.

Ein Vergleich zwischen primären Leukämiezellen (Patientenzellen) und Leukozyten von gesunden Probanden wäre aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine bedeutsame Aufgabe für zukünftige Forschungsprojekte, um die Selektivität zu bestimmen, da die Ausgangsvoraussetzungen gut vergleichbar wären. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen lässt sich eine selektive Wirkung auf maligne Zellen nicht sicher nachweisen. Zwar liegt die korrigierte DNA-Fragmentierung der gesunden Lymphozyten in den untersuchten Konzentrationen jeweils unter der der Zellkulturzellen, jedoch ist der Unterschied nur in den jeweils höchsten untersuchten Konzentrationen von IW283 und IW293 statistisch signifikant. Außerdem wurde für die korrigierte DNA-Fragmentierung jeweils der Wert der unbehandelten Kontrolle abgezogen, der für die primären gesunden Zellen verhältnismäßig hoch war.

Ein weiterer wichtiger Punkt wäre der Vergleich zwischen nicht alterierten Zellkulturzellen und den in dieser Arbeit verwendeten verschiedenen Krebsentitäten. Dieser erfolgte beispielsweise durch Olszewski et al. 2010. Es konnte gezeigt werden, dass die nicht alterierten Kolonepithelzellen IEC-6 sowie Fibroblasten WI-38 eine IC50 von über 94.1 μM TitanocenC haben¹¹⁸.

4.7.2 Patientendaten

Es wurden Apoptosemessungen mit primären Leukämiezellen von insgesamt 26 Patienten (22 ALL, 4 AML) durchgeführt. Für die in dieser Arbeit untersuchte Stichprobe konnte gezeigt werden, dass IW283 und IW293 in der Dosis von 40 μM eine statistisch signifikant höhere Apoptoserate induziert als die anderen getesteten Substanzen, die alle aktuell in der Krebstherapie eingesetzt werden. Ob dieses Phänomen jedoch auch in größeren Stichproben zu beobachten ist, bleibt offen. Außerdem liegt diese Konzentration für beide Substanzen weit über der angenommenen AC50, so dass möglicherweise auch toxische bzw. nekrotische Prozesse eine Rolle spielen.

4.8 *In Vivo*-Versuche

In vitro Ergebnisse geben einen ersten Überblick über das potentielle Wirkungsspektrum von Wirkstoffen. Die untersuchten Zelllinien haben ihren Ursprung in humanen Tumorentitäten, verändern sich aber in der Zellkultur genetisch und epigenetisch, sodass nur begrenzt

Rückschlüsse auf die Wirksamkeit zu ziehen sind. Auch werden bei *ex vivo* Versuchen die Verhältnisse im lebenden Organismus nicht erreicht, weshalb sich nach Indikationsstellung durch entsprechende Vorversuche *in vivo*-Versuche anbieten. Mit einem der in dieser Arbeit vorgestellten Titanocen wurden bereits erfolgreich Tierversuche durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4). Die Ergebnisse sollen hier noch einmal kritisch diskutiert werden.

4.8.1 IW283 im Mausmodell

In den vorgeschalteten Versuchen zur Toxizitätsmessung wurden die Tiere mit einer Dosis von 100 mg/kgKG des Titanocens IW283 behandelt. Mit nur drei behandelten Tieren und einer einzigen Dosis diente dieser Versuch nur als erste Orientierung bezüglich der *in vivo* Wirkung von IW283. Eine Aussage zur LC50 kann aufgrund dieser Versuche selbstverständlich noch nicht getroffen werden. Die gewählte Dosis führte bereits nach sehr kurzer Zeit (ca. 24 h) zum Tod eines der Versuchstiere, ein weiteres verstarb nur wenig später. Für die Versuche zur Tumorreduktion wurde eine niedrigere Wirkstoffdosis von 50 mg/kgKG gewählt. Bei der Sektion fiel bei allen Tieren eine hellrote, fleckige Leber auf. Ursache dieser Beobachtung könnte sowohl eine makroskopisch sichtbare Anreicherung des Wirkstoffes bzw. des Lösungsmittels sein, als auch eine durch die Substanz bedingte Leberschädigung im Sinne von Nekroseinseln. Auch Köpf-Maier betrachtete die Anreicherung der Titanocene in der Leber als mögliches dosislimitierendes Ereignis¹⁵³⁻¹⁵⁵. Korfel et al. zeigten 1998, dass sich anstelle der präklinisch beschriebenen Hepatotoxizität die Nephrotoxizität als dosislimitierendes Ereignis erwies¹⁵⁶. Hierbei ist auch die Applikationsform von Bedeutung, wie Köpf-Maier zeigen konnte¹⁵⁷. Im Falle der intravenösen Applikationsform scheint die Nephrotoxizität bei weitem höher zu sein als bei intraperitonealer Applikation des Wirkstoffes, bei der die Hepatotoxizität im Vordergrund steht. In der in dieser Arbeit gezeigten Testreihe wurden Laborparameter, die auf eine Hepato- oder Nephrotoxizität schließen lassen könnten (wie beispielsweise ALAT, ASAT, Serumkreatinin) nicht bestimmt. In den durchgeführten Blutbildbestimmungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen nach Wirkstoffapplikation. Es ist also davon auszugehen, dass die Behandlung mit IW283 nicht zu einer Myelotoxizität führt, was sich mit den Beobachtungen von Korfel et al. deckt¹⁵⁶. In einer Phase I mit Titanocendichlorid aus dem Jahr 1998 Studie betrug die maximal tolerierte Dosis 140 mg/m² Titanocendichlorid, wobei sich eine reversible Erhöhung von Serumkreatinin und Bilirubin als dosislimitierend erwiesen¹⁵⁸. Keiner der 20 Patienten zeigte eine Myelosuppression und einer der Patienten mit

einem Adenosarcom zeigte eine minimale Therapieantwort. In einer Phase II Studien aus dem Jahr 1998 zeigte Tinocendichlorid zwar nur milde bis moderate Nebenwirkungen, allerdings konnte keine partielle oder komplette Remission von metastasierten Nierenzellcarcinomen nachgewiesen werden¹⁵⁹. Auch in einer Phase II Studie mit metastasiertem Mammacarcinom zeigte sich kein durchschlagender Erfolg, es wurden zwei Remissionen und fünf Fälle eines stable disease gezeigt, wobei die toxischen Nebeneffekte vor allem den Gastrointestinaltrakt, das Nervensystem sowie Leber und Niere betrafen²³.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigten die mit IW283 behandelten Tiere ein geringeres Tumorwachstum. Im Vergleich zu anderen Titanocenen in der Literatur ist die Wirkung jedoch geringer. Für Titanocendichlorid ist beispielweise eine Wachstumssuppression von über 50 % beschrieben^{87,160,161}. Fichtner et al. untersuchten die Wirkung von Titanocen Y auf Mäuse mit Caki-1 (humanes Nierenzellcarcinom) in Dosen von 10, 20, 30 40 und 50 mg/kg KG, appliziert an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige und statistisch signifikante Reduktion des Tumorwachstums, die vor allem statistisch signifikant besser war als durch 2 mg/kg Cisplatin¹⁶². Die maximal tolerierte Dosis lag bei 40 mg/kg, was möglicherweise auch ein realistischer Wert für IW283 ist, wobei hier noch weitere Untersuchungen folgen müssen. Bannon et al. zeigten für Titanocen Y eine Wachstumsinhibition von 40 % des mittleren Tumolvolumens eines Xenografts von A431-Zellen (humanes epidermoides Carcinom)¹⁰⁰. Eine weitere interessante Arbeit aus dem Jahr 2007 ist von Beckhove et al., die ebenfalls eine *in vivo*-Studie mit Titanocen Y durchführten. MCF-7 Xenografts im Mausmodell zeigten eine Reduktion des Tumolvolumens auf etwa ein Drittel nach 21-tägiger täglicher intraperitonealer Gabe von 30 mg/kg Titanocen Y bei sehr guter Verträglichkeit¹⁶³. Bemerkenswert ist, dass nicht nur eine Proliferationshemmung sondern auch eine tatsächliche Tumorreduktion zu verzeichnen war. Für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Substanzen sind weitere Studien zur Verträglichkeit und Antitumorwirkung *in vivo* notwendig. Auch ist es möglich, dass die anderen, *in vitro* ggf. weniger wirksamen Substanzen *in vivo* wirken und möglicherweise auch verträglicher sind als IW283, da die genaue Wirkweise bzw. die Angriffspunkte bisher noch unklar sind¹¹⁷. Für Titanocendichlorid ist bekannt, dass die Antiangiogenese für die antineoplastische Aktivität von Bedeutung ist^{164,165}. Hierfür könnte unter anderem die Fähigkeit, Gelatinasen und andere proteolytische Enzyme zu hemmen, wie Pavlaki et al. zeigen konnten¹³⁹, verantwortlich sein.

4.9 Ausblick

Im Bereich der biologischen Aktivität von metallorganischen Verbindungen wird aktuell zurecht intensiv geforscht. Aus den momentan intensiven Bemühungen sind bereits zahlreiche vielversprechende Verbindungen hervorgegangen, in deren Reihe auch die hier vorgestellten Substanzen gehören. Es bleibt abzuwarten, ob sich die eine oder andere Substanz auch in klinischen Studien bewähren wird. Mit Sicherheit sollten die hier genannten und in dieser Arbeit bezüglich ihrer biologischen Aktivität getesteten Verbindungen weiterführend untersucht werden, um ihr großes Potential auszuschöpfen. Die hier gezeigten und zunächst nur als orientierend einzuordnenden Experimente lassen Raum für weitere Testreihen. Insbesondere sollten Untersuchungen zur Kinetik, zum intrazellulären Target sowie zur Selektivität stattfinden. Weiterhin ist es von großem Interesse, weitere Zelllinien bezüglich ihres Ansprechens auf die die verschiedenen Verbindungen zu untersuchen. Auch der Vergleich mit anderen substituierten Titanocenen verspricht interessante Ergebnisse. Derzeit finden durch die AG Prokop Studien zum Vergleich von Titanocen Y und IW283 bzw. IW293 und anderen von Gansäuer et al. synthetisierten Titanocenen statt¹⁶⁶. Ein weiteres Forschungsgebiet ist neben den oben genannten beispielsweise die Untersuchung von synergistischen Effekten in Kombination mit bisher eingesetzten antineoplastischen Substanzen. Dies wird ebenfalls bereits von der AG Prokop mit viel versprechenden Zwischenergebnissen betrieben.

Durch die modulare Synthesestrategie, die durch Gansäuer et al. beschrieben wurde^{26,28}, ist es möglich, in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen mit zahlreichen verschiedenen Substituenten zu synthetisieren. Hierdurch wäre es zum Beispiel denkbar, die Substanzen einerseits mit Substituenten zu versehen, die weitere Rückschlüsse auf das intrazelluläre Target erlauben und andererseits mit Substituenten, die eine selektive Wirkung versprechen, beispielsweise auf hormonsensitive Tumorzellen. Eine Arbeit von Gao et al. beschreibt die Wirkung von Steroid-funktionalisierten Titanocenen bzw. die Vektor-Wirkung von Sexualsteroiden¹¹³. Die Ergebnisse sind äußerst viel versprechend und sollten weiter untersucht werden. In MCF-7 Zellen erreichten drei der sieben Titanocen-Steroid-Komplexe IC50-Werte im niedrigen micromolaren Bereich und liegen somit etwa in dem Dosis-Bereich, wo auch IW283 angesiedelt ist.

Auch die Applikationsform spielt für potentiell therapeutisch eingesetzte Substanzen eine wichtige Rolle. Eine erste Studie zu einem Controlled-Release-System für Titanocendichlorid wurde 2010 von Chen et al. vorgelegt. Titanocendichlorid verfügt über eine geringe Halbwerts-

zeit im menschlichen Körper und ist relativ schlecht löslich. Während die Halbwertszeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen nicht bestimmt wurde, trifft zumindest die schlechte Löslichkeit auch auf sie zu. Chen et al. entwickelten sog. „electrospun fibers“, in denen Titanocendichlorid inkorporiert ist und über einen längeren Zeitraum abgegeben wird. Der abgegebene Wirkstoff hat deutliche inhibitorische Wirkung auf humane Lungen-carcinomzellen¹⁶⁷. Ob dieses System sich auch *in vivo* bewährt, bleibt abzuwarten. Falls sich weiterhin eine gute Antitumorwirkung zeigt, sollten möglicherweise auch Versuche mit anderen Titanocenen und Nanopartikeln unternommen werden.

Literaturverzeichnis

- [1] CREUTZIG, U. ; SCHRAPPE, M.: [Acute leukemia in childhood. Classification–diagnosis–therapy–prognosis]. In: *Internist (Berl)* 37 (1996), Nr. 10, S. 982–93
- [2] KERSEY, J. H.: Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. In: *Blood* 90 (1997), Dec, Nr. 11, S. 4243–4251
- [3] BRENNER, H. ; KAATSCH, P. ; BURKHARDT-HAMMER, T. ; HARMS, D. O. ; SCHRAPPE, M. ; MICHAELIS, J.: Long-term survival of children with leukemia achieved by the end of the second millennium. In: *Cancer* 92 (2001), Nr. 7, S. 1977–83
- [4] SEIBEL, N. L.: Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2008), S. 374–380
- [5] <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll/025-014.htm>. 25.01.2009
- [6] <http://www.kinderkrebsinfo.de/>
- [7] SCHRAPPE, M. ; HARBOTT, J. ; RIEHM, H. ; GADNER, H. (Hrsg.) ; GAEDICKE, G. (Hrsg.) ; NIEMEYER, C. (Hrsg.) ; RITTER, J. (Hrsg.): *Akute lymphoblastische Leukämien. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2006
- [8] FLOHR, T. ; SCHRAUDER, A. ; CAZZANIGA, G. ; PANZER-GRÜMAYER, R. ; VELDEN, V. van d. ; FISCHER, S. ; STANULLA, M. ; BASSO, G. ; NIGGLI, F. K. ; SCHÄFER, B. W. ; SUTTON, R. ; KOEHLER, R. ; ZIMMERMANN, M. ; VALSECCHI, M. G. ; GADNER, H. ; MASERA, G. ; SCHRAPPE, M. ; DONGEN, J. J M. ; BIONDI, A. ; BARTRAM, C. R. ; (I-BFM-SG), International BFM Study G.: Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Leukemia* 22 (2008), Apr, Nr. 4, S. 771–782

- [9] SKIPPER, H. E.: Thoughts on cancer chemotherapy and combination modality therapy (1974). In: *Jama* 230 (1974), Nr. 7, S. 1033–5
- [10] PASTAN, I. ; GOTTESMAN, M.: Multiple-drug resistance in human cancer. In: *N Engl J Med* 316 (1987), May, Nr. 22, S. 1388–1393
- [11] TSURUO, T. ; NAITO, M. ; TOMIDA, A. ; FUJITA, N. ; MASHIMA, T. ; SAKAMOTO, H. ; HAGA, N.: Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. In: *Cancer Sci* 94 (2003), Nr. 1, S. 15–21
- [12] GALMARINI, C. M. ; MACKEY, J. R. ; DUMONTET, C.: Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. In: *Lancet Oncol* 3 (2002), Nr. 7, S. 415–24
- [13] GALANSKI, M. ; KEPPLER, B. K.: [Development, importance and perspectives. Tumor inhibiting metal compounds]. In: *Pharm Unserer Zeit* 35 (2006), Nr. 2, S. 118–23. – 0048-3664 (Print) Journal Article Review
- [14] FUERTES, M. A. ; ALONSO, C. ; PEREZ, J. M.: Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. In: *Chem Rev* 103 (2003), Nr. 3, S. 645–62
- [15] ROSENBERG, B. ; VANCAMP, L. ; KRIGAS, T.: Inhibition Of Cell Division In Escherichia Coli By Electrolysis Products From A Platinum Electrode. In: *Nature* 205 (1965), S. 698–9
- [16] ROSENBERG, B. ; VANCAMP, L. ; TROSKO, J. E. ; MANSOUR, V. H.: Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. In: *Nature* 222 (1969), Nr. 5191, S. 385–6
- [17] FARRELL, N. ; POVIRK, L. F. ; DANGE, Y. ; DEMASTERS, G. ; GUPTA, M. S. ; KOHLHAGEN, Q. A. G. and Khan K. G. and Khan ; POMMIER, Y. ; GEWIRTZ, D. A.: Cytotoxicity, DNA strand breakage and DNA-protein crosslinking by a novel trans-platinum compound in human A2780 ovarian and MCF-7 breast carcinoma cells. In: *Biochem Pharmacol* 68 (2004), Sep, Nr. 5, S. 857–866
- [18] KOSTOVA, I.: Ruthenium complexes as anticancer agents. In: *Curr Med Chem* 13 (2006), Nr. 9, S. 1085–1107

- [19] CLARKE, M. J. ; ZHU, F. ; FRASCA, D. R.: Non-platinum chemotherapeutic metallo-pharmaceuticals. In: *Chem Rev* 99 (1999), Nr. 9, S. 2511–34
- [20] JAKUPEC, M. A. ; KEPPLER, B. K.: Gallium in cancer treatment. In: *Curr Top Med Chem* 4 (2004), Nr. 15, S. 1575–1583
- [21] HOFHEINZ, R. D. ; DITTRICH, C. ; JAKUPEC, M. A. ; DRESCHER, A. ; JAEHDE, U. ; GNEIST, M. ; KEYSERLINGK, N. G. ; KEPPLER, B. K. ; HOCHHAUS, A.: Early results from a phase I study on orally administered tris(8-quinolinolato)gallium(III) (FFC11, KP46) in patients with solid tumors—a CESAR study (Central European Society for Anticancer Drug Research—EWIV). In: *Int J Clin Pharmacol Ther* 43 (2005), Dec, Nr. 12, S. 590–591
- [22] KOPF, H. ; KOPF-MAIER, P.: Titanocene dichloride—the first metallocene with cancerostatic activity. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 18 (1979), Nr. 6, S. 477–8
- [23] KRÖGER N, Mross K et a. Kleeberg UR U. Kleeberg UR: Phase II clinical trial of titanocene dichloride in patients with metastatic breast cancer. In: *Onkologie* 23 (2000), S. 60–62
- [24] MELENDEZ, E.: Titanium complexes in cancer treatment. In: *Crit Rev Oncol Hematol* 42 (2002), Nr. 3, S. 309–15
- [25] CLAFFEY, J. ; HOGAN, M. ; MULLER-BUNZ, H. ; PAMPILLON, C. ; TACKE, M.: Oxali-titanocene Y: a potent anticancer drug. In: *ChemMedChem* 3 (2008), Nr. 5, S. 729–31
- [26] GANSAUER, A. ; FRANKE, D. ; LAUTERBACH, T. ; NIEGER, M.: A modular and efficient synthesis of functional titanocenes. In: *J Am Chem Soc* 127 (2005), Nr. 33, S. 11622–3
- [27] WINKLER, I.: *Modulare Synthese neuer Titanocene - potentielle Zytostatika und Gel-Bildner*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Diss., 2009
- [28] GANSAUER, 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. In: *Chemistry* (2008)

- [29] DAUNDERER, M.: *Handbuch der Umweltgifte, Ausgabe 06/2006*. ecomed MEDIZIN Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, 1998, 2006
- [30] LAWEN, A.: Apoptosis-an introduction. In: *Bioessays* 25 (2003), Nr. 9, S. 888–96
- [31] DANIAL, N. N. ; KORSMEYER, S. J.: Cell death: critical control points. In: *Cell* 116 (2004), Jan, Nr. 2, S. 205–219
- [32] MEIER, P. ; FINCH, A. ; EVAN, G.: Apoptosis in development. In: *Nature* 407 (2000), Oct, Nr. 6805, S. 796–801
- [33] COTTER, T. G.: Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. In: *Nat Rev Cancer* 9 (2009), Jul, Nr. 7, S. 501–507
- [34] KROEMER, G. ; GALLUZZI, L. ; VANDENABEELE, P. ; ABRAMS, J. ; ALNEMRI, E. S. ; BAEHRECKE, E. H. ; BLAGOSKLONNY, M. V. ; EL-DEIRY, W. S. ; GOLSTEIN, P. ; GREEN, D. R. ; HENGARTNER, M. ; KNIGHT, R. A. ; KUMAR, S. ; LIPTON, S. A. ; MALORNI, W. ; NUÑEZ, G. ; PETER, M. E. ; TSCHOPP, J. ; YUAN, J. ; PIACENTINI, M. ; ZHIVOTOVSKY, B. ; MELINO, G. ; CELL DEATH 2009, Nomenclature C.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. In: *Cell Death Differ* 16 (2009), Jan, Nr. 1, S. 3–11
- [35] WYLLIE, A. H. ; KERR, J. F. ; CURRIE, A. R.: Cell death: the significance of apoptosis. In: *Int Rev Cytol* 68 (1980), S. 251–306
- [36] KERR, J. F. ; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Br J Cancer* 26 (1972), Nr. 4, S. 239–57
- [37] NICOTERA, P. ; LEIST, M. ; FERRANDO-MAY, E.: Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. In: *Toxicol Lett* 102-103 (1998), Dec, S. 139–142
- [38] CRUCHTEN, S. V. ; BROECK, W. Van D.: Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. In: *Anat Histol Embryol* 31 (2002), Aug, Nr. 4, S. 214–223

- [39] BELKA, C. ; BUDACH, W. ; KORTMANN, R. D. ; BAMBERG, M.: Radiation induced CNS toxicity—molecular and cellular mechanisms. In: *Br J Cancer* 85 (2001), S. 1233–9
- [40] BELKA, C. ; RUDNER, J. ; WESSELBORG, S. ; STEPCZYNSKA, A. ; MARINI, P. ; LEPPLE-WIENHUES, A. ; FALTIN, H. ; BAMBERG, M. ; BUDACH, W. ; SCHULZE-OSTHOFF, K.: Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. In: *Oncogene* 19 (2000), Nr. 9, S. 1181–90
- [41] ENGELS, I. H. ; STEPCZYNSKA, A. ; STROH, C. ; LAUBER, K. ; BERG, C. ; SCHWENZER, R. ; WAJANT, H. ; JANICKE, R. U. ; PORTER, A. G. ; BELKA, C. ; GREGOR, M. ; SCHULZE-OSTHOFF, K. ; WESSELBORG, S.: Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. In: *Oncogene* 19 (2000), Nr. 40, S. 4563–73
- [42] WIEDER, T. ; PROKOP, A. ; BAGCI, B. ; ESSMANN, F. ; BERNICKE, D. ; SCHULZE-OSTHOFF, K. ; DORKEN, B. ; SCHMALZ, H. G. ; DANIEL, P. T. ; HENZE, G.: 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. In: *Leukemia* 15 (2001), Nr. 11, S. 1735–42
- [43] DANIEL, P. T. ; WIEDER, T. ; STURM, I. ; SCHULZE-OSTHOFF, K.: The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. In: *Leukemia* 15 (2001), Nr. 7, S. 1022–32
- [44] DANIEL, P. T.: Dissecting the pathways to death. In: *Leukemia* 14 (2000), Nr. 12, S. 2035–44
- [45] RUDNER, J. ; LEPPLE-WIENHUES, A. ; BUDACH, W. ; BERSCHAUER, J. ; FRIEDRICH, B. ; WESSELBORG, S. ; SCHULZE-OSTHOFF, K. ; BELKA, C.: Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. In: *J Cell Sci* 114 (2001), Nr. Pt 23, S. 4161–72
- [46] BELKA, C. ; BUDACH, W.: Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. In: *Int J Radiat Biol* 78 (2002), Nr. 8, S. 643–58
- [47] RUDNER, J. ; JENDROSSEK, V. ; BELKA, C.: New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. In: *Apoptosis* 7 (2002), Nr. 5, S. 441–7

- [48] KROEMER, G. ; ZAMZAMI, N. ; SUSIN, S. A.: Mitochondrial control of apoptosis. In: *Immunol Today* 18 (1997), Jan, Nr. 1, S. 44–51
- [49] KROEMER, G. ; GALLUZZI, L. ; BRENNER, C.: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. In: *Physiol Rev* 87 (2007), Jan, Nr. 1, S. 99–163
- [50] FULDA, S. ; DEBATIN, K-M.: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. In: *Oncogene* 25 (2006), Aug, Nr. 34, S. 4798–4811
- [51] YOULE, R. J. ; STRASSER, A.: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), Jan, Nr. 1, S. 47–59
- [52] HENGARTNER, M. O.: The biochemistry of apoptosis. In: *Nature* 407 (2000), Oct, Nr. 6805, S. 770–776
- [53] KAUFMANN, S. H. ; EARNSHAW, W. C.: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. In: *Exp Cell Res* 256 (2000), Nr. 1, S. 42–9
- [54] BROWN, J. M. ; ATTARDI, L. D.: The role of apoptosis in cancer development and treatment response. In: *Nat Rev Cancer* 5 (2005), Nr. 3, S. 231–7
- [55] MENG, X. W. ; LEE, S. H. ; KAUFMANN, S. H.: Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? In: *Curr Opin Cell Biol* 18 (2006), Nr. 6, S. 668–76
- [56] REED, J. C.: Apoptosis-based therapies. In: *Nat Rev Drug Discov* 1 (2002), Nr. 2, S. 111–21
- [57] FINK, S. L. ; COOKSON, B. T.: Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. In: *Infect Immun* 73 (2005), Nr. 4, S. 1907–16
- [58] MROZEK, A. ; PETROWSKY, H. ; STURM, I. ; KRAUS, J. ; HERMANN, S. ; HAUPTMANN, S. ; LORENZ, M. ; DORKEN, B. ; DANIEL, P. T.: Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma with low microsatellite instability. In: *Cell Death Differ* 10 (2003), Nr. 4, S. 461–7
- [59] GUNER, D. ; BELKA, C. ; DANIEL, P. T.: Disruption of cell death signaling in cancer: impact on disease prognosis and response to therapy. In: *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3 (2003), Nr. 5, S. 319–26

- [60] STURM, I. ; PETROWSKY, H. ; VOLZ, R. ; LORENZ, M. ; RADETZKI, S. ; HILLEBRAND, T. ; WOLFF, G. ; HAUPTMANN, S. ; DORKEN, B. ; DANIEL, P. T.: Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. In: *J Clin Oncol* 19 (2001), Nr. 8, S. 2272–81
- [61] STURM, I. ; BOSANQUET, A. G. ; HERMANN, S. ; GUNER, D. ; DORKEN, B. ; DANIEL, P. T.: Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. In: *Cell Death Differ* 10 (2003), Nr. 4, S. 477–84
- [62] REED, J. C. ; PELLECCIA, M.: Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. In: *Blood* 106 (2005), Nr. 2, S. 408–18
- [63] BANTEL, H. ; ENGELS, I. H. ; VOELTER, W. ; SCHULZE-OSTHOFF, K. ; WESSELBORG, S.: Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. In: *Cancer Res* 59 (1999), Nr. 9, S. 2083–90
- [64] HURWITZ, R. ; HOZIER, J. ; LEBIEN, T. ; MINOWADA, J. ; GAJL-PECZALSKA, K. ; KUBONISHI, I. ; KERSEY, J.: Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. In: *Int J Cancer* 23 (1979), Nr. 2, S. 174–80
- [65] SCHNEIDER, U. ; SCHWENK, H. U. ; BORNKAMM, G.: Characterization of EBV-genome negative null and T cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. In: *Int J Cancer* 19 (1977), Nr. 5, S. 621–6
- [66] HOLZMANN, B. ; LEHMANN, J. M. ; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. ; FUNKE, I. ; RIETHMULLER, G. ; JOHNSON, J. P.: Glycoprotein P3.58, associated with tumor progression in malignant melanoma, is a novel leukocyte activation antigen. In: *Int J Cancer* 41 (1988), Nr. 4, S. 542–7
- [67] SOULE, H. D. ; VAZGUEZ, J. ; LONG, A. ; ALBERT, S. ; BRENNAN, M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. In: *J Natl Cancer Inst* 51 (1973), Nr. 5, S. 1409–16

- [68] VOISARD, R. ; DARTSCH, P. C. ; SEITZER, U. ; ROTH, D. ; KOCHS, M. ; HOMBACH, V.: [Cell culture as a prescreening system for drug prevention of restenosis?]. In: *Vasa Suppl* 33 (1991), S. 140–1
- [69] JENKINS, C. E. ; SWIATONIOWSKI, A. ; POWER, M. R. ; LIN, T. J.: Pseudomonas aeruginosa-induced human mast cell apoptosis is associated with up-regulation of endogenous Bcl-xS and down-regulation of Bcl-xL. In: *J Immunol* 177 (2006), Nr. 11, S. 8000–7
- [70] SMITH, P. K. ; KROHN, R. I. ; HERMANSON, G. T. ; MALLIA, A. K. ; GARTNER, F. H. ; PROVENZANO, M. D. ; FUJIMOTO, E. K. ; GOEKE, N. M. ; OLSON, B. J. ; KLENK, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem* 150 (1985), Nr. 1, S. 76–85
- [71] NICOLETTI, I. ; MIGLIORATI, G. ; PAGLIACCI, M. C. ; GRIGNANI, F. ; RICCARDI, C.: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. In: *J Immunol Methods* 139 (1991), Nr. 2, S. 271–9
- [72] FADOK, V. A. ; XUE, D. ; HENSON, P.: If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. In: *Cell Death Differ* 8 (2001), Nr. 6, S. 582–7
- [73] SCHLEGEL, R. A. ; WILLIAMSON, P.: Phosphatidylserine, a death knell. In: *Cell Death Differ* 8 (2001), Nr. 6, S. 551–63
- [74] VERMES, I. ; HAANEN, C.: Apoptosis and programmed cell death in health and disease. In: *Adv Clin Chem* 31 (1994), S. 177–246
- [75] LAMBERT, I. H. ; HOFFMANN, E. K. ; JORGENSEN, F.: Membrane potential, anion and cation conductances in Ehrlich ascites tumor cells. In: *J Membr Biol* 111 (1989), Nr. 2, S. 113–31
- [76] REERS, M. ; SMILEY, S. T. ; MOTTOLA-HARTSHORN, C. ; CHEN, A. ; LIN, M. ; CHEN, L. B.: Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. In: *Methods Enzymol* 260 (1995), S. 406–17
- [77] BORTZ, J. ; LIENERT, G.A.: *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*. Springer, 2008

- [78] COHEN, G. M.: Caspases: the executioners of apoptosis. In: *Biochem J* 326 (Pt 1) (1997), S. 1–16
- [79] PORTER, A. G. ; JANICKE, R. U.: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. In: *Cell Death Differ* 6 (1999), Nr. 2, S. 99–104
- [80] NICHOLSON, D. W. ; ALI, A. ; THORNBERRY, N. A. ; VAILLANCOURT, J. P. ; DING, C. K. ; GALLANT, M. ; GAREAU, Y. ; GRIFFIN, P. R. ; LABELLE, M. ; LAZEBNIK, Y. A.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. In: *Nature* 376 (1995), Jul, Nr. 6535, S. 37–43
- [81] ASHKENAZI, A. ; DIXIT, V. M.: Death receptors: signaling and modulation. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5381, S. 1305–8
- [82] TOURNEUR, L. ; BUZYN, A. ; CHIOCCHIA, G.: FADD adaptor in cancer. In: *Med Immunol* 4 (2005), Nr. 1, S. 1
- [83] DEGTEREV, A. ; BOYCE, M. ; YUAN, J.: A decade of caspases. In: *Oncogene* 22 (2003), Nr. 53, S. 8543–67
- [84] KOPF-MAIER, P. ; HESSE, B. ; KOPF, H.: [Tumor inhibition by metallocenes: effect of titanocene, zirconocene, and hafnocene dichlorides on Ehrlich ascites tumor in mice (author's transl)]. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 96 (1980), Nr. 1, S. 43–51
- [85] KOPF-MAIER, P. ; KOPF, H.: Tumor inhibition by titanocene dichloride: first clues to the mechanism of action. In: *Naturwissenschaften* 67 (1980), Nr. 8, S. 415–6
- [86] KOPF-MAIER, P. ; WAGNER, W. ; HESSE, B. ; KOPF, H.: Tumor inhibition by metallocenes: activity against leukemias and detection of the systemic effect. In: *Eur J Cancer* 17 (1981), Nr. 6, S. 665–9
- [87] HARSTRICK, A. ; SCHMOLL, H. J. ; SASS, G. ; POLIWODA, H. ; RUSTUM, Y.: Titanocendichloride activity in cisplatin and doxorubicin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. In: *Eur J Cancer* 29A (1993), Nr. 7, S. 1000–1002
- [88] KOPF-MAIER, P. ; TORNIEPORTH-OETTING, I. C.: Antitumor activity of titanocene amino acid complexes. In: *Biometals* 9 (1996), Nr. 3, S. 267–71

- [89] MELÉNDEZ, E.: Titanium complexes in cancer treatment. In: *Crit Rev Oncol Hematol* 42 (2002), Jun, Nr. 3, S. 309–315
- [90] CARUSO, F. ; ROSSI, M.: Antitumor titanium compounds. In: *Mini Rev Med Chem* 4 (2004), Jan, Nr. 1, S. 49–60
- [91] TACKE, M. ; CUFFE, L. P. ; GALLAGHER, W. M. ; LOU, Y. ; MENDOZA, O. ; MULLER-BUNZ, H. ; REHMANN, F. J. ; SWEENEY, N.: Methoxy-phenyl substituted ansa-titanocenes as potential anti-cancer drugs derived from fulvenes and titanium dichloride. In: *J Inorg Biochem* 98 (2004), Nr. 12, S. 1987–94
- [92] VERA, J. L. ; ROMÁN, F. R. ; MELÉNDEZ, E.: Study of titanocene-DNA and molybdenocene-DNA interactions by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy. In: *Anal Bioanal Chem* 379 (2004), Jun, Nr. 3, 399–403. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2596->
- [93] KELTER, G. ; SWEENEY, N. J. ; STROHFELDT, K. ; FIEBIG, H. H. ; TACKE, M.: In-vitro anti-tumor activity studies of bridged and unbridged benzyl-substituted titanocenes. In: *Anticancer Drugs* 16 (2005), Nr. 10, S. 1091–8
- [94] O’CONNOR, K. ; GILL, C. ; TACKE, M. ; REHMANN, F. J. ; STROHFELDT, K. ; SWEENEY, N. ; FITZPATRICK, J. M. ; WATSON, R. W.: Novel titanocene anti-cancer drugs and their effect on apoptosis and the apoptotic pathway in prostate cancer cells. In: *Apoptosis* 11 (2006), Nr. 7, S. 1205–14
- [95] SWEENEY, N. ; GALLAGHER, W. M. ; MULLER-BUNZ, H. ; PAMPILLON, C. ; STROHFELDT, K. ; TACKE, M.: Heteroaryl substituted titanocenes as potential anti-cancer drugs. In: *J Inorg Biochem* 100 (2006), Nr. 9, S. 1479–86
- [96] VALADARES, M. C. ; RAMOS, A. L. ; REHMANN, F. J. ; SWEENEY, N. J. ; STROHFELDT, K. ; TACKE, M. ; QUEIROZ, M. L.: Antitumour activity of [1,2-di(cyclopentadienyl)-1,2-di(p-N,N-dimethylaminophenyl)-ethanediyl] titanium dichloride in xenografted Ehrlich’s ascites tumour. In: *Eur J Pharmacol* 534 (2006), Nr. 1-3, S. 264–70
- [97] ABEYSINGHE, P. M. ; HARDING, M. M.: Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives. In: *Dalton Trans* (2007), Aug, Nr. 32, S. 3474–3482

- [98] HICKEY, T. ; CLAFFEY, J. ; FITZPATRICK, E. ; HOGAN, M. ; PAMPILLON, C. ; TACKE, M.: Dimethylamino-functionalised and N-heteroaryl-substituted titanocene anticancer drugs: synthesis and cytotoxicity studies. In: *Invest New Drugs* 25 (2007), Nr. 5, S. 425–33
- [99] ALLEN, O. R. ; GOTT, A. L. ; HARTLEY, J. A. ; HARTLEY, J. M. ; KNOX, R. J. ; MCGOWAN, P. C.: Functionalised cyclopentadienyl titanium compounds as potential anticancer drugs. In: *Dalton Trans* (2007), Nr. 43, S. 5082–90
- [100] BANNON, J. H. ; FICHTNER, I. ; O'NEILL, A. ; PAMPILLON, C. ; SWEENEY, N. J. ; STROHFELDT, K. ; WATSON, R. W. ; TACKE, M. ; MC GEE, M. M.: Substituted titanocenes induce caspase-dependent apoptosis in human epidermoid carcinoma cells in vitro and exhibit antitumour activity in vivo. In: *Br J Cancer* 97 (2007), Nr. 9, S. 1234–41
- [101] OBERSCHMIDT, O. ; HANAUSKE, A. R. ; PAMPILLON, C. ; SWEENEY, N. J. ; STROHFELDT, K. ; TACKE, M.: Antiproliferative activity of Titanocene Y against tumor colony-forming units. In: *Anticancer Drugs* 18 (2007), Nr. 3, S. 317–21
- [102] GOMEZ-RUIZ, S. ; KALUDEROVIC, G. N. ; PRASHAR, S. ; POLO-CERON, D. ; FAJARDO, M. ; ZIZAK, Z. ; SABO, T. J. ; JURANIC, Z. D.: Cytotoxic studies of substituted titanocene and ansa-titanocene anticancer drugs. In: *J Inorg Biochem* (2008)
- [103] HOGAN, M. ; CLAFFEY, J. ; PAMPILLÓN, C. ; TACKE, M.: Synthesis and cytotoxicity studies of new morpholino-functionalised and N-heteroaryl-substituted titanocene anticancer drugs. In: *Med Chem* 4 (2008), Mar, Nr. 2, S. 91–99
- [104] PAMPILLON, C. ; CLAFFEY, J. ; HOGAN, M. ; TACKE, M.: Novel achiral titanocene anticancer drugs synthesised from bis-N,N-dimethylamino fulvene and lithiated heterocyclic compounds. In: *Biometals* 21 (2008), Nr. 2, S. 197–204
- [105] PAMPILLÓN, Clara ; CLAFFEY, James ; STROHFELDT, Katja ; TACKE, Matthias: Synthesis and cytotoxicity studies of new dimethylamino-functionalised and aryl-substituted titanocene anti-cancer agents. In: *Eur J Med Chem* 43 (2008), Jan, Nr. 1, S. 122–128
- [106] STROHFELDT, K. ; TACKE, M.: Bioorganometallic fulvene-derived titanocene anticancer drugs. In: *Chem Soc Rev* 37 (2008), Jun, Nr. 6, S. 1174–1187

-
- [107] HOGAN, M. ; CLAFFEY, J. ; FITZPATRICK, E. ; HICKEY, T. ; PAMPILLÓN, C. ; TACKE, M.: Synthesis and cytotoxicity studies of titanocene C analogues. In: *Met Based Drugs* 2008 (2008), S. 754358
- [108] KOSTOVA, I.: Titanium and vanadium complexes as anticancer agents. In: *Anticancer Agents Med Chem* 9 (2009), Oct, Nr. 8, S. 827–842
- [109] GAO, L. M. ; MATTA, J. ; RHEINGOLD, A. L. ; MELÉNDEZ, E.: Synthesis, Structure and Biological Activity of Amide-Functionalized Titanocenylys: Improving their Cytotoxic Properties. In: *J Organomet Chem* 694 (2009), Dec, Nr. 26, S. 4134–4139
- [110] CUFFE, S. ; DOWLING, C. M. ; CLAFFEY, J. ; PAMPILLÓN, C. ; HOGAN, M. ; FITZPATRICK, J. M. ; CARTY, M. P. ; TACKE, M. ; WILLIAM, R. ; WATSON, G.: Effects of titanocene dichloride derivatives on prostate cancer cells, specifically DNA damage-induced apoptosis. In: *Prostate* (2010), Jul
- [111] EGER, S. ; IMMEL, T. A. ; CLAFFEY, J. ; MÜLLER-BUNZ, H. ; TACKE, M. ; GROTH, U. ; HUHN, T.: Titanocene difluorides with improved cytotoxic activity. In: *Inorg Chem* 49 (2010), Feb, Nr. 4, S. 1292–1294
- [112] GAO, L. M. ; MELÉNDEZ, E.: Cytotoxic properties of titanocenyl amides on breast cancer cell line mcf-7. In: *Met Based Drugs* 2010 (2010), S. 286298
- [113] GAO, L. M. ; VERA, J. L. ; MATTA, J. ; MELÉNDEZ, E.: Synthesis and cytotoxicity studies of steroid-functionalized titanocenes as potential anticancer drugs: sex steroids as potential vectors for titanocenes. In: *J Biol Inorg Chem* 15 (2010), Aug, Nr. 6, S. 851–859
- [114] ALLEN, O.R. ; CROLL, L. ; GOTT, A.L. ; KNOX, J. ; MCGOWAN, P.C.: In: *Organometallics* 23 (2004), 288–292 S.
- [115] KÖPF-MAIER, P. ; KÖPF, H.: Tumor inhibition by titanocene complexes. Activity against B16 melanoma and colon 38 carcinoma. In: *Arzneimittelforschung* 37 (1987), May, Nr. 5, S. 532–534
- [116] QIAN, Y. ; HUANG, J. ; BALA, M. D. ; LIAN, B. ; ZHANG, H. ; ZHANG, H.: Synthesis, structures, and catalytic reactions of ring-substituted titanium(IV) complexes. In: *Chem Rev* 103 (2003), Nr. 7, S. 2633–90
-

- [117] HARDING, M. M. ; MOKDSI, G.: Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. In: *Curr Med Chem* 7 (2000), Nr. 12, S. 1289–303
- [118] OLSZEWSKI, U. ; CLAFFEY, J. ; HOGAN, M. ; TACKE, M. ; ZEILLINGER, R. ; BEDNARSKI, P. J. ; HAMILTON, G.: Anticancer activity and mode of action of titanocene C. In: *Invest New Drugs* 29 (2011), Aug, Nr. 4, S. 607–614
- [119] MOKDSI, G. ; HARDING, M. M.: Inhibition of human topoisomerase II by the antitumor metallocenes. In: *J Inorg Biochem* 83 (2001), Jan, Nr. 2-3, S. 205–209
- [120] DEBATIN, K. M. ; STAHNKE, K. ; FULDA, S.: Apoptosis in hematological disorders. In: *Semin Cancer Biol* 13 (2003), Nr. 2, S. 149–58
- [121] SCHIMMER, A. D.: Apoptosis in leukemia: From molecular pathways to targeted therapies. In: *Best Pract Res Clin Haematol* 21 (2008), Nr. 1, S. 5–11
- [122] KERR, J. F. ; WINTERFORD, C. M. ; HARMON, B. V.: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. In: *Cancer* 73 (1994), Nr. 8, S. 2013–26
- [123] VERMEULEN, K. ; VAN BOCKSTAELE, D. R. ; BERNEMAN, Z. N.: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. In: *Ann Hematol* 84 (2005), Nr. 10, S. 627–39
- [124] VERMES, I. ; HAANEN, C. ; STEFFENS-NAKKEN, H. ; REUTELINGSPERGER, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: *J Immunol Methods* 184 (1995), Nr. 1, S. 39–51
- [125] HUPPERTZ, B. ; FRANK, H. G. ; KAUFMANN, P.: The apoptosis cascade—morphological and immunohistochemical methods for its visualization. In: *Anat Embryol (Berl)* 200 (1999), Jul, Nr. 1, S. 1–18
- [126] TRUMP, B. F. ; BEREZESKY, I. K. ; CHANG, S. H. ; PHELPS, P. C.: The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. In: *Toxicol Pathol* 25 (1997), Nr. 1, S. 82–88
- [127] HERNÁNDEZ, R. ; MÉNDEZ, Ja. ; LAMBOY, J. ; TORRES, M. ; ROMÁN, F. R. ; MELÉNDEZ, E.: Titanium(IV) complexes: cytotoxicity and cellular uptake of titanium(IV) complexes on caco-2 cell line. In: *Toxicol In Vitro* 24 (2010), Feb, Nr. 1, S. 178–183

- [128] KIM, R. ; EMI, M. ; TANABE, K.: Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). In: *Oncol Rep* 14 (2005), Sep, Nr. 3, S. 595–599
- [129] PARK, S.-Y. ; CHO, S.-J. ; KWON, H.-C. ; LEE, K.-R. ; RHEE, D.-K. ; PYO, S.: Caspase-independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA. In: *Cancer Lett* 224 (2005), Jun, Nr. 1, S. 123–132
- [130] LARSEN, A. K. ; ESCARGUEIL, A. E. ; SKLADANOWSKI, A.: Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. In: *Pharmacol Ther* 99 (2003), Aug, Nr. 2, S. 167–181
- [131] KOPF-MAIER, P. ; WAGNER, W. ; KOPF, H.: Different inhibition pattern of the nucleic acid metabolism after in vitro treatment with titanocene and vanadocene dichlorides. In: *Naturwissenschaften* 68 (1981), Nr. 5, S. 272–3
- [132] KOPF-MAIER, P. ; KRAHL, D.: Tumor inhibition by metallocenes: ultrastructural localization of titanium and vanadium in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. In: *Chem Biol Interact* 44 (1983), Nr. 3, S. 317–28
- [133] KOPF-MAIER, P. ; KRAHL, D.: Intracellular distribution of titanium after treatment with the antitumor agent titanocene dichloride: on electron energy loss spectroscopic study. In: *Naturwissenschaften* 68 (1981), Nr. 5, S. 273–4
- [134] KOPF-MAIER, P.: Intracellular localization of titanium within xenografted sensitive human tumors after treatment with the antitumor agent titanocene dichloride. In: *J Struct Biol* 105 (1990), Nr. 1-3, S. 35–45
- [135] KOPF-MAIER, P. ; MOORMANN, A. ; KOPF, H.: Activity of titanocene dihalides against a human colon carcinoma heterotransplanted to athymic mice. In: *Eur J Cancer Clin Oncol* 21 (1985), Nr. 7, S. 853–7
- [136] GUO, M. ; GUO, Z. ; SADLER, P. J.: Titanium(IV) targets phosphoesters on nucleotides: implications for the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride. In: *J Biol Inorg Chem* 6 (2001), Nr. 7, S. 698–707
- [137] KOPF-MAIER, P. ; MARTIN, R.: Subcellular distribution of titanium in the liver after treatment with the antitumor agent titanocene dichloride. A study using electron spectroscopic imaging. In: *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 57 (1989), Nr. 4, S. 213–22

- [138] KOPF-MAIER, P. ; BRAUCHLE, U. ; HENSSLER, A.: Organ distribution and pharmacokinetics of titanium after treatment with titanocene dichloride. In: *Toxicology* 51 (1988), Nr. 2-3, S. 291–8
- [139] PAVLAKI, M. ; DEBELI, K. ; TRIANTAPHYLLIDOU, I. ; KLOURAS, N. ; GIANNOPOULOU, E. ; ALETRAS, A. J.: A proposed mechanism for the inhibitory effect of the anticancer agent titanocene dichloride on tumour gelatinases and other proteolytic enzymes. In: *J Biol Inorg Chem* 14 (2009), Aug, Nr. 6, S. 947–957
- [140] GUO, M. ; SUN, H. ; MCARDLE, H. J. ; GAMBLING, L. ; SADLER, P. J.: Ti(IV) uptake and release by human serum transferrin and recognition of Ti(IV)-transferrin by cancer cells: understanding the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride. In: *Biochemistry* 39 (2000), Aug, Nr. 33, S. 10023–10033
- [141] MESSORI, L. ; ORIOLI, P. ; BANHOLZER, V. ; PAIS, I. ; ZATTA, P.: Formation of titanium(IV) transferrin by reaction of human serum apotransferrin with titanium complexes. In: *FEBS Lett* 442 (1999), Jan, Nr. 2-3, S. 157–161
- [142] TINOCO, A. D. ; EAMES, E. V. ; VALENTINE, A. M.: Reconsideration of serum Ti(IV) transport: albumin and transferrin trafficking of Ti(IV) and its complexes. In: *J Am Chem Soc* 130 (2008), Feb, Nr. 7, S. 2262–2270
- [143] TINOCO, A. D. ; INCARVITO, C. D. ; VALENTINE, A. M.: Calorimetric, spectroscopic, and model studies provide insight into the transport of Ti(IV) by human serum transferrin. In: *J Am Chem Soc* 129 (2007), Nr. 11, S. 3444–54
- [144] SUN, H. ; LI, H. ; SADLER, P. J.: Transferrin as a metal ion mediator. In: *Chem Rev* 99 (1999), Sep, Nr. 9, S. 2817–2842
- [145] SUN, H. ; COX, M. C. ; LI, H. ; MASON, A. B. ; WOODWORTH, R. C. ; SADLER, P. J.: [¹H,¹³C] NMR determination of the order of lobe loading of human transferrin with iron: comparison with other metal ions. In: *FEBS Lett* 422 (1998), Feb, Nr. 3, S. 315–320
- [146] TINOCO, A. D. ; VALENTINE, A. M.: Ti(IV) binds to human serum transferrin more tightly than does Fe(III). In: *J Am Chem Soc* 127 (2005), Aug, Nr. 32, S. 11218–11219

- [147] WANG, S.-J. ; GAO, C. ; CHEN, B.-A.: Advancement of the study on iron metabolism and regulation in tumor cells. In: *Chin J Cancer* 29 (2010), Apr, Nr. 4, S. 451–455
- [148] TINOCO, A. D. ; EAMES, E. V. ; INCARVITO, C. D. ; VALENTINE, A. M.: Hydrolytic metal with a hydrophobic periphery: titanium(IV) complexes of naphthalene-2,3-diolate and interactions with serum albumin. In: *Inorg Chem* 47 (2008), Nr. 18, S. 8380–90
- [149] WYLER, B. ; SHAO, Y. ; SCHNEIDER, E. ; CIANFRIGLIA, M. ; SCHEPER, R. J. ; FREY, B. M. ; GIESELER, F. ; SCHMID, L. ; TWENTYMAN, P. R. ; LEHNERT, M.: Intermittent exposure to doxorubicin in vitro selects for multifactorial non-P-glycoprotein-associated multidrug resistance in RPMI 8226 human myeloma cells. In: *Br J Haematol* 97 (1997), Nr. 1, S. 65–75
- [150] NITTA, A. ; CHUNG, Y. S. ; NAKATA, B. ; YASHIRO, M. ; ONODA, N. ; MAEDA, K. ; SAWADA, T. ; SOWA, M.: Establishment of a cisplatin-resistant gastric carcinoma cell line OCUM-2M/DDP. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 40 (1997), Nr. 1, S. 94–7
- [151] SEEMANN, O. ; MUSCHECK, M. ; SIEGSMUND, M. ; PILCH, H. ; NEBE, C. T. ; RASSWEILER, J. ; ALKEN, P.: Establishment and characterization of a multidrug-resistant human bladder carcinoma cell line RT112/D21. In: *Urol Res* 22 (1995), Nr. 6, S. 353–360
- [152] GUO, H. ; LU, G. ; XIONG, X. ; DONG, J. ; LIU, S.: Establishment of doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line (BUI-87/ADMR) and its mechanism of multidrug resistance. In: *Chin Med J (Engl)* 110 (1997), Nr. 3, S. 167–72
- [153] KOPF-MAIER, P. ; GERLACH, S.: Pattern of toxicity by titanocene dichloride in mice. Blood and urine chemical parameters. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 111 (1986), Nr. 3, S. 243–7
- [154] KOPF-MAIER, P. ; GERLACH, S.: Pattern of toxicity by titanocene dichloride in mice: hematologic parameters. In: *Anticancer Res* 6 (1986), Nr. 2, S. 235–40
- [155] KÖPF-MAIER, P. ; KÖPF, H.: Antitumor metallocenes: new developments and toxicologic features. In: *Anticancer Res* 6 (1986), Nr. 2, S. 227–233
- [156] KORFEL, A. ; SCHEULEN, M. E. ; SCHMOLL, H. J. ; GRÜNDEL, O. ; HARSTRICK, A. ; KNOCHE, M. ; FELS, L. M. ; SKORZEC, M. ; BACH, F. ; BAUMGART, J. ; SASS, G. ;

- SEEBER, S. ; THIEL, E. ; BERDEL, W. E.: Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors. In: *Clin Cancer Res* 4 (1998), Nov, Nr. 11, S. 2701–2708
- [157] KÖPF-MAIER, P.: The organ toxicity of the antitumour agent titanocene dichloride is dependent on the route and schedule of application. (Abstract). In: *National Cancer Institute-EORTC Symposium on New Drugs in Cancer Therapy* (1996)
- [158] CHRISTODOULOU, C. V. ; FERRY, D. R. ; FYFE, D. W. ; YOUNG, A. ; DORAN, J. ; SHEEHAN, T. M. ; ELIOPOULOS, A. ; HALE, K. ; BAUMGART, J. ; SASS, G. ; KERR, D. J.: Phase I trial of weekly scheduling and pharmacokinetics of titanocene dichloride in patients with advanced cancer. In: *J Clin Oncol* 16 (1998), Aug, Nr. 8, S. 2761–2769
- [159] LÜMMEN, G. ; SPERLING, H. ; LUBOLDT, H. ; OTTO, T. ; RÜBBEN, H.: Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 42 (1998), Nr. 5, S. 415–417
- [160] KOPF-MAIER, P.: Antitumor activity of titanocene dichloride in xenografted human renal-cell carcinoma. In: *Anticancer Res* 19 (1999), Nr. 1A, S. 493–504
- [161] KÖPF-MAIER, P.: Tumor inhibition by titanocene complexes: influence on xenografted human adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 23 (1989), Nr. 4, S. 225–230
- [162] FICHTNER, I. ; PAMPILLON, C. ; SWEENEY, N. J. ; STROHFELDT, K. ; TACKE, M.: Antitumor activity of Titanocene Y in xenografted Caki-1 tumors in mice. In: *Anticancer Drugs* 17 (2006), Nr. 3, S. 333–6
- [163] BECKHOVE, P. ; OBERSCHMIDT, O. ; HANAUSKE, A. R. ; PAMPILLON, C. ; SCHIRRMACHER, V. ; SWEENEY, N. J. ; STROHFELDT, K. ; TACKE, M.: Antitumor activity of Titanocene Y against freshly explanted human breast tumor cells and in xenografted MCF-7 tumors in mice. In: *Anticancer Drugs* 18 (2007), Nr. 3, S. 311–5
- [164] MARAGOUDAKIS, M. E. ; PERISTERIS, P. ; MISSIRLIS, E. ; ALETRAS, A. ; ANDRIOPOULOU, P. ; HARALABOPOULOS, G.: Inhibition of angiogenesis by anthracyclines and titanocene dichloride. In: *Ann N Y Acad Sci* 732 (1994), Sep, S. 280–293

- [165] WEBER, H. ; CLAFFEY, J. ; HOGAN, M. ; PAMPILLÓN, C. ; TACKE, M.: Analyses of Titanocenes in the spheroid-based cellular angiogenesis assay. In: *Toxicol In Vitro* 22 (2008), Mar, Nr. 2, S. 531–534
- [166] KATER, L. ; CLAFFEY, J. ; HOGAN, M. ; JESSE, P. ; KATER, B. ; STRAUSS, S. ; TACKE, M. ; PROKOP, A.: The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. In: *Toxicol In Vitro* (2011), Oct
- [167] CHEN, P. ; WU, Q.-S. ; DING, Y.-P. ; CHU, M. ; HUANG, Z.-M. ; HU, W.: A controlled release system of titanocene dichloride by electrospun fiber and its antitumor activity in vitro. In: *Eur J Pharm Biopharm* 76 (2010), Nov, Nr. 3, S. 413–420

Lebenslauf

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

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Laura Wagner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Synthetische metallorganische Verbindungen als Apoptoseinduktoren‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

18. Juni 2012

Unterschrift

Publikationsliste

1. Mulcahy SP, Gründler K, Frias C, Wagner L, Prokop A, Meggers E.: Discovery of a strongly apoptotic ruthenium complex through combinatorial coordination chemistry. In: *Dalton Trans* 39 (2010), Sep 21, S.8177-82.
2. Dobroschke M, Geldmacher Y, Ott I, Harlos M, Kater L, Wagner L, Gust R, Sheldrick WS, Prokop A.: Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction. In: *ChemMedChem* 4(2009), Feb, S. 177-87.
3. 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. In: *Chemistry* 14 (2008), S. 4160-3.