

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

DISSERTATION

**Präklinische Evaluation pflanzlicher Extrakte aus *Helleborus niger* und *Viscum album* L. sowie eines Gold(I)-Phosphinkomplexes mit funktionellem Naphthalimidliganden bezüglich ihrer Apoptose-induzierenden Wirksamkeit und den dabei zugrunde liegenden Mechanismen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo*.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patrick Jesse

aus Berlin

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze  
                          2. Prof. Dr. med. N. Graf  
                          3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. T. Wieder

Datum der Promotion: 03.09.2010

## Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Einleitung .....	7
1.1 <i>Helleborus niger</i> in der Begleittherapie onkologischer Erkrankungen .....	7
1.2 Mistellektine als zytostatisch aktive Substanzen in <i>Viscum album</i> L.....	8
1.3 Metallkomplexe in der Tumorthherapie .....	8
1.4 Apoptose als Wirkmechanismus zytostatischer Substanzen .....	9
2 Zielstellung .....	10
3 Methodik .....	10
3.1 Verwendete Geräte .....	10
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	11
3.3 Chemikalien und Reagenzien .....	11
3.4 Kommerzielle Kits und Antikörper .....	12
3.5 Verwendete Pflanzenextrakte und Wirkstoffe.....	13
3.5.1 <i>Helleborus niger</i> Extrakte .....	13
3.5.2 Extrakte aus <i>Viscum album</i> L.....	13
3.5.3 Gold(I)-Phosphinkomplex mit Naphthalimidliganden.....	13
3.6 Verwendete Zelllinien und primäre Zellen.....	13
3.7 Messung der LDH- Freisetzung .....	14
3.8 Proliferationsmessung .....	14
3.9 Annexin-V/Propidiumiodid- Doppelfärbung .....	14
3.10 Apoptosemessung mittels modifizierter Zellzyklusanalyse.....	15
3.11 Mitochondriale Membranpotentialanalyse mittels JC-1 .....	15
3.12 Western Blot- Verfahren und Immundetektion .....	15
3.13 Datenauswertung und Statistik .....	16
4 Ergebnisse .....	16
4.1 Präklinische Evaluation von <i>Helleborus niger</i> Extrakt in vitro und ex vivo (Publikation 1) .....	16
4.1.1 Ausschluss eines unspezifischen Zelltodes und Inhibition der Zellproliferation .....	16
4.1.2 Apoptoseinduktion .....	17
4.1.3 Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges .....	17
4.1.4 Synergistische Effekt mit Vincristin .....	17
4.1.5 Apoptoseinduktion in primären Patientenzellen .....	18
4.2 Molekulare Mechanismen der durch Mistelextrakte induzierten Apoptose in einem ALL- Modell in vitro und in vivo (Publikation 2) .....	18
4.2.1 In vitro- Ergebnisse .....	18
4.2.2 In vivo- Ergebnisse.....	19
4.3 Antiangiogenetische und antiproliferative Effekte eines Gold (I)-Phosphinkomplexes mit funktionellem Naphthalimid-Liganden (Publikation 3) .....	19
4.3.1 Antiproliferative Effekte und Bioverteilung .....	19
4.3.2 Inhibition der Thioedoxinreduktase und Apoptoseinduktion .....	20
4.3.3 Hemmung der Angiogenese in einem Zebrafischmodell .....	20
5 Diskussion.....	20
6 Literaturverzeichnis .....	24
7 Anteilserklärung.....	27
8 Verwendete Publikationen .....	28
9 Lebenslauf.....	29
10 Komplette Publikationsliste .....	30
11 Selbstständigkeitserklärung.....	31
12 Danksagung.....	32

## Abstract

Onkologische Erkrankungen gehören nach Herz- Kreislauferkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe für die Behandlung dieser Erkrankungen ist somit von Interesse. Hierbei bietet zum einen die Suche nach neuen zytostatisch wirksamen Substanzen in Pflanzenextrakten einen viel versprechenden Ansatzpunkt, zum anderen bildet die Weiterentwicklung schon bekannter Wirkstoffe durch Verbindung mit zusätzlich funktionellen Gruppen ein interessantes Forschungsfeld. In der vorliegenden Arbeit wurden Pflanzenextrakte aus *Helleborus niger* und *Viscum album* L. sowie ein neu synthetisierter Gold(I)-Phosphinkomplex mit Naphthalimidliganden auf ihre biologische Aktivität in vitro, ex vivo und in vivo untersucht.

Bei der Untersuchung der Extrakte aus *Helleborus niger* konnten erste präklinische Daten zur in vitro- Wirksamkeit auf einer Reihe von Zelllinien gewonnen werden. Eine Inkubation mit *Helleborus niger* Extrakt inhibiert die Proliferation von Tumorzellen und induziert spezifisch Apoptose in BJAB, NALM-6, SUP-B15, JURKAT und REH Zellen. Die Apoptose erfolgt über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg mit konsekutiver Prozessierung der Caspase-3 und ist nicht vollständig durch Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins blockierbar. Eine Apoptoseinduktion konnte auch in primären Patientenzellen von Kindern mit neu diagnostizierter ALL und AML sowie dem Rezidiv einer AML gefunden werden. In der zweiten Publikation wurde erstmalig die Wirksamkeit von *Viscum album* L. Extrakten in einem akuten lymphoblastischen Leukämie Modell in vitro und in vivo evaluiert und die Rolle des Mistellektin-III an der zytotoxischen Wirkung genauer untersucht. Hierzu wurden ein ML-III reiches (MT-P) und ein ML-III armes (MT-A) Extrakt verwendet. In vitro kommt es zu einer dosisabhängigen Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion durch antimitchondriale Effekte in NALM-6 Zellen, die eng mit dem ML-III Gehalt der verschiedenen *Viscum album* L. Extrakte korrelieren. In vivo zeigte sich jedoch eine höhere antileukämische Potenz des ML-III armen MT-A, so dass der antileukämische Effekt der verwendeten Extrakte nicht allein auf ihren absoluten ML-III Gehalt zurückgeführt werden kann.

In der dritten publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, wie die zytotoxische Potenz von Gold(I)-Phosphinverbindungen durch die Kopplung mit einem funktionellen Liganden verbessert werden kann. Der neu synthetisierte Gold(I)-Phosphinkomplex mit Naphthalimidliganden weist sowohl antiproliferative als auch antiangiogene Eigenschaften auf und verursacht eine Apoptoseinduktion durch antimitchondriale Effekte. Der Naphthalimidligand ist hierbei für eine höhere Goldakkumulation im Zellkern sowie die antiangiogenen Effekte des Komplexes verantwortlich. Die Naphthalimidstruktur konnte somit als beachtenswerter Ligand für die Gewinnung neuer Komplexe mit erhöhter zytotoxischer Effektivität identifiziert werden.

## Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under Curve
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma- 2 gene
Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell lymphoma- extra large
Bid	BH3 interacting domain death antagonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Caspase	Cysteiny laspartase
CB	Colony of BALB
CD	Cluster of Differentiation
CED	<i>C. elegans</i> death protein
DISC	Death- Inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	Dithiobisnitrobenzoic acid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme- Linked- Immunosorbent Assay
Et <sub>3</sub> PAuCl	Chloro(triethylphosphin)gold(I)
FACS	Fluorescent- Activated Cell Sorting
FADD	Fas Associated Death Domain
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
IL	Interleukin
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyaniniodid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli
$\mu$	Mikro
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
ML	Mistellektin
MT-A/P	Helixor® A, Helixor® P
NK	Natural Killer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
RNAse	Ribonukleinase
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxR	Thioredoxinreduktase
Viscum album L.	Viscum album Linné
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential

## 1 Einleitung

Die Suche nach neuen Medikamenten und Wirkstoffen für die Behandlung onkologischer Erkrankungen bildet einen großen pharmazeutischen Forschungsschwerpunkt. Trotz erheblicher Anstrengungen die Therapieerfolge maligner Erkrankungen zu verbessern, ist die Anzahl effizienter Medikamente und Wirkstoffe weiterhin limitiert und die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe und Behandlungsalternativen ist somit notwendig. Hierbei bietet zum einen die Suche nach neuen zytostatisch wirksamen Substanzen in Pflanzenextrakten einen viel versprechenden und reichhaltigen Ansatzpunkt, zum anderen bildet die Weiterentwicklung schon bekannter Wirkstoffe durch Verbindung mit zusätzlich funktionellen Gruppen oder Substanzen, welche die zytostatische Wirkung potenzieren, ein interessantes Forschungsfeld. Auch die Kombination zweier Wirkstoffe in einem Medikament kann nicht nur additive, sondern zudem synergistische Effekte hervorrufen, so dass die zytostatische Potenz des Medikamentes um ein Vielfaches gesteigert werden kann.

Zytostatisch aktive Substanzen aus Naturstoffen und speziell Pflanzen, z.B. der Vinkaalkaloide aus *Catharanthus roseus* oder Taxol aus *Taxus brevifolia*, werden in der Medizin und besonders in der Onkologie häufig als hochwirksame Pharmaka eingesetzt oder sind Vorbild synthetischer Wirkstoffe.<sup>1</sup> Diese wurden aus pflanzlichen Extrakten isoliert, bei denen man eine Wirkung auf maligne Zellen gefunden hat, ohne zunächst die für diese Wirkung verantwortlichen Stoffe zu kennen. Die Isolierung dieser Stoffe und chemische Synthetisierung führte schließlich zu den heute sehr erfolgreich in der Therapie maligner Erkrankungen eingesetzten Wirkstoffen. Im Bereich alternativer Krebstherapien ist die Verwendung pflanzlicher Extrakte auch heutzutage noch weit verbreitet. Häufig liegen zu den verwendeten Extrakten keine präklinischen Daten oder klinisch- evaluierte Studien vor und die Verwendung beruht auf „erfahrungsheilkundlicher“ Basis. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Wirksamkeit sind meist nur – wenn überhaupt - rudimentär erforscht. Der langjährige Einsatz dieser Extrakte macht es jedoch dringend notwendig, die Wirksamkeiten und deren zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu evaluieren und die verantwortlichen Inhaltsstoffe zu identifizieren.

### 1.1 *Helleborus niger* in der Begleittherapie onkologischer Erkrankungen

*Helleborus niger*, die schwarze Nieswurz oder Christrose, wird in der anthroposophisch-erweiterten Medizin in der Begleittherapie onkologischer Erkrankungen eingesetzt. Zu den Indikationen zählen Hirntumore bei Kindern, Prostatakarzinome, sowie Leukämien und Lymphome. *Helleborus niger* gehört zur Familie der Hahnenfußgewächse (Ranunculaceae). *Helleborus niger* zeichnet sich durch ein ausgeprägtes, schwarzbraunes Rhizom und einen kräftigen Wurzelstock aus. Die dunkelgrünen Blätter fächern sich fußförmig auf und am unverzweigten Blütenstängel befinden sich die weißen Blütenblätter. Die Pflanze erreicht eine

Höhe zwischen 15 und 30 cm. Die Blütezeit dauert von Dezember bis April.<sup>2,3</sup> Zu den bisher aus *Helleborus niger* isolierten Bestandteilen gehören Saponine, Flavonoide, Bufadienolide und  $\beta$ -Ecdyson.<sup>4-6</sup>

Obwohl *Helleborus niger* in der anthroposophisch- erweiterten Begleitbehandlung onkologischer Erkrankungen eingesetzt wird, liegen bislang keine präklinischen Daten zur Wirksamkeit des Extraktes in vitro und in vivo vor.

## **1.2 Mistellektine als zytostatisch aktive Substanzen in *Viscum album* L.**

Ein zweites Forschungsfeld im Bereich der pflanzlichen Wirkstoffe bilden Extrakte aus *Viscum album* L. Im Gegensatz zur Verwendung von *Helleborus niger* liegen bereits zahlreiche Untersuchungen zum Einsatz von Mistelextrakten bei onkologischen Erkrankungen vor, die Effektivität ihrer Anwendung wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert.<sup>7-10</sup> Zu den bekannten Inhaltsstoffen der Mistelextrakte gehören Mistellektine, Viscotoxine, Polysaccharide und Triterpene, deren Zusammensetzung je nach Wirtsbaum stark variiert.<sup>11-15</sup> Vor allem die Mistellektine sind in den letzten Jahren in den Mittelpunkt der Forschung getreten, da sie zu einem großen Teil für die zytotoxische Wirkung von Mistelextrakten verantwortlich zu sein scheinen.<sup>11,16</sup> Insgesamt sind 4 Arten der Mistellektine - ML-I, -II, -III und das chitinbindende Lektin - bekannt. Die Mistellektine bestehen aus einer A- und B- Kette.<sup>17</sup> Die A-Kette bindet an die 60S ribosomale Untereinheit und führt zu einer Inhibition der ribosomalen Proteinbiosynthese.<sup>18,19</sup> Die B-Kette bindet an Galaktose- und Neolaktogangliosidreste der Zelloberfläche und vermittelt somit den Kontakt zur Zielzelle.<sup>20</sup> Durch Inhibition der ribosomalen Proteinbiosynthese kommt es zur Apoptoseinduktion und zum Untergang der Zelle.<sup>21</sup> Die A-Kette der Mistellektine ist in allen drei Mistellektinen sehr ähnlich,<sup>22</sup> wohingegen die B-Kette lektinspezifisch ist.<sup>23</sup> Die Mistellektine haben unterschiedliche zytotoxisch funktionelle Eigenschaften. Bislang ist jedoch der Anteil von ML-III an der durch Mistelextrakte hervorgerufenen zytotoxischen Wirkung nicht genau untersucht. Auch gibt es noch keine Daten zur in vitro- und in vivo- Wirksamkeit von Mistelextrakten in einem Leukämiemodell.

## **1.3 Metallkomplexe in der Tumorthherapie**

Ein weiteres experimentelles Forschungsfeld für die zukünftige Behandlung von Tumorerkrankungen bilden Metallkomplexe. Der Erfolg der derzeit in der Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten eingesetzten Platinverbindungen wie Cis- oder Carboplatin zeigt das Potential von Metallkomplexen in der Tumorthherapie auf.<sup>24</sup> Die zahlreichen und teilweise schweren Nebenwirkungen, sowie die Resistenzentwicklung gegenüber diesen Verbindungen limitieren deren Einsatz jedoch häufig.<sup>25</sup> Neben Platinverbindungen bieten Goldverbindungen einen interessanten Ansatzpunkt.<sup>26</sup> Erste Untersuchungen zeigen, dass die antiproliferativen

Effekte von Goldkomplexen am ehesten durch das Goldion selbst hervorgerufen werden und auf kovalenten Interaktionen mit Disulfidreduktasen wie der Thioredoxinreduktase beruhen.<sup>27</sup> Die Aufnahme der Goldkomplexe in ihre Zielkompartimente erfolgt über funktionelle Liganden. Sie sind für die Verteilung und die kinetischen Eigenschaften der Goldkomplexe verantwortlich. Die zytotoxischen Eigenschaften von Goldkomplexen könnten somit durch die Verbindung mit zusätzlich antiproliferativen Liganden potenziert werden. Eine interessante Gruppe von Liganden bilden hierbei die Naphthalimide.<sup>28</sup> Die chemische Synthese und erste biologische Evaluation eines solchen Gold(I)-Phosphinkomplexes mit Naphthalimidliganden wurden in der dritten veröffentlichten Arbeit untersucht.

#### **1.4 Apoptose als Wirkmechanismus zytostatischer Substanzen**

Die meisten zytostatisch aktiven Stoffe wirken über eine Induktion der Apoptose. Als Apoptose wird der „gerichtete“ oder „programmierte“ Zelltod bezeichnet. Eine entscheidende Rolle im Ablauf der Apoptosekaskade spielen die Cysteinylasspartasen, die sog. Caspasen.<sup>29</sup> Sie werden in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt. Zu den Initiatorcaspasen zählen die Caspasen-8, -9 und -2, zu den Effektorcaspasen die Caspasen-3, -6 und -7.<sup>30,31</sup> Ihre Aktivierung erfolgt mittels proteolytischer Spaltung durch die übergeordneten Initiatorcaspasen. Die Effektorcaspasen leiten die endgültige Exekution des apoptotischen Zelltods ein und führen durch Spaltung verschiedener Proteine u.a. zum Anhalten der Zellteilung, Inaktivierung von Reparaturmechanismen, Auflösung des Zytoskeletts und der Kernmembran.<sup>32</sup>

Die Apoptose kann auf drei Hauptsignalwegen erfolgen, die entweder über Todesrezeptoren der Zellmembran, Aktivierung und Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium oder das Endoplasmatische Retikulum vermittelt werden.<sup>33</sup> Der extrinsische Apoptoseweg führt über spezifische Ligandenbindung an Oberflächenrezeptoren wie CD95 oder TRAIL der Zielzellen zu deren Konformitätsänderung und Internalisierung, woraufhin auf der zytosolischen Seite über eine sog. Todesdomäne Adapterproteine wie TRADD oder FADD rekrutiert werden.<sup>34</sup> Diese Adapterproteine bilden mit der Initiatorcaspase-8 den DISC-Komplex, in dem Caspase-8 Monomere rekrutiert und durch Dimerisierung aktiviert werden.<sup>32</sup> Aktive Caspase-8 kann dann Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6 und -7 aktivieren.

Der intrinsische Signalweg führt über die Freisetzung verschiedener Faktoren aus dem Mitochondrium zur Aktivierung der Caspase-9. Initial kommt es zur Perforation der äußeren Mitochondrienmembran und damit einhergehend zur Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmatrix.<sup>35</sup> Durch den Zusammenbruch des Membranpotentials kommt es u.a. zur Ausschleusung von Cytochrom-C in den Intrazellularraum, welches zusammen mit der Procaspase-9, dem CED-4-Homolog APAF-1 und (d)ATP das Apoptosom bildet und so die Apoptose initiiert.<sup>36</sup> Das Apoptosom spaltet

konsekutiv die Procaspase-3 in die aktive Caspase-3. Die mitochondriale Apoptose wird über Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie reguliert zu denen sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine gehören.<sup>37,38</sup> Zu den proapoptotischen Proteinen zählen Bid, Bim, Bax und Bak, zu den antiapoptotischen Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1.<sup>39-41</sup> Vor allem die Überexpression von Bcl-2 spielt eine entscheidende Rolle in der Therapieresistenz und Malignität zahlreicher Tumorentitäten.<sup>42-45</sup>

## **2 Zielstellung**

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene pflanzliche Extrakte aus *Helleborus niger* und *Viscum album* L., sowie ein Gold(I)-Phosphinkomplex mit funktionellem Naphthalimidliganden, auf ihre biologische Aktivität in malignen Zellen getestet. Hierbei wurden insbesondere die Wachstumshemmung und die Art des induzierten Zelltodes untersucht. Unterschiedliche Signale und Prozesse aus verschiedenen Phasen der Apoptose wurden mit geeigneten Experimenten nachgewiesen, um eindeutige Aussagen über die Qualität des induzierten Zelltodes treffen zu können. Die Apoptosemessungen wurden mit Suspensionszelllinien, adhärenen Zelllinien und primären Zellen von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen durchgeführt.

Bei der Untersuchung der Extrakte aus *Helleborus niger* sollten erste präklinische Daten zur in vitro- Wirksamkeit auf einer Reihe von Zelllinien und primären Patientenzellen gewonnen werden. In der zweiten Publikation wurden erstmalig zwei Extrakte aus *Viscum album* L. auf ihr zytotoxisches Potential in einem akuten lymphoblastischen Leukämie- Modell in vitro und in vivo untersucht. Um die Rolle des Mistellektin-III an der zytotoxischen Wirkung der Mistelextrakte genauer zu evaluieren, wurde ein ML-III reiches Extrakt von Kiefernmistelbüschen und ein ML-III armes Extrakt von Tannenmistelbüschen verwendet. In der dritten publizierten Arbeit wurde ein neu synthetisierter Gold(I)-Phosphinkomplex auf seine zytotoxischen Eigenschaften untersucht und evaluiert, ob es durch die Verbindung mit einem Naphthalimidliganden zu einer Steigerung der Zytotoxizität im Vergleich mit anderen Goldkomplexen kommt.

## **3 Methodik**

### **3.1 Verwendete Geräte**

Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Multiskan Ascent	Thermo, Waltham, USA
CASY®CellCounter	Schärfe System, Reutlingen
Brutschrank Hera Cell 150	Thermo, Waltham, USA
Chemigenius-2-Bio-Imaging Systems	Syngene, Cambridge, UK

Cleanbench LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Power Pac HC	Bio-Rad, München
Inversmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

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

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Formaldehyd $\geq 37\%$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
RNase A	Qiagen, Hilden
Propidiumiodid	Serva, Heidelberg
Bicoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Bovine Serum Albumin	Sigma- Aldrich, München
DMSO	Serva, Heidelberg
ECL Western Blotting Detection	Amersham Biosciences, Freiburg
Super Signal West Pico ECL-Substrate	Pierce, Rockford, USA
Penicillin(1000 U/ml)/Streptomycin(1000 $\mu\text{g/ml}$ )	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
JC-1	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma- Aldrich, München
DNA-Molecular Weight Marker (Rainbow, full range)	Amersham Biosciences, Freiburg

DNA-Molecular Weight Marker (wide range)	Sigma- Aldrich, München
Ponceau-Rot	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Merck, Darmstadt
FKS	Gibco- Invitrogen, Karlsruhe
CASY@ton-Messlösung	Schärfe System, Reutlingen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
APS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor- Cocktail	Roche Diagnostik, Mannheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Acrylamid (Rotiphorese (Gel 40))	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt

### **3.4 Kommerzielle Kits und Antikörper**

Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostik, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Illinois, USA
Phosphatidylserine Detection Kit	IQ Products, Groningen, Niederlande
<u>Primäre Antikörper</u>	
Anti-Caspase-3	Sigma- Aldrich, München
Anti-Caspase-9	R & D, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti- $\beta$ -Actin	Sigma- Aldrich, München
<u>Sekundäre Antikörper</u>	
Anti-Mouse IgG HRP	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Rabbit IgG HRP	Promega, Minneapolis, USA
Anti-Goat IgG HRP	Calbiochem- Merck, Darmstadt

### **3.5 Verwendete Pflanzenextrakte und Wirkstoffe**

#### **3.5.1 *Helleborus niger* Extrakte**

Für die Zellkulturversuche der veröffentlichten Arbeit wurde ein standardisiertes, wässriges Extrakt aus *Helleborus niger* des Instituts HISCIA verwendet. Für das Herstellungsverfahren sei auf die Publikation verwiesen. In der Zwischenzeit wurden zwei weitere wässrige Gesamtextrakte aus *Helleborus niger* der HELIXOR Heilmittel GmbH und Co. KG und der WALA Heilmittel GmbH untersucht.<sup>46</sup> Für die Versuche wurde jeweils die Urtinktur der Extrakte verwendet.

#### **3.5.2 Extrakte aus *Viscum album* L.**

Für die Versuche der veröffentlichten Arbeit wurden zwei biochemisch und biologisch standardisierte wässrige Mistelextrakte der Firma HELIXOR Heilmittel GmbH & Co verwendet. HELIXOR® A (MT-A) stammt von Tannenmistelbüschen und HELIXOR® P (MT-P) von Kiefermistelbüschen. Die Extrakte hatten jeweils eine Ausgangskonzentration von 50 mg Pflanzenmaterial pro Milliliter. MT-A und MT-P unterscheiden sich in ihrem Lektingehalt aufgrund wirtsbaumspezifischer Unterschiede. MT-P weist einen Lektingehalt von 725 ng/ml auf, der ausschließlich auf ML-II und III zurückzuführen ist. MT-A weist einen Lektingehalt von 160 ng/ml auf, von denen ca. 95% auf ML-II und ML-III zurückzuführen sind.

#### **3.5.3 Gold(I)-Phosphinkomplex mit Naphthalimidliganden**

Für die Versuche wurde der neu- synthetisierte Komplex [*N*-(*N*',*N*'-Dimethylaminoethyl)-1,8-naphthalimid-4-sulfid](triethylphosphin)gold(I) verwendet. Für die exakten chemischen Syntheseschritte sei auf die entsprechende Publikation verwiesen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird dieser Komplex analog zur Publikation als **3** bezeichnet.

### **3.6 Verwendete Zelllinien und primäre Zellen**

Für die Versuche wurden folgende Zelllinien verwendet: BJAB (humane Burkitt-like Lymphomzelllinie), NALM-6, REH, SUP-B15 (humane B-Vorläuferleukämiezelllinien), JURKAT (humane T-Leukämiezelllinie). Bei den Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen, die in Einzelzellen oder in Zellverbänden wachsen. Die Zellen wurden in RPMI1640- Medium, supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt im Brutschrank kultiviert und stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

Mel-HO ist eine Zelllinie, die aus einem primären, humanen Melanom etabliert wurde. Die adhären Zellen wurden in DMEM- Medium, supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die MelHO- Zellen wurden stabil transfiziert mit dem Vektor pIres (MelHO/pIres) und mit dem Bcl-2 Gen in pIres

(MelHO/Bcl-2). Die MelHO/Bcl-2 Zellen zeigen eine starke Überexpression des Bcl-2 gegenüber den MelHO/pIres Zellen. Dieses Zelllinienpaar wurde von PD Dr. rer. nat. Jürgen Eberle, Klinik für Dermatologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

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

### **3.7 Messung der LDH- Freisetzung**

Ein nekrotischer Zelltod ist im Gegensatz zu einem apoptotischen Zelltod mit einer unmittelbaren LDH- Freisetzung assoziiert, da es durch die ungerichtete Membranschädigung zu einer raschen Ausschleusung der zytosolischen Laktatdehydrogenase in das Zellkulturmedium kommt. Die nach 2- 4 h im Überstand detektierte LDH- Aktivität ist ein Maß für die toxische Schädigung der Zellen und kann in einem gekoppelten enzymatischen Test mittels ELISA bestimmt werden. Die Versuchsdurchführung wurde wie beschrieben befolgt.<sup>48</sup>

### **3.8 Proliferationsmessung**

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

### **3.9 Annexin-V/Propidiumiodid- Doppelfärbung**

In der frühen Phase der Apoptose kommt es zur morphologischen Veränderung der Plasmamembran und es erfolgt die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran auf die äußere Oberfläche.<sup>51,52</sup> Annexin-V ist in der Lage calcium-abhängig an Phospholipide zu binden. Wird das Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran präsentiert, bindet Annexin-V mit hoher Affinität. Durch die Konjugation des Annexin-V mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC ist es möglich diese Zellen durchflusszytometrisch zu detektieren. Durch die Gegenfärbung mit Propidiumiodid können vitale, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden werden.<sup>53,54</sup> Die Annexin-V/PI- Doppelfärbung wurde wie beschrieben durchgeführt.<sup>48</sup>

### **3.10 Apoptosemessung mittels modifizierter Zellzyklusanalyse**

In der Endphase der Apoptose kommt es zur DNA-Fragmentierung. Dies zeigt sich bei einer DNA-Färbung an einem verminderten DNA-Gehalt (Hypodiploidie) im Vergleich zu einer Zelle in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase. Nach Anfärbung mit Propidiumiodid sind apoptotische Zellen im Fluoreszenzhistogramm auf der FL3-Achse des Durchflusszytometers unterhalb der diploiden DNA detektierbar.<sup>55,56</sup> Anhand der Relation der AUC (area under curve) der hypoploiden DNA zu der AUC der gesamten detektierten DNA kann der relative Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation berechnet werden. Der Versuch wurde wie beschrieben befolgt.<sup>47</sup>

### **3.11 Mitochondriale Membranpotentialanalyse mittels JC-1**

Mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaniniodid (JC-1) ist eine Detektion der mitochondrialen Membranpotentialänderung möglich. Das JC-1 akkumuliert abhängig vom mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) in der Matrix der Mitochondrien.<sup>57</sup> Monomeres JC-1 zeigt eine grüne Fluoreszenz (525 nm). Bei hohem Membranpotential kommt es zu starker Akkumulation, die JC-1-Fluoreszenz verschiebt sich in den roten Wellenlängenbereich (590 nm). Kommt es zur Membrandepolarisierung, nimmt die rote Fluoreszenz ab und die grüne Fluoreszenz (525 nm) verstärkt sich. Zellen mit niedrigem mitochondrialem Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) wurden wie beschrieben durchflusszytometrisch durch Messung der Abnahme der roten Fluoreszenz in einem FACSCalibur quantifiziert.<sup>47</sup>

### **3.12 Western Blot- Verfahren und Immundetektion**

Die Zellen wurden mit einem Detergenz- und Proteaseinhibitor-haltigen Puffer für 1 h auf Eis lysiert und nichtlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernt. Mittels des BCA-Assays wurde die Proteinkonzentration bestimmt.<sup>58</sup> Anschließend wurden die aufgearbeiteten Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.<sup>59</sup> Mittels Semidry-Blotting Verfahren wurden die Peptide auf die Oberfläche einer Nitrozellulosemembran überführt.<sup>47</sup> Die mit den Proteinen besetzte Nitrozellulosemembran wurde mit einer Blocklösung versetzt und es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Im letzten Schritt erfolgte nach mehreren Waschschritten die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, bevor nach erneutem Waschen und Zugabe einer Chemilumineszenzsubstanz die Lumineszenzsignale mit dem Chemigenius-2-Bio-Imaging-System detektiert wurden.<sup>47</sup>

### 3.13 Datenauswertung und Statistik

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

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen (FACS) erfolgte mit der Cellquest Pro Software. In den Histogrammen der modifizierten Zellzyklusanalyse wurde die AUC bestimmt, welche den Anteil der hypodiploiden sub-G1- Population widerspiegelt. Bei den Dotplots des JC-1 Testes und der Annexin-V/PI- Doppelfärbung wurden die Verteilungen der Zellen in den Quadranten ermittelt und für die Berechnungen verwendet. Zur Ermittlung eines antagonistischen, additiven oder synergistischen Effektes der Kombination zweier Wirkstoffe wurde das „Fraktionelle Produkt“ gemäß Webb berechnet.<sup>60</sup> Das Prinzip beruht hierbei auf dem Vergleich eines erwarteten mit dem tatsächlich eingetretenen Effekt und errechnet sich aus der Formel:  $F_p = E_1 \cdot 2 / (E_1 + E_2 - E_1 \cdot E_2)$ . Ein antagonistischer Effekt ist durch einen Wert  $< 1$ , ein additiver Effekt durch einen Wert  $= 1$  und ein synergistischer Effekt durch einen Wert  $> 1$  gekennzeichnet.<sup>60</sup> Bei den Western Blot Daten wurden repräsentative Membranen gezeigt. Mindestens ein Wiederholungsversuch zeigte ähnliche Banden. Aus den Überlebenszeiten der Mäuse innerhalb der verschiedenen Gruppen der tierexperimentellen Versuche mit *Viscum album* L.- Extrakten wurden Kaplan Meier Kurven generiert. Die Signifikanzen in Bezug auf die Überlebenszeit zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe wurden mit dem Student's t-Test berechnet. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Präklinische Evaluation von *Helleborus niger* Extrakt in vitro und ex vivo (Publikation 1)

#### 4.1.1 Ausschluss eines unspezifischen Zelltodes und Inhibition der Zellproliferation

Die in vitro- Experimente wurden an den Zelllinien BJAB, NALM-6, SUP-B15, REH und JURKAT durchgeführt. Anhand der Messung der LDH- Freisetzung nach 4 h konnte eine unspezifisch toxische Wirkung und somit der Zelltod via Nekrose ausgeschlossen werden. Eine Behandlung mit *Helleborus niger* Extrakt führte nicht zu einer hohen LDH- Freisetzung und die Viabilität der Zellen lag nach 4 h in allen verwendeten Konzentrationen über 87 % (Fig. 1A).

Nach 24 h zeigte sich in der Proliferationsmessung eine dosisabhängige Proliferationsinhibition (Fig. 1B).

#### **4.1.2 Apoptoseinduktion**

Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung anhand der Annexin-V/PI- Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass es nach 48- stündiger Behandlung mit *Helleborus niger* Extrakt zu einer Differenzierung in früh- und spätapoptotische Zellen kommt. Die Apoptoseinduktion ist dosisabhängig. Eine signifikante Nekrose wurde auch in diesen Versuchen nicht beobachtet (Fig. 2A). In der modifizierten Zellzyklusanalyse nach 72 h konnten die für die Apoptose spezifischen hypodiploiden DNA- Fragmente nachgewiesen werden (Fig. 2B). Die Ergebnisse konnten in der Zwischenzeit anhand von Versuchen mit zwei weiteren Gesamtextrakten aus *Helleborus niger* wiederholt und bestätigt werden.<sup>46</sup>

#### **4.1.3 Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges**

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit *Helleborus niger* Extrakt zu einer signifikanten Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials führt (Fig. 4A). Antimitochondriale Effekte sind somit bedeutsam bei der durch *Helleborus niger* vermittelten Apoptose. Im Verlauf kommt es zu einer Prozessierung der Haupteffektorcaspase-3 in deren aktive Untereinheit bei 17 kDa, welche per Western Blot nachgewiesen werden konnte (Fig. 3). In zusätzlichen Untersuchungen mit weiteren *Helleborus niger* Extrakten konnte in der Zwischenzeit ebenfalls eine Prozessierung der Procaspase-9 in ihre aktive Untereinheit bei 36 kDa mittels Western Blot Analytik detektiert werden,<sup>46</sup> was eine weitere Bestätigung für die Involvierung des intrinsischen Apoptoseweges bei dem durch *Helleborus niger* verursachten Zelltod ist.

Um eine Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von Bcl-2 zu untersuchen, wurden MelHO- Zellen stabil mit dem pIres Plasmid (MelHO/pIres) und mit der Bcl-2 cDNA in pIres (MelHO/Bcl-2) transfiziert. Eine starke Überexpression des Bcl-2 Proteins ist charakteristisch für MelHO/Bcl-2 Zellen, wohingegen MelHO/pIres Zellen nur moderate Bcl-2 Level aufweisen (Fig. 4B, Inlett). In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion durch *Helleborus niger* Extrakt durch hohe Bcl-2 Level zwar gemindert, aber nicht vollständig blockiert werden kann (Fig. 4B).

#### **4.1.4 Synergistische Effekt mit Vincristin**

In Kombinationsversuchen von *Helleborus niger* Extrakt mit anderen in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen eingesetzten zytostatischen Wirkstoffen (Cytarabin, Etoposid, Vincristin) konnte ein synergistischer Effekt mit dem Vinkaalkaloid Vincristin gefunden werden. Die Apoptoseinduktion nach 72 h war in der Kombination des *Helleborus niger* Extraktes mit

Vincristin, um ein Vielfaches höher als der allein additive Effekt der Einzelwirkstoffe (Fig. 5). Dieser Effekt konnte nach Berechnung des „Fraktionellen Produktes“ gemäß Webb<sup>60</sup> als synergistisch identifiziert werden (Fig. 5, Inlett).

#### **4.1.5 Apoptoseinduktion in primären Patientenzellen**

Um eine Apoptoseinduktion in primären Zellen zu untersuchen, wurden Zellen von 4 Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie, akuter myeloischer Leukämie und dem Rezidiv einer akuten myeloischen Leukämie mit dem *Helleborus niger* Extrakt inkubiert. Außerdem wurden die Zellen mit unterschiedlichen in der Behandlung dieser Erkrankung eingesetzten Zytostatika (Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Vincristin und Cytarabin) inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass das *Helleborus niger* Extrakt in allen primären Zellen Apoptose induziert (Fig. 6). Interessanterweise konnte eine Apoptoseinduktion auch in den Zellen gefunden werden, die nur mäßig auf die Behandlung mit den Anthrazyklinen Daunorubicin und Doxorubicin ansprachen (Fig. 6).

### **4.2 Molekulare Mechanismen der durch Mistelextrakte induzierten Apoptose in einem ALL- Modell in vitro und in vivo (Publikation 2)**

#### **4.2.1 In vitro- Ergebnisse**

Sämtliche in vitro- Versuche wurden an der Leukämiezelllinie NALM-6 durchgeführt. Im LDH-Assay zeigte sich nach 4 h sowohl in den mit MT-P als auch mit MT-A behandelten Zellen keine hohe LDH-Freisetzung, womit ein ungerichteter, nekrotischer Zelltod ausgeschlossen werden konnte (Fig. 1). In der Proliferationsmessung nach 24 h zeigte sich eine deutliche Proliferationsinhibition, die sowohl von MT-A als auch MT-P hervorgerufen wurde (Fig. 4). Die durchflusszytometrische Bestimmung der früh- und spätaoptotischen Fraktion von mit MT-A und MT-P behandelten NALM-6 Zellen konnte gemessen nach 48 h diese Ergebnisse bestätigen und weiter differenzieren (Fig. 3). Die Apoptoseinduktion wird hierbei durch antimitchondriale Effekte hervorgerufen, da es nach Inkubation von NALM-6 Zellen mit MT-A und MT-P zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt (Fig. 2). Als zusätzlicher Nachweis einer spezifischen Apoptoseinduktion wurde die DNA- Fragmentierung mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der hypodiploiden DNA- Fraktion nach 72 h quantifiziert. Nach Inkubation mit MT-A und MT-P zeigte sich hier ebenfalls ein dosisabhängiger Effekt (Fig. 5). In allen in vitro- Versuchen zeigte sich MT-P potenter bezogen auf die eingesetzte Menge Pflanzenextrakt, was mit dem höheren ML-III Gehalt von MT-P korrelieren würde.

#### 4.2.2 In vivo- Ergebnisse

Im ersten Schritt wurde die in vivo- Verträglichkeit von MT-A und MT-P in einem Mausmodell untersucht. Hierzu wurden SCID Mäuse (CB-17 SCID/SCID) mit intraperitonealen Gaben unterschiedlicher Dosis von MT-A und MT-P an vier konsekutiven Tagen für drei Wochen behandelt. Körpergewicht, Blutbildparameter und Veränderungen des Allgemeinzustands dienten als Maß für die Toxizität. Die Verträglichkeit von MT-A war für alle eingesetzten Dosen (1, 50, 100 mg/kg/KG) unproblematisch. Es kam zu keiner Veränderung der Kontrollparameter im Vergleich zur mit PBS behandelten Kontrollgruppe. Für MT-P zeigte sich eine höhere Toxizität. In den mit 50 und 100 mg/kg/KG behandelten Gruppen kam es zu einem leichten Abfall des Körpergewichts. Im nächsten Schritt wurde die in vivo- Effektivität vom MT-A und MT-P in einem ALL- Mausmodell evaluiert.  $10^6$  NALM-6 Zellen wurden jeweils 8 SCID Mäusen intravenös appliziert, um eine systemische Leukämie zu induzieren. MT-A (1, 50, 100 mg/kg/KG) und MT-P (1, 50 mg/kg/KG) wurden ab Tag 1 post transplantationem an 4 aufeinander folgenden Tagen für insgesamt 3 Wochen intraperitoneal appliziert. Die Negativkontrollgruppe (10 Mäuse) erhielt PBS, die Positivkontrolle 100 mg/kg/KG Cyclophosphamid als einmalige Gabe an Tag 3. Aus den Daten wurden Kaplan Meier Kurven generiert (Fig. 6A). Die mit PBS behandelte Gruppe lebte durchschnittlich 34 Tage und die mit Cyclophosphamid behandelte Gruppe 60 Tage bis zum Abschluss des Experimentes. MT-A 1 mg/kg/KG verlängerte die Überlebenszeit auf 46,0 ( $p < 0.05$ ), MT-A 50 mg/kg/KG auf 55,4 ( $p < 0.05$ ) und MT-A 100 mg/kg/KG auf 47,1 Tage ( $p < 0.05$ ). MT-P 1 mg/kg/KG verlängerte die Überlebenszeit auf 43,5 ( $p < 0.05$ ) und MT-P 50 mg/kg/KG auf 46,3 Tage ( $p < 0.05$ ) und zeigte keinen signifikanten Vorteil gegenüber MT-A (Fig. 6B). In zwei MT-A Gruppen (50, 100 mg/kg/KG) gab es insgesamt drei gesund überlebende Tiere am Ende des Experimentes an Tag 60. Diese Tiere zeigten bei der Autopsie keinen Hinweis auf eine Leukämie oder ein Lymphom.

### 4.3 Antiangiogenetische und antiproliferative Effekte eines Gold (I)- Phosphinkomplexes mit funktionellem Naphthalimid-Liganden (Publikation 3)

#### 4.3.1 Antiproliferative Effekte und Bioverteilung

Die antiproliferativen Effekte von **3** wurden auf HT-29 und MCF-7 Zellen untersucht. Als goldphosphinhaltige Referenzsubstanz wurde  $\text{Et}_3\text{PAuCl}$  verwendet. Die gewonnenen  $\text{IC}_{50}$  Werte waren für **3** in beiden Zelllinien niedriger als für  $\text{Et}_3\text{PAuCl}$ , wodurch die Substitution des Chlor in  $\text{Et}_3\text{PAuCl}$  durch den Naphthalimidliganden eine bessere biologische Wirksamkeit hervorzurufen scheint. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine blaue Emission von **3** vor allem in den Zellkernen und Zellorganellen (Fig. 3). Mittels der Atomabsorptionsspektrometrie konnte ein

wesentlich höherer Goldgehalt der Zellkerne von mit **3** behandelten HT-29 und MCF-7 Zellen im Vergleich zu Et<sub>3</sub>PAuCl behandelten Zellen nachgewiesen werden (Table 1). Somit ist der Naphthalimidligand in der Lage, hohe Mengen des Goldphosphin Restes in die Zellkerne zu transportieren, so dass die DNA als Zielstruktur für **3** gelten kann.

#### **4.3.2 Inhibition der Thioredoxinreduktase und Apoptoseinduktion**

Interaktionen mit der Thioredoxinreduktase (TrxR) gelten als vorwiegende Ursache für die antiproliferativen Effekte von Goldkomplexen.<sup>27</sup> Mit Hilfe des photometrischen DTNB- Assays konnte gezeigt werden, dass **3** die Aktivität dieses Enzyms bereits in niedrigen Dosierungen stark inhibiert. Die Interaktionen von Goldkomplexen mit der TrxR beruhen auf der Bindung an ihre Cystein- und Selenocysteinreste. Tandemmassenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass kovalente Bindungen an Cystein unter Verlust des Naphthalimidliganden für **3** eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Fig. 4). Die Inhibition der TrxR führt zur Apoptoseinduktion, welche mittels durchflusszytometrischer Versuche nachgewiesen werden konnte. Die Annexin-V/PI-Doppelfärbung zeigte nach 48 h eine Differenzierung in früh- und spätapoptotische Zellen (Fig. 5C) und in der modifizierten Zellzyklusanalyse konnten nach 72 h die für die Apoptose spezifischen, hypodiploiden DNA- Fragmente nachgewiesen werden (Fig. 5B). Anhand des JC-1 Testes konnte belegt werden, dass die Behandlung mit **3** zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt (Fig. 5D). Antimitochondriale Effekte scheinen somit hauptverantwortlich für die durch **3** hervorgerufene Apoptoseinduktion zu sein.

#### **4.3.3 Hemmung der Angiogenese in einem Zebrafischmodell**

Die Thioredoxinreduktase ist nicht nur für antiapoptotische Effekte von Tumorzellen verantwortlich, sondern führt auch zur Stimulierung der Angiogenese.<sup>61</sup> Aufgrund der Inhibition der TrxR durch **3**, wurden mögliche antiangiogene Effekte in einem etablierten Zebrafischmodell untersucht. In den Versuchen konnte ein deutlicher antiangiogener Effekt nachgewiesen werden (Fig. 7, Table 2). Da die Angiogenese jedoch nicht durch die Referenzsubstanz Et<sub>3</sub>PAuCl gehemmt wird, welche ebenfalls die TrxR inhibiert, scheinen die antiangiogenen Effekte von **3** durch den funktionellen Naphthalimidliganden hervorgerufen zu werden.

## **5 Diskussion**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Entwicklungsschritte auf dem Weg zu einem potentiell neuen Wirkstoff für die Behandlung onkologischer Erkrankungen dargestellt. Der erste Schritt beinhaltet die Suche nach neuen Wirkstoffen oder Substanzen, die für weitere Investigationen interessante Eigenschaften aufweisen. Ein großes Forschungsfeld bieten hierbei pflanzliche

Extrakte. Dieser erste Evaluierungsschritt wurde anhand der Experimente mit Extrakten aus *Helleborus niger* dargestellt. Hier konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Inkubation mit diesen zu einer Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorzelllinien und primären Zellen von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen führt. Die Apoptose erfolgt über den intrinsischen Apoptoseweg und kann auch durch Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins nicht vollständig gehemmt werden. Des Weiteren konnte ein synergistischer Effekt von *Helleborus niger* in Kombination mit dem Vinkaalkaloid Vincristin gefunden werden. Synergistische Effekte einer Wirkstoffkombination sind für die Behandlung maligner Erkrankungen ein bedeutender Effekt, da somit die Dosis der Einzelkomponenten reduziert und potentielle systemische Nebenwirkungen verringert werden können. Diese Ergebnisse bilden einen sehr interessanten Ansatzpunkt für die weitere Untersuchung der *Helleborus niger* Extrakte. Zu den bisher aus *Helleborus niger* isolierten Bestandteilen gehören Saponine, Flavonoide und Bufadienolide.<sup>6,62,63</sup> Zu den Saponinen zählen das herzoglykosidartige Helleborin und Macranthosid I, zu den Flavonoiden Kämpferol-3-sambubiosyl-7-glucosid, Kämpferol-3,7-diglucosid und Kämpferol-3-sophorosid und zu den Bufadienoliden Hellebrigenin, Deglucohellebrin und Telocinobufagin. Als weitere Substanzen sind das Lacton Protoanemonin<sup>5</sup>, Aconitsäure und Corytuberin zu finden.<sup>2</sup> Des Weiteren enthält *Helleborus niger* das Steroidhormon  $\beta$ -Ecdyson<sup>4</sup>, welches im Insektenreich als Wachstums- und Differenzierungshormon durch gezielte Apoptoseinduktion für die Larvenreife und Häutung verantwortlich ist.<sup>64</sup> In humanen T-Lymphozyten aktiviert  $\beta$ -Ecdyson die CD2-Präsentation und weist immunmodulatorische Wirkungen auf.<sup>65</sup> Ob die apoptotische Wirkung von *Helleborus niger* auf dem Vorhandensein dieses Steroidhormons beruht oder durch weitere Extraktbestandteile hervorgerufen wird, ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

Der zweite Schritt in der Evaluierung eines Pflanzenextraktes bildet die Suche nach den für die Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoffen. Dies konnte anhand der Untersuchungen zu Extrakten aus *Viscum album* L. verdeutlicht werden. In der veröffentlichten Arbeit konnten wir erstmalig zeigen, dass die verwendeten Extrakte aus *Viscum album* L. eine ausgeprägte in vitro- und in vivo- Wirksamkeit in einem ALL- Zellmodell haben. Eine der Leitsubstanzen der verwendeten Extrakte ist das Mistellektin III, neben ML-I, ML-II und dem chitinbindenden Lektin, eines der vier bekannten Lektine der Mistel. In den in vitro- Untersuchungen an NALM-6 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Apoptose- induzierende Wirksamkeit mit dem ML-III Gehalt der Extrakte korreliert und wahrscheinlich auf diesen zurückzuführen ist. Das ML-III reiche MT-P war in Bezug auf die eingesetzte Menge Pflanzenextrakt potenter als MT-A. Interessanterweise konnte sich die Überlegenheit des ML-III reichen Extraktes nicht in den in vivo- Untersuchungen bestätigen. MT-P zeigte eine höhere Toxizität und verminderte Verträglichkeit im Vergleich zu MT-A, was mit dem ungefähr 4- fach höheren ML-III Gehalt des MT-P korreliert. Die

antileukämische in vivo- Wirksamkeit von MT-A war jedoch trotz des niedrigeren ML-III Gehalts äquivalent - wenn nicht besser - zu der des MT-P. Die Erklärung hierfür ist noch offen. Es scheint jedoch somit sicher, dass der antileukämische Effekt der verwendeten Mistelextrakte nicht allein auf ihren absoluten ML-III Gehalt zurückzuführen ist. Vielmehr scheinen weitere, bisher unbekannte, wirtsspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Extrakte eine Rolle zu spielen. Eine Erklärung könnten systemische immunologische Effekte sein. Unterschiedliche in vitro- Studien konnten immunmodulatorische Aktivitäten von Mistelextrakten belegen. Diese werden u.a. durch eine Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-12 und TNF- $\alpha$  und einer erhöhten NK-Zellaktivität vermittelt.<sup>66-68</sup> Diese Effekte scheinen jedoch nicht ausschließlich durch die Mistellektine hervorgerufen zu werden.<sup>13,69</sup> In unseren Versuchen muss jedoch die direkt Apoptose- induzierende Wirkung der Mistellektine als bedeutsamer im Vergleich zu potentiellen immunmodulatorischen Effekten gewertet werden.

Anhand dieser beiden Veröffentlichungen konnte das Problem und / oder das Potential in der Evaluation von Pflanzenextrakten verdeutlicht werden. In Pflanzenextrakten liegen heterogene Inhaltsstoffe vor, die in Abhängigkeit von lokalen Witterungs- und Wachstumsbedingungen, dem Erntezeitpunkt oder - im Falle der Mistel - vom Wirtsbaum stark variieren können. Eine exakte biochemische und chemische Analyse der Extrakte ist somit von großer Bedeutung, um die für die Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoffe zu identifizieren. Häufig kann jedoch auch wie am Beispiel von *Viscum album* L. gezeigt, nicht ein einzelner Inhaltstoff für die zytotoxische Wirkung verantwortlich gemacht werden. Vielmehr ist es scheinbar das komplexe Zusammenspiel der heterogenen Inhaltsstoffe eines Extraktes, welches für die Wirksamkeit verantwortlich ist bzw. diese potenziert.

Ein weiteres Forschungsfeld für die Suche und Evaluierung neuer medikamentöser Behandlungsoptionen onkologischer Erkrankungen bildet die chemische Weiterentwicklung bekannter Wirkstoffe. In der dritten veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, wie die zytotoxische Potenz von Gold(I)-Phosphinverbindungen durch die Kopplung mit einem funktionellen Liganden verbessert werden kann. Der neu synthetisierte Gold(I)-Phosphinkomplex mit Naphthalimidliganden weist sowohl antiproliferative als auch antiangiogene Eigenschaften auf und verursacht eine Apoptoseinduktion durch antimitochondriale Effekte. Weitere Experimente zeigten eine effiziente Aufnahme in spezifische Zellkompartimente und den Zellkern. In vergleichenden Untersuchungen zeigte sich, dass vor allem der Naphthalimidligand für den Transport in den Zellkern verantwortlich zu sein scheint und zu einer wesentlich höheren Goldakkumulation im Zellkern führt. Die antiangiogenen Effekte scheinen ebenfalls durch den Naphthalimidliganden hervorgerufen zu werden. Die Effekte von **3** beruhen somit auf Interaktionen mit unterschiedlichen Zielstrukturen, nukleärer DNA und mitochondrialer Thioredoxinreduktase, und es ergibt sich ein komplexes, pharmakologisches Profil der

untersuchten Substanz. Der exakte Mechanismus und die Ursache des antiangiogenen Effektes von **3** müssen in weiteren Untersuchungen genauer evaluiert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Naphthalimidstruktur ein viel versprechender Ligand für die Gewinnung neuer Komplexe mit erhöhter zytotoxischer Effektivität ist.

In kommenden Projekten werden die in dieser Arbeit geprüften Extrakte und Wirkstoffe weitergehenden Untersuchungen unterzogen. In einem Kooperationsprojekt werden derzeit die *Helleborus niger* Extrakte mittels HPLC und Gaschromatographie aufgetrennt, um exakte Daten über deren Inhaltsstoffe zu erhalten. Gelingt es interessante Stoffe zu identifizieren und zu extrahieren, werden diese im Anschluss auf ihre Apoptose-induzierende Wirksamkeit evaluiert. Des Weiteren sind Tierversuche mit den *Helleborus niger* Extrakten in Planung. Neben den Mistellektinen bilden Triterpene eine weitere wichtige Inhaltsstoffgruppe der Mistelextrakte.<sup>70</sup> Derzeit wird die Rolle dieser Gruppe an der zytotoxischen Wirkung von Mistelextrakten in einem Kooperationsprojekt genauer evaluiert. In kommenden Untersuchungen zum Gold(I)-Phosphinkomplex wird es um die Identifizierung der exakten Zielstrukturen des Komplexes und die Gewinnung erster in vivo-Daten in einem Mausmodell gehen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Thatte U, Bagadey S, Dahanukar S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2000;46:199-214.
2. Hagers. *Helleborus*. *Handbuch der pharmazeutischen Praxis*. 1993;5:419-422.
3. Werner K. Life history of the genus *Helleborus* L. *Flora*. 1994;189:97-130.
4. Kissmer B, Wichtl M. Ecdysone from roots and seeds of *Helleborus* species. *Arch Pharm (Weinheim)*. 1987;320:541-546.
5. Bonora A, Dall'olio G, Bruni A. Separation and quantitation of protoanemonin in ranunculaceae by normal- and reversed-phase HPLC. *Planta Med*. 1985;51:364-367.
6. Linde. Über die Konstitution eines neuen Saponins aus *Helleborus odoratus* Waldst. et Kit. und *Helleborus niger* L. *Helvetica Chimica Acta*. 1971;54:1701-1708.
7. Mansky PJ. Mistletoe and cancer: controversies and perspectives. *Semin Oncol*. 2002;29:589-594.
8. Kienle GS, Berrino F, Bussing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H. Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res*. 2003;8:109-119.
9. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008:CD003297.
10. Melzer J, Iten F, Hostanska K, Saller R. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed*. 2009;16:217-226.
11. Bussing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res*. 1999;19:23-28.
12. Bussing A, Suzart K, Schweizer K. Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anticancer Drugs*. 1997;8 Suppl 1:S9-14.
13. Stein GM, Edlund U, Pfuller U, Bussing A, Schietzel M. Influence of polysaccharides from *Viscum album* L. on human lymphocytes, monocytes and granulocytes in vitro. *Anticancer Res*. 1999;19:3907-3914.
14. Klein R, Classen K, Fischer S, et al. Induction of antibodies to viscotoxins A1, A2, A3, and B in tumour patients during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res*. 2002;7:359-367.
15. Stein GM, Schaller G, Pfuller U, Schietzel M, Bussing A. Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Res*. 1999;19:1037-1042.
16. Bussing A, Suzart K, Bergmann J, Pfuller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett*. 1996;99:59-72.
17. Franz H. Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology*. 1986;43 Suppl 1:23-34.
18. Endo Y, Tsurugi K, Franz H. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett*. 1988;231:378-380.
19. Franz H, Kindt A, Ziska P, Bielka H, Benndorf R, Venker L. The toxic A-chain of mistletoe lectin I: isolation and its effect on cell-free protein synthesis. *Acta Biol Med Ger*. 1982;41:K9-K16.
20. Ye W, Nanga RP, Kang CB, Song JH, Song SK, Yoon HS. Molecular characterization of the recombinant A-chain of a type II ribosome-inactivating protein (RIP) from *Viscum album coloratum* and structural basis on its ribosome-inactivating activity and the sugar-binding properties of the B-chain. *J Biochem Mol Biol*. 2006;39:560-570.
21. Kim MS, So HS, Lee KM, et al. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol*. 2000;34:349-355.
22. Dietrich JB, Ribereau-Gayon G, Jung ML, Franz H, Beck JP, Anton R. Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anticancer Drugs*. 1992;3:507-511.
23. Wacker R, Stoeva S, Betzel C, Voelter W. Complete structure determination of N-acetyl-D-galactosamine-binding mistletoe lectin-3 from *Viscum album* L. album. *J Pept Sci*. 2005;11:289-302.
24. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;146:1-54.
25. Heffeter P, Jungwirth U, Jakupec M, et al. Resistance against novel anticancer metal compounds: differences and similarities. *Drug Resist Updat*. 2008;11:1-16.
26. Ott I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*. 2009;1670-1681.
27. Gromer S, Arscott LD, Williams CH, Jr., Schirmer RH, Becker K. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem*. 1998;273:20096-20101.

28. Brana MF, Ramos A. Naphthalimides as anti-cancer agents: synthesis and biological activity. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2001;1:237-255.
29. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326 ( Pt 1):1-16.
30. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27:6194-6206.
31. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:7320-7326.
32. Daniel PT. Molekulare Grundlagen der Apoptose. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 2008:160-203.
33. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia*. 2000;14:2035-2044.
34. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:255-260.
35. Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:1297-1300.
36. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 1999;144:281-292.
37. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:63-67.
38. Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*. 2002;22:47-58.
39. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 2000;103:839-842.
40. Adams JM, Huang DC, Puthalakath H, et al. Control of apoptosis in hematopoietic cells by the Bcl-2 family of proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:351-358.
41. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:488-496.
42. Campana D, Coustan-Smith E, Manabe A. Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein. *Blood*. 1993;81:1025-1031.
43. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol Lett*. 1995;82-83:155-158.
44. Reed JC, Kitada S, Takayama S, Miyashita T. Regulation of chemoresistance by the bcl-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Ann Oncol*. 1994;5 Suppl 1:61-65.
45. Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2003;4:211-218.
46. Jesse P. Präklinische Evaluation von *Helleborus niger* in Zellkulturversuchen. *Der Merkurstab*. 2009;4:308-314.
47. Wieder T, Essmann F, Prokop A, et al. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*. 2001;97:1378-1387.
48. Prokop A, Wrasidlo W, Lode H, et al. Induction of apoptosis by enediyne antibiotic calicheamicin II proceeds through a caspase-mediated mitochondrial amplification loop in an entirely Bax-dependent manner. *Oncogene*. 2003;22:9107-9120.
49. Voisard R, Dartsch PC, Seitzer U, Roth D, Kochs M, Hombach V. Cell culture as a prescreening system for drug prevention of restenosis?. *Vasa Suppl*. 1991;33:140-141.
50. Dobroschke M, Geldmacher Y, Ott I, et al. Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction. *ChemMedChem*. 2009;4:177-187.
51. Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ*. 2001;8:551-563.
52. Fadok VA, Xue D, Henson P. If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. *Cell Death Differ*. 2001;8:582-587.
53. Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*. 1996;24:123-130.
54. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84:1415-1420.
55. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1:1458-1461.
56. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139:271-279.
57. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol*. 1995;260:406-417.

58. Smith PK, Krohn RI, G.T H. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
59. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1977;252:1102-1106.
60. Webb. Effects of more than one inhibitor. *Enzymes and Metabolic Inhibitors.* 1963;1:66–79, 487-512.
61. Streicher KL, Sylte MJ, Johnson SE, Sordillo LM. Thioredoxin reductase regulates angiogenesis by increasing endothelial cell-derived vascular endothelial growth factor. *Nutr Cancer.* 2004;50:221-231.
62. Bussing A, Schweizer K. Effects of a phytopreparation from *Helleborus niger* on immunocompetent cells in vitro. *J Ethnopharmacol.* 1998;59:139-146.
63. Tarkowski P, Tarkowska D, Novak O, et al. Cytokinins in the perianth, carpels, and developing fruit of *Helleborus niger* L. *J Exp Bot.* 2006;57:2237-2247.
64. Yin VP, Thummel CS. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16:237-243.
65. Trenin DS, Volodin VV. 20-hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: In vitro evaluation. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1999;41:156-161.
66. Heinzerling L, von Baehr V, Liebenthal C, von Baehr R, Volk HD. Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes in vitro, ex vivo, and in vivo. *J Clin Immunol.* 2006;26:347-359.
67. Van Huyen JP, Delignat S, Bayry J, et al. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Lett.* 2006;243:32-37.
68. Schink M. Mistletoe therapy for human cancer: the role of the natural killer cells. *Anticancer Drugs.* 1997;8 Suppl 1:S47-51.
69. Fischer S, Kabelitz D, Musielski H, Scheer R, Scheffler A. Synergism between lectins and vesicles of *Viscum album* L.- detection by biochemical and immunological methods. *J Herb Pharmacother.* 2002;2:7-22.
70. Jager S, Winkler K, Pfuller U, Scheffler A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Med.* 2007;73:157-162.

## 7 Anteilserklärung

Patrick Jesse hatte folgenden Anteil an den verwendeten Publikationen:

Publikation 1: Jesse P, Mottke G, Eberle J, Seifert G, Henze G, Prokop A. Apoptosis-inducing activity of Helleborus niger in ALL and AML. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Apr;52(4):464-9.

90 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Idee, Beschaffung der Extrakte, Einwerbung von Drittmitteln, Literaturrecherche, Planung und Durchführung der Versuche, Verfassung und Einreichung des Manuskripts.

Publikation 2: Seifert G, **Jesse P**, Laengler A, Reindl T, Lüth M, Lobitz S, Henze G, Prokop A, Lode HN. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett*. 2008 Jun 18;264(2):218-28.

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der in vitro- Versuche, Literaturrecherche, Mitarbeit am Manuskript.

Publikation 3: Ott I, Qian X, Xu Y, Vlecken DH, Marques IJ, Kubutat D, Will J, Sheldrick WS, **Jesse P**, Prokop A, Bagowski CP. A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. *J Med Chem*. 2009 Feb 12;52(3):763-70.

15 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Apoptosemessungen in vitro, Mitarbeit am Manuskript.

Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze  
Berlin, den 27.11.2009

Patrick Jesse  
Berlin, den 08.03.2010

## 8 Verwendete Publikationen

### Publikation 1:

**Jesse P**, Mottke G, Eberle J, Seifert G, Henze G, Prokop A.  
Apoptosis-inducing activity of Helleborus niger in ALL and AML.  
Pediatr Blood Cancer. 2009 Apr;52(4):464-9. – Impact Faktor: 2,394

### Publikation 2:

Seifert G, **Jesse P**, Laengler A, Reindl T, Lüth M, Lobitz S, Henze G, Prokop A, Lode HN.  
Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro.  
Cancer Lett. 2008 Jun 18;264(2):218-28. – Impact Faktor: 3,504

### Publikation 3:

Ott I, Qian X, Xu Y, Vlecken DH, Marques IJ, Kubutat D, Will J, Sheldrick WS, **Jesse P**, Prokop A, Bagowski CP.  
A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor.  
J Med Chem. 2009 Feb 12;52(3):763-70. – Impact Faktor: 4,898

## **9 Lebenslauf**

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

## 10 Komplette Publikationsliste

- 2006 *Enantioselective Synthesis of Ferrocenyl Nucleoside Analogues with Apoptosis-Inducing Activity*; Philippe James, Jörg Neudörfl, Moritz Eissmann, **Patrick Jesse**, Aram Prokop, Hans-Günther Schmalz; Org Lett. 2006 Jun 22;8(13):2763-6
- Effective Induction of Apoptosis by Mistletoe Plant Extracts in An Acute Lymphoblastic Leukemia Model*; Georg Seifert, **Patrick Jesse**, Aram Prokop, Tobias Reindl, Stephan Lobitz, Alfred Laengler, Holger N. Lode, Guenter Henze; Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2006; 108(11):533; Posterpräsentation
- Ferrocenyl Nucleoside Analogs, a New Class of Cytostatic Drugs, Overcome Multiple Drug Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Ex Vivo*; Aram Prokop, Moritz Eissmann, **Patrick Jesse**, Guenter Henze, Philippe James, Joerg Neudörfl, Hans-Günther Schmalz; Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2006; 108(11):179
- Effective Induction of Apoptosis by Mistletoe Plant Extracts (MTE) in Acute Lymphoblastic Leukemia in Vivo and in Vitro*; Georg Seifert, **Patrick Jesse**, Aram Prokop, Alfred Laengler, Tobias Reindl, Stephan Lobitz, Holger N. Lode, Guenter Henze; Vortrag SIO 3rd International Conference, Boston, U.S.A
- 2007 *Apoptosis Induced by Extracts of Helleborus Niger in Different Lymphoma and Leukemia Cell Lines and Primary Lymphoblasts of Children with ALL Is Independent of Smac-Overexpression and Executed via the Mitochondrial Pathway*; **Patrick Jesse**, Gritt Mottke, Georg Seifert, Guenter Henze, Aram Prokop; Vortrag SIO 4th International Conference, San Francisco, U.S.A
- 2008 *Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro*; Georg Seifert, **Patrick Jesse**, Alfred Laengler, Tobias Reindl, Maria Lüth, Guenter Henze, Aram Prokop, Holger Lode; Cancer Lett. 2008 Jun 18;264(2):218-28
- A Synthetic Analogue of the Indigo Jeans Dye Tryptanthrin, NTI, Induces Apoptosis in Vitro, Ex Vivo and in Vivo in CD95-Dependent Manner in Pediatric Leukemia and Lymphoma Cells Sensitizing Malignant Cells to Cytostatic Drugs Via Downregulation of XIAP*; **Patrick Jesse**, Herbert Riepl, Thomas Wieder, Guenter Henze and Aram Prokop; Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2008; 112(11):910, Posterpräsentation
- 2009 *A luminescent gold (I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand as TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor*; Ingo Ott, Xuhong Qian, Yufang Xu, Dominik Kubat, Joanna Will, **Patrick Jesse**, Aram Prokop, Christoph Bagowski, William S. Sheldrick; J Med Chem. 2009 Feb 12;52(3):763-70
- Apoptosis-Inducing Activity of Helleborus Niger in ALL and AML*; **Patrick Jesse**, Gritt Mottke, Jürgen Eberle, Georg Seifert, Guenter Henze, Aram Prokop; Pediatr Blood Cancer. 2009 Apr;52(4):464-9.
- Präklinische Evaluation von Helleborus niger in Zellkulturversuchen*; **Patrick Jesse**; Der Merkurstab, Themenschwerpunkt Onkologie, 2009 Aug;(4):308-314

## **11 Selbstständigkeitserklärung**

„Ich, Patrick Jesse, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Präklinische Evaluation pflanzlicher Extrakte aus *Helleborus niger* und *Viscum album* L. sowie eines Gold(I)-Phosphinkomplexes mit funktionellem Naphthalimidliganden bezüglich ihrer Apoptose-induzierenden Wirksamkeit und den dabei zugrunde liegenden Mechanismen in vitro, ex vivo und in vivo“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 08.03.2010

Patrick Jesse

## 12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Günter Henze für die Betreuung dieser Arbeit und seinen inspirativen Einfluss im klinischen und forschenden Arbeitsleben. Sein liebevoller und respektvoller Umgang mit den kleinen Patienten und seine akribische Arbeitsweise mit der Liebe zum Detail werden mich zeitlebens beispielhaft begleiten. Meinen außerordentlichen Dank möchte ich meinem langjährigen Arbeitsgruppenleiter Dr. med. Dr. rer. nat. Aram Prokop aussprechen, der mich in die Thematik und Methodik eingeführt und in all den Jahren stets tief begeistert, ermuntert, inspiriert und im frohen Sinn manchmal fast zur Verzweiflung gebracht hat. Ohne ihn und seine kontinuierlich positive Einstellung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Bei meinem Arbeitsgruppenkollegen möchte ich mich ebenfalls außerordentlich bedanken. Mara, Gritt, Corazon, Moritz, Lisa, Benni, Soo, Susanne, Birgit, Ulli, Liliane, Laura und Anja, ihr habt mir die ein oder andere Arbeitsstunde verschönert und erheitert. Für die liebevolle Stimmung in der Arbeitsgruppe gilt euch ein herzlicher Dank.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Angehörigen danke ich für die stets fürsorgliche Unterstützung in allen Lebenssituationen und all die ermutigenden Ratschläge und Wünsche, sowie ihre Geduld auf diesem langen Weg. Ihr wart mir stets eine treue Begleitung.

Der schönste und bedeutendste Begleiter auf diesem Weg war jedoch die Liebe, die mich in der gesamten Zeit umhüllt und getragen hat. Ihr zu danken ist nicht möglich. Sie ist ein unbeschreibliches Geschenk, welches ich für immer unvergessen in meinem Herzen tragen und bewahren werde. Möge sie noch lange anhalten. In Liebe.