

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

DISSERTATION

**Neuartige metallhaltige Verbindungen als potentielle Zytostatika,
insbesondere für die Behandlung der therapieresistenten
akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter
am Beispiel eines Titanocenes**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Kater
aus Berlin

Datum der Promotion:

05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
1.1	Abstract.....	4
1.2	Abkürzungsverzeichnis	6
1.3	Einleitung.....	8
1.3.1	Apoptose	8
1.3.2	Regulation der Apoptose und Entstehung von Zytostatikaresistenzen	10
1.3.3	Übergangsmetallkomplexe in der Therapie onkologischer Erkrankungen	10
1.3.4	TitanocenY.....	11
1.3.5	Zielstellung	12
1.4	Materialien und Methoden.....	12
1.4.1	Materialien	12
1.4.1.1	Geräte.....	12
1.4.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	12
1.4.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	13
1.4.1.4	Zytostatika.....	13
1.4.1.5	Zelllinien.....	14
1.4.2	Methoden	15
1.4.2.1	Kultivierung der Zelllinien	15
1.4.2.2	Herstellung von medikamentenresistenten Zelllinien	15
1.4.2.3	Zellzahlbestimmung	16
1.4.2.4	Messung der DNS-Fragmentierung.....	16
1.4.2.5	Genexpressionsanalyse	17
1.4.2.6	Auswertung der Daten und statistische Analyse.....	17
1.4.2.7	Weitere Methoden (Publikationen 2 und 3).....	18
1.5	Ergebnisse.....	19
1.5.1	TitanocenY hemmt die Proliferation von malignen Zellen.....	19
1.5.2	TitanocenY induziert Apoptose <i>in vitro</i>	19
1.5.3	TitanocenY induziert Apoptose über den extrinsischen Signalweg	20
1.5.4	TitanocenY führt zu einer Hochregulation des FAS Liganden	20
1.5.5	TitanocenY induziert Apoptose unabhängig von der Expression der regulatorischen Proteine SMAC und Bcl-2	20
1.5.6	TitanocenY überwindet Resistenz gegen Vincristin	21

1.5.7	TitanocenY zeigt synergistische Effekte mit Vincristin.....	21
1.5.8	Weitere Ergebnisse (Publikationen 2 und 3)	21
1.6	Diskussion	23
1.7	Literaturverzeichnis.....	27
1.8	Abbildungen	32
2	Eidesstattliche Versicherung	36
3	Anteilerklärung	37
4	Verwendete Publikationen	38
5	Lebenslauf	39
6	Komplette Publikationsliste	41
6.1	Publikationen	41
6.2	Posterpräsentationen.....	41
7	Danksagung	43

1 Zusammenfassung

1.1 Abstract

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters. Dank der Entwicklung hochwirksamer Chemotherapeutika in den letzten Jahrzehnten, welche in variablen Kombinationstherapien zum Einsatz kommen, können heutzutage über 80 % der Patienten langfristig geheilt werden. Dennoch erleiden bis zu 20% der betroffenen Kinder im Laufe der Behandlung ein Rezidiv, welches häufig wesentlich schlechter auf die medikamentöse Behandlung anspricht und mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergeht. Da das Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung und somit der Therapieerfolg maßgeblich durch die Entwicklung von zellulären Zytostatikaresistenzen limitiert wird, besteht ein dringender Bedarf an neuartigen Chemotherapeutika, welche in der Lage sind, solche Resistenzen zu überwinden.

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige Metallkomplexe hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität, ihrer biologischen Wirkungsweise und insbesondere der Fähigkeit, Resistenzen gegenüber herkömmlichen Zytostatika zu überwinden, untersucht: Das TitanocenY, der Eisen-Komplex HUNI 068, sowie verschiedene Rhodium(III) und Iridium(III) Polypyridylkomplexe. Der Schwerpunkt der Dissertation liegt auf der Untersuchung der biologischen Aktivität des Titan-Metallkomplexes TitanocenY (TiY).

Die Behandlung mit TitanocenY führt in etablierten Tumorzelllinien von Leukämie-, Lymphom- und Melanomzellen zu einer Inhibition der Zellproliferation und induziert konzentrationsabhängig im mikromolaren Bereich Apoptose, die in Lymphomzellen partiell vom Todesrezeptor CD95 abhängig ist. Mittels real-time PCR (polymerase chain reaction) konnte eine signifikante Hochregulierung von Fas Ligand in den behandelten Zellen festgestellt werden. TitanocenY induziert Apoptose unabhängig von der Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 gene) und pro-apoptotischem SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) und wirkt effektiv auf P-Glycoprotein überexprimierenden multidrug-resistenten Zellen. In Kombination mit Vincristin konnten synergistische Effekte beobachtet werden.

Insgesamt scheint TitanocenY ein vielversprechender Wirkstoff für die Therapie maligner Tumorerkrankungen zu sein, insbesondere für die Behandlung von Tumoren, welche aufgrund von zellulären Resistenzmechanismen therapierefraktär sind. Hinsichtlich der beobachteten Synergie mit dem vielfach verwendeten Zytostatikum Vincristin könnte sich TitanocenY zudem als Komponente einer Polychemotherapie eignen.

Despite the advantages in the outcome of patients with acute lymphoblastic leukemia, about 20% of the affected children suffer relapses. The response to chemotherapy is essentially determined by cellular drug resistance. To increase the cure rate of relapsed malignancy, drugs that are capable to overcome cell resistance to antineoplastic drugs are urgently needed. The purpose of the present study was to investigate the ability of TitanoceneY, the iron complex HUNI 068 and different Rhodium(III) and Iridium(III) complexes to overcome resistance against conventional anti-cancer drugs and to identify the main mechanisms of action. Focus of this work is the cytotoxic activity of TitanoceneY.

Treatment with TitanoceneY leads to an inhibition of tumour cell proliferation and induces apoptosis in various established cell lines. The extrinsic pathway appears to be responsible, at least in part, for TitanoceneY-induced cell death: TitanoceneY-mediated apoptosis is partly inhibited in Fas-associated Death Domain protein- dominant negative (FADD-dn) BJAB cells (lymphoma-cells), and via real-time PCR we found a significant up-regulation of Fas ligand during TitanoceneY-induced cell death.

TitanoceneY induces apoptosis regardless of whether the malignant cells are expressing elevated levels of anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 gene (Bcl-2) and pro-apoptotic second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC) and is also effective on cells that are multidrug resistant due to overexpression of P-glycoprotein (P-gp).

In combination with vincristine, impressive synergistic effects could be observed, exposing TitanoceneY as a possible component for polychemotherapy.

Therefore, TitanoceneY turns out to be a promising candidate for anti-tumour therapy, especially for the treatment of multidrug resistant malignancies.

1.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC- Transporter	ATP Binding Cassette- Transporter
AC50	Apoptosis-inducing- Concentration of 50% cells
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Annexin-V-FITC	Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma- 2 gene
BSA	Bovines Serum Albumin
CD95	Cluster of Differentiation 95
Caspase	Cysteinylasspartase
DISC	Death- Inducing Signaling Complex
DNAse	Desoxyribonukleinase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme- Linked- Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescent- Activated Cell Sorting
FADD	Fas Associated Death Domain
FADD-dn	Fas-associated Death Domain dominant negative
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Flu	Fludarabin
FP	Fraktionelles Produkt
g	Gramm
h	Stunde
HRP	Horseradish Peroxidase
IGC50	Inhibition-of-Growth-Concentration of 50% cells
IL	Interleukin

JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyaniniodid
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli
μ	Mikro
MDR	Multi- Drug- Resistance
NK	Natural Killer
n.s.	Nicht signifikant
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P-gp	P-Glycoprotein
PI	Propidiumiodid
RNAse	Ribonukleinase
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standart Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
Taxol	Paclitaxel
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TiY	TitanocenY
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ver	Vincristin
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential

1.3 Einleitung

In den vergangenen 50 Jahren haben Fortschritte in der Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), der häufigsten malignen Erkrankung im Kindesalter, zu Langzeitüberlebensraten von über 80% geführt. Dennoch erleiden bis zu 20% der betroffenen Kinder im Laufe der Therapie ein Rezidiv, welches u.a. aufgrund der Entwicklung von zellulären Zytostatikaresistenzen mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergeht.^{1,2}

Daher besteht ein Bedarf an neuartigen zytostatischen Substanzen, welche gut verträglich sind und die Fähigkeit besitzen, Resistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika zu überwinden. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit das Benzylsubstituierte Titanocen Bis-[(p-methoxybenzyl)cyclopentadienyl] titanium(IV) dichlorid (TitanocenY), das Ferrocen HUNI 068 (C₃₄H₃₃FeNO₆) sowie verschiedene Rhodium(III) und Iridium(III) Polypyridyl Komplexe untersucht. Der Schwerpunkt der Dissertation liegt auf Wirksamkeit und Wirkweise von TitanocenY.

1.3.1 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde erstmals im Jahre 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben.³ Es handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltods, die mit charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen einhergeht und gewährleistet, dass eine Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht.

Apoptose spielt eine bedeutsame Rolle in einer Vielzahl biologischer Systeme. Sie ist u.a. essentiell für die Gestaltgebung der Gewebe während der Embryonalentwicklung, für die Entwicklung des Immunsystems, für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellwachstum und Zelltod und für die Elimination entarteter Zellen aus dem Organismus. Eine dysregulierte Apoptose ist in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen involviert und kann sowohl zu Gewebeatrophie, als auch zu unkontrollierter Zellproliferation führen.⁴

Apoptose kann über verschiedene Signalwege ablaufen. Die beiden meist erforschten sind der extrinsische, Todesrezeptor-vermittelte und der intrinsische, mitochondriale Weg. Diese Signalwege verlaufen unabhängig voneinander, konvergieren jedoch bei bestimmten Caspasen, welche beiden Signalwegen nachgeschaltet sind und letztlich zu dem kontrollierten Absterben der Zelle führen.⁵

Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung von Todesliganden (z.B. Fas Ligand) an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Fas/CD95) eingeleitet. Fas Ligand ist ein Zytokin, welches zu der TNF Familie gehört. Als Effektormolekül hat es die Funktion, virusinfizierte und entartete Zellen aus dem Organismus zu entfernen. Die Expression von Fas

wird durch verschiedene Stressoren wie Exposition mit UV- und Gammastrahlung induziert. Fas/CD95, der Rezeptor für Fas Ligand, ist ein TypI Membranprotein und Mitglied der TNF Rezeptor Familie. Das Tumorsuppressor Protein p53 verstärkt die Expression von Fas.⁶ Die Bindung von Fas Ligand an Fas-exprimierende Zielzellen führt zu einer Bindung von spezifischen Adapter-Proteinen wie der Fas-assoziierten Todesdomäne (Fas-Associated protein with Death Domain, FADD) und Caspase-8 in einen den Zelltod einleitenden Signal Komplex (cell death-inducing signaling complex, DISC). In der Folge aktiviert sich die inaktive Form von Caspase 8 durch Selbstspaltung und leitet die Proteasen Kaskade ein, welche schließlich zur Apoptose führt.^{7, 8, 9}

Der intrinsische Signalweg wird durch zellulären Stress, z.B. aufgrund von DNA- Schäden oder Entzug von Wachstumsfaktoren, ausgelöst. Es kommt zu einer Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen proapoptischen Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma. Cytochrom C bildet mit Apaf-1, (d)ATP und Procaspase-9 das sog. Apoptosom, das die Procaspase 3 in ihre aktive Form spaltet und damit zum Zelltod führt.¹⁰

Weitere Apoptose- Signalwege umfassen u.a. eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums und können auch unabhängig von Caspasen ablaufen.¹¹

Dem selektiven programmierten Zelltod Apoptose wird häufig die unspezifische Nekrose gegenübergestellt. Während Apoptose durch intrinsische Signale oder benachbarte Zellen ausgelöst wird, kommt es zur Nekrose v.a. durch irreparable Zellschädigung von außen, wobei häufig ganze Zellverbände betroffen sind. Ursachen können u.a. mechanische Traumata, Ischämie, Toxine oder bakterielle Infektionen sein¹². Anders als Apoptose verläuft Nekrose ATP- unabhängig, und bei mangelhafter Energieversorgung können apoptotische Zellen dazu übergehen, den nekrotischen Zelltod zu durchlaufen.¹³

Morphologisch kommt es bei der Nekrose zu einer Volumenzunahme von Organellen und Zytoplasma und zu einem Anschwellen der Zelle. Die Zellmembran rupturiert und der intrazelluläre Inhalt wird in den Extrazellulärraum freigesetzt, wodurch eine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird. Ablauf und Auftreten des nekrotischen Zelltods wurden viele Jahre als gänzlich unreguliert betrachtet, neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass auch der nekrotische Zelltod gewissen Kontrollmechanismen unterliegt. Der kontrollierte Ablauf der Nekrose ist Thema aktueller Forschung und wird aufgrund von Gemeinsamkeiten mit der Apoptose auch Nekroptose genannt.^{14, 12}

Neben den oben genannten sind weitere Formen des Zelltods bekannt (Zelllyse, Autophagie, Pyroptose, mitotische Katastrophe u.a.); insgesamt werden Einteilung und Terminologie des Zelltods in der Literatur nicht immer einheitlich gebraucht und kontrovers diskutiert.¹⁴

Die medikamentöse Behandlung onkologischer Erkrankungen mit Zytostatika wird meist durch Induktion von Apoptose in den malignen Zellen vermittelt.¹⁵ Entartete Zellen sind jedoch häufig in der Lage, sich über verschiedene Mechanismen dem Zelltod zu entziehen, wodurch die eingesetzten Medikamente ihre Wirksamkeit verlieren können.¹⁶

1.3.2 Regulation der Apoptose und Entstehung von Zytostatikaresistenzen

Dysregulierte Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese und der Entstehung von zellulären Resistenzen gegenüber konventionellen Zytostatika. Die Regulation der Apoptose findet auf molekularer Ebene durch verschiedene Proteine, wie z.B. pro- und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie statt.¹⁷ Anti-apoptotisches Bcl-2 entfaltet seine Wirkung, indem es mit anderen Mitgliedern derselben Genfamilie, wie dem proapoptotischen Protein Bax, Dimere bildet. So schützt eine Überexpression von antiapoptotischem Bcl-2 die Zelle vor apoptotischen Stimuli. Das Verhältnis zwischen Bcl-2 und Bax hat eine prognostische Aussagekraft bei der ALL: Eine Abnahme des Bax/Bcl-2 Quotienten korreliert mit einem schlechten Ansprechen auf die Chemotherapie.^{18, 19}

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Entwicklung zellulärer Zytostatikaresistenzen ist die Expression von Membranproteinen aus der Familie der ATP binding cassette (ABC-) Transporter (z.B. P-Glycoprotein). ABC-Transporter schützen die Zellen vor zytotoxischen Substanzen, indem sie diese unter Energieverbrauch gegen den Konzentrationsgradienten in den Extrazellulärraum transportieren und somit eine intrazelluläre Akkumulation verhindern.²⁰ Auf diese Weise kann eine Überexpression von P-Glycoprotein (P-gp) zu einer multiplen Medikamentenresistenz (MDR) gegenüber strukturell unterschiedlichen Substanzen wie Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden führen.²¹ Im Falle der akuten lymphoblastischen Leukämie korreliert die Expression von P-gp negativ mit der Wahrscheinlichkeit einer Remission und dem Ansprechen auf die initiale Therapie mit Steroiden.²²

1.3.3 Übergangsmetallkomplexe in der Therapie onkologischer Erkrankungen

Übergangsmetallkomplexe spielen in der chemotherapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen seit Jahrzehnten eine wichtige Rolle. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Zytostatikum Cisplatin, welches bereits seit 1978 erfolgreich in der Behandlung von Lungen-, Ösophagus-, Hoden-, Eierstock- und Blasenkrebs sowie von Tumoren im Kopf- und Halsbereich angewendet wird. Die ausgezeichnete Wirksamkeit von

Cisplatin wird jedoch durch seine zahlreichen Nebenwirkungen und durch die Ausbildung von Resistenzen limitiert, weshalb intensiv nach alternativen organometallischen Zytostatika gesucht wird.²³

Neben den auf Platin basierenden Verbindungen gehören eisen- und titanhaltige Substanzen zu den meisterforschten Übergangsmetallkomplexen. Die Eisenverbindung Ferrocen wurde bereits 1951 als erste Substanz aus der Klasse der Übergangsmetallkomplexe beschrieben.²⁴ Ferrocen ist eine thermisch und chemisch stabile, wenig toxische aromatische Verbindung, welche über reversible Redoxeigenschaften verfügt. Ferrocen und seine Derivate wurden in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht, wobei sich hinsichtlich der Wirksamkeit auf Tumorzellen vielversprechende Ergebnisse zeigten. Besonders hervorzuheben ist das Tamoxifenanalogon Ferrrocifen, welches in klinischen Studien zur Behandlung von Brustkrebserkrankungen erprobt wird.^{25, 26} Außerhalb der Krebsforschung werden eisenhaltige organometallische Verbindungen u.a. auch zur Behandlung von Malaria getestet.²⁷ Der genaue Wirkmechanismus von Ferrocen ist bislang nicht vollständig geklärt. Die erste titanhaltige organometallische Verbindung, für die eine ausgeprägte Anti-Tumor Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte, ist das Titanocen Dichlorid, über das erstmals 1979 berichtet wurde.²⁸

1.3.4 TitanocenY

Das p- Methoxybenzyl- substituierte TitanocenY stellt hinsichtlich seiner besseren Löslichkeit in Wasser und größeren hydrolytischen Stabilität eine Weiterentwicklung des Titanocen Dichlorids dar. In *ex vivo* Experimenten konnte für TitanocenY ein zytotoxischer Effekt auf Zellen von Nieren-, Ovar-, Lungen- und Kolontumoren nachgewiesen werden, welcher vergleichbar mit demjenigen von Cisplatin ist.^{27,29} TitanocenY induzierte des Weiteren Zelltod in primären humanen Mammakarzinomzellen und führte in einem MCF-7 (Mammakarzinomzelllinie) Xenograft-Modell in der Maus zu einer Reduktion des Tumorwachstums. Alle Versuchstiere überlebten die Behandlung, was auf eine geringe Toxizität des Wirkstoffes hinweist.³⁰ In humanen Epidermoidkarzinomzellen führte die Exposition mit TitanocenY zu Caspase-3 und -7 abhängiger Apoptose *in vitro* und hemmte das Tumorwachstums in einem A431 (Epidermoidkarzinomzelllinie) Xenograft-Modell *in vivo*. In derselben Untersuchung wurden A431 Tumorzellen mit Annexin V und Propidiumjodid gefärbt, um früh- und spätapoptotische Zellen zu unterscheiden und Nekrose auszuschließen.³¹ Untersuchungen mit einem Caki-1 (Nierenzellkarzinomzelllinie) Xenograft-Modell in der Maus zeigten eine signifikante, dosisabhängige Inhibition des Tumorwachstums ohne schwere Nebenwirkungen innerhalb des nicht-toxischen

Konzentrationsbereiches.³² Des Weiteren bewirkte die Behandlung mit TitanocenY eine Angiogenesehemmung.³³

1.3.5 Zielstellung

Übergangsmetallkomplexe spielen seit Jahrzehnten eine bedeutende Rolle in der Therapie von onkologischen Erkrankungen. Ihr Einsatz ist jedoch durch unerwünschte Nebenwirkungen und die Ausbildung von zellulären Resistenzen limitiert. In der hier vorgestellten Arbeit soll die Wirksamkeit von TitanocenY und anderen neuartigen Übergangsmetallkomplexen auf etablierten Tumorzelllinien und primären Patientenzellen überprüft werden. In zellbiologischen Experimenten sollen der Einfluss auf die Tumorzellproliferation und die Art des induzierten Zelltods bestimmt werden. Von besonderem Interesse ist außerdem die Fähigkeit der Substanzen zur Überwindung von zellulären Zytostatikaresistenzen. Hierfür wurden in unserer Arbeitsgruppe gezielt Tumorzellen gezüchtet, welche gegenüber der Behandlung mit klinisch häufig verwendeten Zytostatika Resistenzen und Kreuzresistenzen ausgebildet haben. Da moderne Chemotherapie meist in Form einer Kombinationstherapie durchgeführt wird, soll des Weiteren eine potentielle synergistische Wirkung mit konventionellen Zytostatika untersucht werden. Zuletzt ist es Ziel dieser Arbeit, im Hinblick auf die beteiligten Apoptosesignalwege die Mechanismen zu identifizieren, über welche die untersuchten Substanzen ihre zytotoxische Wirkung entfalten.

1.4 Materialien und Methoden

1.4.1 Materialien

1.4.1.1 Geräte

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank Hera Cell 150 von Thermo (Waltham, USA). Des Weiteren verwendeten wir die Zentrifugen 5804 R und 5415 R und den Thermomixer comfort von Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland), FACSCalibur von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), CASY® CellCounter von Innovatis (Bielefeld, Deutschland) und den LightCycler480 von Roche Diagnostics (Rotkreuz/Risch, Schweiz).

1.4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Röhrchen, Pipetten, Zellkulturflaschen und Lochplatten waren von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Für die Zellzahlbestimmung nutzten wir CASY®cups von

Innovatis (Bielefeld, Deutschland), für die Genexpressionsanalyse SuperArray PAHS-012 von SABiosciences Corporation (Frederick, MD, USA).

1.4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Formaldehyd ($\geq 37\%$), Ammoniumpersulfat (APS), Tetramethylethyldiamin (TEMED), β -Mercaptoethanol, Tris, Acrylamid und Magermilchpulver stammten von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Ethanol, Phosphat Buffered Saline (PBS), Triton X-100, Ammoniumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumazid, Essigsäure und Tween 20 von Merck (Darmstadt, Deutschland), RNase A von Qiagen (Hilden, Deutschland), Propidiumiodid (PI), Dimethylsulfoxid (DMSO), Natriumdodecylsulfat (SDS), Glycin und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) von Serva (Heidelberg, Deutschland), Bovines Serum Albumin (BSA) von Sigma (Saint Louis, USA), Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection und DNA-Molecular Weight Marker (Rainbow) von Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England), Super Signal West Pico ECL-Substrate von Pierce (Rockford, USA), Penicillin (1000 U/ml)/ Streptomycin (1000 $\mu\text{g/ml}$) von Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Trypanblau 0,4 % und Trypsin von Sigma-Aldrich (München, Deutschland), 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) von Molecular Probes (Leiden, Niederlande), Fetales Kälberserum (FKS) von Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), CASY®-Messlösung von Innovatis (Bielefeld, Deutschland) und Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat (Annexin-V-FITC) von BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland).

1.4.1.4 Zytostatika

Bis-[(p-methoxybenzyl)cyclopentadienyl] titanium(IV) dichlorid (TitanocenY) erhielten wir aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tacke (UCD School of Chemistry and Chemical Biology, Dublin, Irland). HUNI 068 ($\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{FeNO}_6$) wurde synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt von Andrea Hunold aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz (Universität zu Köln, Deutschland), wie bereits in einer früheren Publikation erläutert wurde.³⁴ Die Rhodium(III) und Iridium(III) Polypyridyl Komplexe mer-[$\text{RhX}_3(\text{DMSO})(\text{pp})$] ($\text{X}=\text{Cl}$; pp=phen (**1**), dpq (**2**), dppz (**3**); $\text{X}=\text{Br}$, pp=phen (**4**)), fac- [$\text{IrCl}_3(\text{DMSO})(\text{phen})$] (**5**), mer- [$(\text{IrX}_3(\text{DMSO})(\text{phen}))$] ($\text{X}=\text{Cl}$ (**7**), $\text{X}=\text{Br}$ (**8**)) sowie fac- [$\text{IrCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{pp})$] (pp=phen (**9**), dpq (**10**)), fac- [$\text{IrBr}_3(\text{L})(\text{phen})$] ($\text{L}=\text{H}_2\text{O}$ (**11**); $\text{L}=1\text{-Melm}$, 1-methylimidazole (**12**); $\text{L}=1\text{-MeBlm}$, 1-Methylbenzimidazole (**13**)) und fac- [$\text{IrX}_3(\text{tpy})$] ($\text{X}=\text{Cl}$ (**14**); $\text{X}=\text{Br}$ (**15**)) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sheldrick (Ruhr Universität Bochum, Deutschland) hergestellt. Die Polypyridil-Liganden dieser Verbindungen sind: bpy=2,2-bipyridin; phen=1,10-

phenanthrolin; dpq=dipyrido [3,2-f:2',3'-h] quinoxaline; dppz=dipyrido [3,2-a:2'3'-c] phenazine. Während die meridionalen Rhodium(III) Komplexe in Dichlormethan gelöst stabil sind, isomerisieren sie in polaren Lösungsmitteln photochemisch zu den weniger zytotoxisch wirkenden facialen Komplexen. Die facialen Iridium(III) Komplexe sind hingegen in wässrigen- und Methanol-Lösungen stabil und isomerisieren in Dichlormethan gelöst unter Einwirkung von Licht zu einer Mischung aus mer- und fac- Komplexen. Im Gegensatz zu den Rhodium(III) Komplexen sind hier die facialen Isomere wesentlich zytotoxischer als die meridionalen Iridium(III) Komplexe.

Als konventionelle Zytostatika verwendeten wir Fludarabin (Flu), Vincristin (Vcr) und Paclitaxel (Taxol), die uns von der Apotheke der Charité (CVK, Berlin) zur Verfügung gestellt wurden. Die Verdünnung erfolgte zur Herstellung von Stocklösungen mit DMSO oder mit den entsprechenden Zellkulturmedien oder Pufferlösungen während der Experimente. Als Lösungsmittelkontrolle wurden für die Experimente Kontrollzellen lediglich mit der entsprechenden Menge an DMSO inkubiert.

1.4.1.5 Zelllinien

Folgende Tumorzelllinien kamen zum Einsatz: Die von einem humanen Burkitt-Lymphom stammenden Zelllinien BJAB Mock und BJAB FADD-dn (FAS associated Death Domain dominant negative) wurden uns von Prof. Dr. Peter Daniel (Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In Kultur handelt es sich dabei um Suspensionszellen. Durch Transfektion mit pcDNA3-FADD-dn exprimiert die BJAB FADD-dn Zelllinie eine dominant-negative FADD-Mutante, welcher die N-terminale Death Effector-Domäne fehlt. Dadurch resultiert eine vollständige Blockade CD95-vermittelter Apoptose.³⁵ Im Gegensatz dazu ist durch Transfektion mit einem pcDNA3-Primer ohne FADD-dn-Gen die Expression des funktionellen FADD in den BJAB Mock Zellen normal. Extrinsisch vermittelte Apoptose ist hier nicht beeinträchtigt. Die aus humanen leukämischen B-Vorläuferzellen gewonnene Zelllinie Nalm-6 stammt von einem Patienten mit einem ALL-Rezidiv. Diese Suspensionszellen wurden uns von der AG Henze (Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Resistenztestungen verwendeten wir u.a. eine speziell gezüchtete Vincristin-resistente Nalm-6-Zelllinie, deren Herstellung im Methodenteil erläutert wird. Von Dr. Eberle (Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) erhielten wir des Weiteren die Melanomzelllinien MelHO pIres/Bcl-2. Die Zelllinien bestehen aus MelHO Zellen, die mit dem pIres-Vektor, bzw. mit dem pIres-Bcl-2-Vektor transfiziert wurden. Die Bcl-2-Linie überexprimiert das antiapoptotische Bcl-2-Protein. Mit den von einer humanen T-Zell-Leukämie stammenden

Zelllinien Jurkat neo/SMAC, bei der die SMAC-Linie das proapoptische SMAC-Protein überexprimiert, untersuchten wir, ob die Apoptoseauslösung durch SMAC beeinflussbar ist. Diese Zelllinien erhielten wir von PD Dr. Fulda (Universität Ulm, Deutschland).

1.4.2 Methoden

1.4.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Wir kultivierten die Zelllinien in Zellkulturflaschen (250-ml) bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Für Suspensionszellen verwendeten wir als Kulturmedium RPMI 1640 Medium von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), supplementiert mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS, L-Glutamin (0,56 g/l), Penicillin (100000 i.u.) und Streptomycin (0,1 g/l). Für Adhäsionszellen benutzen wir DMEM von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), supplementiert mit 10% (v/v) FKS und Geneticin (0,4 g/l). Durch Verdünnung auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml erfolgten 2-3mal pro Woche die Zellpassagierungen. Um standardisierte Versuchsbedingungen zu erreichen, wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Direkt vor der Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen wurden die Zellen auf 1×10^5 Zellen/ml verdünnt und in 6-Lochplatten überführt.

1.4.2.2 Herstellung von medikamentenresistenten Zelllinien

Durch regelmäßige Behandlung mit schrittweise ansteigenden Konzentrationen von bestimmten Zytostatika erreichten wir in einigen Zelllinien ausgeprägte Resistenzen gegenüber den applizierten Substanzen sowie teilweise auch Kreuzresistenzen gegenüber anderen Zytostatika. Hierzu wurden die Zelllinien bis zu dreimal pro Woche mit zunächst geringen Konzentrationen der entsprechenden Zytostatika behandelt, wobei diese über einen Zeitraum von sechs Monaten langsam gesteigert wurden. Die Behandlung erfolgte nach Verdünnung der Zellen auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml, sofern die vorherige Vitalitätsbestimmung mittels eines CASY®CellCounter + Analyzer System einen Wert > 80% ergab. Für die Resistenztestung von TitanocenY kam eine Vincristin-resistente B-Leukämie-Zelllinie (Nalm-6/Vcr) zum Einsatz, für die in Publikation 2 und 3 erwähnten Versuche wurden zudem eine Daunorubicin-resistente B-Leukämie-Zelllinie (Nalm-6/Dauno), eine Doxorubicin-resistente Lymphom-Zelllinie (7CCA) sowie eine Vincristin-resistente Lymphom-Zelllinie (BJAB/Vcr) verwendet.

1.4.2.3 Zellzahlbestimmung

Mit einem CASY®CellCounter + Analyzer System bestimmten wir Zellzahl und Zellviabilität, wie im Vorfeld beschrieben.^{36, 37} Das System unterscheidet zwischen vitalen Zellen, toten Zellen und Zelldebris, wodurch die Zellkonzentration genau bestimmt werden kann. Für die jeweiligen Zellen wurden speziell angepasste Messparameter verwendet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte 24 Stunden nach Behandlung von 1×10^5 Zellen/ml in 6-Lochplatten mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen. Einige Zellen wurden als Kontrolle mit DMSO inkubiert. Zur Analyse mit dem CASY®Cellcounter wurden nach sorgfältiger Resuspension 100µl jeder Probe mit 10ml CASY®ton (gebrauchsfertige isotonische Kochsalzlösung) in einem CASY®cup vermischt. Die Zellkonzentration der Kontrolle wurde mit einer Zellvermehrung von 100% gleichgesetzt. Wenn die Zellzahlkonzentration einer behandelten Probe gegenüber der Zellzahl zu Beginn des Experiments nicht zugenommen hatte, lag eine komplette Proliferationshemmung vor. Diejenige Konzentration einer Substanz, welche die Zellvermehrung nach 24-stündiger Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrolle um 50% hemmen konnte, definierten wir als halbmaximale Hemmkonzentration IGC50 (24 h).

1.4.2.4 Messung der DNS-Fragmentierung

Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit mit den zu untersuchenden Substanzen in 6-Lochplatten bei 37 °C quantifizierten wir das Ausmaß apoptotischer DNS-Fragmentierung mit Hilfe einer modifizierten Zellzyklusanalyse, wie sie im Vorfeld beschrieben wurde.³⁸ Nach Sammlung der Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 300g wurden die Zellen mit PBS bei 4°C gewaschen und mit PBS/ 2% (v/v) Formaldehyd für 30 Minuten auf Eis fixiert. Daraufhin wurden die Zellen pelletiert, 15 Minuten mit Ethanol/PBS (2:1, v/v) inkubiert und erneut pelletiert. Es folgte eine Resuspension mit RNase A (40µg/ml) enthaltendem PBS, woraufhin die RNS für 30 Minuten bei 37°C aufgeschlossen wurde. Nach erneuter Pelletierung und Resuspendierung mit PI (50µg/ml) enthaltendem PBS erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung von hypodiploider DNS mit dem FACScan-Apparat. Mit Hilfe der CELL Quest Software wurden die Daten analysiert. Die Anzahl apoptotischer Zellen wird durch den prozentualen Anteil an Hypodiploidie (Sub-G1) reflektiert. Durch Subtraktion der in den Kontrollzellen beobachteten Hintergrundapoptose von der Apoptoserate in den behandelten Zellen wurde die spezifisch durch die applizierten Substanzen induzierte Apoptose berechnet. Diejenige Konzentration einer Substanz, die nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden in 50% der behandelten Zellen zu einer Fragmentierung

der DNS führte, wurde als halbmaximale Apoptose-induzierende Konzentration AC50 (72 h) bezeichnet.

1.4.2.5 Genexpressionsanalyse

Mittels Echtzeit-PCR untersuchten wir den Einfluss unserer Substanzen auf die Expression verschiedener apoptoserelevanter Gene. Dafür kamen apoptosespezifische RT2-profiler PCR expression arrays (SuperArray PAHS-012) zum Einsatz, die wir nach den Instruktionen des Herstellers verwendeten.³⁹ Wir extrahierten die RNS von Lymphomzellen (BJAB) nach festgelegten Inkubationszeiten mit den zu untersuchenden Substanzen und behandelten die RNS mit DNase I (2U/ μ l), um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNS zu eliminieren. 700ng/ μ l der extrahierten RNS verwendeten wir dann als Matrize für die Synthese einer cDNS-Sonde. Nach Herstellerangaben erfolgte die quantitative Echtzeit-PCR SuperArray Analyse, wobei ein LightCycler480 Verwendung fand. Die Hybridisierungssignale wurden durch Verwendung der Mittelwerte von „Housekeeping Genen“ normalisiert, und die Ergebnisse wurden mithilfe der SuperArray Analyzer Software analysiert. Die Darstellung der Daten erfolgte als Vielfaches der Expression der entsprechenden Gene im Vergleich zu Kontrollzellen, die lediglich mit trägerstoffenthaltendem Medium inkubiert worden waren.

1.4.2.6 Auswertung der Daten und statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Die vergleichende Gegenüberstellung der Werte wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests berechnet. $P < 0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant und $p < 0,001$ als extrem signifikant bewertet; $p > 0,05$ wurde als nicht signifikant (n.s.) gewertet. Dementsprechend wurden Ergebnisse mit einem einzelnen Asterisk gekennzeichnet wenn der p-Wert geringer als 0,05 war, mit zwei Asterisken bei einem p-Wert kleiner als 0,01 und mit drei Asterisken bei einem p-Wert kleiner als 0,001.

Zur Berechnung des synergistischen Effektes kam das Konzept des fraktionellen Produktes nach Webb zur Anwendung, welches eine anerkannte und vielfach beschriebene Methode zur Analyse synergistischer, antagonistischer und summatorischer Effekte ist.⁴⁰ Das fraktionelle Produkt wurde entsprechend der Formel $F_p = E_1 \cdot 2 / (E_1 + E_2 - E_1 \cdot E_2)$ berechnet. $F_p < 1$ bedeutet einen antagonistischen Effekt, $F_p = 1$ beweist einen additiven Effekt und $F_p > 1$ deutet auf einen synergistischen Effekt hin.⁴¹

Alle Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

1.4.2.7 Weitere Methoden (Publikationen 2 und 3)

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Methoden verwendeten wir für die Untersuchungen des Eisen-Komplexes HUNI 068 und der Rhodium(III) und Iridium(III) Polypyridyl-Komplexe einige weitere Methoden, die hier nur kurz erläutert werden sollen. In den entsprechenden Publikationen lassen sich ausführliche Beschreibungen finden.^{42, 43} Die bei diesen Methoden verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind im Abschnitt Materialien mit aufgeführt, die zahlreichen Pufferlösungen für die Westernblotanalytik sind jedoch nicht aufgeführt und können ebenfalls in den entsprechenden Publikationen nachgelesen werden. Durch Messung der Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) mit dem Cytotoxicity Detection Kit von Roche (Mannheim, Deutschland) und einem ELISA-Reader wurden die Substanzen auf unspezifische Zytotoxizität hin untersucht. Die Durchführung des Testes erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers und wurde im Vorfeld beschrieben.⁴⁴ Mit dem Annexin-V-FITC/ PI-Doppelfärbungstest, einer Methode, die auf dem frühapoptotischen Prozess der Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Zellmembranseite basiert, wurde zwischen unspezifischem Zelltod und Apoptose unterschieden. Die Durchführung erfolgte wie im Vorfeld beschrieben.⁴⁵ Durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) untersuchten wir, ob apoptotische Vorgänge unter Beteiligung der Mitochondrien ablaufen, was auf eine Aktivierung der intrinsischen Apoptosesignalkaskade hinweist. Die Messung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen unter Zugabe des Farbstoffs JC-1. Die genaue Durchführung wurde im Vorfeld beschrieben.⁴⁶ Die Analyse der Zellen erfolgte sowohl bei dem Annexin-V-FITC/ PI-Doppelfärbungstest als auch bei der Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit einem mit der CellQuest-Software ausgerüsteten FACScan. Mittels Westernblotanalyse erfolgte des Weiteren die Detektion bestimmter Proteine, wie es im Vorfeld vielfach beschrieben wurde.⁴⁷ Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert, das Blotting erfolgte für 1 Stunde mit $1\text{mA}/\text{cm}^2$ in einer Transblot Semi Dry Transfer Cell von Biorad (München, Deutschland). Die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte entsprechend der Instruktionen der Antikörperhersteller. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden inkubierten wir die Membranen (Protran Nitrocellulose Transfer Membranen von Schleicher & Schnell Bioscience Inc, Dassel, Deutschland) mit ECL® Western Blotting Detection und fotografierten die Lumineszenzsignale mit einem Chemigenius-2-Bio-Imaging-System von Syngene (Cambridge, USA). Für die Detektion von Caspase-9 verwendeten wir primäre Maus anti-humane Caspase-9 Antikörper von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt,

Deutschland) und sekundäre anti-Maus horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper von Promega (Minneapolis, USA). Der Nachweis von β -Aktin erfolgte mit primären Maus anti-humane β -Aktin Antikörpern von Sigma (Saint Louis, USA).

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Axioskop2 mit Fluoreszenz-Option von Zeiss (Jena, Deutschland), welches mit dem Filter-Set 09 mit $\lambda_{\text{ex}}=450-490\text{nm}$ und $\lambda_{\text{em}}=490\text{nm}$ ausgestattet ist, durchgeführt. Hierfür wurden Lymphomzellen (BJAB) mit dem Polypyridylkomplex **3** für 12 Stunden bei 37°C inkubiert und mit Formaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen ($20\mu\text{l}$) wurden auf einen Objektträger mit poly-L-Lysin (Sigma, Saint Louis, USA) in einen gefärbten Kreis aufgetragen. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden sie zweimal mit PBS gewaschen. Hiernach wurde der Farbstoff BisBenzimid H 33258 (Sigma, Saint Louis, USA) in einer Verdünnung von $0,25\mu\text{g/ml}$ PBS aufgetragen. Mittels BisBenzimid wurden die Kerne der behandelten Zellen gefärbt und dargestellt. Vor der mikroskopischen Begutachtung wurden die Objektträger mit Glycerin (Sigma, Saint Louis, USA) behandelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

1.5 Ergebnisse

1.5.1 TitanocenY hemmt die Proliferation von malignen Zellen

Wir inkubierten die Tumorzelllinien Nalm-6 (B-Leukämiezellen), Jurkat (T-Leukämiezellen), BJAB (Lymphomzellen) und MelHO (Melanomzellen) mit TitanocenY in unterschiedlichen Konzentrationen und maßen nach 24 Stunden Viabilität und Zellzahl mit dem CASY®CellCounter + Analyzer System. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit TitanocenY zu einer dosisabhängigen Hemmung der Tumorzellteilung in jeder der getesteten Zelllinien führte. Des Weiteren führte die Behandlung von Nalm-6 Zellen mit $30\mu\text{M}$ TitanocenY zu einer Zellkonzentration, die geringer war als zu Beginn des Experimentes. Auf BJAB, Jurkat und MelHO Zellen sank die Zellzahl nicht unter die ursprünglich verwendete Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml. Die halbmaximale Hemmkonzentration IGC50 (24 h) lag in Nalm-6 bei $12\mu\text{M}$, in BJAB bei $30\mu\text{M}$ und in Jurkat und MelHO bei $40\mu\text{M}$. Abb.1a zeigt die Proliferationshemmung von Nalm-6 Zellen.

1.5.2 TitanocenY induziert Apoptose *in vitro*

Nach Inkubation verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von TitanocenY für 72 h bestimmten wir das Ausmaß der DNA-Fragmentierung. In jeder der untersuchten Zelllinien (B-Leukämiezellen, T-Leukämiezellen, Lymphom- und

Melanomzellen) konnte nach Inkubation mit TitanocenY in mikromolaren Konzentrationsbereichen die apoptotische DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. Die halbmaximale apoptotische Konzentration (AC50) nach 72 Stunden betrug in den entsprechenden Zelllinien Nalm-6 15µM, in Jurkat 20µM, in BJAB 50µM und in MelHO 120µM. Abb.1b zeigt die Induktion von Apoptose in B-Leukämiezellen (Nalm-6).

1.5.3 TitanocenY induziert Apoptose über den extrinsischen Signalweg

Um zu untersuchen, inwieweit der extrinsische Apoptose-Signalweg eine Rolle bei der durch TitanocenY vermittelten Apoptose spielt, führten wir Experimente mit dem Lymphomzellpärchen BJAB Mock/ BJAB FADD-dn durch. Die Behandlung der FADD-dn Zellen mit TitanocenY führte zu einem signifikant niedrigeren Apoptoselevel, als die der BJAB Mock Zellen: Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit 60µM TitanocenY wurde durch Messung der DNA-Fragmentierung festgestellt, dass 71,5% der BJAB Mock Zellen und 52,4% der BJAB FADD-dn Zellen kontrollierten Zelltod durchlaufen hatten ($p = 0,0058$) (Abb.2a).

1.5.4 TitanocenY führt zu einer Hochregulation des FAS Liganden

Als nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss des Fas Liganden auf den durch TitanocenY induzierten Zelltod. Hierzu analysierten wir mittels Echtzeit-PCR die mRNA Expression dieses proapoptotischen Mitgliedes der TNF- Familie. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden mit 30µM TitanocenY konnte in den behandelten Lymphomzellen BJAB eine 34-fache Hochregulierung von Fas Ligand festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

1.5.5 TitanocenY induziert Apoptose unabhängig von der Expression der regulatorischen Proteine SMAC und Bcl-2

Um die involvierten Apoptose-Signalwege detaillierter zu untersuchen, benutzten wir abermals Zellpärchen mit Abweichungen spezifischer Apoptose-relevanter Moleküle. SMAC überexprimierende T-Leukämiezellen (Jurkat SMAC) sprachen auf die Behandlung mit TitanocenY vergleichbar sensibel an wie die Kontrollzelllinie Jurkat neo. Inkubation mit 20µM TitanocenY führte in dem Zellpärchen zu 48,1% bzw. 49,7% Apoptose ($p = 0,84$) (Abb.2b). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Experimenten mit dem Zellkonstrukt MelHO pIres/ Bcl-2, wobei letztere Zellen eine Überexpression von antiapoptotischem Bcl-2 aufweisen. Beide Melanom-Zelllinien reagierten vergleichbar auf die Behandlung mit TitanocenY. Nach Inkubation mit 60µM TitanocenY waren 20,9% der Bcl-2 Zellen und 17,2% der Kontrollzelllinie apoptotisch ($p = 0,337$) (Abb.2c).

1.5.6 TitanocenY überwindet Resistenz gegen Vincristin

Mittels Westernblotanalytik konnte in speziell gezüchteten Vincristin-resistenten B-Leukämiezellen (Nalm-6) eine Überexpression von P-Glycoprotein nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass diese Zellen zusätzlich resistent gegenüber Paclitaxel und Fludarabin sind und somit die Kriterien einer multi-drug-resistance (MDR) erfüllen (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, inwiefern TitanocenY in der Lage ist, diese multiple Resistenz zu überwinden, inkubierten wir die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz und bestimmten nach 72h die Fragmentierung der DNA. TitanocenY wirkte auf der resistenten Zelllinie ebenso effektiv wie auf der Kontrollzelllinie (Abb.3).

1.5.7 TitanocenY zeigt synergistische Effekte mit Vincristin

Um eine eventuelle synergistische Wirkung von TitanocenY mit Vincristin zu untersuchen, wurden Lymphomzellen (BJAB) für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY, Vincristin und einer Kombination beider Substanzen inkubiert.

Es stellte sich heraus, dass der Gesamteffekt der Kombination von TitanocenY und Vincristin um ein Vielfaches größer ist als die Summe der Einzelwirkungen. Die prozentuale Berechnung des synergistischen Effektes belief sich auf bis zu 237% (Abb.4).

1.5.8 Weitere Ergebnisse (Publikationen 2 und 3)

Als weitere metallhaltige Verbindungen untersuchten wir den Eisen-Komplex Huni 068 sowie verschiedene Rhodium(III) und Iridium(III) Polypyridylkomplexe (Daten nicht gezeigt). Sowohl HUNI 068, als auch die Rhodium(III) bzw. Iridium(III) Komplexe mer- $[(\text{RhCl}_3(\text{DMSO})(\text{pp}))]$ (pp=dpq (**2**) bzw. dppz (**3**)) sowie fac- $[(\text{IrBr}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{phen}))]$ (**11**) und mer- $[(\text{IrCl}_3(\text{tpy}))]$ (**14**) induzierten eine konzentrationsabhängige Inhibition der Tumorzellproliferation und lösten in malignen Zellen verschiedener Zelllinien Apoptose aus. Im Falle von HUNI 068 lag die IGC50 für BJAB (Lymphomzellen) und Nalm6 Zellen (B-Leukämiezellen) zwischen 30 und 40 μM und die AC50 bei 40 μM . Die meridionalen Rhodium(III) und Iridium(III) Komplexe **2**, **3**, und **14** bewirkten bereits in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,4 μM (**3**) und 0,8 μM (**2**) eine halbmaximale Proliferationshemmung in BJAB Zellen. Der faciale Iridium(III) Komplex **11** inhibierte ebenfalls die Proliferation von Lymphomzellen, jedoch in einem wesentlich höheren Konzentrationsbereich (IGC50: 5 μM). Die Polypyridylkomplexe **2**, **3**, **11** und **14** induzierten bei Konzentrationen zwischen 0,6 μM (**14**) und 40 μM (**11**) in 50% der Zellen eine DNS-Fragmentierung. Substanz **3** induzierte nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden in BJAB Zellen typische morphologische Apoptosemerkmale, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie

sichtbar gemacht wurden. Nach einer Inkubationszeit von 1h (HUNI 068, **11**) bzw. 3h (**2**, **3**) konnte nach Behandlung mit HUNI 068 und den Polypyridylkomplexen **2**, **3** und **11** keine signifikante Erhöhung der extrazellulären LDH- Konzentration nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu verursachte der meridionale tpy Komplex **14** nach kurzer Inkubationszeit eine Freisetzung von LDH aus den behandelten Zellen. Durch Annexin-V-FITC/P-Bindungsmessung wurde die zytotoxische Wirkung von HUNI 068 auf BJAB Zellen mit der Wirkung von HUNI 068 auf primären Leukozyten einer gesunden Person verglichen. Hierbei zeigte sich, dass letztere durch die Behandlung signifikant weniger geschädigt wurden.

HUNI 068 wirkte sowohl auf multiresistenten (Nalm-6/Vcr), als auch auf Daunorubicin-resistenten (Nalm-6/Dauno) B-Leukämiezellen mindestens so effektiv wie auf den Kontrollzelllinien. Bei den Vincristin-resistenten Lymphomzellen BJAB/Vcr war die Apoptoserate bei einer Konzentration von 50µM um 16% geringer als auf den nichtresistenten BJAB-Zellen, wobei dieser Unterschied bei einer Konzentration von 30 µM nicht auftrat. Im Gegensatz zu dem Rhodium(III) Komplex **3** war Komplex **2** in der Lage, in Doxorubicin-resistenten BJAB Zellen (7CCA) Apoptose auszulösen. Durch vergleichende Untersuchungen der Lymphomzelllinien BJAB mock/FADD-dn zeigte sich eine Unabhängigkeit der durch HUNI 068 induzierten Apoptose von CD95. Mittels Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) konnte zudem eine Aktivierung der Mitochondrien festgestellt werden. Dies galt auch für die Polypyridyl Komplexe **2**, **3**, **11** und **14**. Durch Westernblot-Technik wurde nach Behandlung von BJAB Zellen mit HUNI 068 eine Prozessierung von Caspase-9 nachgewiesen und mittels Echtzeit-PCR konnte eine um den Faktor 50 erhöhte Expression des proapoptotischen Gens Harakiri identifiziert werden. Mit HUNI 068 wurden außerdem *ex vivo* Versuche mit primären Lymphoblasten eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), eines Patienten mit einer primären ALL, sowie eines Patienten mit einem ALL-Rezidiv durchgeführt. Letztere Zellen wurden auch mit den Rhodium(III) Komplexen **2** und **3** behandelt. Zum Vergleich wurden die malignen Zellen mit herkömmlich verwendeten Zytostatika wie Daunorubicin, Doxorubicin und Vincristin inkubiert. Für alle Substanzen verwendeten wir die vorher auf den Lymphomzellen BJAB ermittelten AC50 Konzentrationen. Die primären malignen Zellen erwiesen sich im Allgemeinen als wenig sensibel gegenüber der Behandlung mit allen getesteten Wirkstoffen, wobei die Resistenzen gegen HUNI 068, den dpq Komplex **2** und den dppz Komplex **3** geringer ausfielen als gegen die herkömmlichen Zytostatika.

1.6 Diskussion

Die meisten Gewebe des Organismus unterliegen während der gesamten Lebenszeit einem ständigen Prozess von Zelltod und Zellerneuerung. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Sterben und Wachstum der Zellen ist für die Entwicklung und Funktion des Organismus von großer Bedeutung. Während vermehrtes Zellsterben u.a. zu verschiedenen immunologischen und degenerativen Erkrankungen führen kann, kann ein unkontrolliertes Zellwachstum in Verbindung mit einem verminderten Zelltod die Ausbildung von malignen Tumoren begünstigen. Dementsprechend werden in der Therapie von Krebserkrankungen gezielt Medikamente eingesetzt, welche die Zellteilung bremsen und die malignen Zellen dem Zelltod zuführen.¹⁵

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Metall-organischen Verbindungen TitanocenY, HUNI 068, sowie die Rhodium(III)- bzw. Iridiumkomplexe **2**, **3**, bzw. **11** und **14** hemmen die Proliferation von Zellen unterschiedlicher Tumorzelllinien effektiv und konzentrationsabhängig. Die Proliferationshemmung konnte sowohl in Leukämie- und Lymphomzellen, als auch in Melanomzellen beobachtet werden. In B-Leukämiezellen wurde durch Inkubation mit TitanocenY die Zellteilung nahezu vollständig inhibiert. In dieser Zelllinie war nach Exposition mit mindestens 30µM TitanocenY die Zelldichte sogar niedriger als zu Beginn des Experimentes. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass zusätzlich zur Proliferationshemmung bereits nach der kurzen Inkubationszeit von 24 Stunden Zelltod stattgefunden haben muss.

Es sind verschiedene Formen des Zelltods bekannt, welche sich sowohl in ihrem Ablauf, als auch in der Auswirkung auf das die sterbende Zelle umgebende Gewebe voneinander unterscheiden. Während der unspezifischen Nekrose kommt es zu einem Anschwellen der Zelle und in der Folge zur Zerstörung der Zellmembran. Potentiell schädliche Zellbestandteile gelangen somit in den Extrazellulärraum. Hierdurch entsteht eine Entzündung, die das umliegende Gewebe schädigt.⁴⁸ Durch Messung der LDH- Freisetzung aus den behandelten Zellen konnte Nekrose als Ursache des Zelltodes für HUNI 068, sowie für die Polypyridylkomplexe **2**, **3** und **11** ausgeschlossen werden. Bei Komplex **14** war dies nicht der Fall, ein möglicher therapeutischer Einsatz dieser Verbindung ist aufgrund dessen unwahrscheinlich.

Beim programmierten Zelltod tötet sich die Zelle durch Aktivierung eines Todesprogrammes auf kontrollierte Weise selbst. Apoptose ist die häufigste und am besten verstandene Form des programmierten Zelltods. Während der Apoptose löst sich die Zelle zunächst aus ihrem Zellverband und beginnt zu schrumpfen. Es kommt zu einer Kondensierung von Nukleus und

Zytoplasma und zur Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Zuletzt zerfällt die Zelle unter Vesikelbildung in sog. apoptotic bodies, die von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen abgebaut werden. Da im Gegensatz zur Nekrose die Zellmembran während des gesamten Prozesses intakt bleibt, wird das umliegende Gewebe nicht geschädigt.⁴⁹ Die meisten gebräuchlichen Chemotherapeutika wirken über eine mehr oder weniger spezifische Induktion von Apoptose in den Tumorzellen.¹⁵ TitanocenY induziert Apoptose in allen getesteten Tumorzelllinien. Der zytotoxische Effekt tritt bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereichen auf, die AC50 in B-Leukämiezellen liegt bei 15µM. Auch der Eisen-Komplex HUNI 068 und die Komplexe **2**, **3**, **11** und **14** induzieren Apoptose, wobei sich die wirksamen Konzentrationsbereiche der Substanzen deutlich voneinander unterscheiden: Hier lagen die AC50 Werte zwischen 0,6 µM (**14**) und 40µM (HUNI 068).

Die medikamentöse Therapie von Tumorerkrankungen wird häufig durch unerwünschte Nebenwirkungen begrenzt, da auch gesunde Körperzellen von den Chemotherapeutika geschädigt werden. Für HUNI 068 konnte eine relative Selektivität nachgewiesen werden- Lymphozyten einer gesunden Person wurden durch die Substanz deutlich weniger angegriffen als Tumorzellen.

Die beiden meistuntersuchten Signalwege, über die Apoptose vermittelt werden kann, sind der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Der extrinsische Weg wird über die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche initiiert und durch Rekrutierung von zytosolischen Effektormolekülen weitergeleitet. FADD ist ein solches Effektormolekül, welches nach Bindung von FasL an den Rezeptor CD95 das Apoptosesignal auf die Effektorcaspasen überträgt.⁶ Die Lymphomzelllinie BJAB FADD-dn exprimiert eine dominant-negative FADD-Mutante, der die N-terminale Todeseffektordomäne (death effector) fehlt, woraus eine vollständige Blockade der CD95-vermittelten Apoptose resultiert.³⁵ Diese Zellen sprechen signifikant weniger auf eine Behandlung mit TitanocenY an als Zellen der Kontrollzelllinie. Folgerichtig scheint der extrinsische Signalweg mindestens teilweise für die Vermittlung des zytotoxischen Effektes von TitanocenY verantwortlich zu sein. Dennoch wurde, wenn auch in einem signifikant geringeren Ausmaß, auch in den FADD-dn Zellen Apoptose ausgelöst. Dies deutet darauf hin, dass TitanocenY seine Wirkung auch über einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus entfalten kann. Für HUNI 068 konnte eine solche Abhängigkeit von CD95 nicht nachgewiesen werden, was erste Hinweise darauf gibt, dass diese Substanz über einen anderen Apoptoseweg als TitanocenY seine Wirkung entfaltet.

Um die Beteiligung des Fas Liganden an der TitanocenY-induzierten Apoptose näher zu untersuchen, führten wir Echtzeit-PCR Experimente durch. Das Genexpressions-Profilung zeigte eine 34-fache Hochregulation des Fas Liganden nach Exposition von Lymphomzellen mit TitanocenY. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass der extrinsische Signalweg in die TitanocenY-vermittelte Apoptose involviert ist. Ein kausaler Zusammenhang muss jedoch in der Zukunft in funktionellen Experimenten nachgewiesen werden.

Während des intrinsischen Signalweges übernehmen die Mitochondrien die zentrale Regulation des apoptotischen Prozesses und stellen die Energie bereit, die für den kontrollierten Zelltod benötigt wird. Im Verlauf werden proapoptische Proteine wie SMAC und Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt, welche die nachfolgenden apoptotischen Signalwege einleiten.⁵⁰ Interessanterweise stellte sich heraus, dass das Expressionslevel von SMAC keinen Einfluss auf die zytotoxische Effektivität von TitanocenY hat. So reagierten B-Leukämiezellen, welche eine Überexpression von SMAC aufweisen, statistisch vergleichbar sensibel auf die Exposition mit der Substanz wie die Kontrollzelllinie. Im Gegensatz hierzu scheinen die Substanzen HUNI 068, **2**, **3**, **11** und **14** Apoptose durch Aktivierung des mitochondrialen Signalübertragungsweges einzuleiten. So konnte nach Inkubation von Lymphomzellen mit den verschiedenen Substanzen mittels Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) eine Aktivierung der Mitochondrien während des Apoptosevorganges festgestellt werden. Für HUNI 068 konnte auch eine Prozessierung der Caspase-9 nachgewiesen werden. Dies kann als ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung des intrinsischen Signalweges an der Wirkweise dieser Substanzen gewertet werden. Bei der Regulation des intrinsischen Apoptose Signalweges spielen pro- und anti-apoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie eine wichtige Rolle. Anti-apoptisches Bcl-2 schützt die Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli und verhindert die Freisetzung von Cytochrom C, SMAC und anderen proapoptischen Faktoren aus dem Mitochondrium. Aufgrund seiner Funktion ist anti-apoptisches Bcl-2 in die Entstehung von Zytostatikaresistenzen involviert. In humanen Melanomzellen führt die Überexpression von Bcl-2 zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen, und bei akuter Leukämie korreliert sie mit einem schlechten Ansprechen auf die Chemotherapie.^{18, 51} TitanocenY induziert Apoptose unabhängig von anti-apoptischem Bcl-2 und proapoptischem SMAC. Dies unterstreicht zum einen die Wichtigkeit des extrinsischen Signalweges für die TitanocenY-vermittelte Apoptose. Die Unabhängigkeit von anti-apoptischem Bcl-2 deutet jedoch außerdem darauf hin, dass TitanocenY in der

Behandlung von Tumoren wirksam sein könnte, welche aufgrund einer Überexpression von Bcl-2 gegenüber herkömmlichen Zytostatika Resistenzen entwickelt haben.

Neben Bcl-2 stellt P-Glycoprotein (P-gp), eine energieabhängige Transmembranpumpe, eine wichtige Ursache für die Entwicklung von Zytostatikaresistenzen dar. Indem es in der Lage ist, unterschiedliche Zytostatika aus der Zielzelle heraus zu transportieren, führt P-gp zu „multidrug Resistenz“ (MDR) in verschiedenen Tumorentitäten. In vorausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von P-gp bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter mit einer schlechten Prognose korreliert und einen Vorhersagewert für die Entstehung eines Rezidives darstellt.²² Überraschenderweise zeigte sich, dass Vincristin-resistente B-Leukämiezellen, welche P-gp überexprimieren, empfindlich auf die Behandlung mit TitanocenY reagieren. Diese Zellen sind zusätzlich resistent gegenüber Fludarabin und Paclitaxel und erfüllen somit die Kriterien einer MDR. Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass TitanocenY ein effektives Medikament für die Behandlung von malignen Erkrankungen sein könnte, welche aufgrund einer Überexpression von P-gp gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika Resistenzen aufweisen. Auch HUNI 068 wirkt auf der multiresistenten B-Leukämie Zelllinie und zusätzlich auf Daunorubicin-resistenten B-Leukämiezellen. Des Weiteren – wenn auch in etwas geringerem Ausmaß – sind auch Vincristin-resistente Lymphomzellen sensibel gegenüber HUNI 068. Der Rhodium(III) Komplex **2** war in der Lage, in Doxorubicin-resistenten Lymphomzellen Apoptose auszulösen, was für Komplex **3** nicht zutraf. Um den Mechanismus der Resistenzüberwindung im Falle von HUNI 068 näher zu untersuchen, führten wir abermals Echtzeit-PCR Experimente durch. Hier konnte eine erhöhte Expression des pro-apoptischen Gens Harakiri identifiziert werden. Es ist bekannt, dass Harakiri mit Bcl-2 interagiert und dessen anti-apoptische Wirkung antagonisiert.⁵²

Mit dem Eisenkomplex und den Rhodium(III)-Komplexen **2** und **3** wurden zudem *ex vivo* Versuche auf Zellen von Patienten durchgeführt, die an Leukämie erkrankt waren. Die primären malignen Zellen zeigten im Vergleich zu herkömmlichen Zytostatika eine erhöhte Sensibilität gegenüber der Behandlung mit den oben genannten Wirkstoffen. Dies traf insbesondere für die Zellen eines ALL-Rezidivs zu, was einen weiteren Hinweis liefert, dass die getesteten Substanzen in der Lage sind, Zytostatikaresistenzen zu überwinden.

Moderne Polychemotherapie besteht aus einer Kombination verschiedener zytostatischer Wirkstoffe, wodurch potentielle synergistische Effekte ausgenutzt und unerwünschte Arzneimittelwirkungen minimiert werden. Man spricht von Synergie, wenn eine Substanz die Wirkung einer anderen Substanz zu steigern vermag und der gemeinsame Effekt größer ist,

als die Summe der Einzeleffekte.⁴⁰ In Kombination mit Vincristin, einem Wirkstoff, welcher in zahlreichen chemotherapeutischen Therapieregimen verwendet wird, konnte für TitanocenY ein synergistischer Effekt von bis zu 236% beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt eine Einsatzmöglichkeit von TitanocenY als Komponente für eine Polychemotherapie auf und bietet eine interessante Basis für weitere präklinische Untersuchungen.

Zusammengefasst induziert TitanocenY Apoptose in Leukämie-, Lymphom- und Melanomzellen *in vitro*. Der Wirkstoff aktiviert den Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalweg über eine Hochregulation von Fas Ligand und wirkt auch auf malignen Zellen, welche aufgrund der Überexpression von Bcl-2 oder dem Transmembranprotein P-Glycoprotein zelluläre Zytostatikaresistenzen ausgebildet haben. Der Titan-Komplex zeigt des Weiteren ausgeprägte synergistische Effekte mit Vincristin. Zuletzt qualifiziert die Fähigkeit, Zytostatika-Resistenzen zu überwinden, das neuartige TitanocenY als einen vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung von therapierefraktären malignen Tumorerkrankungen.

1.7 Literaturverzeichnis

1. Bhojwani D et al. (2006) Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 108(2): 711-7
2. Vrooman LM, Silverman LB (2009) Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr* 21: 1-8
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-57
4. MacFarlane M (2009) Cell death pathways-potential therapeutic targets. *Xenobiotica* 39(8): 616-624
5. Lee H et al. (2011) Delivery of Intracellular- acting Biologics in Pro-Apoptotic Therapies. *Curr Pharm Des* 17(3): 293-319
6. Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3): 355-365
7. Juo P et al. (1999) FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ* 10(12): 797-804
8. Voss M et al. (2008) Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun Signal* 6: 11
9. Walczak H, Haas TL (2008) Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol* 414: 221-239

10. Granville DJ, Gottlieb RA (2002) Mitochondria: Regulators of Cell Death and Survival (2002) *The Scientific World Journal* 2: 1569–1578
11. Constantinou C, Papas KA, Constantinou AI (2009) Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy? *Curr Cancer Drug Targets* 9(6): 717-28
12. Negroni A et al. (2015) Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm* 2015: 250762
13. Leist M et al. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185(8):1481-6
14. Kroemer G et al. (2009) Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 *Cell Death Differ* 16 (1): 3-11
15. Herr I, Debatin KM (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98: 2603-2614.
16. Fulda S (2011) Targeting Apoptosis Signaling Pathways for Anticancer Therapy. *Front Oncol* 1: 23
17. Vogler M (2014) Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours *Adv Med* 2014: 943648
18. Srinivas G et al. (2000) Mutant p53 protein, Bcl-2/Bax ratios and apoptosis in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 62-67
19. Prokop A et al. (2000) Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 14: 1606-1613
20. Ma H et al. (2014) Reversal Effect of ST6GAL 1 on Multidrug Resistance in Human Leukemia by Regulating the PI3K/Akt Pathway and the Expression of P-gp and MRP1. *Plos One* 9(1): e85113
21. Pieters R et al. (1997) Everything you always wanted to know about cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 25: 11-26
22. Brozek J. et al. (2009) P-glycoprotein activity predicts outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 31: 493-499
23. Gómez-Ruiz et al. (2012) On the Discovery, Biological Effects, and use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorg Chem Appl*. 2012: 140284

24. Kealy T, Pauson P (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature* 168: 1039–1040
25. Jaouen G, Vessières A, Top S (2015) Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem Soc Rev* 44: 8802-8817
26. Nguyen A et al. (2007) Ferrocifens and ferrocifenols as new potential weapons against breast cancer. *Chimia* 61: 716–724
27. Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N (2011) Organometallic Anticancer Compounds. *J Med Chem.* 54(1): 3–25
28. Köpf H, Köpf-Maier P (1979) Titanocene dichloride—the first metallocene with cancerostatic activity. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*. 18(6): 477–478
29. Oberschmidt O et al. (2007) Antiproliferative activity of Titanocene Y against tumor colony-forming units. *Anticancer Drugs* 18: 317-321
30. Beckhove P et al. (2007) Antitumor activity of Titanocene Y against freshly explanted human breast tumor cells and in xenografted MCF-7 tumors in mice. *Anticancer Drugs* 18: 311-315
31. Bannon et al. (2007) Substituted titanocenes induce caspase-dependent apoptosis in human epidermoid carcinoma cells in vitro and exhibit antitumour activity in vivo. *Br J Cancer* 97: 1234-1241
32. Fichtner I et al. (2006) Anti-tumor activity of Titanocene Y in xenografted Caki-1 tumors in mice. *Anticancer Drugs* 17: 333-336
33. Weber H et al. (2008) Analyses of Titanocenes in the spheroid-based cellular angiogenesis assay. *Toxicol In Vitro* 22: 531-534
34. Hunold A et al (2009) Stereoselective Synthesis of New Ferrocene-Derived Amino Acid Building Blocks. *Eur J Org Chem* 4429-4440
35. Wieder T et al. (2001) Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97: 1378-1387
36. Tillner J, Winckler T, Dingermann T (1994) A simple cytotoxicity assay using the eucaryotic microorganism *Dictyostelium discoideum*. *Pharmazie* 49: 759-761
37. Voisard R et al. (1991) Cell culture as a prescreening system for drug prevention of restenosis. *Vasa Suppl* 33: 140-141
38. Nicoletti I et al. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279

39. Lyon E, Wittwer CT (2009) LightCycler Technology in Molecular Diagnostics. *J Mol Diagn* 11(2): 93–101
40. Chou T-C, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 22: 27-55
41. Webb (1963) Effects of more than one inhibitor. *Enzymes and Metabolic Inhibitors* 1: 66–79, 487-512
42. Dobroschke M et al. (2009) Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction. *ChemMedChem*. 4(2): 177-87
43. Kater B et al. (2011) Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(4): 639-649
44. Wieder T, Orfanos CE, Geilen CC (1998) Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem* 273: 11025-11031
45. Vermes I et al. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184: 39-51
46. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C (1995) Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* 260: 406-417
47. Wieder T et al. (1994) Identification of a putative membrane-interacting domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from rat liver. *FEBS Lett* 345: 207-210
48. Mohammad RM et al. (2015) Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 35: 78–103
49. Poon IKH et al. (2014) Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 14(3): 166-180
50. Gustafsson AB, Gottlieb RA (2007) Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 292 : 45-51
51. Raisova M et al. (2001) The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 117(2):333-40

52. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G (1997) Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* 16:1686-1694

1.8 Abbildungen

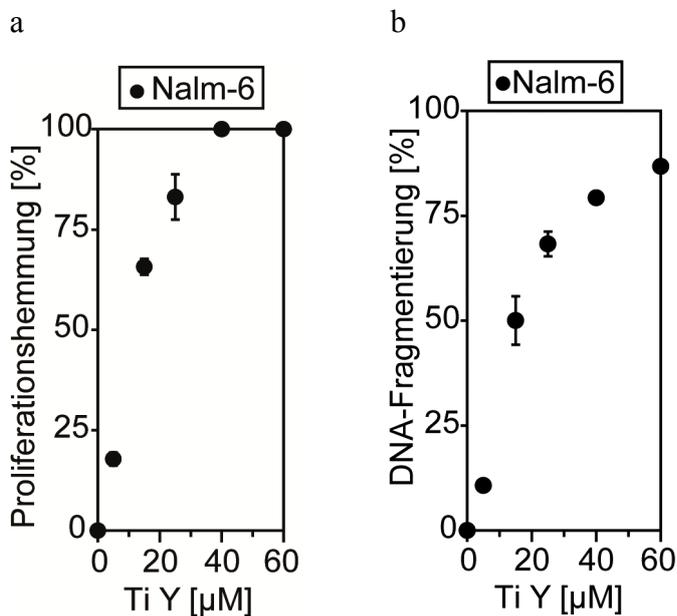


Abb. 1 a-b TitanocenY inhibiert die Tumorzellproliferation und induziert Apoptose in Nalm-6 Zellen

a TitanocenY inhibiert die Tumorzellproliferation von Nalm-6 Zellen (B-Leukämiezellen). Die Zellen wurden entweder als Kontrolle unbehandelt belassen, oder mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY inkubiert. Nach 24 h wurde die Zellkonzentration mit einem CASY®CellCounter + Analyzer System bestimmt. Die Inhibition der Proliferation ist in % gegenüber der Kontrolle \pm SD (n = 3) angegeben.

b TitanocenY induziert DNA Fragmentierung in Nalm-6 Zellen (B-Leukämiezellen). Die Zellen wurden entweder als Kontrolle unbehandelt belassen, oder mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY inkubiert. Nach 72h wurde die DNA Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die DNA Fragmentierung ist in % \pm SD (n = 3) angegeben

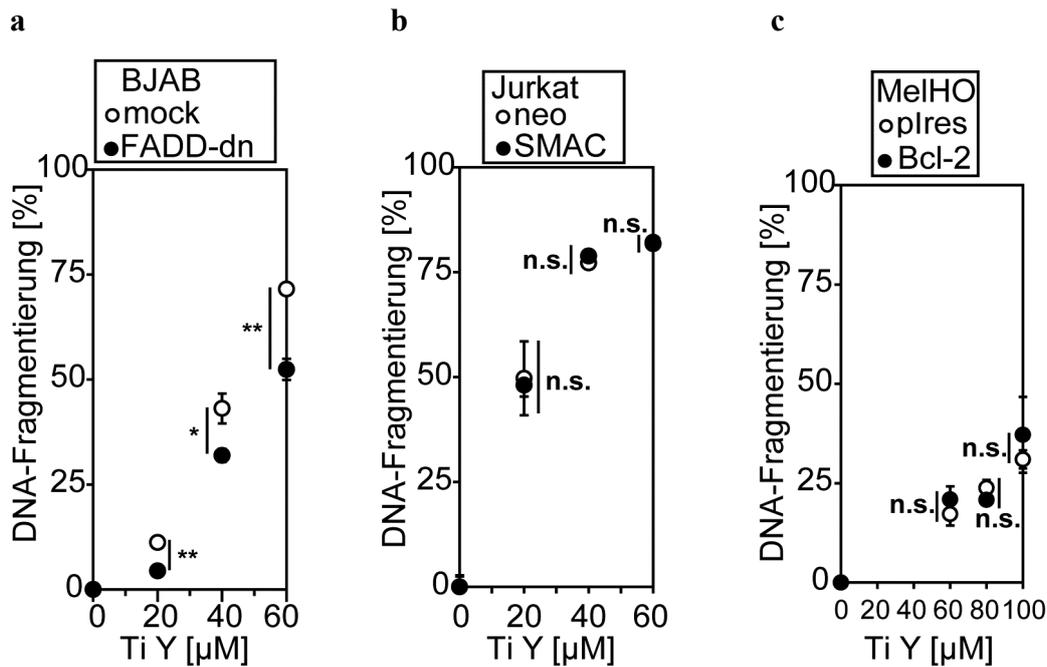


Abb. 2 a-c Titanocen Y induziert Apoptose über den extrinsischen Signalweg und unabhängig von der Expression der regulatorischen Proteine SMAC und Bcl-2

a BJAB FADD-dn Zellen (Lymphomzellen), welche eine dominant-negative FADD-Mutante exprimieren und BJAB mock Zellen, welche das funktionelle FADD normal exprimieren, wurden entweder mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach 72h wurde die DNA Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die DNA Fragmentierung ist in % \pm SD (n = 3) angegeben.

b Jurkat SMAC Zellen (T-Leukämiezellen), welche das proapoptotische SMAC Protein überexprimieren und Jurkat neo Zellen wurden entweder mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach 72h wurde die DNA Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die DNA Fragmentierung ist in % \pm SD (n = 3) angegeben.

c MelHO Bcl-2 Zellen (Melanomzellen), welche das antiapoptotische Bcl-2 Protein überexprimieren und MelHO pIres Zellen wurden entweder mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach 72h wurde die DNA Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die DNA Fragmentierung ist in % \pm SD (n = 3) angegeben.

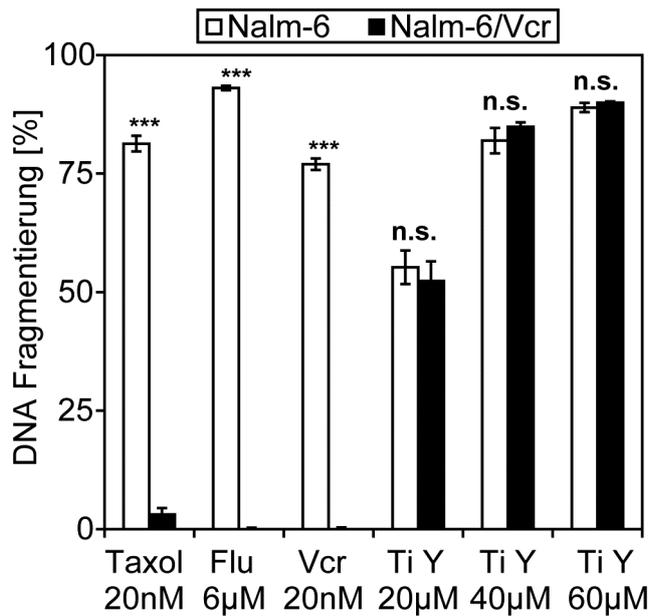


Abb. 3 TitanocenY überwindet Resistenz gegen Vincristin

Vincristin resistente Nalm-6 Zellen (Nalm-6/Vcr) (B-Leukämiezellen) und die entsprechenden nichtresistenten Nalm 6 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von TitanocenY sowie Paclitaxel (Taxol), Fludarabin (Flu) und Vincristin (Vcr) inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt belassen.

Nach 72h wurde die DNA Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die DNA Fragmentierung ist in % \pm SD (n = 3) angegeben.

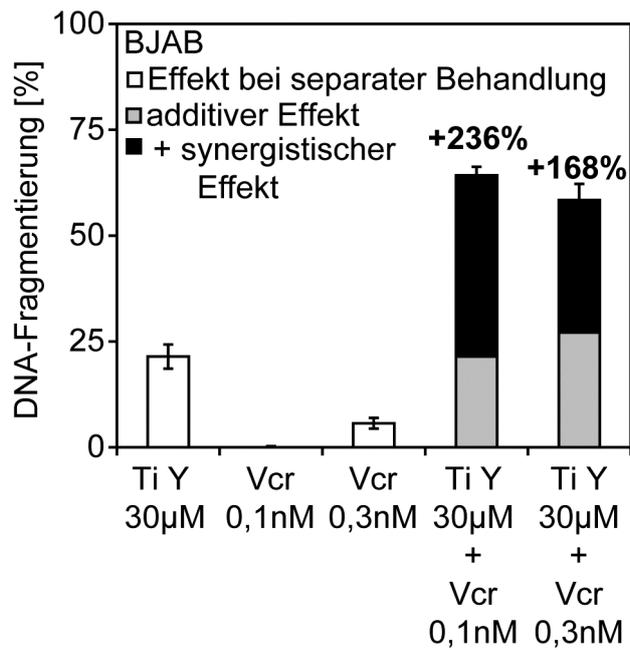


Abb.4 TitanocenY zeigt synergistische Effekte mit Vincristin

BJAB Zellen (Lymphomzellen) wurden entweder mit TitanocenY, mit Vincristin oder mit einer Kombination von beiden Substanzen inkubiert. Um mögliche synergistische Effekte zu untersuchen, wurden alle Substanzen in sehr niedrigen Konzentrationen verwendet. Nach 72h wurde die DNA Fragmentierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die DNA Fragmentierung ist in % ± SD (n = 3) angegeben.

2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lisa Kater, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuartige metallhaltige Verbindungen als potentielle Zytostatika, insbesondere für die Behandlung der therapieresistenten akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter am Beispiel eines Titanocenes“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

3 Anteilserklärung

Lisa Kater hatte folgenden Anteil an den verwendeten Publikationen:

Publikation 1: **L. Kater**, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, B. Kater, S. Strauss, M. Tacke, A. Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. *Toxicol In Vitro* 2011;26(1):119-124.

Anteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Planung und Durchführung der meisten Experimente, Herstellung und Kultivierung resistenter Zelllinien, Verfassen und Einreichen des Manuskripts.

Publikation 2: M. Dobroschke, Y. Geldmacher, I. Ott, M. Harlos, **L. Kater**, L. Wagner, R. Gust, W.S. Sheldrick, A. Prokop. „Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction.“ *ChemMedChem*.2009; Feb;4(2):177-87

Anteil: 15 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Anteil an *in-vitro*-Versuchen, Herstellung und Kultivierung resistenter Zelllinien, Mitarbeit am Manuskript

Publikation 3: B. Kater, A. Hunold, H. G. Schmalz, **L. Kater**, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(4):639-649.

Anteil: 10 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Anteil an *in-vitro*-Versuchen, Herstellung und Kultivierung resistenter Zelllinien

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

Lisa Kater
Berlin, den

4 Verwendete Publikationen

L. Kater, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, B. Kater, S. Strauss, M. Tacke, A. Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. *Toxicol In Vitro* 2011;26(1):119-124. - Impact factor 3,207

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.010>

M. Dobroschke, Y. Geldmacher, I. Ott, M. Harlos, **L. Kater**, L. Wagner, R. Gust, W.S. Sheldrick, A. Prokop. „Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction“. *ChemMedChem*.2009; Feb;4(2):177-87. - Impact factor 3,046

<http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200800311>

B. Kater, A. Hunold, H. G. Schmalz, **L. Kater**, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative.

J Cancer Res Clin Oncol 2011;137(4):639-649. - Impact factor 3,009

<http://dx.doi.org/10.1007/s00432-010-0924-6>

5 Lebenslauf

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

6 Komplette Publikationsliste

6.1 Publikationen

2009 M. Dobroschke, Y. Geldmacher, I. Ott, M. Harlos, **L. Kater**, L. Wagner, R. Gust, W.S. Sheldrick, A. Prokop. „Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction“. ChemMedChem.2009; Feb;4(2):177-87

2011 **Kater L.** „Praktisches Jahr in Kenia- So ist das Leben“. Deutsches Ärzteblatt Studieren.de, Heft 1/2011: S. 19-20

B. Kater, A. Hunold, H. G. Schmalz, **L. Kater**, B. Bonitzki, P. Jesse, A. Prokop. Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. J Cancer Res Clin Oncol 2011;137(4):639-649.

2012 **Kater L.** „Berufsstart in der Kinder- und Jugendpsychiatrie: Wenn die Maske zu bröckeln beginnt“. Deutsches Ärzteblatt Studieren.de, Heft 1/2012: S. 24

L. Kater, J. Claffey, M. Hogan, P. Jesse, B. Kater, S. Strauss, M. Tacke, A. Prokop. The role of the intrinsic FAS pathway in Titanocene Y apoptosis: The mechanism of overcoming multiple drug resistance in malignant leukemia cells. Toxicol In Vitro 2011;26(1):119-124.

6.2 Posterpräsentationen

2008 A. Prokop, L. Wagner, A. Selig, **L. Kater**, I. Winkler, T. Lauterbach, A. Gansäuer. Carbonyl- substituted Titanocenes, a new class of cytostatic agents against lymphoma and leukemia in childhood.

1. ICDDD, Dubai, World Trade Center, 4. -7.2.2008

A. Prokop, L. Wagner, A. Selig, **L. Kater**, I. Winkler, T. Lauterbach, A. Gansäuer. A new class of cytostatic agents: Carbonyl-substituted Titanocenes against lymphoma and leukemia in childhood.

Symposium on Medicinal Organometallic Chemistry (DFG), St. Martin, Germany, 2.5.-5.5.2008

2009 B. Kater, A. Hunold, H.G. Schmalz, **L. Kater**, L. Onambebe, B- Bonitzki, G. Henze, J. Eberle, A. Prokop. A novel Ferrocenyl analogue induces apoptosis in cancer cells and overcomes mechanisms of drug resistance.

DFG-Konferenz FOR 630, Kaiserslautern

2010 L. Onambebe, N. Hoffmann, H.G. Schmalz, **L. Kater**, B. Kater, J. Eberle, A. Prokop. Effects of a novel apoptosis-inducing cobalt organo-complex on lymphoma, leukemia and melanoma cells in vitro.

DFG-Konferenz FOR 630, Goslar 2010

S.Y. Lee, A. Hille, C. Frias, **L. Kater**, B. Kater, R. Gust, A. Prokop. [FeIII salophene (Cl)], a novel iron salophene complex with high antitumor activity, induces apoptosis via the intrinsic pathway and overcomes drug resistance in malignant lymphoma and leukemia cells.

DFG-Konferenz FOR 630, Goslar 2010

7 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Dr. Aram Prokop bedanken. Er hat meine Begeisterung für die Forschung geweckt und mich mit seinem ansteckenden Enthusiasmus, seinem umfassenden Fachwissen und seiner großen Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit sehr unterstützt.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Günter Henze, der mir diese Promotion ermöglicht hat. Ich bewundere sein außergewöhnliches Engagement in der Forschung und in der Klinik.

Besonders wichtig für den Erfolg meiner Arbeit war mein Bruder Benjamin, mit dem ich im Labor eng zusammengearbeitet habe und der mir immer wieder unschätzbare Hilfe geleistet hat. Ich danke auch den anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe: Soo, Corazon, Birgit, Mara, Patrick, Liliane, Laura, Anja, Ulli, Moritz und Susanne, mit denen ich eine unvergessliche Zeit verbringen durfte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Kind Phillip Stiftung für die Unterstützung meiner Arbeit durch ein Promotionsstipendium.

Zuletzt danke ich den Versuchstieren, die im Namen der medizinischen Forschung ihr Leben lassen müssen.