Apoptose und Autophagozytose in Krebszellen: Mechanismen des Zelltodes, verursacht durch σ-Rezeptor-Liganden und photoaktivierbare Pt^{IV}-Komplexe

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von
Katharina Korpis
geboren am 19.11.1983
in Peine

Greifswald, 19.12.2013

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser
1. Gutachter: Prof. Dr. Patrick J. Bednarski
2. Gutachter: Prof. Dr. Günther Bernhardt
Tag der Promotion: 08.04.2014

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

TABELLENVERZEICHNIS IX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS X

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der programmierte Zelltod (Apoptose) 1

1.1.1 Morphologie der Apoptose und Nekrose 2

1.1.2 Auslösende Faktoren der Apoptose 4

1.1.3 Die Funktion von Caspasen in der Apoptose 4

1.1.3.1 Initiatorcaspasen 5

1.1.3.2 Effektorcaspasen 5

1.1.4 Signaltransduktionswege der Apoptose 6

1.1.4.1 Der extrinsische Signalweg 6

1.1.4.2 Der intrinsische Signalweg 7

1.1.5 Proteine der Bcl-2-Familie 8

1.1.5.1 Proapoptotische Bcl-2-Proteine 8

1.1.5.2 Antiapoptotische Bcl-2-Proteine 9

1.1.5.3 BH-3-*only*-Proteine 9

1.2 Der Caspase-unabhängige Zelltod 10

1.3 Autophagozytose 11

1.3.1 Mechanismus 12

1.3.2 Signalwege 13

1.3.3 Autophagozytose als Form des programmierten Zelltodes 14

1.3.4 Die Autophagozytose in der Krebstherapie 15

1.4 Oxidativer Stress 15

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) 16

1.4.2 Lipidperoxidation (LPO) 16

1.5 Sigma-Rezeptoren 17

1.5.1 Der σ_1-Rezeptor 18

1.5.2 Der σ_2-Rezeptor 20

1.5.3 Lokalisation der σ-Rezeptoren 21

1.5.4 Mögliche Mechanismen der σ-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion 22
1.5.5 σ-Rezeptoren und Krebs 23

1.6 Photodynamische Therapie 24

1.7 Photoaktivierbare Chemotherapie (PACT) und Pt^{IV}-Komplexe 25

2 FRAGESTELLUNG 28

3 MATERIAL UND METHODEN 30

3.1 Allgemeines 30

3.2 Materialien 30
3.2.1 Zelllinien und Medium 30
3.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 31
3.2.3 Reagenzien und Chemikalien 33
3.2.4 Puffer 36
3.2.5 Antikörper 37
3.2.6 Ratten-Lebermikrosomen 38
3.2.7 Kits 38
3.2.8 Software 39

3.3 Methoden 40
3.3.1 Passagieren der Zellen 40
3.3.2 Bestimmung der Zellzahl 41
3.3.3 Einfrieren von Zellen 41
3.3.4 Auftauen von Zellen 41

3.4 Mikroskopie 42
3.4.1 Lichtmikroskopie 42
3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie: DAPI-Färbung 42

3.5 Photometrische Bestimmungen zur Messung der Zytotoxizität 43
3.5.1 Kristallviolett-Assay 43
3.5.2 MTT-Assay 45

3.6 Durchflusszytometrie 48
3.6.1 Annexin-V-Assay zur Apoptosebestimmung mittels Durchflusszytometrie 49
3.6.2 Zellzyklus-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie 51
3.6.3 Bestimmung der Caspase-Aktivität mittels Durchflusszytometrie 53
3.6.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) 54
3.6.4.1 Bestimmung der ROS nach Inkubation mit σ-Rezeptor-Liganden 54

3.6.4.2 Bestimmung der ROS nach photodynamischer Therapie 54
3.6.5 Bestimmung der Lipidperoxidation (LPO) mittels Durchflusszytometrie 55
3.6.6 Durchflusszytometrische Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) 55

3.7 Western Blot 56
3.7.1 Stimulation der Zellen 57
3.7.2 Zellaufbereitung 58
3.7.2.1 Gesamtprotein-Lysate 58
3.7.2.2 Zytosolische Proteinlysate 59
3.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford 60
3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) 61
3.7.5 Blotting 63
3.7.6 Anfärben der Membran mit Ponceau-S 64
3.7.7 Antikörperinkubation 65
3.7.8 Entwicklung der Membran 66
3.7.9 Strippen der Membran 66

3.8 HPLC-Untersuchungen 67
3.8.1 Reinheit 67
3.8.2 Metabolismus 68
3.8.2.1 HPLC-Untersuchung 70
3.8.2.2 Kopplung mit LC/MS 70

3.9 Statistik 71

4 ERGEBNISSE 72

4.1 Untersuchungen mit Sigma-Rezeptor-Liganden 72
4.1.1 Untersuchte Substanzen 72
4.1.2 Antiproliferative Wirkung von σ-Rezeptor-Liganden und Struktur-Wirkungs-Beziehungen 77
4.1.3 Lichtmikroskopische Veränderungen 88
4.1.4 Chromatinkondensation 92
4.1.5 Detektion der DNA-Fragmentierung in Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt 92
4.1.6 Zellzyklusanalyse 94
4.1.7 Nachweis der Apoptose mittels Annexin/PI-Färbung 95
4.1.8 (*S*)-11 und (*R*)-11 aktivieren Caspase-3 99
4.1.9 (*S*)-11 und (*R*)-11 führen zur Spaltung von PARP 100
4.1.10 (*S*)-11 und (*R*)-11 aktivieren Caspase-8 und Caspase-9. 101
4.1.11 Keine Detektion von Caspase-9-Spaltprodukten im Western Blot 102
4.1.12 Die σ-Ligand-induzierte Apoptose ist Caspase-unabhängig 104

4.1.13 (*R*)-11 senkt das mitochondriale Membranpotential ... 108
4.1.14 Freisetzung vom *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) ... 109
4.1.15 Regulation von pro-und antiapoptotischen Proteinen ... 110
4.1.16 Einfluss von (*R*)-11 auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ... 113
4.1.17 (*R*)-11 induziert zeitabhängig die Lipidperoxidation (LPO) ... 114
4.1.18 Funktion von Antioxidantien auf die (*R*)-11-induzierte LPO ... 115
4.1.19 Funktion der LPO in der σ-Ligand-induzierten Apoptose ... 117
4.1.20 Funktion der LPO auf die zytotoxischen Effekte von (*S*)-11und (*R*)-11 ... 120
4.1.21 (*S*)-11und (*R*)-11 aktivieren die Autophagozytose ... 121
4.1.22 Zusammenhang von σ-Ligand-induzierter Autophagozytose und LPO-Produktion ... 123
4.1.23 Einfluss von Inhibitoren der Autophagozytose ... 124
4.1.23.1 3-Methyladenin ... 125
4.1.23.2 Wortmannin ... 126
4.1.24 Einfluss von Wortmannin auf die Apoptoserate ... 127
4.1.25 Kombinationsversuche mit (*R*)-8 ... 127
4.1.25.1 Kombinierte Wirkung von (*R*)-8 mit Melphalan ... 127
4.1.25.2 Kombinierte Wirkung von (*R*)-8 mit Haloperidol ... 130
4.1.25.3 Kombinierte Wirkung von (*R*)-8 mit PB 28 ... 130
4.1.26 *In-vitro*-Metabolismusuntersuchungen mit (*S*)-8 ... 131

4.2 Ergebnisse der photodynamischen Untersuchungen von Pt^{IV}-Verbindungen ... 136
4.2.1 FM 165 induziert keine Apoptose ... 137
4.2.2 FM 165 aktiviert die Autophagozytose ... 138
4.2.3 FM 165 führt zur Bildung von ROS ... 139

4.3 Gegenüberstellung der untersuchten Substanzklassen anhand ihres zellulären Wirkungsspektrums ... 140

5 DISKUSSION ... 143

5.1 σ-Liganden mit antiproliferierender Wirkung ... 143

5.2 σ-Liganden induzieren Apoptose ... 146
5.2.1 σ-Liganden aktivieren Caspasen ... 147
5.2.2 Die induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Caspasen ... 148
5.2.3 Die Rolle der Bcl-2-Familie ... 149

5.3 Die Lipidperoxidation ist der Apoptose vorangeschaltet ... 150

5.4 σ-Liganden induzieren eine unvollständige Autophagozytose ... 153
5.4.1 Die Autophagozytose wird durch die LPO beeinflusst ... 155
5.4.2 Effekte der Autophagozytose-Inhibitoren ... 155
5.4.3 Die σ-Ligand-induzierte Autophagozytose ist nicht zellschützend ... 157

5.5 Kombinationstherapien 158

5.6 Fremdstoffmetabolismus von (*S*)-8 159

5.7 Weiterführende Fragestellungen 161

5.8 Photoaktiviertes FM 165 induziert keine Apoptose 162

5.9 FM 165 aktiviert die Autophagozytose 162

5.10 Photoaktiviertes FM 165 führt zur frühen ROS-Bildung 163

6 ZUSAMMENFASSUNG 164

7 ANHANG 167

8 LITERATURVERZEICHNIS 171

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 192

CURRICULUM VITAE 193

VERÖFFENTLICHUNGEN 194

DANKSAGUNG 196

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Graphische Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose moduliert nach Witting[15]..... 3
Abbildung 1.2 Signalwege der Apoptose adaptiert nach Fu & Shin.[33]..... 8
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung ausgewählter Bcl-2 Mitglieder und ihrer BH-Domänen[21]. 10
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Autophagozytose moduliert nach Jon Lieff.[50] .13
Abbildung 1.5 Postuliertes σ_1-Rezeptor Modell moduliert nach Fontanilla et al.[96] 19
Abbildung 1.6 2-D Pharmakophormodell modifiziert nach Glennon.[97,98] 20
Abbildung 1.7 3-D Pharmakophormodell des σ_1-Rezeptors nach Zampieri mit Benzo[*d*]oxazolon als Liganden.[99] 20
Abbildung 1.8 Strukturelle Übersicht photoaktivierbarer Pt^{IV}-Komplexe. 26
Abbildung 3.1 Normalisiertes Isobologramm für die nicht-konstante Kombination moduliert nach Chou[173]. 48
Abbildung 3.2 Repräsentative *Dot-Plot*-Darstellung zur Bestimmung apoptotischer Zellen...50
Abbildung 3.3 Repräsentatives Histogramm mit den Phasen des Zellzyklus. 52
Abbildung 3.4 Vereinfachte schematische Abfolge der Arbeitsschritte zur Herstellung zytosolischer Fraktionen. 60
Abbildung 4.1 Strukturen ausgewählter σ-Rezeptor-Liganden. 77
Abbildung 4.2 Typische morphologische Merkmale des apoptotischen Zelltodes. 89
Abbildung 4.3 Lichtmikroskopische Aufnahmen von RPMI 8226-Zellen (I). 90
Abbildung 4.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen von RPMI 8226-Zellen (II). 91
Abbildung 4.5 Detektion des kondensierten Chromatins. 92
Abbildung 4.6 Schematische Darstellung der sub-G_1-Population. 93
Abbildung 4.7 Quantitative Auswertung der sub-G_1-Zellpopulation. 94
Abbildung 4.8 Zeitabhängige Zellzyklusanalyse. 95
Abbildung 4.9 Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit σ-Liganden für 48 h. 96
Abbildung 4.10 Zeitabhängige Apoptoserate nach 6, 24 und 48 h. 97
Abbildung 4.11 Anteil der gesamtapoptotischen Zellpopulation. 98
Abbildung 4.12 Apoptose nach 72 h. 99
Abbildung 4.13 Prozentualer Anteil aktivierter Caspase-3. 100
Abbildung 4.14 Zeitabhängige Detektion der PARP-Spaltung. 101
Abbildung 4.15 Prozentualer Anteil aktivierter Caspase-8 und -9. 102
Abbildung 4.16 Zeitabhängige Detektion der Caspase-8-Spaltprodukte. 103
Abbildung 4.17 Zeitabhängige Detektion der Caspase-9-Spaltprodukte. 104

Abbildung 4.18 Einfluss des Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK auf die (*R*)-11 induzierte Caspase-3-Aktivierung. 105
Abbildung 4.19 Einfluss des Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK auf die (*S*)-11-induzierte sub-G_1- Population. 106
Abbildung 4.20 Einfluss des Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK auf die (*S*)-11 induzierte Apoptose. 107
Abbildung 4.21 Einfluss des Apoptose-Inhibitors (AI) M50054 auf die (*S*)-11 induzierte Apoptose. 108
Abbildung 4.22 Durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials (MMP). 109
Abbildung 4.23 Zeitabhängige, zytosolische AIF-Expression. 110
Abbildung 4.24 Zeitabhängige Bcl-2-Expression. 111
Abbildung 4.25 Zeitabhängige Bax-Expression. 112
Abbildung 4.26 Zeitabhängige Bid-Expression. 113
Abbildung 4.27 Detektion von ROS. 114
Abbildung 4.28 Einfluss von (*R*)-11 auf die Lipidperoxidation. 115
Abbildung 4.29 LPO-Detektion nach Vorbehandlung mit α-Tocopherol. 116
Abbildung 4.30 Einfluss des lipophilen Antioxidans α-Tocopherol auf die (*R*)-11-induzierte LPO. 117
Abbildung 4.31 Funktion von α-Tocopherol auf die Apoptoserate. 118
Abbildung 4.32 Funktion von *N*-Acetylcysein auf die Apoptoserate. 119
Abbildung 4.33 Einfluss von α-Tocopherol auf die zellwachstumshemmenden Eigenschaften. 121
Abbildung 4.34 Zeitabhängige Expression von LC3-II im Western Blot. 122
Abbildung 4.35 Zeitabhängige Expression von p62 im Western Blot. 123
Abbildung 4.36 Einfluss von α-Tocopherol auf die Expression von LC3-II und p62. 124
Abbildung 4.37 Einfluss von 3-MA auf die Expression von LC3-II und p62. 125
Abbildung 4.38 Einfluss von Wortmannin auf die Expression von LC3-II und p62. 126
Abbildung 4.39 Einfluss von Wortmannin auf die Apoptoserate. 127
Abbildung 4.40 Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit (*R*)-8, Melphalan oder in Kombination. 128
Abbildung 4.41 Normalisiertes Isobologramm. 129
Abbildung 4.42 Einzel- und Kombinationstherapie von (*R*)-8 und Haloperidol. 130
Abbildung 4.43 Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit (*R*)-8, PB 28 oder in Kombination. 131
Abbildung 4.44 Metabolische Stabilität von (*S*)-8. 132
Abbildung 4.45 HPLC-Chromatogramme der Phenobarbital-induzierten (*S*)-8-Probe. 133

Abbildung 4.46 DAD- und Ionenchromatogramme nach HPLC Phenobarbital-induzierter (*S*)-8-Proben. 134
Abbildung 4.47 Postulierter Metabolit des (*S*)-8. 135
Abbildung 4.48 FM 165 und die Referenzsubstanzen Cisplatin und Etoposid. 137
Abbildung 4.49 Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit lichtaktiviertem FM 165, Cisplatin und Etoposid. 138
Abbildung 4.50 Expression von LC3-II und p62. 139
Abbildung 4.51 Effekt von FM 165 auf die ROS-Produktion. 140
Abbildung 6.1 Postulierter Wirkmechanismus der untersuchten σ-Rezeptor-Liganden. 165
Abbildung 7.1 Repräsentative *Dot Plots* apoptotischer Zellen mit oder ohne z-VAD-FMK ..168
Abbildung 7.2 Expression ausgewählter Proteine nach Doxorubicin-Behandlung.....169
Abbildung 7.3 Expression der Autophagozytose-Marker LC3-II und p62 nach Doxorubicin-Behandlung. 170
Abbildung 7.4 Massenspektren der Phenobarbital-induzierten Mikrosomen nach Behandlung mit (*R*)-11 mit oder ohne NADPH. 170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Unterschiede zwischen apoptotischen und nekrotischen Zelltod.[16] 3
Tabelle 3.1 Übersicht der verwendeten Zelllinien. 30
Tabelle 3.2 Therapieschema der Kombinationsbehandlungen. 47
Tabelle 3.3 Eingesetzte Arbeitskonzentrationen der σ-Liganden. 49
Tabelle 3.4 Behandlungsschema der Western Blot-Proben. 58
Tabelle 3.5 BSA-Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Proteingehaltes. 61
Tabelle 4.1 Strukturelle Übersicht aller mono- und bizyklischen Piperazinederivate. 73
Tabelle 4.2 Übersicht der IC_{50}-Konzentrationen aller getesteten Verbindungen an ausgewählten humanen Krebszelllinien mittels Kristallviolett-Assay. 79
Tabelle 4.3 Übersicht der IC_{50}-Konzentrationen aller getesteten Verbindungen an den (Teil-)Suspensionszelllinien RPMI 8226 und HL 60 mittels MTT-Assay. 83
Tabelle 4.4 Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen. 85
Tabelle 4.5 Übersicht der überbrückten Piperazine von Holl und Sunnam.....87
Tabelle 4.6 CI-Werte für die Kombination von (*R*)-8 mit 4,25 µM Melphalan 129
Tabelle 4.7 Gegenüberstellung der spezifischen Charakteristika von (*S*)-11 und (*R*)-11 als σ-Rezeptor-Liganden mit der photoaktivierbaren Pt^{IV}-Verbindung FM 165. 141
Tabelle 7.1 Übersicht der K_i-Werte der synthetisierten Piperazin-Derivate von Frauke Weber.[186].....167

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AIF	*Apoptosis Inducing Factor*
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	*Apoptotic Protease Activating Factor 1*
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Adenin-Thymin
Atg	*Autophagy related genes*
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	*B cell lymphoma-2*
BiP	*ER Luminal Binding Protein*
BODIPY 665/67 C_{11}	(*E,*E)-4,4-Difluor-3,5-bis(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen
BSA	*Bovine Serum Albumin*, Rinderserumalbumin
CARD	*Caspase Recruitment Domain*
CDDP	Cisplatin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
CT	*Charge Transfer*
CYP 450	Cytochrom P 450
DAD	*Dioden Array Detector*
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DAPK	*Death Associated Protein Kinase*
2′,7′-DCF	2′,7′-Dichlorfluorescein
2′,7′-DCFDA	2′,7′-Dichlorfluorescindiacetat
DD	*Death Domain*
DED	*Death Effector Domain*
Diablo	*Direct IAP binding protein with low PI*
DISC	*Death Inducing Signaling Complex*
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DRP-1	*DAPK Related Protein-1*
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E64d	(*2S,3S*)-*trans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutan-ethylester
$EDTANa_2 \cdot 2\ H_2O$	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatrium-Dihydrat
EGF	*Epidermal Growth Factor*
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FADD	*FAS Associated Death Domain*
FCS	*Fetal Calf Serum*, Fetales Kälberserum
FLIP	*Flice-Inhibitory Protein*
GC	Guanin-Cytosin
$[^3H]N_3DTG$	Azido-1,3-di-*o*-tolylguanidin
HNE	4,Hydroxy-2(*E*)-nonenal
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
HtrA2	*High temperature requirement A2*
IAP	*Inhibitor of Apoptosis Proteins*
IC_{50}	*Inhibiting Concentration 50 %*, die Wirkstoffkonzentration, die das Zellwachstum um 50 % hemmt
IP_3	Inositoltrisphosphat
IPAG	1-(4-Iodophenyl)-3-(1-adamantyl)-guanidin
IU	Internationale Einheiten
K_i	Inhibitorische Konstante
LC3B	*Light Chain 3B*
LCMS	*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*
LED	*Light Emitting Diode*
LMCF	*Ligand to Metal Charge Transfer*
LPO	*Lipid Peroxidation*, Lipidperoxidation
M50054	2,2′-Methylenbis(1,3-cyclohexandion)
3-MA	3-Methyladenin
MAM	*Mitochondria Associated ER-Membrane*
MAP-LC3	*Microtubule Associated Protein-Light Chain 3*
MEF	*Mouse Embryonic Fibroblasts*
MEM	*Minimum Essential Media*

MM	Multiples Myelom
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MOMP	*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*
mTor	*mammalian Target of rapamycin*
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazoliumbromid
NAC	*N*-Acetylcystein
NMDA	*N*-Methyl-D-Aspartat
NRS	NADPH-Regenerationssystem
OD	Optische Dichte
PACT	Photoaktivierbare Chemotherapie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PE	Phosphatidylethanolamin
PBS	*Phosphat Buffered Saline*
PDT	Photodynamische Therapie
PGRMC-1	*Progesterone Receptor Membrane Component-1*
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PS	Phosphatidylserin
PUFA	*Poly Unsatturated Fatty Acids*, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RF	Resistenzfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	*Reactive Nitrogen Species*, reaktive Stickstoffspezies
ROS	*Reactive Oxygen Species*, reaktive Sauerstoffspezies
RP	*Reverse Phase*, Umkehrphase
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
SBDL	*Steroid Binding Domain-Like*
SD	*Standard Deviation*, Standardabweichung
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*, Natriumdodecylsulfat
Smac	*Second mitochondrial activator of capases*
SQSTM1	*Sequestosom 1*

TBST	Tris Buffered Saline (with) Tween
T/C_{corr} (%)	*Treated over Control, corrected in %*, prozentualer Anteil der überlebenden behandelten Zellen an den Kontrollzellen
TEMED	*N,N,N′,N′*-Tetramethylenethylendiamin
TNE	Tris-NaCl-EDTA
TNF	*Tumor Necrosis Factor*
TNFR	*Tumor Necrosis Factor Receptor*
α-Toco	α-Tocopherol
TRAIL	*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett
UVRAG	*Ultraviolett Radiation Resistance Associated Gene*
Vps 34	*Vacuolar protein sorting 34*
XIAP	*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Obwohl schon einige Jahre zuvor Merkmale des Zelltodes entdeckt wurden, beschrieben erstmals Kerr, Wyllie und Currie im Jahr 1972 die Apoptose.[1] Der Begriff stammt aus dem Griechischen und leitet sich von *apo* = „ab“ oder „los“ und *ptosis* = „fallen“ ab und steht für das Abfallen der Blätter der Bäume. Untersuchungen mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* lieferten erste Hinweise auf einen geregelten und genetisch kontrollierten Zelltod, da während der Entwicklung des Nematoden exakt 131 somatische Zellen absterben.[2] Dieser programmierte Zelltod spielt schon in der Embryogenese eine wichtige Rolle: Bei der Entwicklung von Fingern und Zehen werden zunächst Interdigitalhäute gebildet, die im weiteren Verlauf überflüssig werden und absterben.[3] Apoptose dient auch der Erhaltung der Gewebshomöostase, da in einem gesunden Organismus Zellneubildung (Proliferation) und Zelltod (Apoptose) im Gleichgewicht vorliegen müssen. So handelt es sich also um einen Prozess, an dem die Zellen aktiv an ihrem Untergang beteiligt sind. Wird diese Homöostase gestört, kann es zu Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer kommen, in denen eine erhöhte Apoptoserate Neuronen zerstört.[4] Krebserkrankungen dagegen basieren auf verminderten Apoptosefähigkeiten entarteter Zellen.[5] Desweiteren kann Apoptose auch als Verteidigungsmechanismus dienen, z. B. bei der Immunantwort oder äußerlichen Noxen.[6] Es existieren zahlreiche Stimuli, die jedoch nicht in jedem Zelltyp Apoptose auslösen müssen. Eine weitere Art des „klassischen“ Zelltodes ist die Nekrose. Im Gegensatz zur Apoptose werden die Zellen durch starke exogene Reize dermaßen geschädigt, dass ein kontrolliertes Absterben nicht mehr möglich ist. Beide Formen des Zelltodes können unabhängig voneinander, sequentiell oder auch simultan im Organismus ablaufen. Je nach Stimulus bzw. dessen Art, Dauer und Intensität kann die Apoptose und/oder Nekrose als Zelltodmechanismus ausgelöst werden. In geringen Dosen lösen z. B. ionisierende Strahlung, Chemotherapie oder Hypoxie zuerst den programmierten Zelltod aus, während steigende Konzentrationen die Nekrose einleiten. Auch das physiologische Milieu spielt eine entscheidende Rolle.[7-9] Neben der unkontrollierten Nekrose wird auch ein regulierter Mechanismus postuliert, der als Nekroptose bezeichnet wird.[10]

1.1.1 Morphologie der Apoptose und Nekrose

Durch Licht- und Elektronenmikroskopie konnten zahlreiche morphologische Veränderungen, die während der Apoptose ablaufen, identifiziert werden. Im frühen Verlauf der Apoptose schrumpfen die Zellen, sodass das Zellvolumen abnimmt, das Zytoplasma sich verdichtet und die Zellorganellen dichter gepackt sind. Es kommt zur Kondensation des Chromatins im Zellkern und schließlich zur Kernfragmentierung. Der Apoptose sind typischerweise einzelne Zellen bzw. kleine Zellcluster unterlegen, die sich abrunden und von den Nachbarzellen ablösen. Es kommt zur Bläschenbildung (*membrane blebbing*) und Membranausstülpungen, in denen schließlich das gesamte zelluläre Material in membranumhüllte Vesikel, den *apoptotic bodies*, abgeschnürt wird. Diese enthalten Zytoplasma und Zellorganellen mit oder ohne Kernfragment. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt die Plasmamembran jedoch intakt. Durch Externalisation des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der inneren Membranseite auf die Zelloberfläche der apoptotischen Zellen wird die Phagozytose angeregt, bevor es zur Zelllyse kommt.[11] Somit werden bei der Apoptose Entzündungsprozesse vermieden und Nachbarzellen nicht geschädigt. Die morphologischen und biochemischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose sind graphisch in Abbildung 1.1 sowie zusammenfassend in Tabelle 1.1 dargestellt.[1,12,13]

Neben den zwei „klassischen“ Formen des Zelltodes werden inzwischen weitere Arten, wie z. B. die Nekroptose als kontrolliert ablaufende Form der Nekrose oder die Autophagozytose diskutiert.[14] Letztere wird gesondert in Kapitel 1.3 beschrieben.

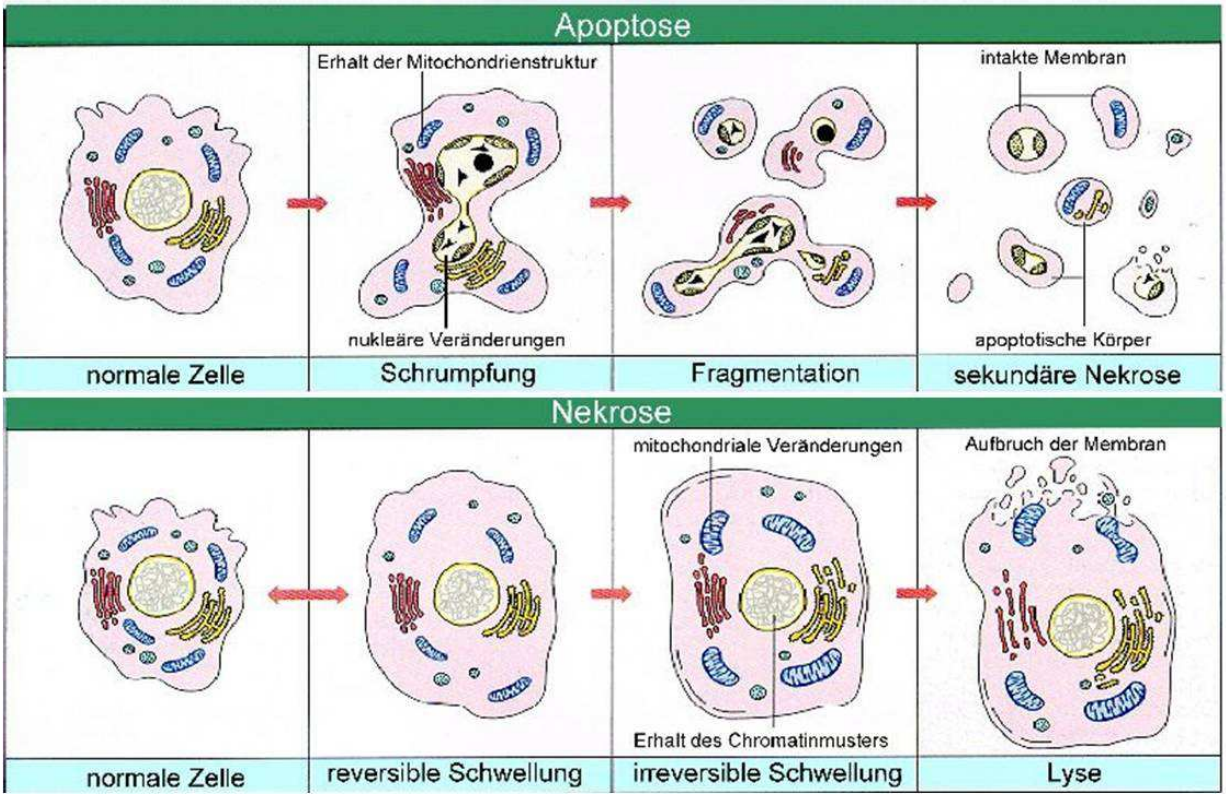


Abbildung 1.1 Graphische Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose moduliert nach Witting.[15]

Tabelle 1.1 Unterschiede zwischen apoptotischen und nekrotischen Zelltod.[16]

Apoptose	Nekrose
genetisch kontrolliert	keine genetische Kontrolle
keine Entzündungsreaktion	durch Zelllyse induzierte Entzündungsreaktion
ATP-abhängig	energieunabhängig
verringertes Zellvolumen	vergrößertes Zellvolumen
unbeschädigte Zellorganellen	Anschwellen der Zellorganellen
Chromatinkondensation	Auflockerung des Chromatins
DNA-Fragmentierung mit definierter Länge	DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge
Bildung von „*apoptotic bodies*“	vollständige Zelllyse
Phagozytose	Phagozytose der Zellreste
intakte Plasmamembran	Lyse der Plasmamembran

1.1.2 Auslösende Faktoren der Apoptose

Wie bereits erwähnt, können zahlreiche Stimuli Apoptose auslösen. Dazu zählen nicht-Rezeptor vermittelte Reize wie ionisierende Strahlung, Hypoxie, Hyperthermie, virale Infektionen, freie Radikale und Chemotherapeutika, die hauptsächlich DNA-Schäden hervorrufen.[8,17-19] Als Folge wird das Tumorsupressorgen p53 aktiviert, das über eine Expression von Zellzyklusinhibitoren diesen in der G_1-Phase arretiert bis die Schäden durch das zelluläre Reparatursystem behoben sind. Bei nicht korrigierbaren Schäden vermittelt p53 jedoch auch die Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg durch Induktion proapoptotischer Bcl-2-Mitglieder (siehe Kapitel 1.1.5.3).[16]

Daneben existieren die Rezeptor-vermittelten Stimuli. Dabei handelt es sich um extrazelluläre Liganden, die an transmembranäre Rezeptoren der Zellmembran („Todesrezeptoren“) binden. Physiologisch handelt es sich um Cytokine oder Oberflächenmoleküle benachbarter Zellen, die eng mit den Todesrezeptoren in Verbindung stehen. Die Liganden gehören der TNF-(*Tumor Necrosis Factor*)-Familie an und die Rezeptoren der TNF-Rezeptor-(TNFR)-Familie. Die bekanntesten Rezeptoren mit ihren Liganden sind der TNF-(*Tumor Necrosis Factor*)-1-Rezeptor/Ligand, FAS-(CD95 oder Apo-1)-Rezeptor/Ligand und der TRAIL-(*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand* oder DR4/DR5)-Rezeptor/Ligand.[16,20,21]

1.1.3 Die Funktion von Caspasen in der Apoptose

Die Aktivierung von Caspasen ist eine Gemeinsamkeit der in Kapitel 1.1.2 beschriebenen apoptotischen Stimuli. Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate nach Aspartat-Resten spalten. Im Menschen sind 14 verschiedene Formen bekannt, von denen sieben an der Apoptose beteiligt sind. Caspasen werden als inaktive Procaspasen (Zymogene) synthetisiert und werden im Allgemeinen nach ihrer Funktion, Struktur und der Art ihrer Aktivierung eingeteilt, wobei diese Einstufungen ineinander übergehen können. Generell existieren zwei Formen der Apoptose-beteiligten Caspasen: Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7). Außerdem sind Caspasen, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Caspase-1, -4 und -5) und weniger erforschte Caspasen (Caspase-11, -12, -13 und -14) zu nennen. Alle Procaspasen bestehen aus drei Regionen: Der N-terminalen Prodomäne sowie einer großen und kleinen

Untereinheit. Durch Eigenproteolyse oder aktivierende Proteine (FADD, Apaf-1) erfolgt zunächst die Abtrennung der Prodomäne und im Anschluss die Spaltung der Untereinheiten zur aktiven Caspase. Diese besteht aus einem Heterotetramer von zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (Dimere).[21-23]

1.1.3.1 Initiatorcaspasen

Initiatorcaspasen liegen in der Zelle als inaktive Monomere vor und werden nicht durch Hydrolyse sondern durch Dimerisierung aktiviert. In dieser Form können sie sich selbst zwischen der großen und kleinen Untereinheit spalten, was zur Stabilisierung des Dimers führt. Die Initiatorcaspasen besitzen lange Prodomänen mit Regionen, an die Adapterproteine binden. Die Bindung alleine reicht jedoch nicht zur Aktivierung der Initiatorcaspase aus, sondern erfolgt erst nach Dimerisierung. Je nach Caspase existieren unterschiedliche Regionen, Caspase-8 hat zwei *Death Effector Domains* (DEDs) und Caspase-9 *CAspase Recruitment Domains* (CARDs).[21,24]

1.1.3.2 Effektorcaspasen

Den Effektorcaspasen mit ihren kurzen Prodomänen fehlen die Regionen, an denen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen stattfinden können. Sie liegen als inaktive Dimere vor und werden durch aktive Initiatorcaspasen, die zwischen der großen und kleinen Untereinheit spalten, aktiviert.[21] Nach der Aktivierung regulieren Effektorcaspasen zahlreiche Proteine, die die Apoptose einleiten, wie z. B. die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly-(ADP-Ribose-)-Polymerase (PARP). Durch Inaktivierung des Proteins wird der Apoptosevorgang erleichtert und das für die PARP-Aktivierung benötigte ATP kann für den energieabhängigen Apoptoseprozess genutzt werden. Die PARP-Spaltung wird direkt durch Caspase-3 vorgenommen und signalisiert deren Aktivität.[25] Außerdem können Proteine gespalten werden, die zellzyklusregulierende Eigenschaften besitzen oder am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, und somit die Apoptose-typischen morphologischen Veränderungen der Zelle hervorrufen.

1.1.4 Signaltransduktionswege der Apoptose

Für die Aktivierung der Caspasen existieren zwei Hauptsignalwege, die im Folgenden näher beschrieben werden. Dabei handelt es sich um den Todesrezeptor-vermittelten extrinsischen Signalweg und den über Mitochondrien ablaufenden intrinsischen Signalweg. Beide Mechanismen können durch Amplifizierung ineinander übergehen und werden durch apoptotische Stimuli, die bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben wurden, ausgelöst.

1.1.4.1 Der extrinsische Signalweg

Da das CD95-Rezeptor/Ligand-System bisher am besten charakterisiert ist, wird anhand dieses Modells der extrinsische Signalweg erläutert.
Die auf der Zelloberfläche lokalisierten Todesrezeptoren liegen als Trimere vor und sind mit einer intrazellulären Todesdomäne, der *Death Domain* (DD) ausgestattet. Die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung der DD im Zytoplasma, die eine Wechselwirkung des Liganden mit dem zytoplasmatischen Protein FADD (*Fas Associated Death Domain*) erlaubt, das ebenfalls eine DD besitzt. Es kommt zur Ausbildung der *Death Effector Domain* (DED) am FADD-Protein. Die DED wiederum bindet an ihre analoge Form, die sich in der Prodomäne der Initiatorcaspase-8 befindet und zur Dimerisierung der Initiatorcaspase beiträgt (siehe Kapitel 1.1.3.1). Dieser Komplex aus Ligand, FADD und Procaspase-8 wird *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) genannt. Am DISC erfolgt die autokatalytische Spaltung zur aktivierten Caspase-8, die dann Effektorcaspasen spalten kann, welche schließlich die Apoptose induzieren.[21] Bei hohen Konzentrationen der Initiatorcaspase-8 wird durch deren autokatalytische Spaltung eine kaskadenartige Verstärkung der Reaktion begünstigt. Dies ist in sogenannten Typ I-Zellen (z. B. Lymphozyten) der Fall, während in Zellen vom Typ II (Hepatozyten, HL 60 Zellen) hingegen nur ein geringer Anteil an Caspase-8 aktiviert.[26] Daher wird die Signaltransduktion über den mitochondrialen Weg verstärkt, indem Caspase-8 das BH3-*only* Protein Bid an der Mitochondrienmembran zum *truncated* Bid (tBid) spaltet. Auf diese Weise geht der extrinsische in den intrinsischen Signalweg über (siehe auch Kapitel 1.1.5.3).[27,28] Nicht alle Zellen, die den CD95-Rezeptor exprimieren, gehen in die Apoptose über. Das der Caspase-8 ähnliche Protein FLIP (*FLice-Inhibitory Protein*) kann ebenfalls an FADD im DISC

binden. Durch Dimerisierung werden beide Proteine aktiviert, woraufhin Caspase-8 FLIP spaltet, jedoch nicht sich selbst. Somit wird keine Apoptose induziert.[29]

1.1.4.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch zelluläre Schäden ausgelöst, die zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP = *mitochondrial outer membrane permeabilization*) und schließlich zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) führen. Zur Apoptoseinduktion muss jedoch zunächst eine Initiatorcaspase aktiviert werden. In diesem Signalweg handelt es sich dabei um Caspase-9. Deren Aktivierung erfolgt über das Adapterprotein Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*), das zunächst als inaktives Monomer im Zytosol vorliegt. Cytochrom C, das infolge der MOMP ins Zytoplama freigesetzt wird, bindet dort an ATP und Apaf-1. Letzteres kann dann durch Oligomerisation mit seiner CARD-Domäne an die analoge Domäne der Procaspase-9 binden und das sogenannte Apoptosom bilden. Aktivierte Caspase-9 spaltet anschließend die nachgeschalteten Effektorcaspasen, die die Apoptose einleiten.[21,30] Neben dem Cytochrom C gelangen auch weitere Proteine in das Zytosol, wie z. B. Smac/Diablo (*Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with low PI*). Wie der Name erahnen lässt, erfolgt eine Caspaseaktivierung, die jedoch anders als beim Cytochrom C abläuft. Smac neutralisiert nämlich die Funktion des Proteins XIAP, einem endogenen Inhibitor von Caspase-9 und Effektorcaspasen (= IAP, *Inhibitor of Apoptosis Proteins*). Dabei bindet der Amino-Terminus von Smac genau an die Region vom XIAP, die mit der Caspase-9 in Wechselwirkung treten würde und veranlasst auf diesem Wege die Aktivierung der Caspase.[31] Ein weiterer Vertreter der IAP-Hemmer ist das HtrA2 (*High temperature requirement A2*)/Omi, das nach Freisetzung in das Zytosol, XIAP blockiert.[32] Beide Signalwege sind in Abbildung 1.2 zusammengefasst.

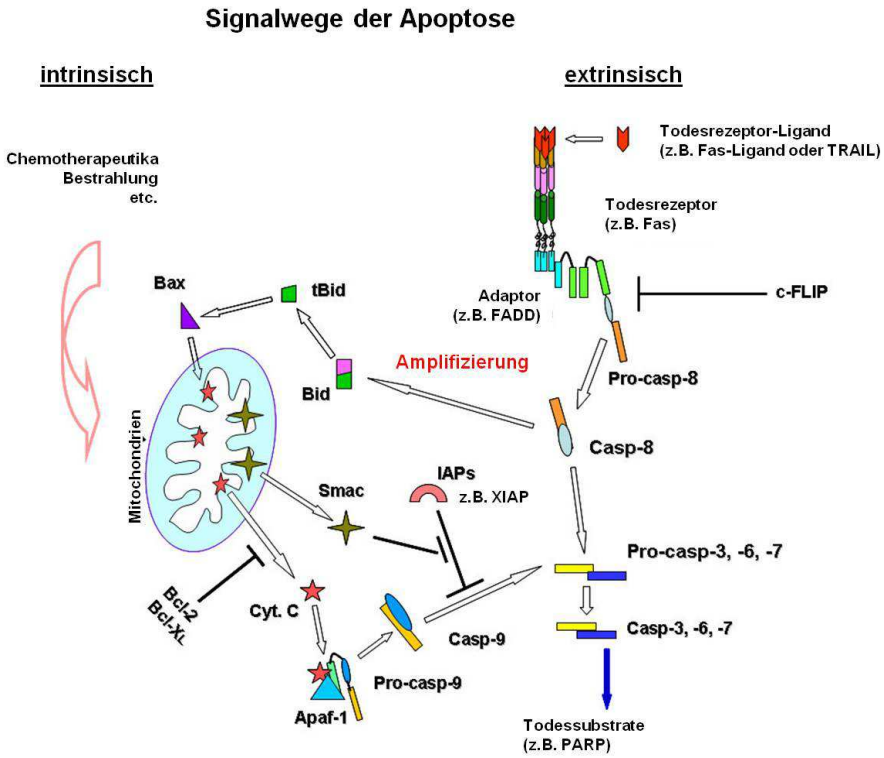


Abbildung 1.2 Signalwege der Apoptose adaptiert nach Fu & Shin.[33]

1.1.5 Proteine der Bcl-2-Familie

Die Kontrolle der Mitochondrien-vermittelten Apoptose wird entscheidend durch Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert, deren Name sich aus dem ersten beschriebenen Mitglied, *B cell lymphoma-2*, zusammensetzt. Beim Menschen sind bisher 20 verschiedene Mitglieder beschrieben, die sich in drei funktionelle Gruppen aufteilen und über ihre Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domänen) wechselwirken.[34]

1.1.5.1 Proapoptotische Bcl-2-Proteine

Bax, Bak und Bok/Mtd gehören der proapoptotischen Gruppe von Proteinen an, die gemeinsame BH-1, BH-2 und BH-3 Domänen besitzen. Während Bax gelöst im Zytosol vorliegt und bei Apoptoseinduktion ins Mitochondrium migriert, ist Bak mit der Carboxy-terminalen Seite bereits an das Mitochondrium gebunden. Nach Aktivierung verlagern sie sich in die äußere Mitochondrienmembran und bilden Oligomere, die Poren in der Membran formen. Man nimmt an, dass diese Poren durch ein Eingreifen der Oligomere in die Lipidanordnung der Zellmembran entstehen.[35] Die Wirkweise von Bok ist hingegen noch nicht genau bekannt, dessen Überexpression führt jedoch zum Zelltod.[21]

1.1.5.2 Antiapoptotische Bcl-2-Proteine

Zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen zählen neben Bcl-2 selbst u. a. Bcl-xL und Mcl-1, welche die Mitochondrien stabilisieren und somit den intrinsischen Signalweg blockieren. Sie besitzen eine charakteristische Bindetasche, die sich aus der BH-1-, BH-2- und BH-3-Domäne zusammensetzt und essentiell für die Apoptosehemmung ist. Die Bindung an BH-3-Domänen proapoptotischer Mitglieder kann jedoch nur unter hydrophoben Bedingungen stattfinden, die in der äußeren Mitochondrienmembran gegeben sind. Durch die Bindung wird eine, für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran notwendige, Oligomerisation aktivierter proapoptotischer Proteine verhindert. Dabei bindet die BH-3-Domäne von Bak bevorzugt mit der Bindetasche von Bcl-xL und Mcl-1, während Bax spezifisch mit Bcl-xL und Bcl-2 interagiert.[21,36]

1.1.5.3 BH-3-*only*-Proteine

Diese Gruppe der Bcl-2-Familie besitzt ausschließlich eine BH-3-Domäne, mit der sie an antiapoptotische Proteine binden kann, wobei die Bindung weniger spezifisch ist, als bei den proapoptotischen Mitgliedern. Bid, Bim und Puma können an die antiapoptotischen Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-xL binden, während Noxa bevorzugt mit Mcl-1 interagiert und Bad mit Bcl-2 und Bcl-xL. Exprimiert eine Zelle zwei antiapoptotische Proteine, so müssen auch beide neutralisiert werden, um die Apoptose auszulösen. Die BH-3-*only*-Mitglieder Bim und Bid sind in der Lage proapoptotisches Bax und Bak zu aktivieren und werden daher auch als „direkte Aktivatoren“ bezeichnet.[37,38] Der genaue Mechanismus der BH-3-Gruppe ist bisher noch ungeklärt. Es werden zwei Modelle postuliert, in denen diese Proteine zum einen die Wechselwirkung proapoptotischer mit antiapoptotischen Mitgliedern aufheben, wodurch proapoptotische Proteine selbstständig oligomerisieren und MOMP auslösen. Im zweiten Modell nimmt man an, dass Bim und Bid als „direkte Aktivatoren“ an antiapoptotische Mitglieder binden und von anderen BH-3-Proteinen verdrängt werden. So sind die direkten Aktivatoren in der Lage Bak und Bax zu aktivieren, während die antiapoptotische Gruppe durch die übrigen BH-3-Mitglieder neutralisiert wird.[21,39,40] Auch eine hohe p53-Aktivität regt die Expression proapoptotischer Proteine an: Puma wird durch p53 induziert und dessen Überexpression ist mit einem Anstieg der Bax-Expression verbunden.[7,41]

Dem Bid kommt eine besondere Rolle zu, da es beide Signaltransduktionswege der Apoptose miteinander vereinen kann. Dazu muss es jedoch erst gespalten werden, da die natürliche BH-3-Domäne für Interaktionen mit anderen Bcl-2-Mitgliedern nicht zugänglich ist. Nach erfolgter Spaltung, die durch Proteasen (z. B. Cathepsine, Calpaine oder Caspasen) vorgenommen wird, kann das *truncated* Bid (tBid) in die Mitochondrienmembran gelangen, und mit der exponierten BH-3-Domäne an andere pro- oder antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder binden. Bei der Amplifizierung der beiden Signalwege spaltet die Initiatorcaspase-8 des extrinsischen Signalweges Bid, das zu den Mitochondrien gelangt und den intrinsischen Weg einleitet.[28] Die Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über die Anordnung der BH-Domänen einiger Bcl-2-Mitglieder.

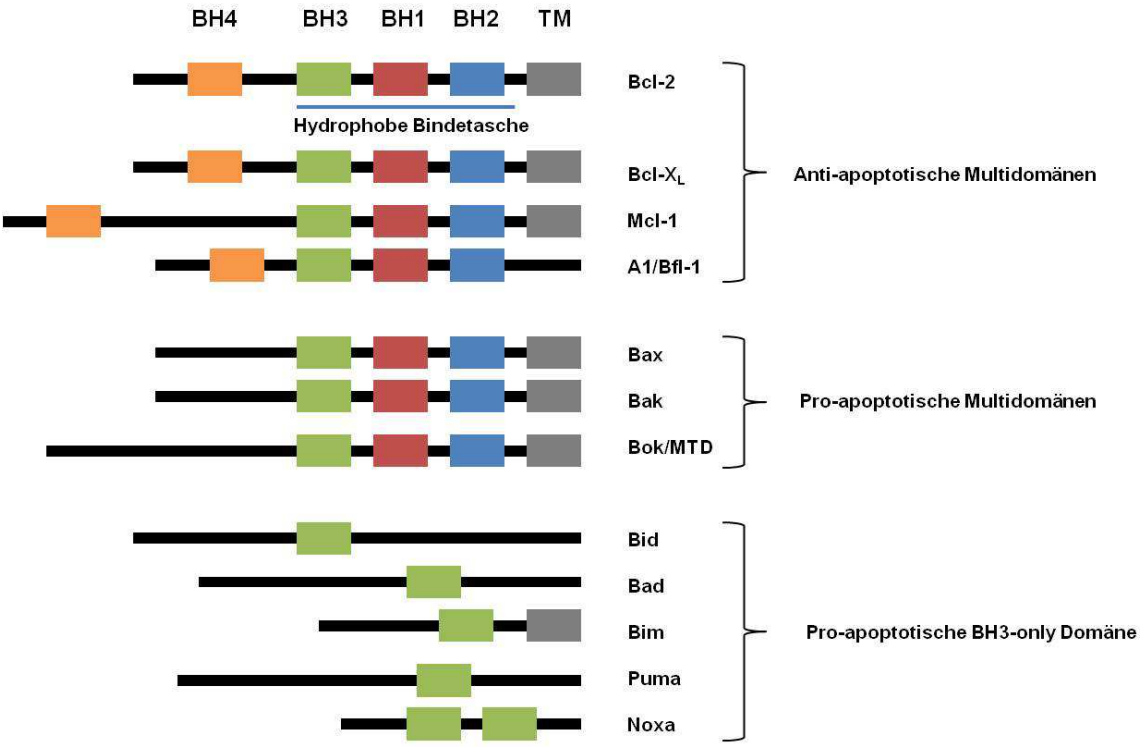


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung ausgewählter Bcl-2 Mitglieder und ihrer BH-Domänen.[21]
TM = Transmembranäre Domäne; die Liste gibt exemplarisch Mitglieder der einzelnen Gruppen an und ist nicht vollständig.

1.2 Der Caspase-unabhängige Zelltod

Wie in Kapitel 1.1.5 beschrieben, diffundieren infolge der MOMP Proteine aus den Mitochondrien ins Zytosol, die Caspasen aktivieren können. Daneben existiert jedoch

noch eine weitere Gruppe an Proteinen, die ohne Beteiligung von Caspasen zur Apoptose führt. Zu ihnen gehört der *Apoptosis Inducing Factor* (AIF).

In intakten Zellen liegt AIF an der inneren Membran des mitochondrialen Intermembranraumes fixiert vor und ist als Oxidoreduktase an physiologischen Prozessen, wie der oxidativen Regulation, beteiligt. Nach Permeabilisierung der Mitochondrienmembran können Proteasen diese Fixierung lösen, sodass AIF in das Zytosol und anschließend dort zum Kern transloziert. Charakteristische Merkmale der Apoptose, wie Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung werden verursacht, die nicht durch pharmakologische Caspase-Inhibitoren gehemmt werden können und somit keine Caspase-Aktivität erfordern.[42]

Neben der Bcl-2-abhängigen MOMP, in der AIF der Bcl-2-Familie nachgeschaltet agiert, wird ein weiterer Mechanismus der AIF-Freisetzung diskutiert, bei der das DNA-Reparaturenzym PARP-1 eine bedeutende Rolle spielt.[43] Dessen Überexpression führt, ohne Beteiligung von Caspasen, zur AIF-Freisetzung in das Zytosol, verbunden mit den morphologischen Apoptosemerkmalen, wobei die AIF-Freisetzung nicht durch die Caspase-Inhibitoren z-VAD-FMK und Baf unterdrückt werden kann. Als späte Ereignisse folgen dann erst die Cytochrom C-Freisetzung sowie die Aktivierung einiger Caspasen, die für die AIF-Freisetzung unwichtig scheinen. Die Abwesenheit der Caspase-3 ermöglicht dabei erst die Überaktivität des PARP-1, da es sich bei dem DNA-Reparaturenzym um ein direktes Produkt der Effektorcaspase handelt. Eine aktivierte Caspase-3 hätte damit sofort eine Spaltung und Inaktivierung des PARP-1 zur Folge. Bei diesem Denkansatz fungiert AIF der Bcl-2-Familie vorgeschaltet.[44]

1.3 Autophagozytose

Der Begriff Autophagozytose oder Autophagie leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet so viel wie „Selbstverdauung der Zelle“.[45] Die Autophagozytose ist ein regulierter Prozess, der nahezu in jeder Zelle vorkommt, um eine Aufrechterhaltung der Zellfunktion zu gewährleisten. Dieser Mechanismus dient in erster Linie als Überlebensstrategie der Zelle unter Stressbedingungen, wie z. B. Nährstoffmangel. Dabei werden zelluläre überschüssige Bestandteile abgebaut, indem sie von *de novo* ausgebildeten Doppelmembranen im Zytoplasma umhüllt werden. Durch Fusion dieser Autophagosomen mit Lysosomen erfolgt dann deren Abbau. Im Gegensatz dazu können übermäßige Level zum Zelltod führen. Man spricht daher auch von

einem nicht-apoptotischen, programmierten Zelltod vom Typ II (*Typ II programmed cell death*).[46]

Es existieren drei Arten der Autophagozytose, die alle den Abbau zytosolischer Zellbestandteile gemeinsam haben, jedoch aufgrund ihres Mechanismus bzw. ihrer Funktion in Chaperon-vermittelte, Mikro- und Makro-Autophagozytose aufgeteilt werden. Bei der Chaperon-vermittelten Form werden nur Proteine mit einem spezifischen Pentapeptid-Motiv über einen Rezeptor-vermittelten Prozess abgebaut, während bei der Mikroautophagozytose das Lysosom selbst für die Umhüllung der zu verdauenden Zellorganellen sorgt.[47]

Die (Makro-)Autophagozytose ist bisher am besten beschrieben und wird in der vorliegenden Arbeit als Autophagozytose bezeichnet und näher betrachtet.

1.3.1 Mechanismus

Im Säugetierorganismus beginnt die Autophagozytose mit der Ausbildung einer isolierten Membran, dem sogenannten Phagophor. Dabei handelt es sich womöglich um spezielle Membran-Cisterna unbekannten Ursprungs sowie um Membranen des endoplasmatischen Reticulums und des trans-Golgi-Netzwerkes.[48] Das Phagophor weitet sich aus und umschließt die abzubauenden Zellorganellen durch Bildung von doppelmembranären Autophagosomen. Diese fusionieren schließlich mit Lysosomen zu Autolysosomen, in denen lysosomale Enzyme den Vesikelinhalt mittels Hydrolyse verdauen.[49] Die dabei entstehenden Moleküle (u. a. Aminosäuren und Glukose) werden dann durch Permeasen oder Transporter zurück in das Zytosol rekrutiert, wo sie den Zellen erneut für die Proteinsynthese oder Metabolisierungsprozessen zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 1.4). Auf diese Weise können Zellen stressbedingte Situationen überdauern.[47]

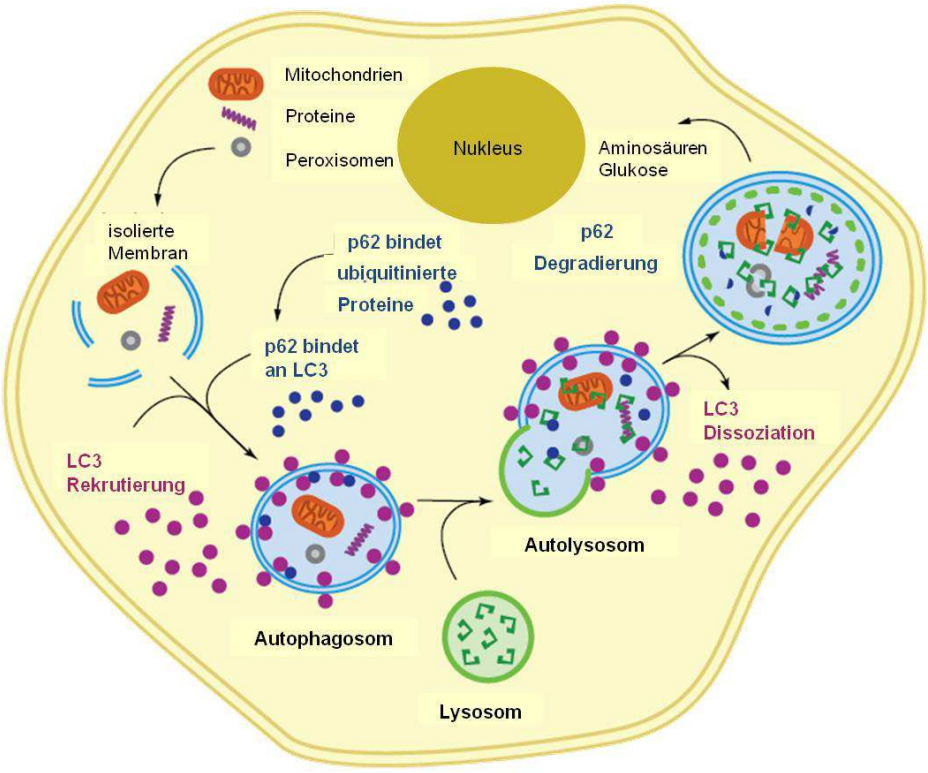


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Autophagozytose moduliert nach Jon Lieff.[50]

1.3.2 Signalwege

Autophagozytose kann durch verschiedene Signalwege ausgelöst werden. Allen gemeinsam ist die Beteiligung des Schlüsselenzyms mTor (*mammalian Target of rapamycin*), einer Serin/Threonin-Kinase. Unter nährstoffreichen Bedingungen verhindert mTor die Autophagozytose, indem es Autophagozytose-ähnliche Gene (*Autophagy related genes*, Atgs) reguliert.[51] Die Phosphorylierung durch eine AMP-Kinase hemmt mTor. Eine entscheidende Rolle in der Regulation spielt auch das Bcl-2-Mitglied Beclin-1. Dessen Freisetzung durch anti-apoptotisches Bcl-2 führt zur Komplexbildung mit der Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase Vps34 (*Vacuolar protein sorting 34*), UVRAG (*Ultraviolett Radiation Resistance Associated Gene*) und weiteren Genen und kontrolliert die Autophagosombildung. Außerdem führt die Konjugation zwischen Atg5 und Atg12 zu deren Oligomerisation und schließlich zur Anordnung auf der äußeren Membran des sich ausweitenden Phagophors.[52] Ein ebenso essentieller Schritt ist die Spaltung von MAP-LC3 (*Microtuble Associated Protein Light Chain-3*) durch Atg4 zur LC3-I-Form. Die nachfolgende Konjugation von zytosolischem LC3-I mit Phosphatidylethanolamin (PE), einem Phosphoglycerin, das

am Aufbau von Biomembranen beteiligt ist, führt zur LC3-II-Isoform. Diese ist an die Autophagosomen-Membran gebunden und stellt somit einen wichtigen Marker dieses Prozesses dar.[46,53,54] Eine Markerfunktion besitzt auch *Sequestosom 1* (SQSTM1; auch p62 genannt). Es ist ein Polyubiquitin-bindendes Protein, das am Aufbau zytosolischer Vesikel beteiligt ist und über direkte Bindung an LC3 Proteinaggregate zum autophagischen Verdau veranlasst.[55] Darüber hinaus kann es bei oxidativen Stress produziert werden.[56]

1.3.3 Autophagozytose als Form des programmierten Zelltodes

Die Autophagozytose dient der Zelle als Überlebensmechanismus bei Nährstoffmangel und ist dabei ein etablierter Vorgang zur Erhaltung der Zell- und Gewebshomöostase. Die Beseitigung von zerstörten, Apoptose-auslösenden Organellen, wie depolarisierten Mitochondrien, wurde in primären Hepatozyten entdeckt und unterstreicht die protektive Rolle gegenüber apoptotischen Prozessen.[57] Im Gegensatz dazu ermöglichen eben diese Eigenschaften aber auch das Überleben entarteter Zellen und die Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika.[58]

Dennoch können übermäßige Autophagozytoseraten zum Zelltod führen. Die Behandlung von MCF-7-Brustkrebszellen mit dem selektiven Estrogen-Antagonisten 4–Hydroxytamoxifen endet nach mehreren Tagen im Zelltod und der Bildung von Autophagosomen. Dieser Tumorzelllinie fehlt die Effektorcaspase 3. Daher wird angenommen, dass Zellen mit apoptotischen Defiziten auf den programmierten Zelltod vom Typ II ausweichen.[59] Autophagische Vesikel werden auch bei neurodegenerativen Krankheiten, wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, verzeichnet. Auf der einen Seite könnten sie dabei der Beseitigung von Proteinaggregaten dienen, andernfalls aber auch den Zellabbau beschleunigen.[60,61] Studien deuten auf eine Autophagozytose-Beteiligung bei der Caspase-unabhängigen Form des Zelltodes hin.[62] Ein Defizit der proapoptotischen Proteine Bax und Bak führt zu einem nichtapoptotischen Zelluntergang nach Gabe von Apoptose-auslösenden Chemotherapeutika. Dabei ist die Expression von Autophagozytose-Genen unerlässlich.[63] Desweiteren gibt es auch zahlreiche Moleküle, die für einen *„Cross talk“* beider Mechanismen sprechen. Beclin-1 gehört der Bcl-2-Familie an und besitzt eine BH-3-Domäne, die mit anti-apoptotischem Bcl-2 wechselwirkt. Eine Überexpression von Bcl-2 verhindert die Freisetzung von Beclin-1

und somit die Autophagozytose.[64] Inbal et al. berichten von zwei Ca^{2+}-Calmodulin-abhängigen Kinasen (DAPK = *Death Associated Protein Kinase*; DRP-1 = *DAPK Related Protein-1*), die sowohl an der Regulation der Membranausstülpungen während der Apoptose als auch an der Bildung autophagischer Vakuolen beteiligt sind.[65] Diese Beispiele verdeutlichen die Komplexität der Autophagozytose und ihrer Rolle als schützender bzw. Zelltod-auslösender Mechanismus.

1.3.4 Die Autophagozytose in der Krebstherapie

Die Steuerung von Autophagozytose-Vorgängen in der Krebstherapie stellt ein neues und vielversprechendes Konzept dar. Dabei stellt sich jedoch die Frage in welche Richtung (Aktivierung/Inaktivierung) diese Prozesse manipuliert werden müssen. Es existieren klinische Studien mit dem Autophagozytose-Hemmstoff Chloroquin in Kombination mit Carboplatin, Paclitaxel und Bevacizumab bei der Behandlung von Lungenkrebs, die zu einer signifikanten Verminderung der Tumorgröße infolge erhöhter Apoptoseraten führen.[66] Auch der σ_2-Rezeptor-Agonist Siramesin induziert auf diese Weise eine zellschützende Autophagozytose in MCF-7-Brustkrebszellen, die mit dem Hemmstoff 3-Methyladenin (3-MA) blockiert werden kann.[67] Die Behandlung mit 3-MA in Tumoren der Speiseröhre kann jedoch auch Autophagozytose induzieren und schließlich den programmierten Zelltod vom Typ II einleiten. Auch Kombinationstherapien mit mTor-Hemmern zur Autophagozytose-Aktivierung werden bereits in klinischen Studien angewandt.[68,69]
Diese gegensätzlichen Aspekte verdeutlichen erneut das paradoxe Thema Autophagozytose. Scheinbar hängen die beobachteten Mechanismen jeweils vom Tumorstadium und der Art der Krebsform ab.[64]

1.4 Oxidativer Stress

Im Zellstoffwechsel herrscht gewöhnlich ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen. Ein Übermaß oxidativer Reaktionen wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Dieses kann durch Überproduktion oxidativer Spezies oder durch verminderte Aktivität endogener, antioxidativer Enzyme hervorgerufen werden und an der Beteiligung einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt sein, wie. z. B. von Morbus Parkinson, rheumatoider Arthritis und Krebs.[70] Auf der anderen Seite können

reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auch für die Tumortherapie genutzt werden (siehe Kapitel 1.6).[71]

ROS unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktivität, Stabilität und ihrem radikalischen- bzw. nichtradikalischen Charakter. Neben dem Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) treten weitere Zwischenprodukte, wie das Superoxidanionenradikal ($O_2^{\bullet -}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($^{\bullet}OH$) auf, die bei der Reduktion von Sauerstoff in Wasser entstehen. Desweiteren werden auch Hypochlorit (OCl^-), Peroxylradikale ($ROO^{\bullet}$) und Alkoxylradikale ($RO^{\bullet}$) dazu gerechnet. Reaktive Stickstoffspezies (RNS), wie z. B. das Stickstoffmonoxid (NO) gehören einer eigenen Substanzklasse der reaktiven Spezies an. Die ROS können entweder durch Enzyme (Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase) oder durch nicht enzymatische Antioxidantien, sogenannte Radikalfänger (*scavenger*), wie Vitamin C und E, sowie Glutathion abgebaut werden.[72]

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Das Superoxidanion entsteht durch Reduktion von molekularem Sauerstoff. Das geringe Redoxpotential erlaubt keine Permeabilität von Membranen, da die Umwandlung durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid rasch erfolgt. Mit einer Halbwertszeit von einigen Sekunden und intrazellulären Konzentrationen im mikromolaren Bereich, ist das nicht-radikalische Wasserstoffperoxid in der Lage, Membranen zu durchdringen und kann enzymatisch durch Katalase oder Glutathionperoxidase entgiftet werden. In Anwesenheit von Chloridionen entsteht aus Wasserstoffperoxid über die Myeloperoxidase in den Granulozyten die bakterizid wirkende hypochlorige Säure (HOCl).[73] In Anwesenheit von Eisen(II)- und Kupfer(II)-Ionen wird in der Fenton-Reaktion aus Wasserstoffperoxid das aggressive Hydroxylradikal gebildet. Mit einem Redoxpotential von + 183 mV ist es sehr kurzlebig, die Halbwertszeit beträgt lediglich 1 ns und die meisten Reaktionen sind diffusionslimitiert.[74]

1.4.2 Lipidperoxidation (LPO)

Ein wichtiger Bestandteil von oxidativem Stress ist die Lipidperoxidation. Durch diverse Kettenreaktionen werden ROS/RNS-übermittelte Schäden auf Makromoleküle (DNA, Proteine, Lipide etc.) übertragen, sodass der LPO in der

Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie z. B. kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes mellitus oder eben Krebs eine bedeutende Rolle zukommt.[75]

Hauptinitiator ist das Hydroxylradikal, das aufgrund seines freien Elektrons eine besonders große Reaktivität besitzt und in der Lage ist, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA = *PolyUnsatturated Fatty Acids*) zu oxidieren. Durch Abstraktion von Wasserstoffatomen aus den aktivierten Methylengruppen der ungesättigten Fettsäuren entstehen durch Umlagerungsreaktionen konjugierte Diene, die mit molekularem Sauerstoff ein Peroxylradikal bilden, das in einer verzweigten Kettenreaktion den PUFAs wiederum Wasserstoffatome entziehen kann. Durch die Reaktion zweier Radikale miteinander bzw. durch Antioxidantien kann die Kettenreaktion beendet werden.[72,76] Sobald nicht jedes gebildete Hydroxylradikal abgefangen wird, sind immer Folgeschäden anzunehmen.[75] Folgen der LPO-Prozesse sind u. a. eine verringerte Fluidität der Membran verbunden mit einer erhöhten Permeabilität von Ionen und schließlich dem Abfall des Membranpotentials und der Freisetzung intrazellulärer Zellbestandteile.[77]

1.5 Sigma-Rezeptoren

Der σ-Rezeptor wurde 1976 erstmals von Martin et al. als Subtyp der Opioid-Rezeptoren klassifiziert, da die Wirkung des Benzomorphans *N*-Allylnormetazocin (SKF-100047) durch den Opioid-Antagonisten Naloxon aufgehoben werden konnte.[78] Dieses Ereignis erwies sich in späteren Versuchen jedoch als nicht reproduzierbar. Vielmehr bestätigte sich, dass Naloxon und dessen Analoga die psychotomimetische Wirkung nicht antagonisieren konnten.[79,80] Daher werden die σ-Rezeptoren mittlerweile als eigenständige Rezeptor-Klasse angesehen, die aus dem σ_1- und σ_2-Subtyp besteht.[81] Beide Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Molekülgröße, Verteilung im Gewebe und dem Ligandenbindungsprofil.[82] Außerdem zeigt sich eine Stereospezifität der rechtsdrehenden (+)-Benzomorphan-Enantiomere gegenüber dem σ_1-Rezeptor, während die (-)-Enantiomere an beide Subtypen zu binden vermögen.[83,84]

1.5.1 Der σ_1-Rezeptor

Der σ_1-Rezeptor ist bereits 1996 das erste Mal aus der Leber von Meerschweinchen kloniert worden.[85] Die Klonierung des humanen Rezeptors, sowie aus Ratten- und Mäusepräparationen konnte bisher ebenso erfolgreich durchgeführt werden.[86-88] Dabei sind die Gene innerhalb dieser Spezies zu 90 % identisch und zu 95 % ähnlich.[85] Desweiteren existiert eine 30 %ige Sequenz-Homologie zur Δ^8/Δ^7-Sterolisomerase der Hefe, die an der Cholesterol-Bildung beteiligt ist. Dabei weist der Rezeptor selbst keine Isomeraseaktivität auf und interessanterweise besteht auch keine weitere Homologie zu irgendeinem Säugetierprotein, selbst nicht mit der analogen Δ^8/Δ^7-Sterolisomerase.[89] Als endogene Liganden werden Neurosteroide wie z.B. Progesteron oder das Halluzinogen *N,N*-Dimethyltryptamin diskutiert, die jedoch nur geringe Bindungsaffinitäten besitzen (K_i-Wert: 268 nM für Progesteron bzw. 14 µM für *N,N*-Dimethyltryptamin).[90,91] Die Auswahl exogener Liganden mit Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich ist dagegen vielfältig und sehr heterogen im Bezug auf die chemische Struktur. Viele dieser Verbindungen (u. a. Haloperidol, Fluvoxamin) werden bei neurologischen bzw. psychischen Erkrankungen eingesetzt.[84,92] Dies spricht auch für die Lokalisation des σ_1-Rezeptorgens auf Chromosom 9 Band 13, einer Region, die mit psychischen Krankheiten in Verbindung gebracht wird.[93]

Das σ_1-Protein besteht aus 223 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 25,3 kDa.[85] Es beinhaltet drei hydrophobe Regionen, von denen zwei Regionen transmembranäre Domänen mit einem extrazellulären Loop und einem intrazellulären Carboxy- und Amino-Terminus darstellen, die dritte hydrophobe Region liegt im Carboxy-Terminus nahe der postulierten σ_1-Ligandenbindestelle.[94] Für die Bindung des Liganden sind dabei noch die sogenannten *Steroid Binding Domain-Like* (SBDL)-Regionen von Bedeutung. Dabei handelt es sich ebenfalls um hydrophobe Regionen, in der die SBDL-I im Bereich der zweiten Transmembrandomäne angeordnet ist und die SBDL-II im Bereich der dritten hydrophoben Region. Durch räumliche Annäherung der beiden Domänen stehen sie im direkten Kontakt zueinander.[95] Das Zusammenspiel aller hydrophoben Regionen scheint die Ligandenbindestelle auszumachen (Abbildung 1.5).

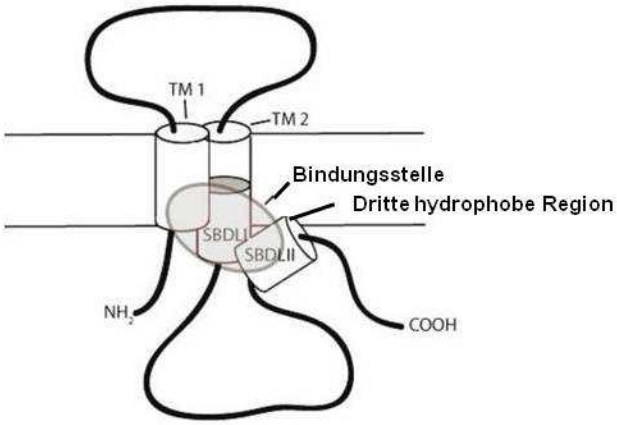


Abbildung 1.5 Postuliertes σ_1-Rezeptor Modell moduliert nach Fontanilla et al.[96]
TM = Transmembranäre Domäne.

Die Analyse auf gemeinsame Eigenschaften von untersuchten Verbindungen kann zur Erstellung von Pharmakophormodellen genutzt werden. Das für den σ_1-Rezeptor von Glennon et al. aus dem Jahr 1994 hat bis heute Gültigkeit, obwohl es sich dabei um ein 2D-Modell handelt.[97] Durch Struktur-Affinitäts-Beziehungen N-alkylierter Phenylalkylverbindungen konnten nach dem sogenannten „*Deconstruction-Reconstruction-Elaboration*"-Prinzip folgende essentielle Pharmakophorelemente geltend gemacht werden[98]:

- basisches Stickstoffatom (Amin) im Zentrum, das von zwei hydrophoben Gruppen umgeben ist
- Der Abstand der primären hydrophoben Gruppe zum zentralen Amin beträgt 6–10 Å, der der sekundären Gruppe 2,5–3,9 Å.

Die Reste der hydrophoben Gruppen können in ihrem sterischen Anspruch variieren (*Region of Bulk Tolerance*). Dabei wirkt sich ein Phenylrest oder eine vergleichbare Gruppe (z. B. Cyclohexylmethyl-Rest) positiv auf die Affinität aus. Die sekundäre hydrophobe Gruppe kann kleiner und das Amin kann zudem Teil eines Ringsystems sein. Abbildung 1.6 gibt schematisch das Pharmakophor wieder.

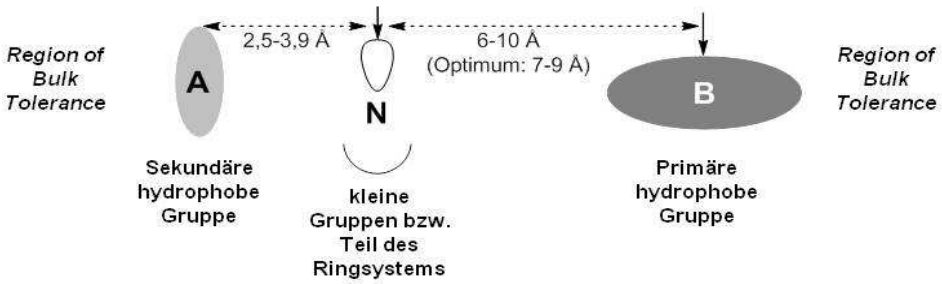


Abbildung 1.6 2-D Pharmakophormodell modifiziert nach Glennon.[97,98]

Das aktuellste 3D-*Binding*-*Site*-Modell wurde von Zampieri et al. mit Benzo[*d*]oxazolon-Liganden konzipiert.[99] Abbildung 1.7 zeigt, dass abweichend von dem Modell nach Glennon drei hydrophobe Regionen (hellblaue und violette Spheroide) postuliert werden, die das basische Zentrum (roter Spheroid; in diesem Modell als positiv ionisierbare Gruppe bezeichnet) flankieren. Der Abstand der Aromaten hierzu beträgt dabei 7,0 und 8,5 Å. Die grünen Spheroide stehen für Wasserstoffbrückenbildungs-Eigenschaften (kleinerer Spheroid: Donoratom des Pharmakophors; größerer Spheroid: Akzeptoratom des Rezeptors).[99]

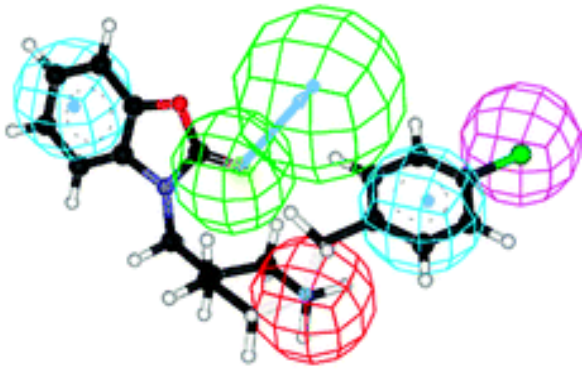


Abbildung 1.7 3-D Pharmakophormodell des σ_1-Rezeptors nach Zampieri mit Benzo[*d*]oxazolon als Liganden.[99]

1.5.2 Der σ_2-Rezeptor

Der σ_2-Rezeptor konnte bis heute nicht kloniert werden. Photoaffinitätsstudien mit radioaktiv markiertem [^{3}H]N_3DTG (Azido-1,3-di-*o*-tolylguanidin) ergaben zwei Proteinbanden von unterschiedlicher Größe. Da der klonierte σ_1-Rezeptor ein Protein von 25,3 kDa codiert, wurde das andere Protein, mit einer Größe von 21,5 kDa, dem

σ_2-Rezeptor zugeschrieben.[81] Xu et al. schlagen die *Progesterone Receptor Membrane Component 1* (PGRMC-1) als mögliche Binderegion des σ_2-Rezeptors vor.[100]

1.5.3 Lokalisation der σ-Rezeptoren

σ-Rezeptoren sind in vielen Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) vorhanden, insbesondere in Regionen, die mit Gedächtnis, Emotionen und der Motorik in Verbindung gebracht werden.[101] Desweiteren sind sie an der Modulation von Neurotransmittersystemen beteiligt. Die Regulation von NMDA-Rezeptoren legt einen Zusammenhang zwischen σ-Rezeptoren und Lernprozessen nahe.[102-104]
Besonders der σ_1-Rezeptor wurde bereits intensiv auf seine Funktion im ZNS untersucht, da dieser Subtyp mit der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen des ZNS in Verbindung gebracht wird. Dazu zählen u. a. Angst,[105] Depression,[103] Schizophrenie[106] und Psychosen,[107] aber auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson[108] und Morbus Alzheimer.[104,109] Daneben ist der σ_1-Rezeptor in peripheren Organen wie der Leber, den Nieren, der Lunge, dem Herz, den Hoden und Eierstöcken exprimiert.[81,110,111] Eine hohe Dichte wurde auch in embryonalen Stammzellen gefunden.[112] Auf zellulärer Ebene ist der σ_1-Rezeptor im Endoplasmatischen Reticulum (ER), genauer gesagt, an der Grenzfläche zum Mitochondrium lokalisiert (*Mitochondria Associated ER-Membrane*, MAM). Nach Hayashi und Su liegt er dort in Cholesterin- und Sphingomyelin-reichen Mikrodomänen vor, den sogenannten *Lipid Rafts*.[113] Infolge von Stress oder durch Bindung eines Liganden kann er auch zur Plasmamembran oder anderen subzellulären Kompartimenten wandern und wird daher auch als ER-Chaperon bezeichnet, das zwischen den jeweiligen Organellen Signale überträgt.[114-116]
Photoaffinitätsstudien ergaben für den σ_2-Rezeptor ebenfalls hohe Dichten im ZNS, der Leber, den Nieren und dem Herz, dabei war die Expression jedoch geringer als beim σ_1-Subtyp.[84] Auch auf zellulärer Ebene ist der σ_2-Rezeptor hauptsächlich im ER, den Mitochondrien und der Plasmamembran lokalisiert.[117]
Die hohe Expression beider Subtypen in Krebszellen wird gesondert in Kapitel 1.5.5 beschrieben.

1.5.4 Mögliche Mechanismen der σ-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion

Aktivierte σ_1-Rezeptoren sind in der Lage Ankyrin, ein IP_3-Rezeptor inhibierendes und zytoskeletales Protein, vom IP_3-Rezeptor (= Liganden-aktivierter Ca^{2+}-Kanal) abzuspalten, was zur Ca^{2+}-Freisetzung an der MAM ins Zytosol führt. Das Ca^{2+} dient den Mitochondrien zur Energiegewinnung.[118] In ihrer Chaperon-Funktion können σ_1-Rezeptoren mit einem weiteren Ca^{2+}-bindenden Chaperon, dem BiP (*ER Luminal Binding Protein*), einen Komplex eingehen. Su et al. beschrieben 2009, dass moderate Liganden- bzw. sinkende Ca^{2+}-Konzentrationen die Dissoziation von σ_1-Rezeptoren aus diesem Komplex begünstigen. Dadurch stabilisieren sie IP_3-Rezeptoren an der MAM und erhöhen die Ca^{2+}-Signalübertragung aus dem ER in die Mitochondrien. Höhere Konzentrationen oder die Überexpression des Rezeptors verursachen dagegen die Translokation der σ_1-Rezeptoren von der MAM zur Plasmamembran, wo sie Ionenkanäle modulieren können.[91,114] All diese Interaktionen werden der Carboxy-terminalen Region des Rezeptors zugeschrieben.[116] Die Beeinflussung des Ca^{2+}-Levels durch Modulation von *Lipid Rafts* konnte auch für σ_2-Rezeptoren in Brustkrebszellen nachgewiesen werden. So waren σ_2-Liganden in der Lage, konzentrationsabhängig Cholesterol-Spiegel zu erhöhen und gleichzeitig Sphingolipid-Spiegel zu senken.[119]

Die Modulation von Ionenkanälen nimmt eine wichtige Rolle in der Physiologie der σ-Rezeptoren ein, wobei die genauen Mechanismen der Signaltransduktion noch nicht eindeutig aufgeklärt sind. Die Inhibierung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle durch σ-Rezeptoren wird weder von zytosolischen Botenstoffen noch von einer G-Protein-Kopplung vermittelt.[120] Die Hemmung spannungsabhängiger K^+-Kanäle durch σ-Rezeptor-Liganden konnte in zahlreichen Zelltypen belegt werden.[121,122] Dabei können die Kanäle direkt moduliert werden (durch Protein-Protein-Wechselwirkungen). He et al. beschrieben jedoch erst kürzlich einen indirekten Vorgang durch Wechselwirkungen des Liganden mit einem funktionellen Komplex, bestehend aus dem σ_1-Rezeptor, dem $K_v2.1$-Kanal und einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor.[123] Auch Calcium-abhängige K^+-Kanäle werden mit dem σ_1-Rezeptor in Verbindung gebracht.[124] Der potentiell endogene σ_1-Rezeptor Ligand *N,N*-Dimethyltryptamin hemmt den $Na_v1.5$-Kanal und verursacht Hypermobilität in Mäusen.[125] Kürzlich ergaben Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie, dass der σ_1-Rezeptor direkt an den $Na_v1.5$-Kanal bindet.[126] Der σ_1-Subtyp hemmt darüber

hinaus auch volumenregulierte Chlorid-Kanäle, die bei der Zellproliferation wichtig sind.[121]

1.5.5 σ-Rezeptoren und Krebs

Obwohl zahlreiche Daten auf eine Beteiligung der σ-Rezeptoren in der Krebspathogenese hinweisen, konnte bis heute kein genauer Mechanismus identifiziert werden, der die Effekte dieser Rezeptorklasse im Detail aufklärt. Wie in Kapitel 1.5.4 beschrieben, ist der σ_1-Rezeptor als ER-Chaperon in der zellulären Ca^{2+}-Homöostase involviert. Studien belegen, dass der Rezeptor nur in Stresssituationen aktiviert wird und im gesunden Gewebe „ruht".[104] Sinkende Ca^{2+}-Konzentrationen im ER können Stress verursachen und schließlich zum Zelluntergang (Apoptose) führen.[127] Eine Ca^{2+}-Freisetzung ins Zytosol scheint sich auch auf autophagische Prozesse auszuwirken.[128]

Beide Rezeptor-Subtypen sind mit hoher Dichte in verschiedenen humanen Tumorzellen wie z. B. der Brust[129], dem Melanom[130], der Bauchspeicheldrüse[131], dem Multiplen Myelom[132], der Blase[133] und dem Gehirn[134] exprimiert. Für den σ_2-Rezeptor wurden in proliferierenden Zellen 10fach höhere Konzentrationen als in ruhenden Tumoren beobachtet.[135] Da viele Liganden ein Iodid- oder Fluorid-Atom in ihrer Struktur enthalten, wurden einige σ_2-Liganden bereits als Biomarker für die diagnostische Bildgebung zur Detektion von soliden Tumoren entwickelt und in präklinischen Studien eingesetzt.[107,117,136] Untersuchungen zu antiproliferierenden Eigenschaften von potentiellen σ-Liganden sind bisher in zahlreichen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien durchgeführt worden.[129,137-139] Dabei konnte für beide Subtypen die Apoptose als möglicher Zelltodmechanismus identifiziert werden.[130,140,141] Apoptotische Wirkungen wurden für σ_1-Antagonisten, σ_2-Agonisten und gemischte σ_1-Antagonisten/σ_2-Agonisten detektiert, während σ_1-Agonisten und σ_2-Antagonisten anti-apoptotische und z. T. neuroprotektive Eigenschaften besitzen.[129,142-144] Eine Ausnahme ist dabei der σ_1-Agonist 4-(*N*-Benzylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamid (4-IBP), der in nicht-toxischen Dosen die Effekte proapoptotischer Substanzen in Glioblastomzellen verstärken kann.[145] Darüber hinaus deuten zahlreiche Studien auf eine Caspase-abhängige Apoptose der σ_1-Antagonisten hin, während die durch σ_2-Agonisten aktivierte Apoptose unabhängig von Caspasen abläuft.[146-148] Abweichend berichten Hornick et al. jedoch auch von einer Caspaseaktivierung durch σ_2-Liganden.[140]

Megalizzi et al. und Ostenfeld et al. zeigten erstmals einen Zusammenhang zwischen σ-Rezeptoren bzw. deren Liganden und Autophagozytose. Letztere schlagen eine Kombinationstherapie des σ_2-Liganden Siramesin mit Autophagozytose-Inhibitoren vor, um so dem zellprotektiven Mechanismus entgegenzuwirken und die entarteten Tumorzellen in die Apoptose zu leiten.[67,148] Exzessive Autophagozytose kann jedoch auch direkt im Zelltod enden.[149-151]

Auch eine Beeinflussung des Zellzyklus ist für σ-Rezeptor-Liganden beider Subtypen dokumentiert. Dabei wird in verschiedene Phasen des Zellzyklus (G_1, S, G_2/M) eingegriffen.[121,130]

1.6 Photodynamische Therapie

Die tumor-lokalisierte Bestrahlung von nicht-toxischen, lichtaktivierbaren Substanzen, sogenannten Photosensitizern, mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Sauerstoff wird als „Photodynamische Therapie“ (PDT) bezeichnet. Durch lokale Gabe eines Photosensitizers kann dieser anschließend mit Licht geeigneter Wellenlänge selektiv aktiviert werden. Dabei kommt es zur Absorption von Photonen, wodurch die Photosensitizer vom Grundzustand in einen angeregten Singulett-Zustand angehoben werden. Je länger dieser Zustand anhält, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den ebenfalls angeregten, aber deutlich langlebigeren Triplett-Zustand. Molekularer Sauerstoff liegt hingegen bereits vorrangig in einem Triplett-Grundzustand vor. Da die Energie, die für einen Übergang in den angeregten Singulett-Zustand nötig wäre, geringer als die Energie des angeregten Photosensitizers ist, kommt es zu einem Energieaustausch, in dem beide Moleküle in einen Singulett-Zustand übergehen. Dabei entsteht der äußerst reaktive und langlebige Singulett-Sauerstoff, der durch Oxidation Zellen schädigen und u. a. Apoptose oder Autophagozytose auslösen kann (Typ-II-Reaktion).[17,152]

Daneben können aktivierte Photosensitizer über Redoxreaktionen auch andere ROS, wie z. B. freie Radikale (Hydroxylradikale) generieren (Typ-I-Reaktion). Auch Sauerstoff-unabhängige Mechanismen werden diskutiert, in denen der Photosensitizer direkt das Zielmolekül zerstört (Typ-III-Reaktion).[153]

Photosensitizer werden in Porphyrine und nicht-Porphyrine aufgeteilt. Photofrin®, ein Hämatoporphyrin-Derivat, ist der klassische Vertreter der ersten Generation der Porphyrine. Auftretende Nebenwirkungen wie suboptimale Gewebepenetration und verlängerte Photosensibilität der Haut führten jedoch zur Entwicklung von

Photosensitizern der zweiten Generation (z. B. Temoporfin, Foscan®), die in geringeren Dosen und Lichtintensitäten verabreicht werden können.[154] Desweiteren existiert auch eine dritte Generation, in der Photosensitizer der zweiten Generation mit Biomolekülen, wie z. B. monoklonalen Antikörpern, konjugiert sind. Da die Tumorzellen Oberflächenantigene besitzen, die sich von gesundem Gewebe unterscheiden, können die konjugierten Photosensitizer selektiv an das Zielgewebe binden und sich dort anreichern.[155] Zur Klasse der nicht-Porphyrin-Photosensitizer zählen kationische Verbindungen, wie z. B. das Phenothiazin-Derivat Methylenblau, die selektiv in die Mitochondrien gelangen und Apoptose induzieren können[156,157]. Ein weiterer Vertreter der nicht-Porphyrine ist das natürlich vorkommende Anthrachinonderivat Hypericin, das sich aufgrund seiner Lipophilie bevorzugt in Membranen anreichert und zu direkten Zell- und Gewebsschäden führt.[158-161]
Durch Einsatz von langwelligem Licht der Wellenlänge 600–800 nm erfolgt eine Eindringtiefe des Lichtes in Gewebeschichten von 0,5 bis 1 cm. Als Lichtquelle eignen sich hierbei Breitbandstrahler mit Wellenlängenfiltern, Leuchtdioden (LED), und Laser. Die Bestrahlungsdauer liegt, abhängig vom jeweiligen Photosensitizer, zwischen wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden.[162]

1.7 Photoaktivierbare Chemotherapie (PACT) und Pt^{IV}-Komplexe

Die photoaktivierbare Chemotherapie ist ein weiterer Ansatz auf dem Gebiet der Phototherapie. Anders als bei der PDT, wird ein Chemotherapeutikum *in-situ* aus seiner Prodrug-Form durch Licht im sichtbaren Bereich photoaktiviert, ohne dass Sauerstoff benötigt wird. Photoaktivierbare Chemotherapeutika stehen daher seit einigen Jahren als potentielle Antitumorwirkstoffe im Interesse der Forschung. Übergangsmetall-Komplexe, wie die Pt^{IV}-Komplexe sind aufgrund ihrer Photochemie für die PACT optimal geeignet und in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.[163,164]

Im Vergleich zu quadratisch planaren Pt^{II}-Verbindungen sind die oktaedrischen Pt^{IV}-Komplexe unter biologischen Bedingungen stabiler und dienen zytotoxischen Pt^{II}-Substanzen als Prodrug. Zu den ersten Substanzen dieser Klasse zählen Verbindungen mit einem Ethylendiamin-Grundgerüst und Iodido als reduzierenden Liganden. Die axiale *trans*-Position nehmen Chlorido-, Hydroxido-, Acetato- oder Methansulfonato-Liganden ein.[165] Da diese Komplexe jedoch leicht durch biologische Reduktionsmittel, wie Glutathion oder *N*-Acetylcystein, zu den korrespondierenden Pt^{II}-Spezies reduziert werden können und auch ohne

Lichteinfluss relativ wirksam sind, ist ihr Einsatz in der Photodynamischen Therapie nicht effizient.[162]

Durch Synthese von Analoga, die zwei Azido-Liganden als wichtiges Strukturelement enthalten, konnten ausreichend stabile Pt^{IV}-Komplexe entwickelt werden. Hierbei wird der sonst nachteilige Effekt der Photolabilität ausgenutzt, da der Diazido-Pt-Komplex direkt zu Pt^{II} unter Abspaltung von zwei Azidradikalen ($N_3^{\bullet}$) reduziert werden kann. Letztere zerfallen zu molekularem Stickstoff (N_2) und können nicht mehr weiter reagieren.[166,167] Der Einsatz von Hydroxyliganden verbessert die Wasserlöslichkeit sowie die Stabilität der vierwertigen Komplexe. Desweiteren hängt das Potenzial dieser Komplexe von den substituierten stickstoffhaltigen Liganden (Pyridin ≈ Piperidin > Amin) und ihrer Konfiguration (*trans* > *cis)* ab. Abbildung 1.8 zeigt eine Übersicht ausgewählter photoaktivierbarer Pt^{IV}-Komplexe.

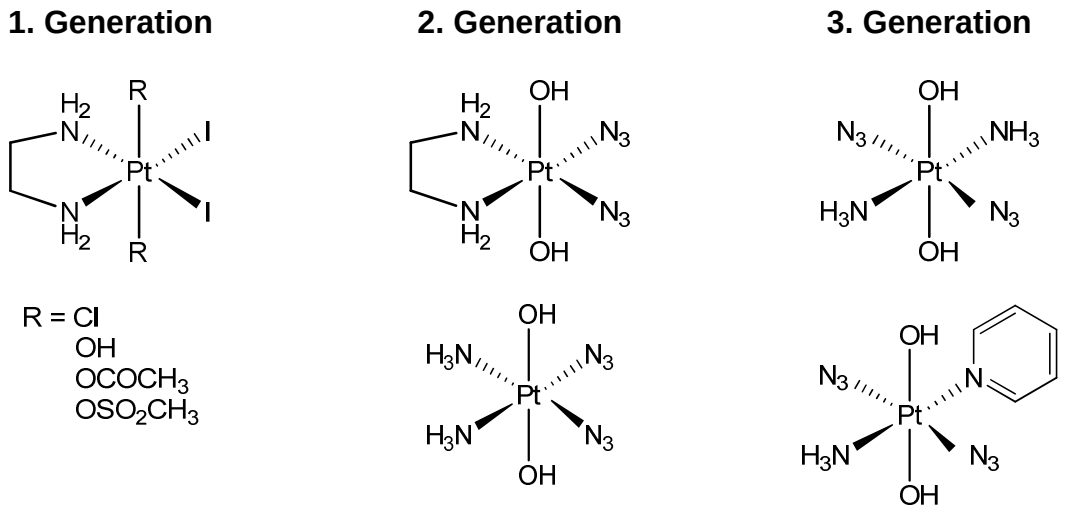


Abbildung 1.8 Strukturelle Übersicht photoaktivierbarer Pt^{IV}-Komplexe.

Bei der Photoaktivierung der Pt-Verbindungen erfolgt eine Typ-III-Reaktion, die unabhängig von Sauerstoff abläuft (siehe auch Kapitel 1.6). Das nicht-toxische Pt^{IV}-Prodrug reichert sich in bzw. um das Tumorgewebe an und wird durch Anregung mit langwelligem Licht (600–800 nm) entweder direkt zum chemotherapeutischen Pt^{II}-Derivat umgewandelt oder zu Pt^{III}-Verbindungen reduziert, die wiederum mit dem Liganden reagieren können oder durch eine weitere Ein-Elektronen-Reduktion zum Pt^{II} abgebaut werden. Die Photochemie beruht auf Anregung von Elektronen in sogenannte *Ligand to Metal Charge Transfer* (LMCT)-Banden. Hierbei handelt es sich um *Charge-Transfer*-(CT)-Übergänge, bei denen Elektronen vom Liganden zum Metallzentrum übertragen werden. Durch diese Verschiebungen der

Elektronendichte können Redoxreaktionen und Bindungsspaltungen begünstigt werden.[168] Platin akkumuliert auf diese Weise nur nach Lichtanregung in den Tumorzellen und bindet dort an zelluläre DNA, was u. a. zum Abbruch der RNA-Polymerase führen kann.

Während die antiproliferierende Wirkung von Cisplatin auf apoptotischen Prozessen beruht, können bei den Pt^{IV}-Verbindungen keine typischen Charakteristika der Apoptose, wie z. B. DNA-Kondensation oder Membranausstülpungen nachgewiesen werden. Daher wird ein abweichender Wirkmechanismus im Vergleich zu klassischen Pt^{II}-Verbindungen angenommen.[162,163]

2 Fragestellung

In der Tumorforschung liegt ein wesentliches Interesse in der Entwicklung neuer, selektiv wirkender Chemotherapeutika, um auftretende Resistenzentwicklungen bekannter Zytostatika zu umgehen oder geringere Nebenwirkungspotentiale zu generieren. Um zielgerichtet Tumore in der Therapie bekämpfen zu können, sollen dazu auch die Signalwege und Wirkmechanismen der eingesetzten Substanzen aufgeklärt werden. Dabei spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle, denn Chemotherapeutika nutzen oftmals diese Form des programmierten Zelltodes, um die Tumorzellen zu eliminieren. In den letzten Jahren ist die Autophagozytose in das Interesse der Forschung gerückt. Neben ihrer ursprünglichen Schutzfunktion erweist sie sich als vielversprechender Ansatz in der Tumortherapie.

Sigma-Rezeptoren und ihre Liganden stehen seit einigen Jahren ebenso im Interesse der Krebsforschung, sowohl in der Diagnostik, als auch als potentielle Therapieoption zur Behandlung verschiedener Krebsarten, obwohl ihr Signalweg bis heute nicht genau aufgeklärt ist. Besonders σ_1-Antagonisten und σ_2-Agonisten können antiproliferierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Neben der klassischen Apoptose, werden auch Caspase-unabhängige Formen des Zelltodes diskutiert.

Aber nicht nur neuartige Wirkstoffklassen sind von Interesse. Ein weiterer Ansatz liegt in der Optimierung von bereits bekannten Substanzen, wie es bei den Platinzytostatika der Fall ist. Durch ihre photochemischen Eigenschaften lassen sie sich als photoaktivierbare Chemotherapeutika einsetzen, wo sie selektiv im Tumor durch Licht aktiviert werden können.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher diese zwei unterschiedlichen Substanzklassen auf ihre antiproliferierenden Eigenschaften zu untersuchen und insbesondere die Beteiligung von Apoptose und Autophagozytose als mögliche Zelltodmechanismen dieser Wirkstoffkandidaten näher zu betrachten.

Dazu sollten die in einem Kooperationsprojekt mit dem Arbeitskreis von Professor Bernhard Wünsch an der Universität Münster synthetisierten σ-Rezeptor-Liganden zunächst auf ihre antiproliferierenden Fähigkeiten untersucht werden. Durch im Arbeitskreis etablierte Färbetechniken (Kristallviolett- oder MTT-Assay) wurde eine Reihe verschiedener humaner Krebszelllinien mit den Verbindungen auf deren Zytotoxizität getestet. Die resultierenden Ergebnisse sollten zusammen mit der

experimentell bestimmten Rezeptoraffinität (Universität Münster) in Struktur-Wirkungs-Beziehungen einfließen, um durch systematische Variation der Strukturelemente potentielle Liganden für den σ-Rezeptor zu identifizieren.

Bei Verbindungen mit guten zellwachstumshemmenden Eigenschaften ($IC_{50} < 20$ µM) sollte in RPMI 8226-Zellen, einer Zelllinie mit hoher σ_1-Rezeptor-Dichte, die Fähigkeit Apoptose auszulösen detailliert getestet werden. Dazu sollten anerkannte Eigenschaften, wie etwa die Chromatinkondensation und Caspase-Aktivität herangezogen werden. Außerdem sollte der Mechanismus einer möglichen Apoptoseinduktion charakterisiert werden. Dazu sollten mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Western-Blot-Analysen typische Schlüsselmoleküle detektiert werden. Darüber hinaus sollte auch der Einfluss dieser Substanzklasse auf die Autophagozytose näher betrachtet werden.

Um Angaben über die metabolische Aktivität der Verbindungen machen zu können, sollte mittels HPLC der Effekt der Liganden auf Leberpräparationen der Ratte ermittelt werden. Neben unbehandelten Mikrosomen sollten auch Arzneistoff-induzierte Fraktionen benutzt werden, um auf das beteiligte Cytochrom P 450 (CYP 450)-Isoenzymsystem zu schließen. In weiterführenden LC/MS-Untersuchungen sollte auch die metabolische Stabilität berücksichtigt werden, um entstehende Metabolite strukturell aufklären zu können.

Die im Arbeitskreis Bednarski nachsynthetisierte photoaktivierbare Pt^{IV}-Verbindung *trans,trans,trans*-$[Pt(N_3)_2(OH)_2(NH_3)(py)]$, die im Arbeitskreis von Prof. Peter Sadler (University of Warwick, UK) entwickelt wurde und für die bereits antiproliferierende Eigenschaften in der humanen Leukämie-Zelllinie HL 60 dokumentiert wurden, sollte ebenso auf ihre Fähigkeiten Apoptose und bzw. oder Autophagozytose auszulösen, analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Alle Puffer und Lösungen wurden mit ultrareinem Wasser hergestellt, das über eine MilliQ/Elix3-Anlage durch Umkehrosmose und Filtration entmineralisiert wurde.
Alle Chemikalien haben *p.a.*-Qualität, sofern nicht anders angegeben.
Alle Chemikalien und Kits wurden nach Angaben des Herstellers nach ihrer physikalischen und chemischen Stabilität gelagert.

3.2 Materialien

3.2.1 Zelllinien und Medium

Die verwendeten humanen Krebszelllinien stammen alle vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) und können der Tabelle 3.1 entnommen werden.

Tabelle 3.1 Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Organ/Gewebe	Verdopplungszeit (h)	Wachstum
A427	Lunge (kleinzellig)	38	adhärent
5637	Harnblase	30	adhärent
DAN-G	Pankreas	42	adhärent
LCLC-103H	Lunge (großzellig)	40	adhärent
MCF-7	Brust	63	adhärent
RT-4	Harnblase	44	adhärent
HL 60	Akute myeloische Leukämie	22	Suspension
RPMI 8226	Multiples Myelom	72	Suspension/adhärent

- Standardmedium: RPMI 1640 + 10 % fetales Kälberserum (FCS) + Penicillin G (300 mg/10 l) und Streptomycinsulfat (400 mg/10 l)

- Medium für RT-4-Zellen: 55 mg Natriumpyruvat in 5 ml *Minimum Essential Media* (MEM) lösen und in Standardmedium (500 ml) steril filtrieren
- Einfriermedium: 70 % Standardmedium + 20 % FCS + 10 % DMSO

Alle Zellen wurden in Standardmedium kultiviert, abweichend wurde die RT-4-Zelllinie zusätzlich mit Natriumpyruvat und MEM versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5%iger CO_2-Begasung in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre.

3.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Absaugsystem Vacuboy	IBS-Integra, Eschenbach, Schweiz
Analysenwaage MC1	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Anthos Plattenphotometer 2010	Anthos, Krefeld, Germany
Aperge Stickstoffbehälter	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
BiCell-Gefäße	Nihon Freezer Co., LTD, Tokyo, Japan
Brutschrank HERAcell	Kendro, Hanau, Deutschland
ChemoCam Intas	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
Coulter Counter Z2	Beckman-Coulter, Miami, FL,USA
Cryo-Einfrierbehälter	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Cryo-Röhrchen 2 ml	Merck, Eurolab, Darmstadt, Deutschland
D-7000 HPLC System Manager (HSM)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Digitalkamera DSLR- A100	Sony, Minato, Tokyo, Japan
Durchflusszytometer MacsQuant™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Einwegspritzen 1 ml	Braun Medical Inc. Bethlehem, PA, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Evaporator EVA EC L	VLM GmbH, Bielefeld, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 3.1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
RP-HPLC-Säule CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 AB	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
HPLC Säule Chromolith® SpeedRod RP-18 endcapped, 50 mm	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isoton®	Beckman Coulter, Miami, FL, USA

Kulturflaschen 25 cm^2, 75 cm^2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Laminar-Flow-Box HERAsafe	Kendro, Hanau, Deutschland
Lampen λ = 365 nm	Luzchem Research Inc., Ontario, Kanada
LC/MS Solution Version 3.41	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Netzgerät EV 231	Consort, Turnhout, Belgien
Nitrocellulosemembran Protran Ba 83	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm	VWR, Hannover, Deutschland
pH-Meter p539	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Labopette® 100 µl	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Hannover, Deutschland
Pipettierhilfe Accu Jet® *pro*	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Plattenphotometer Tecan Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Schüttler TiMix 5	E. Bühler, Hechingen, Deutschland
SDS-Gel-Apparatur Minigel-Twin	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µM	Millipore, Bedford, MA, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy Ministar	VWR, Hannover, Deutschland
Ultraschallbad Qualilab	Merck, Bruchsal, Deutschland
Wasseraufbereitung MilliQ/Elix3	Millipore, Bedford, MA, USA
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Western Blotter MWB 3	Merck Eurolab Poole, Dorset, UK
6-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-(Mikrotiter)Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatmann-Filterpapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vortexer Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Kendro, Hanau, Deutschland

3.2.3 Reagenzien und Chemikalien

Accutase™ (Art.Nr. L02-007)	PAA, Cölbe, Deutschland
Acetonitril (ACN), ultrapurer Reinheitsgehalt (Art.Nr. 20060.320)	VWR, Hannover, Deutschland
Ameisensäure (Art.Nr. 06446)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Art.Nr. 9592)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BODIPY 665/67 C_{11} (Art.Nr. B3932)	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Bovine Serum Albumin (BSA) (Art.Nr. A7906)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau (Art.Nr. A512)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
tert-Butylhydroperoxid (Art. Nr. 458139)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) (Art.Nr. 1479.1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cisplatin (Art.Nr. GA8978)	Chempur, Karlsruhe, Deutschland
Color Plus Prestained Protein Marker, Broad Range (7–175 kDa) (Art.Nr. P7709V)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) (Art.Nr. D8417)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2′,7′-Dichlorfluorescindiacetat (2′,7′-DCFDA) (Art.Nr. D6883)	
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazoliumbromid (MTT) (Art.Nr. M2128)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (Art.Nr. 6908)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMF für Spektroskopie (Art.Nr. 1.02937)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO für Molekularbiologie (Art.Nr. A994.2)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Doxorubicin	Pharmacia & Upjohn, Stockholm, Schweden

Ethylendiamintetraessigsäure Dinatrium-Dihydrat ($EDTANa_2 \cdot 2\ H_2O$) (Art.Nr. E5134)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(*2S,3S*)-*trans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutan-ethylester (E64d) (Art.Nr. E8640)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 99%	Abfüllung
Etoposid (Art.Nr. E1383)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS) (Art.Nr. 77524)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gas: Kohlenstoffdioxid, Stickstoff	Air Liquide GmbH, Düsseldorf, Deutschland
D-Glucose-6-Phosphat Dinatriumsalz Dihydrat (Art.Nr. G7250)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* (Art.Nr. G8404)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutaraldehyd 50 % (Art.Nr. 4995)	Roth,Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (Art.Nr. G5516)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin (Art.Nr. 3908)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Abfüllung
KCl (Art.Nr. P5405)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KH_2PO_4 (Art.Nr. 1.04873)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett (Art.Nr. C3886)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Melphalan (Art.Nr. M2011)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Abfüllung
Methanol, ultrapurer Reinheitsgehalt (Art.Nr. 20864.320)	VWR, Hannover, Deutschland
3-Methyladenin (3-MA) (Art.Nr. M9281)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (Art.Nr. 170610)	Synopharm, Barsbüttel, Deutschland
Milchpulver (Art.Nr. T145)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Minimal Essential Medium (MEM) 100× (Art.Nr. M7145)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
N-Acetylcystein (Art.Nr. A9165)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ (Art.Nr. 1.06580)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl (Art.Nr. 3957)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na_2CO_3 (Art.Nr. A135)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NADP (Art.Nr. N0505)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaF (Art.Nr. 27860.231)	VWR, Hannover, Deutschland
Natriumpyruvat (Art.Nr. P-5280)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Na_3VO_4 (Art.Nr. S6508)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PB 28 (Art.Nr. P9246)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Art. Nr. P06-07100)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Pepstatin A (Art.Nr. P5318)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS, ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) (Art.Nr.1825)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ponceau-S (Art.Nr. 5938)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid (Art.Nr. A2261)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) for use with mammalian cell and tissue extracts (Art.Nr. P8340)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RNAse (Art.Nr. 7156)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® 30 % (Art.Nr. 3029)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Nanoquant 5 × Konzentrat (Art.Nr. K880)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Kulturmedium (Art.Nr. P04-16500)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Art.Nr. 2326.1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim, Krefeld, Deutschland
Stripping-Puffer (Art.Nr. 0083)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N′,N′-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Art.Nr. T9281)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
α-Tocopherol (Art.Nr. T3251)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRAIL, *human recombinant*, *E. coli* (Art.Nr. 616374)	EMD Chemicals, Inc. San Diego, CA, USA
Trichloressigsäure (Art.Nr. K289007)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Trifluoressigsäure (Art.Nr. S1700)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris (Art.Nr. 5429)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl (Art.Nr. 9090)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 (Art.Nr. T8787)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 1× (Art.Nr. T3924)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween® 20 (Art.Nr. 9127.1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wortmannin (Art.Nr. 1628)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
z-VAD-FMK (Art.Nr. PK-CA577-1140-1)	Promokine, Heidelberg, Deutschland

3.2.4 Puffer

1 × Bindepuffer (Art.Nr. 130-092-052)	0,25 ml 20 × Bindepuffer + 4,75 ml H_2O
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)	1 g KCl, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 7,75 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, 1 g KH_2PO_4, 40 g NaCl, 5000 ml H_2O
PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	siehe Kapitel 3.2.3
TNE-Puffer (Tris-NaCl-EDTA-Puffer)	40 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM $EDTANa_2 \cdot 2\ H_2O$ pH 7,5, 150 mM NaCl
20 mM KH_2PO_4-Puffer pH 3,0	1,36 g KH_2PO_4/500 ml H_2O, Einstellen auf pH 3,0 mit H_3PO_4 85 %
50 mM Tris-Puffer pH 7,4	0,3 g Tris/50 ml H_2O, Einstellen auf pH 7,4 H_3PO_4 85 %
Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,6 100 mM NaCl 100 mM NaF 5 mM $EDTANa_2 \cdot 2\ H_2O$ 0,2 mM Na_3VO_4 0,1 % Triton X-100
4 × Lämmli-Puffer	0,8 g Dithiothreitol 0,1 mg Bromphenolblau 2 ml 1 M Tris pH 6,8 2 ml 30 %ige SDS-Lösung

	3 ml Glycerol
	1 ml H_2O
10 × Laufpuffer	60 g Tris
	288 g Glycin
	20 g SDS
	ad 2000,0 ml H_2O
1 × Laufpuffer	100 ml 10 × Laufpuffer
	ad 1000,0 ml H_2O
1,5 M Tris pH 8,8	15,39 g Tris
	3,69 g Tris-HCl
	ad 100,0 ml H_2O
1,0 M Tris pH 6,8	1,16 g Tris
	14,34 g Tris-HCl
	ad 100,0 ml H_2O
Towbin-Blot-Puffer	6,05 g Tris
	28,8 g Glycin
	400 ml Methanol
	ad 2000,0 ml H_2O
5 × TBS (*Tris Buffered Saline*)	24,2 g Tris
	84,8 g NaCl
	ad 2000,0 ml H_2O
1 × TBST *(Tris Buffered Saline with Tween)*	200 ml 5 × TBS
	500 µl Tween 20
	ad 1000,0 ml H_2O

3.2.5 Antikörper

<u>Primär-Antikörper</u>	
Anti-Caspase-8 (rabbit) (Art.Nr. APO007PU-N)	Acris, Herford, Deutschland
Anti-Caspase-9 (rabbit)	Acris, Herford, Deutschland

(Art.Nr. APO0153PU-N)	
Anti-Bax (rabbit)	Acris, Herford, Deutschland
(Art.Nr. APO0015PU-N)	
Anti-Bcl-2 (rabbit)	Acris, Herford, Deutschland
(Art.Nr. APO2600PU-N)	
Anti-Bid (rabbit)	Acris, Herford, Deutschland
(Art.Nr. APO0056PU-N)	
Anti-PARP (rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt,
(Art.Nr. 9542)	Deutschland
Anti-AIF (rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt,
(Art.Nr. 4642)	Deutschland
Anti-GAPDH (rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt,
(Art.Nr. 2118)	Deutschland

Sekundär-Antikörper

Anti-Rabbit IgG (rabbit)	Acris, Herford, Deutschland
(Art.Nr. R1364HRP)	

3.2.6 Ratten-Lebermikrosomen

Male Sprague-Dawley rat Kontrolle	Celsis, Baltimore, MD, USA
(Art.Nr. M00001)	
Dexamethason-induziert	Celsis, Baltimore, MD, USA
(Art.Nr. M40001)	
ß-Naphthoflavon-induziert	Celsis, Baltimore, MD, USA
(Art.Nr. M20001)	
Phenobarbital-induziert	Celsis, Baltimore, MD, USA
(Art.Nr. M70001)	

3.2.7 Kits

Annexin V-FITC Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
(Art.Nr. 130-092-052)	Deutschland
Chemolumineszenz-Kit	Biorad, München, Deutschland
(Art.Nr. 170-5061)	

Green Caspase-3 Staining Kit (Art.Nr. PK-CA577-K183)	Promokine, Heidelberg, Deutschland
Green Caspase-8 Staining Kit (Art.Nr. PK-CA577-K188)	Promokine, Heidelberg, Deutschland
Green Caspase-9 Staining Kit (Art.Nr. PK-CA577-K189)	Promokine, Heidelberg, Deutschland
Mitochondrial Apoptosis Staining Kit (Art.Nr. PK-CA577-K250)	Promokine, Heidelberg, Deutschland
Pierce™ Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Art.Nr. 89874)	Thermo Scientific, Waltham,, MA, USA

3.2.8 Software

ChemDraw	Cambridgesoft, Cambridge, MA, USA
CompuSyn Version 1.0	Nick Martin, MIT, Cambridge, MA, USA
Coulter Z2 AccuComp Version 2.01	Beckman Coulter, Miami, FL, USA
GraphPadPrism	GraphPad Software Inc., CA, San Diego, USA
D-7000 HPLC System Manager (HSM)	Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland
MacsQuant Software	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LCMS Solution Version 3.41	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
WinRead 2.10 für Anthos 2010	Pedevilla Walter, Kufstein, Österreich
Word/Excel	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

3.3 Methoden

3.3.1 Passagieren der Zellen

Material:

- Trypsin/EDTA
- Accutase™
- RPMI 1640 Standardmedium

Methode:

Adhärente Zellen: Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90% heranwachsen gelassen und nach anschließender Entfernung des Mediums mit Trypsin/EDTA (2,5 ml für kleine 25 cm^2-Kulturflaschen bzw. 4 ml für große 75 cm^2-Kulturflaschen) für 1–5 Minuten (je nach Zelllinie) im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen abrundeten, sowie von der Gefäßwand ablösten, wurde die Trypsin/EDTA-Lösung abgesaugt und die Zellen durch Klopfen an die Zellkulturflasche und mehrmaliges Spülen der Gefäßwand mit frischem Medium zu einer Einzelzellsuspension überführt. Die teils adhärent, teils in Suspension vorliegende RPMI 8226-Zelllinie wurde abweichend mit Accutase™ behandelt, da diese Zellen keine Trypsinbehandlung benötigen und die im Datenblatt der Zelllinie angegebenen Passagierungsmethoden mit TNE-Puffer (Tris-NaCl-EDTA-Puffer) bzw. Zellschaber die Vitalität der Zellen in höherem Maß beeinträchtigten. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 3.3.2) wurden für die jeweiligen Zelllinien entsprechende Zellzahlen in 25 cm^2-Kulturgefäße ausgesät:

- A427 + RT-4: 100.000 Zellen
- 5637: 50.000 Zellen
- DAN-G + MCF-7: 70.000 Zellen
- LCLC: 30.000 Zellen

Suspensionszellen: Je nach gewünschter Zelldichte wurden die Suspensionszellen nach erfolgter Zellzahlbestimmung in eine neue 75 cm^2-Zellkulturflasche mit 20 ml Medium überführt.

Regelmäßig wurde das verbrauchte Medium, dessen pH-Wert Änderung durch eine Farbänderung von rot über orange nach gelb angezeigt wurde, durch Frisches ersetzt.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Material:

- Isoton® (0,9 %ige Kochsalz-Lösung)

Methode:

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Einzelzellsuspension der Zellen hergestellt. 0,5 ml dieser Suspension wurden in 20 ml Isoton® gegeben und anschließend per Coulter Counter gemessen. Beim Durchtritt einzelner Zellen, durch die im Coulter Counter enthaltene Kapillare, kommt es zu einer Widerstandserhöhung, durch Verdrängung der Elektrolytlösung. Diese Änderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Aus den Einzelmessungen ergeben sich Signale, über die die Zellzahl bestimmt wird. Die jeweils benötigte Zellzahl wurde durch anschließende Verdünnung mit Medium eingestellt.

3.3.3 Einfrieren von Zellen

Material:

- RPMI 1640 Einfriermedium

Methode:

Die Zellen wurden zum Einfrieren in ausreichender Menge herangezüchtet und zu einer Zellsuspension aufgearbeitet. Durch anschließende Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurde ein Zellpellet erhalten, das in Einfriermedium resuspendiert wurde. Mittels Coulter Counter wurde die Zellsuspension auf ca. $1–2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und in Cryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in BiCell-Gefäße gestellt und für 5 Stunden bei −70 °C gelagert. Auf diese Weise erfolgte ein schonender Einfriervorgang (−1 °C/min) der Zellen, bevor sie zur längerfristigen Lagerung in flüssige Stickstoffbehälter überführt wurden.

3.3.4 Auftauen von Zellen

Material:

- RPMI 1640 Standardmedium

Methode:

Die eingefrorenen Zellen wurden aus den flüssigen Stickstoffbehältern entnommen und im Wasserbad durch gleichmäßiges Schwenken bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 5 × 1 ml Kulturmedium tropfenweise unter Schwenken verdünnt. Nach Zugabe von weiteren 15 ml Kulturmedium wurde die Suspension bei 400 g für 5 min zentrifugiert, anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Eine entsprechende Zellmenge wurde in Kulturgefäße zum weiteren Heranwachsen überführt.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Lichtmikroskopie

Zur Detektion der morphologischen Veränderungen nach Substanzzugabe wurden zeitabhängige Aufnahmen mit einem Carl Zeiss Axiovert 25 Phasenkontrastmikroskop mit eingebauter Digitalkamera (Sony, DSLR-A100) aufgenommen.

Methode:

Dazu wurden Zellen in 25 cm^2-Kulturgefäße ausgesät, mit entsprechenden Konzentrationen der Substanzen behandelt und bei 37 °C in 5 % CO_2 inkubiert. Die Aufnahmen erfolgten zu den jeweils angegebenen Zeiten (0–96 h).

3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie: DAPI-Färbung

Zur Analyse der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde ein AxioVision 3.1 der Firma Carl Zeiss benutzt.

DAPI ist ein fluoreszierender Indol-Farbstoff, der präferenziell an AT (Adenin-Thymin)-reiche Basenpaare der DNA bindet[169]. Eine Interkalation an GC (Guanin-Cytosin)-Sequenzen ist jedoch auch nachgewiesen[170]. Bei der sogenannten DNA-Kondensation verdichtet sich das Chromatin in der Zelle, welches durch Anfärbung mit DAPI sichtbar gemacht werden kann. Im Unterschied zu apoptotischen Zellen liegt das Chromatin bei nicht-apoptotischen Zellen frei verteilt vor, sodass Kontrollzellen eine gleichmäßige blaue Fluoreszenz aufweisen, während in den

verdichteten Bereichen der apoptotischen Zellen eine hellblaue Färbung mit dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen wird.

Material:

- DAPI (4′,6-Diamidino-2-phenylindol)
- Methanol

Methode:

$7{,}5 \times 10^5$ RPMI 8226-Zellen wurden auf einem Deckglas in 6-Well-Platten ausgesät und mit den jeweiligen Konzentrationen an Substanz für 48 h inkubiert. Nach Entfernung des Mediums erfolgte ein Waschschritt mit DAPI/Methanol (2,5 µg/ml) und eine 15minütige Inkubation mit DAPI/Methanol bei 37 °C. Anschließend wurde das Deckglas vorsichtig aus den 6-Well-Platten entfernt, mit Methanol gewaschen und umgedreht auf einen Objektträger gelegt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von λ = 365 nm mit dem Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{Ex/Em}$ = 365/397 nm).

3.5 Photometrische Bestimmungen zur Messung der Zytotoxizität

Um die antiproliferierende Wirkung der synthetisierten Verbindungen zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Zytotoxizitätstests in 96-Well-Platten durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei, im Arbeitskreis etablierte, Methoden ausgewählt: Der Kristallviolett-Assay und der MTT-Assay. Die auf photometrische Weise ermittelten IC_{50}-Werte beschreiben die Konzentration an Substanz, die 50 % des Zellwachstums hemmt.

3.5.1 Kristallviolett-Assay

Bei Kristallviolett handelt es sich um einen kationischen Triphenylmethan-Farbstoff, der von DNA gebunden werden kann. Durch den enthaltenen Waschschritt ist er nur für adhärente Zellen geeignet, da Suspensionszellen und tote Zellen, die ihre Adhärenz verlieren, entfernt werden. Die verbliebenen Zellen werden nach Fixierung gefärbt und mittels Plattenphotometer vermessen. Je intensiver die Färbung im Well, desto größer die vorhandene Zellmasse.[171]

Material:

- Kristallviolett-Lösung
    - 0,02 % Kristallviolett in H_2O
- Dulbecco´s Puffer
- Fixierlösung
    - 1 % Glutaraldehyd in Dulbecco´s Puffer
- Ethanol 70 %

Methode:

100 µl der entsprechenden Zellsuspension wurden in 96-Well-Platten ausgesät (A427, 5637 und RT-4: 2000 Zellen/Well; DAN-G und MCF-7: 1000 Zellen/Well; LCLC: 250 Zellen/Well). Nach 24stündiger Inkubation, wuchsen die Zellen wieder adhärent und die zu untersuchenden Testsubstanzen konnten hinzugegeben werden. *Primärscreening:* Die 10 mM Stammlösungen wurden mit Medium und anschließender 1:1 Verdünnung im Well zu 20 µM Endkonzentrationen eingestellt, die auf die Zellen wirkten. Reihe 1 diente als Kontrollwert und enthielt nur Medium und Lösungsmittel. Die Reihen 2–12 konnten mit den Testsubstanzen pipettiert werden. *Sekundärscreening:* Die Stammlösungen wurden in seriellen Verdünnungen mit entsprechendem Lösungsmittel hergestellt, mit Medium 500fach verdünnt und anschließend 100 µl in jedes Well pipettiert (insgesamt 1000fache Verdünnung). Die erste und die siebte Reihe der Mikrotiterplatte dienten als Kontrollwert, Reihe 2–6 sowie 8–12 wurden mit den fünf seriell verdünnten Konzentrationen pipettiert. Die Kontrollreihen enthielten eine maximale Konzentration von 0,2 % des Lösungsmittels, die selbst keine wachstumshemmenden Eigenschaften bewirkte. Wässrige Stammlösungen (z. B. Cisplatin) wurden steril filtriert und direkt mit Medium verdünnt. Nach Zugabe der Substanzen, wurde eine unbehandelte Kontrollplatte zum Zeitpunkt t_0 mit Fixierlösung gestoppt und bis zur weiteren Anfärbung bei 4 °C aufbewahrt. Nach 96 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurde aus Platten, mit den behandelten Zellen, das Medium entfernt, sie 20 min mit Fixierlösung (100 µl/Well) inkubiert und bis zur Färbung mit 100 µl Dulbecco´s Puffer bei 4 °C gelagert. Die Anfärbung mit 100 µl 0,02%iger Kristallviolett-Lösung erfolgte für 30 min. Nach einem 15minütigem Waschschritt in Wasser wurde der gebundene Farbstoff durch 4stündiges Schütteln mit 150 µl 70%igem Ethanol gelöst. Anschließend konnte die optische Dichte mit dem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{T}{C_{korr}}(\%) = \frac{(OD_{test} - OD_{t0}) \times 100}{(OD_{kon} - OD_{t0})}$$

T/C_{korr} = (*Treated over Control, corrected*: prozentualer Anteil von behandelten, überlebenden Zellen an Kontrollzellen); OD_{test} = optische Dichte der behandelten Zellen; OD_{t0} = optische Dichte der unbehandelten Zellen nach 24 h; OD_{kon} = optische Dichte der Kontrollzellen

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde MS-Excel® verwendet. T/C_{korr}-Werte wuden gegen die logarithmierten Konzentrationen der Testsubstanz aufgetragen und durch lineare Regression aus der Kurvengleichung die IC_{50} bestimmt. Für die Berechnung wurden nur die Konzentrationen verwendet, deren T/C_{korr}-Werte zwischen 10 und 90% lagen.

3.5.2 MTT-Assay

Die Berechnung der IC_{50}-Konzentrationen für die Zelllinien HL 60 und RPMI 8226 wurde mittels MTT-Assay durchgeführt. Dieser bestimmt abweichend vom Kristallviolett-Assay die Viabilität der Zellen, denn die Färbung beruht auf der Umsetzung des gelben, löslichen MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durch die mitochondriale Atmungsaktivität vitaler Zellen in ein violettes, unlösliches Formazan-Derivat. Je vitaler die Zellen, desto mehr Formazan-Kristalle bilden sich. Da bei diesem Assay keinerlei Waschschritte anfallen, wird er bevorzugt bei Suspensionszellen angewandt.

Material:

- Dulbecco´s Puffer
- MTT-Lösung
    - 2,5 mg MTT/1 ml Dulbecco´s Puffer
- 0,04 N HCl/Isopropanol

Methode:

5000 Zellen/Well (HL 60) bzw. 10.000 Zellen/Well (RPMI 8226) in 50 µl Medium wurden in 96-Well-Platten ausgesät, wobei die erste Reihe frei blieb und nur Medium ohne Zellen enthielt (Blindwert). Während zu den Reihen 1–2 zusätzlich 50 µl

Medium und Lösungsmittel (max. Endkonz: 0,2 %) pipettiert wurden, konnten die übrigen Reihen 3–12 mit 50 µl der seriellen Verdünnungen der Testsubstanzen versehen werden. Nach 48 h (HL 60) bzw. 72 h (RPMI 8226) Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank wurden 20 µl der MTT-Lösung in jedes Well gegeben, daran folgte eine weitere 4 h (HL 60) bzw. 6 h (RPMI 8226) Inkubation. Die umgewandelten Formazan-Kristalle wurden mit 100 µl 0,04 N Salzsäure/Isopropanol unter vorsichtigem Schwenken im Ultraschallbad gelöst und die optische Dichte mit dem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm gemessen. Die Auswertung erfolgte nach folgender Berechnung:

$$\frac{T}{C_{korr}}(\%) = \frac{(OD_{test} - OD_{blind}) \times 100}{(OD_{kon} - OD_{blind})}$$

T/C_{korr} = (*Treated over Control, corrected*: prozentualer Anteil von behandelten, überlebenden Zellen an Kontrollzellen); OD_{test} = optische Dichte der behandelten Zellen; OD_{blind} = optische Dichte des Blindwertes; OD_{kon} = optische Dichte der unbehandelten Kontrollzellen

Auch hier wurde die IC_{50} durch Auftragung der T/C_{korr}-Werte gegen die logarithmierten Konzentrationen der Testsubstanz und anschließende lineare Regression erhalten.

Kombinationsbehandlung:

In der heutigen Chemotherapie entwickeln sich unter der Behandlung mit konventionellen Zytostatika häufig Resistenzen, sodass die herkömmliche Therapie oftmals versagt. Verbessertes Ansprechen der Tumorzellen auf eine Kombinationstherapie kann daher ein erfolgversprechender Ansatz sein.

Desweiteren kann eine Behandlung mit bekannten σ-Rezeptor-Agonisten/Antagonisten erste Informationen zur intrinsischen Aktivität der synthetisierten Liganden an den Rezeptor liefern. Daher sollte in Kombinationsbehandlungen die Zytotoxizität der Substanzen in RPMI 8226-Zellen mittels MTT-Assay untersucht werden.

Abweichend vom MTT-Assay wurden dazu die Zellen mit nachfolgenden Substanzen in Kombination behandelt:

Tabelle 3.2 Therapieschema der Kombinationsbehandlungen.

Konzentration (*R*)-8	Zytostatikum	Konzentration	Anmerkung
0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 µM	Melphalan	4,25 µM	≈ IC_{50}/2
0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 µM	PB 28	2,3 µM	≈ IC_{50}/4
0; 1,25; 2,5; 5, 10; 20 µM	Haloperidol	5 + 10 µM	< IC_{50}

(*R*)-8 (Struktur siehe Tabelle 4.1 auf Seite 73) wurde in Konzentrationen, welche aus der gewohnten Verdünnungsreihe (0–20 µM) hervorgehen, in das Medium gegeben. Die Zugabe der kommerziellen Zytostatika erfolgte in einer festgelegten Stammkonzentration, die unterhalb der jeweiligen IC_{50} lag und in jedem Well konstant war, durch direkte Gabe in das Medium. 50 µl wurden dann zu den bereits ausgesäten Zellen im Well pipettiert, wobei auch die Kontrollreihen mit dem Zytostatikum versehen wurden, um eine alleinige zytotoxische Wirkung der Substanz auszuschließen. Daraus ergibt sich folgender Belegungsplan: Reihe 1: Medium + LM + Zytostatikum

Reihe 2: Zellen + LM + Zytostatikum
Reihe 3+4: Zellen + Zytostatikum + **(*R*)-8** (1,25 µM)
Reihe 5+6: Zellen + Zytostatikum + **(*R*)-8** (2,50 µM)
Reihe 7+8: Zellen + Zytostatikum + **(*R*)-8** (5,00 µM)
Reihe 9+10: Zellen + Zytostatikum + **(*R*)-8** (10,00 µM)
Reihe 11+12: Zellen + Zytostatikum + **(*R*)-8** (20,00 µM)

Die Berechnung der *Combination Indices* (CI) erfolgte nach der Methode von Chou und Talalay[172,173] mit der Software CompuSyn[174] bei nicht-konstanter Kombination zweier Testsubstanzen:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \frac{(D)_1(D)_2}{(D_x)_1(D_x)_2}$$

Dabei sind $(D)_1$ und $(D)_2$ die Dosis der Substanzen, die in Kombination zu einem definierten Effekt x (z. B. IC_{50}) führen. $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ stellen die Konzentrationen der

jeweiligen Monotherapie dar, um diesen Effekt x zu erzielen. Der Term $\frac{(D)_1(D)_2}{(D_x)_1(D_x)_2}$ geht nur in die Gleichung ein, wenn es sich bei den Substanzen um einen unabhängigen Wirkmechanismus handelt. Ein synergistischer Effekt liegt bei CI < 1, ein additiver Effekt bei CI = 1 und ein antagonistischer Effekt bei CI > 1 vor. Anhand der im MTT-Assay ermittelten Dosis-Wirkungskurven lassen sich durch mathematische Berechnungen Kurven gleicher Wirkung, sogenannte Isobologramme, ableiten. Bei einer nicht-konstanten Kombinationstherapie, wie sie in dieser Arbeit vorliegt, kann kein klassisches Isobologramm erstellt werden, in dem die D_x der Testsubstanzen gegeneinander aufgetragen werden. Daher wird eine Normalisierung nach $\frac{(D)_1}{(D_x)_1}$ bzw. $\frac{(D)_2}{(D_x)_2}$ vorgenommen, woraus sich ein Isobologramm, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, ergibt.

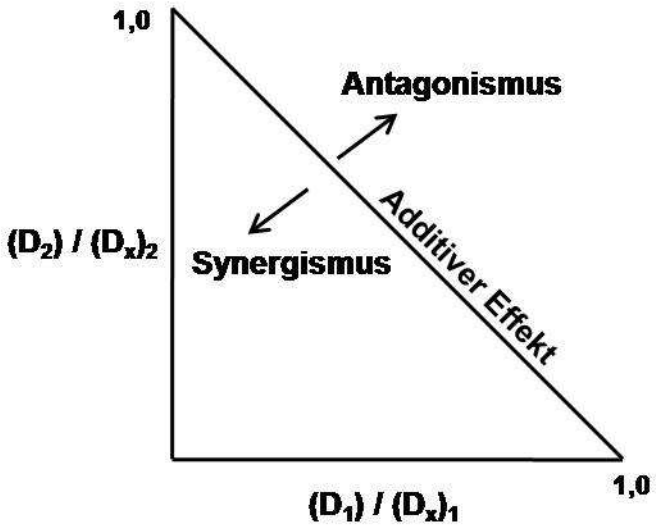


Abbildung 3.1 Normalisiertes Isobologramm für die nicht-konstante Kombination moduliert nach Chou[173].

3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, in der Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität oder Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden können. Dafür müssen die Zellen zunächst als Einzelzellsuspension vorliegen. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen in einer Messzelle perlenschnurartig hintereinander an Lasern vorbeigeführt, wodurch ein Streulicht entsteht. Beim sogenannten Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter*, FSC),

können Angaben über die Größe der Zelle erhalten werden, während das Seitwärtsstreulicht (*Side scatter*, SSC) vom Inhalt der Zelle (Granularität) abhängt. Detektoren wandeln die Intensitäten in Signale um, die dann in einer sogenannten Punktwolken (*Dot-Plot*)-Graphik anschaulich dargestellt werden können, wobei jeder Punkt einer Zelle/einem Ereignis entspricht.

Möchte man bestimmte Merkmale einer Zelle detektieren, wie z.B. die Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche, kann man diese mit entsprechenden Antikörpern markieren, an denen ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist. Passieren die Zellen dann den Laserstrahl mit entsprechender Wellenlänge, werden die Fluorochrome angeregt und es kommt zur Fluoreszenz. Durch Markierung der Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, können auf diese Weise mehrere Merkmale einer Zelle untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Durchflusszytometer MacsQuant™ der Firma Miltenyi Biotec gearbeitet, für jeden Versuch wurden 10^4 Zellen/*Events* gemessen. Bei den σ-Liganden (Struktur siehe Tabelle 4.1 auf Seite 73) wurden, sofern nicht anders angegeben, folgende Konzentrationen ausgewählt:

Tabelle 3.3 Eingesetzte Arbeitskonzentrationen der σ-Liganden.

σ-Ligand	Konzentration
(*S*)-8	3,6 µM
(*R*)-8	15,3 µM
(*S*)-11	36 µM
(*R*)-11	23 µM

3.6.1 Annexin-V-Assay zur Apoptosebestimmung mittels Durchflusszytometrie

Das Protein Annexin-V bindet in Abhängigkeit von Ca^{2+} spezifisch an das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen. Durch Markierung von Annexin-V mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC, kann PS detektiert werden.[175] In vitalen Zellen ist PS jedoch im Inneren der Zellmembran lokalisiert, sodass es nicht nachgewiesen werden kann. Im frühen Stadium der Apoptose kommt es zu Membranausstülpungen, in denen das PS an die

Zelloberfläche transloziert wird und vom Annexin-V gebunden werden kann. Auf diese Weise ist eine Differenzierung zwischen vitalen und apoptotischen Zellen möglich. Um zwischen frühapoptotischen Zellen und spätapoptotischen Zellen bzw. nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wird als weiterer Farbstoff Propidiumiodid (PI) herangezogen. PI lagert sich in die DNA von Zellen ein und färbt diese somit selektiv. Damit es bis zur DNA gelangt, muss jedoch die Zellmembran bereits durchlässig sein, was erst bei spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen der Fall ist. Somit lassen sich mit der Doppelanfärbung a) vitale Zellen (Annexin-V negativ/PI negativ), b) apoptotische Zellen (Annexin-V positiv/PI negativ) und c) spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen (Annexin-V und PI positiv) erfassen (siehe Abbildung 3.2).[176]

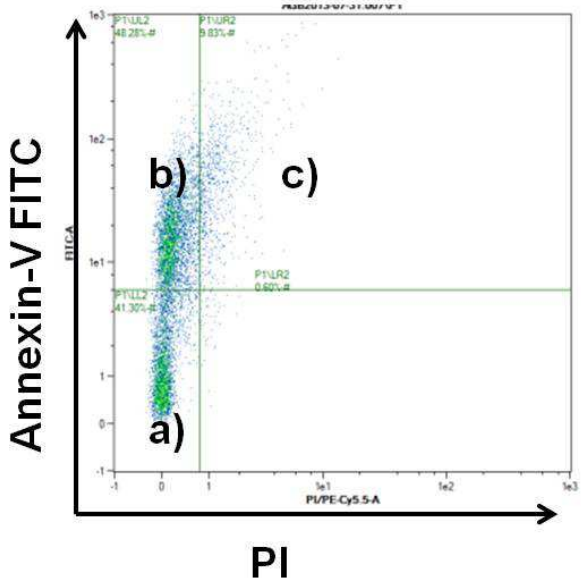


Abbildung 3.2 Repräsentative *Dot-Plot*-Darstellung zur Bestimmung apoptotischer Zellen.

Material:

- Annexin-V FITC Kit bestehend aus:
  - Annexin-V FITC
  - Propidiumiodid (100 µg/ml)
  - 20 × Bindepuffer
- Z-VAD-FMK

Methode:

$7{,}5 \times 10^5$ RPMI 8226-Zellen/5 ml Medium wurden in kleine Zellkulturgefäße ausgesät und mit den σ-Liganden für 0–72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die Vorinkubation mit z-VAD-FMK wurde eine 20 mM z-VAD-FMK-Stammlösung in DMSO hergestellt und durch Zugabe in das Medium auf die entsprechende Endkonzentration verdünnt. Für die Kombinationsbehandlungen wurden 4,25 µM Melphalan oder 2,3 µM PB 28 jeweils mit 4,3 µM **(*R*)-8** (= $IC_{50}/2$) simultan versetzt und für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend vereinzelt und mit 1 × Bindepuffer bei 300 g für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 µl 1 × Bindepuffer in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 10 µl Annexin-V FITC für 15 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde das Zellpellet in 500 µl 1 × Bindepuffer erneut resuspendiert, mit 5 µl PI versehen und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Die Detektion erfolgte mit den Fluoreszenzkanälen B1 (*Band Passfilter*: 520/50 nm) für Annexin-V FITC und B3 (*Band Passfilter*: 655–730 nm) für PI. Um eine Überschneidung des Spektralbereiches beider Fluoreszenzkanäle zu umgehen, wurde eine Kompensation durchgeführt.

3.6.2 Zellzyklus-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie

Bei der Zellzyklusbestimmung nutzt man die Fähigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes PI zur Interkalation in zelluläre DNA. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zum DNA-Gehalt, sodass quantitative Aussagen möglich sind. Während des Zellzyklus durchlaufen die Zellen Phasen, mit unterschiedlichen DNA-Gehalten. Zellen in der G_0/G_1-Phase besitzen einen einfachen Chromosomensatz. In dieser Phase werden Organellen nachgebildet und das Zytoplasma vermehrt. Daran schließt sich die S-Phase, in der die DNA-Synthese stattfindet und der DNA-Gehalt ansteigt, bis er schließlich in der G_2/M-Phase doppelt vorliegt. Bevor sich die Zelle teilt (Mitose), werden in der G_2-Phase weitere Zellstrukturen gebildet. Der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen ist aufgrund der DNA-Fragmentierung geringer als der diploide Chromosomensatz der G_0/G_1-Phase, man spricht daher von einem sub-diploiden Chromosomensatz bzw. der sub-G_1-Phase, die im Histogramm noch vor dem G_0/G_1-Peak erscheint (siehe Abbildung 3.3).[16,177]

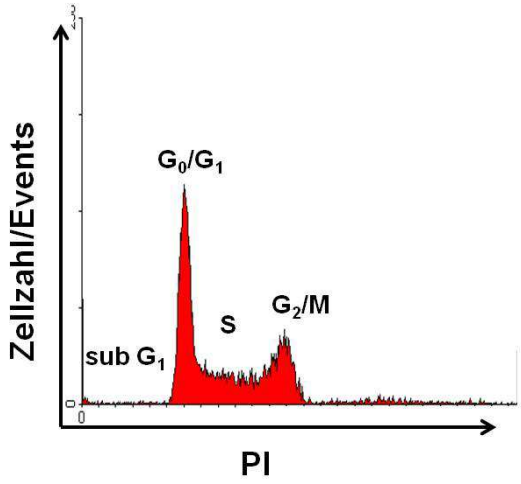


Abbildung 3.3 Repräsentatives Histogramm mit den Phasen des Zellzyklus.

Material:

- PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})
- Ethanol 70 %, eisgekühlt
- Propidiumiodid (2,5 mg/ml H_2O)
- RNAse (10 mg/ml H_2O)

Methode:

$7{,}5 \times 10^5$ RPMI 8226-Zellen/5 ml Medium wurden in kleine Kulturgefäße ausgesät und mit Substanzen für 24, 48 und 72 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen ohne Substanz dienten als Kontrolle. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen vereinzelt, in Falcon-Röhrchen überführt und bei 500 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet für 1–2 Sekunden vorgetext und tropfenweise 500 µl eiskalter, 70 %iger Ethanol während des Vortexens hinzugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C (analog war das Pellet nach dem Vortexen mit Ethanol auch für längere Zeit bei −20 °C haltbar), folgte die Zentrifugation bei 4000 rpm/min bei 4 °C für 10 min. Das Pellet wurde dann in 500 µl einer Mischung aus PBS (500 µl/Probe), PI (5 µl/Probe) und RNAse (5 µl/Probe) für 30 min bei RT resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzkanal B3 (*Band Passfilter*: 655–730 nm).

3.6.3 Bestimmung der Caspase-Aktivität mittels Durchflusszytometrie

Die Aktivierung von Caspasen spielt eine zentrale Rolle während der Apoptose. Durch Identifizierung bestimmter Caspasen lassen sich Rückschlüsse auf den beteiligten Apoptoseweg (intrinsisch/extrinsisch) ziehen. Die Zellmarkierung erfolgt dabei mittels entsprechender, Fluoreszenz-basierter Caspase-Inhibitoren, welche irreversibel an die jeweils aktivierte Caspase binden. Bei den im Kit enthaltenen Inhibitoren handelt es sich um synthetische Tetrapeptide, deren Aminosäuresequenz mit der zu inhibierenden Caspase übereinstimmt. Durch die zusätzliche Fluoromethylketon-Gruppe (-FMK) binden die Hemmstoffe kovalent an das aktive Zentrum der Caspase und inaktivieren diese irreversibel. Beim z-VAD-FMK ist die vierte Aminosäure in der Peptidkette gegen einen Benzyloxycarbonyl-Rest ersetzt, dies ermöglicht eine unspezifische Bindung an alle Caspasen (Breitspektrum-Inhibitor).[178,179]

Material:

- *Green Caspase-3, -8, and -9 Staining Kit* bestehend aus jeweils:
    - FITC-DEVD-FMK (Caspase-3) oder
    - FITC-IETD-FMK (Caspase-8) oder
    - FITC-LEHD-FMK (Caspase-9) und
    - Waschpuffer
    - z-VAD-FMK

Methode:

$7{,}5 \times 10^5$ RPMI 8226-Zellen/5 ml Medium wurden in kleine Zellkulturgefäße ausgesät und mit **(*S*)-11** und **(*R*)-11** für 24 und 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen ohne Substanz dienten als Kontrolle. Eine weitere Probe wurde für 1 h mit dem enthaltenen Caspase-Inhibitor z-VAD-FMK (1 µl/ml) inkubiert und anschließend mit Substanz induziert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen vereinzelt und 300 µl/Probe in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 2 µM des jeweiligen FITC-markierten Caspase-Inhibitors wurde für 30 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet zweimal mit Waschpuffer gewaschen, ehe es in 300 µl Waschpuffer resuspendiert und durchflusszytometrisch vermessen wurde. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzkanal B1 (*Band Passfilter*: 520/50 nm). 10^4 Zellen/*Events* wurden pro Messung erfasst.

3.6.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Für die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird der nicht-fluoreszierende Ausgangsstoff 2′,7′-Dichlorfluorescindiacetat (2′,7′-DCFDA) verwendet, der in die Zellen penetrieren kann. Die Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen führt zum nicht-fluoreszierenden 2′,7′-Dichlorfluorescin, das über Oxidation durch ROS in das fluoreszierende Derivat 2′,7′-Dichlorfluorescein (2′,7′-DCF) umgewandelt wird.

Material:

- PBS
- 2′,7′-Dichlorfluorescindiacetat (10 mM in DMSO)
- *tert*-Butylhydroperoxid (220 µM in H_2O)

3.6.4.1 Bestimmung der ROS nach Inkubation mit σ-Rezeptor-Liganden

Methode:

5×10^5 RPMI 8226-Zellen/5 ml Medium wurden in kleine Zellkulturgefäße ausgesät und mit Substanzen für 0–48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen ohne Substanz dienten als Kontrolle, als Positivkontrolle dienten inkubierte Zellen mit 220 µM *tert*-Butylhydroperoxid (TBH). Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen vereinzelt, in Falcon-Röhrchen überführt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS in Eppendorf-Reaktionsgefäße resuspendiert und nach Zugabe von 2 µl der 10 mM Stammlösung 2′,7′-DCFDA für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometer vermessen. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzkanal B1 (*Band Passfilter*: 520/50nm).

3.6.4.2 Bestimmung der ROS nach photodynamischer Therapie

Methode:

5×10^5 HL 60 Zellen/7,5 ml Medium wurden in kleine Zellkulturgefäße augesät und mit 0,1 mM FM 165 (Strukturformel siehe Abbildung 4.48 auf Seite 137) für 1 h inkubiert. Zellen ohne Substanz dienten als Kontrolle und mit TBH behandelte Zellen

als Positivkontrolle. Anschließend erfolgte eine 30minütige Bestrahlung bei λ = 365 nm sowie eine weitere Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator für 0–6 h. Da es sich bei den HL 60-Zellen um reine Suspensionszellen handelt, konnten die Zellen direkt in Falcon-Gefäße überführt und wie in Kapitel 3.6.4.1 für die Durchflusszytometrie aufbereitet werden.

3.6.5 Bestimmung der Lipidperoxidation (LPO) mittels Durchflusszytometrie

ROS können auch Cholesterol oder ungesättigte Fettsäuren oxidieren, was zur Entstehung freier Radikale führt, die die Zellen beschädigen. Um die LPO zu messen wird der lipophile Fluoreszenzfarbstoff (*E,*E)-4,4-Difluor-3,5-bis(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen = BODIPY 665/676 C_{11} benutzt, der mit seinem konjugierten Polyensystem anfällig für eine Oxidation durch Peroxylradikale ist, was sich in einer veränderten Fluoreszenzintensität wiederspiegelt.[180]

Material:

- PBS
- BODIPY 665/676 C_{11} (0,2 mM in DMSO)

Methode:

5×10^5 RPMI 8226-Zellen/5 ml Medium wurden in kleine Kulturgefäße ausgesät und mit **(*S*)-11** oder **(*R*)-11** für 0–24 h bei 37° C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen ohne Substanz dienten als Kontrolle. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen vereinzelt, in Falcon-Röhrchen überführt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS in Eppendorf-Reaktionsgefäße resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl der 0,2 mM Stammlösung BODIPY 665/676 C_{11} für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und per Durchflusszytometer vermessen. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzkanal R1 (*Band Passfilter:* 655-730 nm).

3.6.6 Durchflusszytometrische Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)

Der Zusammenbruch des MMP ist eines der frühesten Erscheinungsbilder, die während der Apoptoseinduktion auftreten. Das MMP liegt normal zwischen −170 mV

bis −200 mV. Bei dem im Kit enthaltenen MitoCapture Reagenz handelt es sich um den kationischen Fluoreszenzfarbstoff 5,5′,6,6′-Tetrachlor-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid (JC-1), der mit der Mitochondrienmembran agiert. Bei vitalen Zellen fluoresziert der Farbstoff entweder als Monomer im Zytosol mit grüner Farbe oder hauptsächlich als Aggregat in den Mitochondrien mit roter Farbe. Bei apoptotischen und nekrotischen Zellen hingegen kann JC-1 aufgrund des verminderten Membranpotentials nicht in den Mitochondrien akkumulieren und fluoresziert daher nur als Monomer grün. Somit können vitale Zellen durch ihre Grün- und Rotfluoreszenz von apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen mit lediglich Grünfluoreszenz unterschieden werden.[181]

Material:

- *Mitochondrial Apoptosis Staining Kit*, bestehend aus:
    - MitoCapture Reagenz (JC-1)
    - Inkubationspuffer

Methode:

5×10^5 RPMI 8226-Zellen/5 ml Medium wurden in kleine Kulturgefäße ausgesät und mit **(*R*)-11** für 1, 3, 5 und 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen ohne Substanz dienten als Kontrolle. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen vereinzelt, in Falcon-Röhrchen überführt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde das schlecht lösliche MitoCapture Reagenz (pro Probe: 1 µl in 1 ml Inkubationspuffer, vorgewärmt bei 37 °C) für 13.000 g für 1 min zentrifugiert und der Überstand zum Zellpellet gegeben und für 20 min im Brutschrank inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl des vorgewärmten Inkubationspuffers resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzkanal B1 (*Band Passfilter:* 520/50 nm).

3.7 Western Blot

Der Western Blot, oder auch Immunoblot, dient dem Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran. Durch Lysieren der Zellen werden die Proteine freigesetzt (Kapitel 3.7.2) und auf ihren Proteingehalt bestimmt (Kapitel 3.7.3). In der sich anschließenden Gel-Elektrophorese werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt (Kapitel 3.7.4) und dann im eigentlichen Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Kapitel 3.7.5). Durch reversibles Anfärben mit

Ponceau-S erfolgt der Nachweis einer erfolgreichen Proteinübertragung (Kapitel 3.7.6). Spezifische Antikörper (Primärantikörper), die an das auf der Membran fixierte Protein binden, werden mit der Membran inkubiert und anschließend mit einem Sekundärantikörper, der wiederum mit dem Primärantikörper bindet, behandelt (Kapitel 3.7.7). Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym markiert, das mit dem Entwicklungsreagenz eine Chemolumineszenzreaktion eingehen kann, über die dann das jeweilige Protein nachgewiesen wird (Kapitel 3.7.8). Durch Entfernen der Antikörper von der entwickelten Membran, dem sogenannten Strippen, können nach erneuter Antikörperinkubation weitere Proteine detektiert werden (Kapitel 3.7.9).

3.7.1 Stimulation der Zellen

$1{,}5 \times 10^6$ RPMI 8226-Zellen wurden in 7,5 ml Medium in 25 cm^2-Zellkulturgefäße ausgesät und mit **(*S*)-11** bzw **(*R*)-11** für 0–96 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 3 nM Doxorubicin behandelt wurden. Vorinkubationen wurden mit den Autophagozytose-Hemmstoffen Wortmannin und 3-Methyladenin sowie mit dem lipophilen Antioxidans α-Tocopherol unternommen (siehe Tabelle 3.4).
Für die photochemischen Versuche wurden 5×10^5 HL 60 Zellen in 10 ml Medium in 75 cm^2-Zellkulturflaschen überführt. Vor der Zugabe der Substanzen wurden zwei Proben mit den lysosomalen Proteaseinhibitoren E64d und Pepstatin A (10 µg/ml) für 1 h vorinkubiert. FM 165 wurde in H_2O zu einer 8,8 mM Stammlösung gelöst, steril filtriert und in einer 100 µM Endkonzentration zu den Zellen gegeben. Kontrollzellen wurden mit 200 µl DMSO inkubiert und als Positivkontrolle dienten Zellen mit Etoposid und Cisplatin (jeweils 0,74 µM). Nach Inkubation für 1 h wurden die Proben bei Licht der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm für 30 min bestrahlt und für weitere 6 h inkubiert.

Tabelle 3.4 Behandlungsschema der Western Blot-Proben.

Zelllinie	Stimulation	Vorbehandlung 1 h	
RPMI 8226	36 µM **(*S*)-11** /23 µM **(*R*)-11**	-	
	36 µM **(*S*)-11**/23 µM **(*R*)-11**	α-Tocopherol	200 µM
	36 µM **(*S*)-11** /23 µM **(*R*)-11**	Wortmannin	2 µM
	36 µM **(*S*)-11**/23 µM **(*R*)-11**	3-Methayladenin	10 mM
	0,003 µM Doxorubicin		
HL 60	100 µM FM 165	-	
	100 µM FM 165	E64d + Pepstatin A	10 µg/ml
	0,74 µM Cisplatin		
	0,74 µM Cisplatin	E64d + Pepstatin A	10 µg/ml
	0,74 µM Etoposid		
	0,74 µM Etoposid	E64d + Pepstatin A	10 µg/ml

3.7.2 Zellaufbereitung

3.7.2.1 Gesamtprotein-Lysate

Material:

- Lysepuffer
- Proteinase Inhibitor Cocktail (PIC)

Methode:

Herstellung der Zelllysate: Mindestens 1–1,5 × 10^6 Zellen wurden vereinzelt, mit PBS gewaschen und das Pellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl PIC wurden die Proben für 30 min auf Eis gelagert und anschließend für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation bei 18.000 g für 20 min bei 4 °C wurde der Überstand in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und das Pellet verworfen.

3.7.2.2 Zytosolische Proteinlysate

Für die Analyse der AIF-Freisetzung in das Zytosol, wurden reine Zytosol-Fraktionen nach dem *Mitochondria Isolation Kit for Cultured cells* aufbereitet.

Material:

- *Mitochondria Isolation* Reagenz A
- *Mitochondria Isolation* Reagenz B
- *Mitochondria Isolation* Reagenz C
- PIC, wird zu Reagenzien A + C gegeben (1 µl/100 µl Reagenz)

Methode:

Mindestens 5×10^6 Zellen wurden vereinzelt, kurz zentrifugiert und das Medium bis auf ca. 2 ml verworfen. Das Zellpellet wurde mit dem übrigen Medium resuspendiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 850 g für 2 min wurde der Überstand entsorgt. Nach Zugabe von 800 µl des Reagenz A zum Zellpellet wurde für 5 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und anschließend für exakt 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 10 µl des Reagenz B wurde die Probe erneut für 5 s gevortext und für 5 min auf Eis gelagert, wobei nach jeder Minute ein weiteres Vortexen bei maximaler Geschwindigkeit erfolgte. Anschließend wurden 800 µl vom Reagenz C zur Probe pipettiert und das Reaktionsgefäß mehrere Male gewendet. Nach Zentrifugation bei 700 g für 10 min bei 4 °C wurde der erhaltene Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei 3000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der neue Überstand enthielt die zytosolische Fraktion. Abbildung 3.4 fasst die einzelnen Schritte in einer Übersicht zusammen.

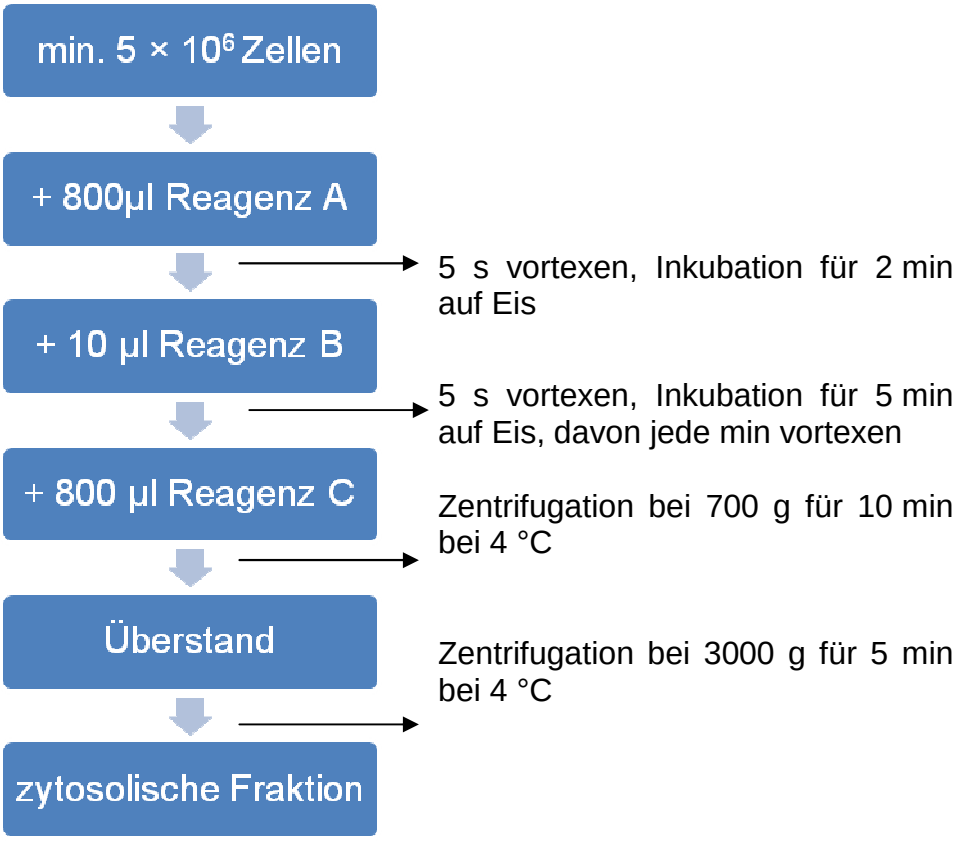


Abbildung 3.4 Vereinfachte schematische Abfolge der Arbeitsschritte zur Herstellung zytosolischer Fraktionen.

3.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Bradford gewählt. Sie beruht auf einer kolorimetrischen Reaktion des im Reagenz enthaltenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250. Dieser bindet an Proteine der Probe und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption stellt ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung dar.[182]

Material:

- *Bovine Serum Albumin* (BSA)-Stammlösung
- Roti®-Nanoquant
- Plattenreader Tecan Sunrise

Methode:

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurde zunächst eine BSA-Stammlösung (1 g/10 ml H_2O, 1:1000 Verdünnung) hergestellt. Durch jeweilige Verdünnung der Stammlösung mit H_2O wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen erstellt:

Tabelle 3.5 BSA-Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Proteingehaltes.

Proteingehalt (mg/l)	Stammlösung (µl)	H_2O
20	200	800
40	400	600
60	600	400
80	800	200
100	1000	0

Jeweils 20 µl der Verdünnungen wurden senkrecht in jeweils ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Daneben wurden dann 5 × 20 µl der Proteinproben pipettiert, die vorher noch 1:50 verdünnt worden sind. Als Leerwert diente ein Well, in dem nur H_2O mit Lysepuffer war. Nach Zugabe von 80 µl/Well Roti®-Nanoquant für genau 5 min wurde die Absorption der Platte bei 595 nm im Plattenphotometer gemessen, wobei unmittelbar vor der Messung die Mikrotiterplatte für 5 s vom Gerät selbst geschüttelt wurde. Durch Übertragung der ermittelten Intensitäten in ein Excel-Datenblatt erfolgte die Auswertung mittels linearer Regression.

3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Trennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße wurde die diskontinuierliche Methode nach Lämmli gewählt.[183] Sie beruht auf den unterschiedlichen pH-Werten von Tris-Glycin-Puffern in Trenn- und Sammelgel. Durch Versetzten der Proben mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt. Das im Lämmli-Puffer enthaltene Dithiothreitol sorgt für die Aufspaltung von Disulfidbrücken der Probenproteine und verhindert so Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen), so dass die Proteine sich nur in ihrer Molekülgröße unterscheiden. Durch Herstellung eines Polyacrylamidgels von bestimmter Porengröße werden die Proteine zunächst im Sammelgel aufkonzentriert, um anschließend im Trenngel aufgrund des Molekularsiebeffektes nach ihrer Größe aufgetrennt zu werden. Durch Auftragen eines Molekülmarkers, mit Proteinen definierter Größe, lässt sich die Molekülgröße der detektierten Proteine zuordnen.

Material:

- 4 × Lämmli-Puffer
- 1 × Laufpuffer
- 1,5 M Tris pH 8,8
- 1 M Tris pH 6,8
- *N,N,N′,N′*-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
- Isopropanol
- 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10 mg/100 ml H_2O)
- 10 % SDS (10 mg/100 ml H_2O)
- Trenngel: (für 2 Gele)
    - 5 ml H_2O
    - 6 ml Rotiphorese 30 %
    - 3,75 ml Tris 1,5 M pH 8,8
    - 150 µl SDS 10 %
    - 150 µl APS 10 %
    - 30 µl TEMED
- Sammelgel: (für 2 Gele)
    - 3 ml H_2O
    - 650 µl Rotiphorese 30 %
    - 1,23 ml 1 M Tris pH 6,8
    - 50 µl SDS 10 %
    - 50 µl APS 10 %
    - 15 µl TEMED
- Proteinmarker (7–175 kDa), *prestained*
- Elektrophoreseapparatur

Methode:

Nach der Proteinbestimmung wurden die benötigten Volumina der Proben, die 20 µg Protein enthalten, mit 5 µl 4 × Lämmli-Puffer bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gelagert.

Für die Herstellung der Gele wurden zunächst die Glasplatten der Gelapparatur mit Ethanol 99 % gereinigt und zusammengebaut sowie die Komponenten des Trenngels miteinander vermischt. APS 10 % als Radikalstarter und TEMED als Katalysator wurden erst unmittelbar vor dem Einfüllen der Lösung zwischen die

Glasplatten zugesetzt. Isopropanol wurde auf das noch flüssige Trenngelgemisch gegeben, um eine glatte Oberfläche des polymerisierten Gels zu erhalten. Nach erfolgter Gelbildung wurde das Isopropanol entfernt und die Sammelgellösung zwischen die Glasplatten gefüllt. Die Kämme, zur Bildung der Geltaschen, wurden aufgesteckt und die Apparatur bis zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen. Anschließend wurden die Glasplatten in die Elektrophoresekammer gestellt, die Kämme entfernt und die Geltaschen mit 1 × Laufpuffer von Luftblasen befreit. Nachdem die Proben bzw. der Marker in die Taschen pipettiert wurden, konnte die Elektrophorese bei 150 V für ca. 1,5 h gestartet werden.

3.7.5 Blotting

Um die aufgetrennten Proteine detektieren zu können, werden sie beim Blotten vom Gel auf eine dünne Trägermatrix übertragen, bei der es sich bei Proteinen häufig um Nitrocellulose handelt. Die am weitesten verbreitete Methode stellt der Elektroblot dar. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, das senkrecht zum Gel gerichtet ist, wandern die Proteine vom Gel auf die Membran in Richtung Anode, da sie durch Komplexierung mit SDS immer noch negativ geladen sind. Der Elektroblot kann in das Tank- und Semidry-Verfahren unterteilt werden, das sich im Aufbau der Apparatur (Puffertank-puffergesättigte Filterpapiere) sowie den Pufferzusammensetzungen (kontinuierlicher-diskontinuierlicher Puffer) unterscheidet.
Material:

- Nitrocellulosemembran Protran BA 83
- Whatman-Filterpapier
- Towbin-Blot-Puffer
- Western Blot-Apparatur
- Ponceau-S-Färbelösung
- TBST (*Tris Buffered Saline* + Tween® 20)
- Milchpulver 10 % (0,5 g Trockenmilch/50 ml TBST)

Methode:

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach Towbin mittels Tankblotsystem durchgeführt.[184] Nach erfolgter Proteinauftrennung wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen, aus den Glasplatten gelöst und in Towbin-Puffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde eine entsprechend große Nitrocellulosemembran und Whatman-Filterpapiere zurechtgeschnitten und ebenfalls in den Towbin-Puffer gelegt. Der Blot wurde dann für das Tankblotverfahren wie folgt zusammengesetzt:

Kathode→ Schwamm→ 3 Whatman-Filterpapiere→ Gel→ Membran→ 3 Whatman-Filterpapiere→ Schwamm→ Anode

Die Blotting-Sandwiches wurden in die Blotting-Kammer eingeführt und mit Towbin-Puffer getränkt, das Blotten erfolgte bei 370 mA für 1,5 h.

3.7.6 Anfärben der Membran mit Ponceau-S

Die Anfärbung mit dem wasserlöslichen Azofarbstoff Ponceau-S dient zum Nachweis des Proteintransfers auf die Membran. Der Farbstoff bindet dabei reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine, so dass sich die Banden auf der Membran rot anfärben lassen. Durch Waschen mit H_2O und TBST wird die Membran wieder entfärbt und kann weiter bearbeitet werden.

Material:

- Ponceau-S-Färbelösung 0,2 %:
    - 0,2 g Ponceau-S
    - 100 ml Trichloressigsäure 3 %

Methode:

Nach erfolgtem Blot wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt und überschüssiger Farbstoff mit H_2O weggespült. Nach Identifizierung ausreichender Proteinbanden ließ sich die Membran anschließend mit TBST komplett entfärben und konnte dann mit einer 10 %igen Milchpulverlösung für mindestens 1 h bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen blockiert werden.

3.7.7 Antikörperinkubation

Nach erfolgtem Blotten liegen die Proteine frei auf der Membran vor und lassen sich mit entsprechenden Primärantikörpern, die gegen das zu untersuchende Protein gerichtet sind, inkubieren. Ungebundener Primärantikörper wird durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt. Durch Inkubation der Membran mit einem markierten Sekundärantikörper, der mit dem Primärantikörper bindet, kann nach erneuten Waschschritten das gewünschte Protein durch eine Chemolumineszenzreaktion detektiert werden (Kapitel 3.7.8).

Material:

- 1 % BSA in TBST (0,5 g/ 50 ml)
- Primärantikörper — Verdünnung in 1 % BSA-Lösung

Primärantikörper	Verdünnung in 1 % BSA-Lösung
Anti-Caspase-8	1:200
Anti-Caspase-9	1:100
Anti-Bax	1:250
Anti-Bcl-2	1:500
Anti-Bid	1:500
Anti-PARP	1:1000
Anti-AIF	1:1000
Anti-LC3-B	1:1000
Anti-p62	1:1000
Anti-GAPDH	1:1000

- Sekundärantikörper — Verdünnung in 1 % BSA-Lösung

Sekundärantikörper	Verdünnung in 1 % BSA-Lösung
Anti Rabbit IgG	1:10 000

Methode:

Die Membran wurde nach dem Blockieren zur Entfernung des Milchpulvers kurz mit TBST gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Abweichend davon lieferte eine zweistündige Inkubation mit GAPDH ausreichend erfassbare Proteinbanden. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST, wurde der Sekundärantikörper für 1 h auf die Membran gegeben und anschließend erneut dreimal für 10 min gewaschen.

3.7.8 Entwicklung der Membran

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem Chemolumineszenzkit der Firma BioRad. Das Kit enthält zwei Reagenzien: Luminol und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Da der Sekundärantikörper mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, kann eine Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Peroxidase und H_2O_2 erfolgen.[185] Das energiereiche Luminolmolekül wird dabei in einen angeregten Zustand versetzt und bei der Rückkehr in den Grundzustand wird Licht (Photon) genau an der Stelle emittiert, wo es zur spezifischen Bindung des Primärantikörpers mit dem Sekundärantikörper kommt. Die resultierende Chemolumineszenz lässt sich mit der Kamera detektieren Zur Auswertung der Proteinbanden diente der mitaufgetragene Proteinmarker, der Banden bekannter Proteingrößen enthält.

Material:

- Chemolumineszenzkit bestehend aus:
    - Reagenz I: Luminol
    - Reagenz II: Wasserstoffperoxid
- ChemoCam

Methode:

Die Chemolumineszenzreagenzien wurden zu gleichen Teilen gemischt und für 5 min mit der Membran inkubiert. Diese wurde dann zwischen zwei Plastikfolien luftblasenfrei gelegt und mit der Kamera entwickelt. Durch eine vorangegangene Echtzeitvorschau, lässt sich die benötigte Belichtungszeit kalkulieren. Anschließend wird im *Single Scan* Modus eine Einzelaufnahme der Membran mit der zuvor berechneten Belichtungszeit aufgenommen.

3.7.9 Strippen der Membran

Um verschiedene Proteine nacheinander auf einer Membran detektieren zu können, müssen die bereits gebundenen Antikörper von der Membran abgelöst werden. Durch Strippen der Membran mit Stripping-Puffer werden durch saure/basische pH-Werte unter Temperatureinwirkung die Antikörperbindungen wieder vorsichtig gelöst. Es sollte jedoch bedacht werden, dass nach jedem Strippen ein geringer Anteil an

Protein verloren geht, sodass sich dieser Vorgang nicht beliebig oft wiederholen lässt.

Material:

- Roti®-Free Stripping-Puffer

Methode:

Die Membran wurde nach erfolgter Detektion mit TBST gewaschen und anschließend mit Roti®-Free Stripping-Puffer für 30 min bei 56 °C auf dem Schüttelwasserbad inkubiert. Daran folgte ein erneuter Waschschritt mit TBST zur Entfernung des übrigen Puffers und schließlich die erneute Blockierung mit 10 %igem Milchpulver.

3.8 HPLC-Untersuchungen

3.8.1 Reinheit

Die von Frauke Weber am Institut für Pharmazie der Universität Münster synthetisierten Verbindungen wurden zur Prüfung auf Reinheit mittels NMR und HPLC bereits untersucht und als Stammlösungen in DMSO zur weiteren Bearbeitung nach Greifswald geschickt. Bei Erhalt einer neuen Verbindung wurde dennoch ein weiteres Mal die Reinheit durch HPLC überprüft.

Material:

- HPLC : Merck Hitachi mit folgenden Modulen:
  - Entgaser L-7612
  - Interface D-7000
  - Pumpe L-7100
  - Autosampler L-7200
  - Diodenarray-Detektor L-4500
  - Säulenofen L-7360
- RP-Säule: CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 AB, Macherey Nagel
- Acetonitril (ACN; ultrapurer Reinheitsgehalt für HPLC)
- 20 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (KH_2PO_4-Puffer) pH 3,0

Methode:

Isokratisch: Eluent A: 40 % ACN, Eluent B: 60 % KH_2PO_4-Puffer pH 3,0
Flussrate: 0,7 ml/min
Säulentemperatur: 30 °C
Injektionsvolumen: 20 µl
Probenlauf: 30 min
Detektion: 220 nm

Probenvorbereitung: Die Substanzen liegen als 10 mM Stammlösungen gelöst in DMSO vor und wurden mit der Eluentenzusammensetzung (40% ACN/60% Puffer) 1:50 verdünnt und mittels HPLC untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mittels D-7000-HPLC-System-Manager (HSM)-Software analysiert. Bei Detektion eines Hauptwirkstoffpeaks und der Abwesenheit von Nebenpeaks wurde die Stammlösung als geeignet angesehen und für alle weiteren Versuche herangezogen. Durch Aliquotieren der gesamten Probe in Eppendorf-Reaktionsgefäße sollten mehrmalige Einfrier/Auftau-Zyklen minimiert werden, um die Stabilität der Probe zu gewährleisten.

3.8.2 Metabolismus

In der Wirkstoffentwicklung werden Untersuchungen zum Metabolismus neuer Substanzen möglichst zeitnah durchgeführt, um Eliminationsgeschwindigkeiten und entstehende toxische Metabolite zu identifizieren. Dabei werden subzelluläre Fragmente des endoplasmatischen Retikulums (ER) der Leber, die Mikrosomen, in den *in-vitro*-Assays genutzt. Diese enthalten wichtige Enzyme des CYP 450-Systems, die für den Fremdstoffabbau unerlässlich sind. Mit der Vorbehandlung bestimmter Substrate kann die Expression bestimmter CYP 450-Gene selektiv erhöht werden (Enzyminduktion). Beispielsweise führt eine Inkubation von Mikrosomen mit Dexamethason zur verstärkten Biosynthese des CYP 3A4-Isoenzyms. Durch Behandlung dieser induzierten Mikrosomen mit dem Wirkstoffkandidaten und den nötigen Kofaktoren kann dann, auf das am Metabolismus beteiligte Isoenzym, geschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mikrosomen genutzt:

Material:

- Männliche Sprague-Dawley Rattenleber-Mikrosomen
    - nichtinduziert
    - β-Naphthoflavon-induziert (CYP 1A2)
    - Dexamethason-induziert (CYP 3A1)
    - Phenobarbital-induziert (CYP 2B2)
- NADPH-Regenerationssystem (NRS):
    - NADP (1,7 mg/ml)
    - D-Glucose-6-Phosphat Dinatriumsalz-Dihydrat (7,8 mg/ml)
    - Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (6 *Units*/ml)
- Natriumbicarbonat-Lösung 2 %
- Tris-Puffer pH 7,4
- ACN, eisgekühlt

Methode:

Zuerst wurde das NRS für ein Gesamtvolumen von 2,5 ml hergestellt. Dazu wurde eine 2%ige Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$)-Lösung aus 1 g $NaHCO_3$ in 50 ml H_2O gelöst. Pro 2,5 ml Lösung wurde dann jeweils 4,25 mg NADP, 19,5 mg Glucose-6-Phosphat und 5 µl Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (4 mg/ml; 735 *Units*/mg Protein) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß hinzugewogen. Ein weiterer Ansatz wurde hergestellt, der kein NADP enthielt. Dieses System wurde zur sofortigen Weiterverarbeitung hergestellt, konnte jedoch auch für bis zu 8 h bei 4 °C aufbewahrt werden. Desweiteren mussten die Mikrosomen-Fraktionen auf eine Endkonzentration von 20 mg/ml mit Tris-Puffer pH 7,4 eingestellt werden.

Für die Reaktion wurden zunächst Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis gestellt und 100 µl der Leberfraktion sowie 640 µl Tris-Puffer und 10 µl der 10 mM **(*S*)-8**-Stammlösung hinzugegeben, sodass das Reaktionsvolumen genau 750 µl entsprach. Anschließend wurde dieses Gemisch separat mit dem NRS in ein auf 37 °C vortemperiertes Schüttelwasserbad gestellt und durch Zugabe von 250 µl NRS zur Probe die Reaktion gestartet. Analog wurde mit dem NRS ohne NADP verfahren, um den CYP 450 spezifischen Abbau zu quantifizieren. Nach 0, 15, 30 und 60 min wurden jeweils 155 µl der Probe entnommen und zu 155 µl eiskaltem ACN gegeben und der Ansatz zur Fällung der Proteine für 30 min auf Eis gelagert. Nach einer 5minütigen Behandlung im Ultraschallbad wurden die Proben bei 14.000 g für 10 min

bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bis zur HPLC-Untersuchung bei – 32 °C für maximal 48 h gelagert. Bevor die Proben per LC/MS untersucht werden konnten, wurden sie zunächst im Evaporator unter Stickstoffbegasung auf ca. 90 µl eingeengt und anschließend mit 100 µl ACN verdünnt.

3.8.2.1 HPLC-Untersuchung

Material:

- HPLC-Anlage (Module siehe Kapitel 3.8.1)
- 20 mM KH_2PO_4-Puffer pH 3,0
- ACN, ultrarein für HPLC

Methode:

Für die Wahl einer geeigneten HPLC-Methode wurden zunächst viele Parameter, wie die Säulenauswahl, Säulentemperatur, Injektionsvolumina und Flussrate getestet. Schließlich wurde folgende Methode als Standard festgelegt:

- Eluent A: 30 % ACN
- Eluent B: 70 % KH_2PO_4-Puffer pH 3,0
- Säule: CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 AB, Macherey Nagel
- Flussrate: 0,7 ml/min
- Injektionsvolumen: 100 µl
- Säulentemperatur: 30 °C
- Probenlauf: 30 min

Die erhaltenen Chromatogramme wurden mittels D-7000-HPLC-System-Manager (HSM)-Software analysiert und die erhaltenen Signalflächen für die Bestimmung der prozentualen Gehaltsabnahme herangezogen.

3.8.2.2 Kopplung mit LC/MS

Zur weiteren Metabolitenaufklärung wurde die HPLC mit einem Massenspektrometer gekoppelt, um strukturelle Aussagen treffen zu können.

Material:

- LC/MS-Anlage*: Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer* LCMS-IT-TOF mit folgenden Modulen:

  - Solvent Delivery Module: LC-20AD Prominence
  - Autosampler: SIL-20AC HT Prominence
  - Säulenofen: CTO-20A Prominence
  - System Controller: CBM-20A Prominence
  - UV/VIS Photodioden Array Detektor: SPD-M20A Prominence
  - *Evaporative Light Scattering* Detektor: ELSD-LT II
  - Spectrofluorimetric Detektor: RF-10A XL
  - LCMS-IT-TOF *Workstation*
  - Software: LCMS solution Version 3.41
  - HPLC-Säule: Chromolith® SpeedRod RP-18 endcapped, 50 mm
  - Rotary Pumpe (Fa. Edwards UK): E2M28 (Serial No.: 066404429)
- Methanol
- H_2O
- Ameisensäure 0,1 %

Methode:

- Eluentengemisch: Methanol : H_2O (+ 0,1 % Ameisensäure) 45:55
- Flussrate: 0.4 ml/min
- Injektionsvolumen: 2 µl
- Heizblock- und CDL-Temperatur: 200 °C
- Probenlauf: 15 min

Die nach der Evaporation erhaltenen Proben wurden in dem Eluentengemisch der LC/MS aufgenommen und vermessen. Die erhaltenen MS-Spektren wurden auf Strukturmerkmale entstehender Metabolite analysiert.

3.9 Statistik

Alle Experimente sind mindestens dreimal durchgeführt worden und als Mittelwert ± SD angegeben. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm GraphPadPrism über ANOVA mit nachfolgenden vergleichenden Tests nach Dunnett und Bonferroni. Für den Vergleich zweier Messreihen wurde der *Student´s t-Test* (gepaart, zweiseitig) angewandt. *p*-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant angenommen, mit **p* < 0,05; ***p* < 0,001*;* ****p* < 0,001*.*

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen mit Sigma-Rezeptor-Liganden

4.1.1 Untersuchte Substanzen

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Universität Münster wurden im Arbeitskreis Prof. Bernhard Wünsch von Frauke Weber nachfolgende (Tabelle 4.1) mono- bzw. bicyclische Piperazin-Derivate synthetisiert, die in einem weiteren Teilprojekt von Stefanie Brune (ebenfalls Universität Münster) auf ihre Affinität zum σ-Rezeptor untersucht wurden. Parallel zu den Affinitätsuntersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit Zytotoxizitätstests durchgeführt, deren Ergebnisse diskutiert werden. Durch Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden die Verbindungen an unterschiedlichen Positionen des Moleküls variiert. Ausgehend von (*S*)- bzw. (*R*)-Asparaginsäure wurden zunächst enantiomerenreine (Piperazin-2-yl)alkanole mit variierenden Resten an beiden N-Atomen synthetisiert. Desweiteren wurde auch der Einfluss der Seitenkettenlänge, ausgehend von (S)-Glutaminsäure, untersucht. Schließlich wurden konformativ fixierte, überbrückte Analoga der (Piperazin-2-yl)alkanole entwickelt, um Vergleiche mit den monocyclischen Analoga ziehen zu können.[186]

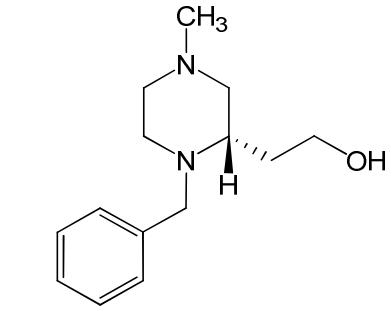
Tabelle 4.1 Strukturelle Übersicht aller mono- und bizyklischen Piperazinederivate.

Monocyclische Piperazine

Alkylrest an N4

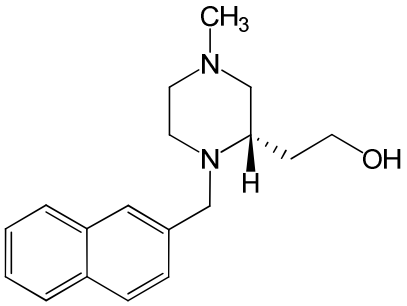
(*S*)-1

WMS 34-01



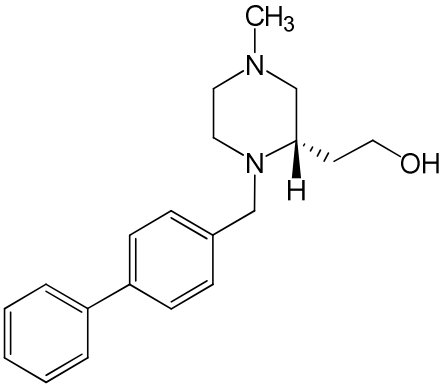
(*S*)-2

WMS 34-03



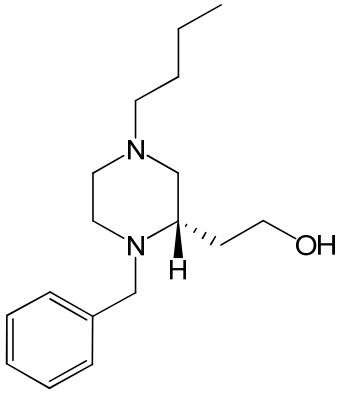
(*S*)-3

WMS 34-04



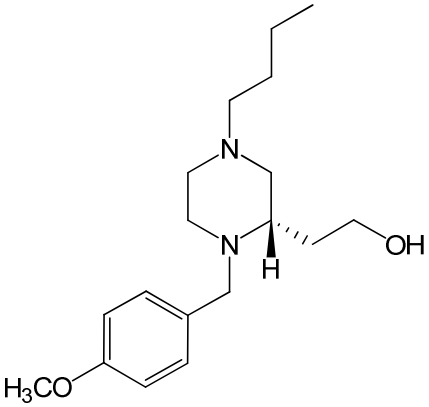
(*S*)-4

WMS 34-06



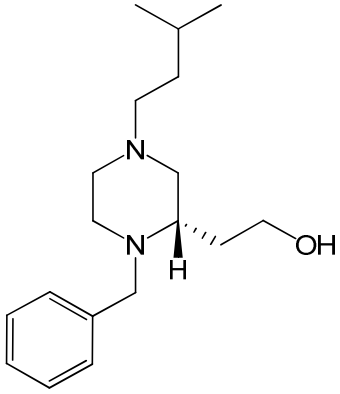
(*S*)-5

WMS 34-08



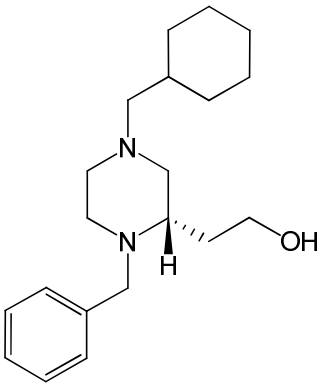
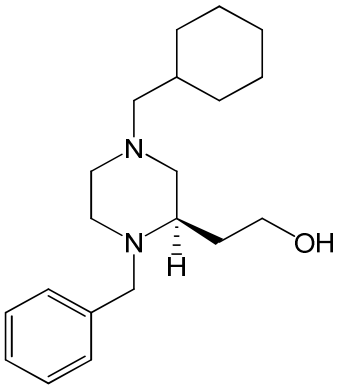
(*S*)-6

WMS 34-09

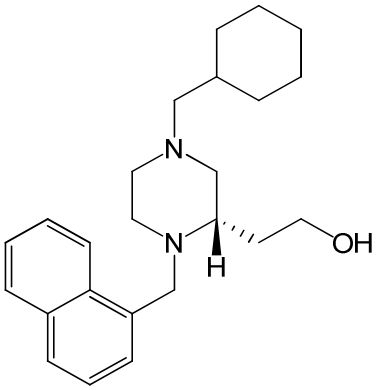
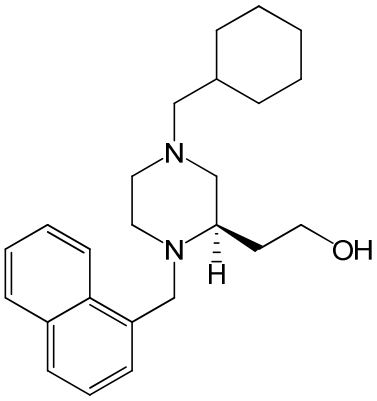


Cyclohexylmethyl-Rest an N4

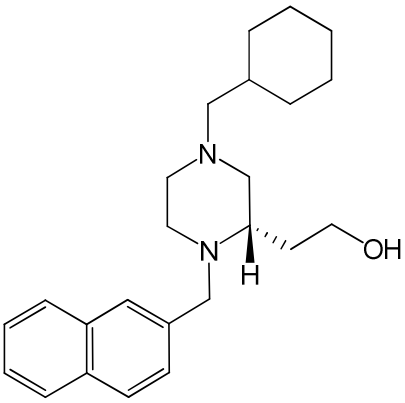
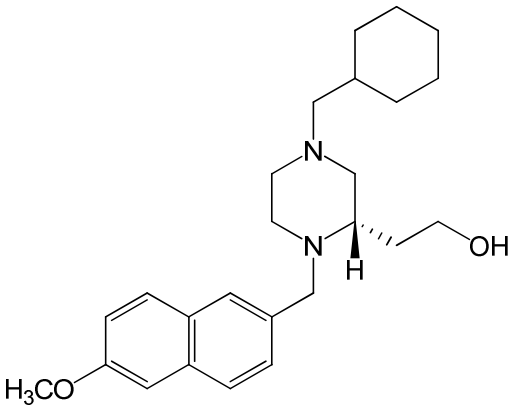
Benzyl-Rest an N1

(*S*)-7	**(*R*)-7**
WMS 34-07	**WMS 34-15**
	

1-Naphthylmethyl-Rest an N1

(*S*)-8	**(*R*)-8**
WMS 34-10	**WMS 34-13**
	

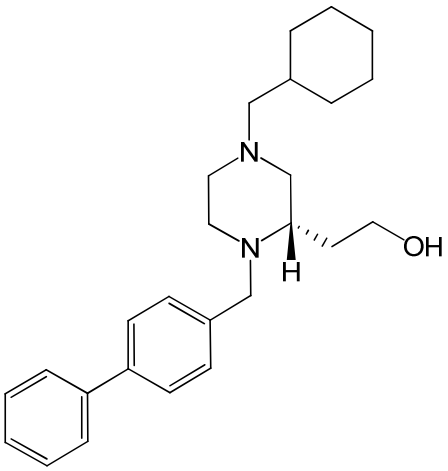
2-Naphthylmethyl-Rest an N1

(*S*)-9	**(*S*)-10**
WMS 34-21	**WMS 34-18**
	

4-Biphenylmethyl-Rest an N1

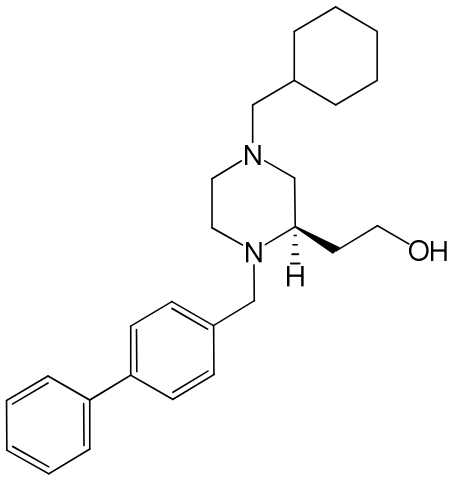
(*S*)-11

WMS 34-11



(*R*)-11

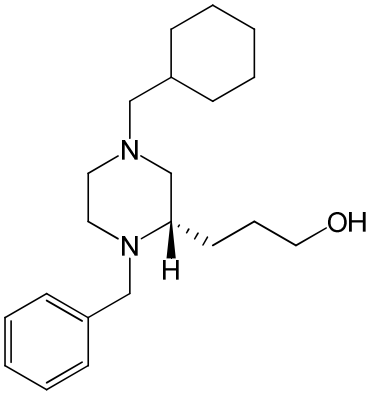
WMS 34-14



Verlängerung der 2-Hydroxyalkyl-Seitenkette

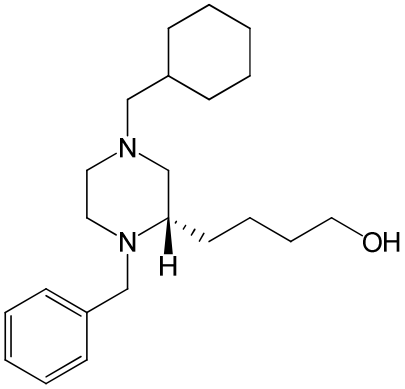
(*S*)-12

WMS 34-20



(*S*)-13

WMS 34-19

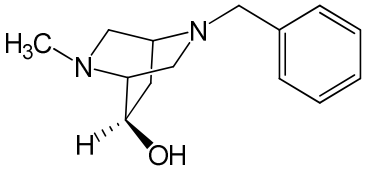


Bicyclische Piperazine

Alkyl-Rest an N2

(*R,S,R*)-14

WMS 34-02

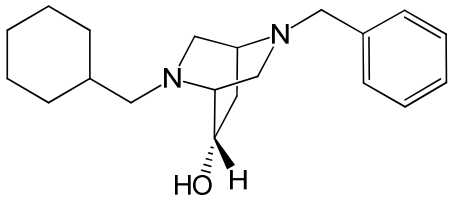


Cyclohexylmethyl-Rest an N2

Benzyl-Rest an N5

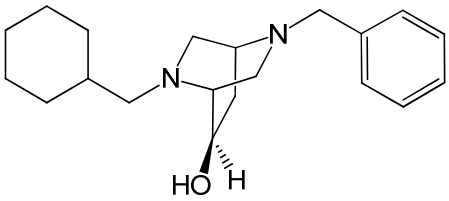
(*R,S,S*)-15

WMS 34-16



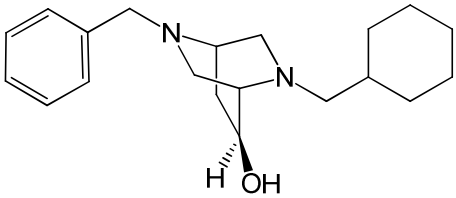
(*R,S,R*)-15

WMS 34-17



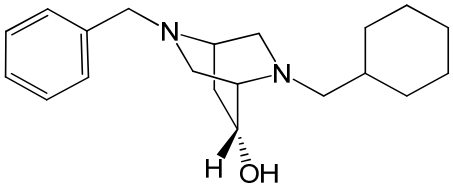
(*S,R,R*)-15

WMS 34-23



(*S,R,S*)-15

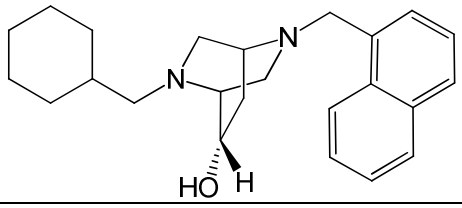
WMS 34-24



Naphthylmethyl-Rest an N5

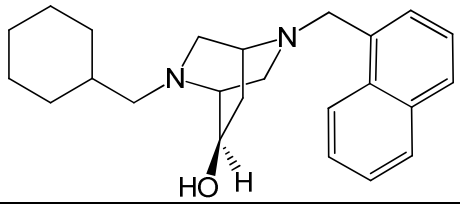
(*R,S,S*)-16

WMS 34-27



(*R,S,R*)-16

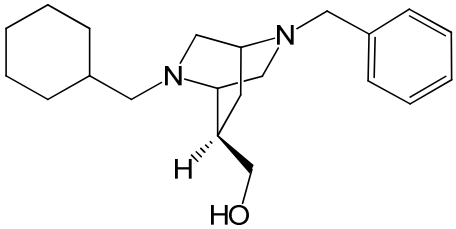
WMS 34-28



Verlängerung der 2-Hydroxyalkyl-Seitenkette

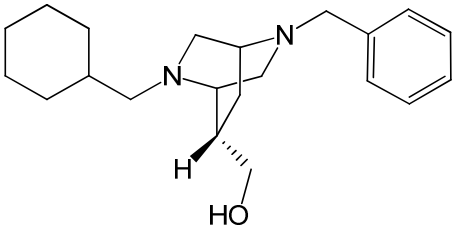
(*S,S,R*)-17

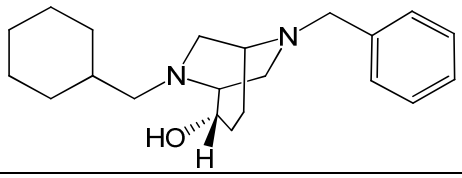
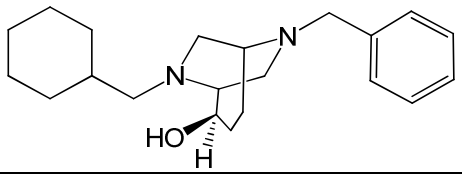
WMS 34-26



(*R,R,S*)-17

WMS 34-30



Erweiterung zur Propanobrücke	
(*R,S,S*)-18 **WMS 34-31**	**(*R,R,S*)-18** **WMS 34-32**
	

Als Vergleichssubstanz wurde der kommerziell erhältliche σ_1-Antagonist/σ_2-Agonist 1-Cyclohexyl-4-[3-(5-methoxy-1,2,3,4-tetra-hydronaphthalen-1-yl)propyl]piperazin (PB 28) sowie der selektive σ_1-Agonist (+)-Pentazocin und der unselektive σ_1-Antagonist Haloperidol auf deren antiproliferierende Eigenschaften in ausgewählten Zelllinien untersucht. Die Strukturen sind in Abbildung 4.1 wiedergegeben.

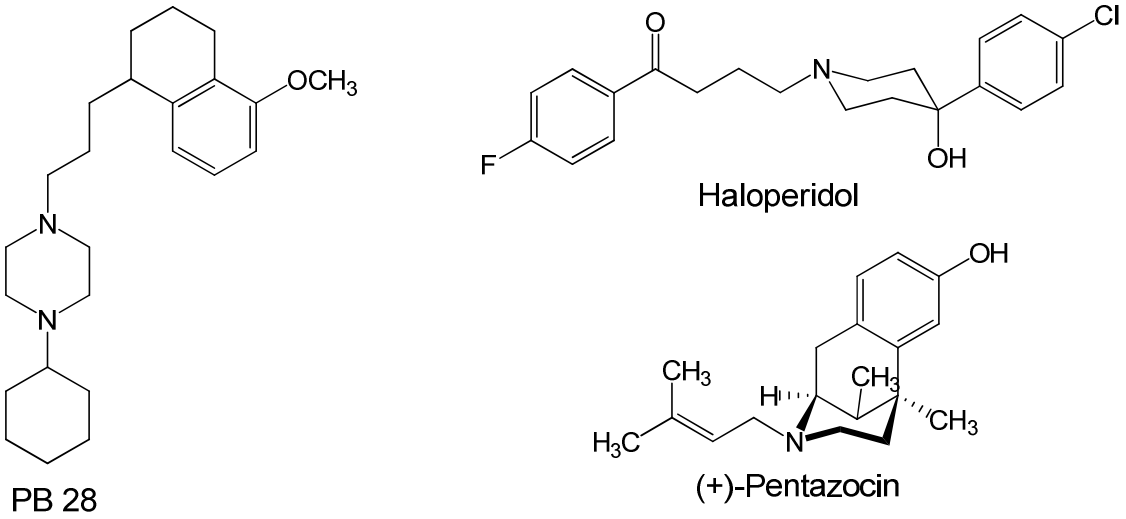


Abbildung 4.1 Strukturen ausgewählter σ-Rezeptor-Liganden.

4.1.2 Antiproliferative Wirkung von σ-Rezeptor-Liganden und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Nachdem die Reinheit jeder Verbindung eingangs geprüft wurde, war es grundlegend die antiproliferative Wirkung der Substanzen in einer Reihe von Zelllinien zu untersuchen. In Tabelle 4.2 sind alle IC_{50}-Werte der getesteten Verbindungen zusammengefasst. Generell lässt sich, mit Ausnahme der RPMI 8226-Zellen, feststellen, dass die bicyclischen Alkohole, mit einem Cyclohexylmethyl-Rest

an N2 und einem Naphthylmethyl-Rest an N5 (**(*R,S,S*)-16** und **(*R,S,R*)-16**) sowie die monocyclischen Verbindungen, mit ebenso einem Cyclohexylmethyl-Rest an N4 und einem raumfüllenden Substituenten an N1 (**(*S*)-8/(*R*)-8/(*S*)-9**): Naphthylmethyl-, **(*S*)-10**: OCH_3-Naphthylmethyl- und **(*S*)-** und **(*R*)-11**: Biphenylmethyl-) in jeder Zelllinie zu den drei Verbindungen mit geringstem IC_{50}-Wert zählen. Bei genauerer Betrachtung ergibt sich für die A427-Zelllinie nach aufsteigenden IC_{50}-Werten folgender Trend:

PB 28 < **(*R,S,S*)-16** < **(*S*)-9** < **(*S,R,R*)-15** < **(*R*)-11**< **(*R*)-8** ≤ **(*S*)-10** < **(*R,S,R*)-16** < **(*R,S,S*)-18** ≤ **(*S,S,R*)-17** < **(*S*)-8** ≤ **(*S*)-11** ≤ **(*S*)-13** ≤ Haloperidol ≤ **(*R,S,R*)-15** < **(*R,R,S*)-18** < **(*R,R,S*)-17** < **(*S,R,S*)-15** = **(*S*)-3** < **(*S*)-7** < **(*R,S,S*)-15**

Das Wachstum dieser Zellen wird von den meisten Verbindungen gehemmt.

Auch in der Blasenkrebszelllinie 5637 zeigen zahlreiche Verbindungen antiproliferierende Eigenschaften. Die monocyclischen Piperazine mit Cyclohexylmethyl-Rest an N4 und Naphthylmethyl-Rest an N1 zeigen hier die effektivsten zytotoxischen Eigenschaften:

(*S*)-10 ≤ **(*S*)-9** ≤ Haloperidol ≤ Pentazocin < **(*S*)-8** < **(*R,S,S*)-16** < **(*R*)-8** ≤ **(*S,R,R*)-15** = **(*R,S,R*)-16** < **(*S*)-13** < **(*R*)-11** < **(*R,R,S*)-17** ≤ **(*S*)-12** < PB 28 < **(*S,S,R*)-17** ≤ **(*R,S,R*)-15** < **(*S*)-11**

Das Wachstum der Pankreas-Krebszelllinie DAN-G hemmen nur fünf Substanzen mit einer Konzentration unterhalb von 20 µM. Insgesamt sind die IC_{50}-Werte jedoch höher als bei den beiden vorangegangenen Zelllinien A427 und 5637:

PB 28 < **(*R,S,S*)-16** < **(*R*)-11** < **(*R*)-8** < **(*R,S,R*)-16** < **(*S*)-10**

Tabelle 4.2 Übersicht der IC_{50}-Konzentrationen aller getesteten Verbindungen an ausgewählten humanen Krebszelllinien mittels Kristallviolett-Assay.

Verbindung	A427	5637	DAN-G	LCLC	MCF-7	RT-4
(*S*)-1	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-2	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-3	11,29 ± 5,11	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-4	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-5	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-6	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-7	13,63 ± 4,89	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*R*)-7	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*S*)-8	9,12 ± 1,98	3,65 ± 2,25	>20	16,18 ± 1,21	9,77 ± 3,01	5,76 ± 2,89
(*R*)-8	5,02 ± 1,68	4,79 ± 2,94	13,30 ± 3,90	6,48 ± 0,90	9, 05 ± 1,07	6,68 ± 2,94
(*S*)-9	2,46 ± 2,62	2,13 ± 1,89	>20	>20	>20	>20
(*S*)-10	5,17 ± 2,72	2,00 ± 2,60	16,20 ± 5,72	13,42 ± 6,90	11,55 ± 8,27	7,51 ± 3,61
(*S*)-11	9,25 ± 1,00	10,54 ± 0,60	>20	>20	>20	>20
(*R*)-11	3,46 ± 1,21	6,57 ± 4,76	12,21 ± 0,50	14,90 ± 1,05	8 ,83 ± 2,08	11,31 ± 3,39

Verbindung	A427	5637	DAN-G	LCLC	MCF-7	RT-4
(*S*)-12	>20	8,03 ± 5,62	>20	>20	15,27 ± 2,18	>20
(*S*)-13	9,56 ± 5,09	6,02 ± 4,01	>20	>20	>20	>20
(*R,S,R*)-14	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*R,S,S*)-15	16,49 ± 6,20	>20	>20	>20	>20	>20
(*R,S,R*)-15	9,84 ± 4,32	9,16 ± 6,25	>20	>20	>20	>20
(*S,R,R*)-15	2,81 ± 1,69	4,84 ± 3,11	>20	>20	>20	>20
(*S,R,S*)-15	11,24 ± 4,80	>20	>20	>20	>20	>20
(*R,S,S*)-16	2,28 ± 0,90	4,29 ± 1,82	10,17 ± 3,09	10,43 ± 0,89	6 ,96 ± 4,11	12,89 ± 7,26
(*R,S,R*)-16	6,01 ± 3,80	4,87 ± 1,22	16,07 ± 2,06	8,76 ± 2,00	6, 75 ± 1,50	11,28 ± 5,94
(*S,S,R*)-17	7,63 ± 4,78	8,96 ± 3,94	>20	>20	>20	>20
(*R,R,S*)-17	10,61 ± 3,99	7,90 ± 4,93	>20	>20	12,03 ± 4,77	>20
(*R,S,S*)-18	7,56 ± 4,70	>20	>20	>20	13,58 ± 2,83	>20
(*R,R,S*)-18	10,29 ± 2,91	>20	>20	>20	16,17 ± 2,84	>20
(*R,R,S*)-19	7,2 ± 5,52	13,85 ± 5,14	>20	14,33 ± 13,60	>20	n.b.
(*R,S,S*)-19	22,13 ± 3,31	22,13 ±3,62	>20	>20	n.b.	n.b.

Verbindung	A427	5637	DAN-G	LCLC	MCF-7	RT-4
(*R,S,S*)-20	3,49 ± 1,07	10,75 ± 0,43	5,32 ± 0,86	>20	6,32 ± 3,84	n.b.
(*S,R,R*)-20	10,98 ± 4,38	11,39 ± 5,96	11,30 ± 2,53	>20	14,49 ± 2,26	n.b.
(*R,S,S*)-21	5,72 ± 0,66	>20	19,77 ± 8,10	>20	8,41 ± 1,20	n.b.
(*S,R,R*)-21	8,14 ± 2,97	10,74 ± 1,40	11,52 ± 0,57	>20	13,93 ± 0,54	n.b.
(*SR,RS,RS*)-22	>20	>20	>20	>20	n.b.	n.b.
(*SR,SR,RS*)-22	>20	>20	>20	>20	36,58 ± 3,64	n.b.
(*SR,RS,RS*)-23	16,95 ± 1,62	6,83 ± 5,28	>20	>20	12,85 ± 2,63	n.b.
(*SR,SR,RS*)-23	29,49 ± 9,04	18,50 ± 1,80	>20	>20	>20	n.b.
(*S,S*)-24	15,44 ± 2,13	8,83 ± 7,18	16,50 ± 3,71	20,41 ± 3,66	16,13 ± 0,31	n.b.
(*S,S*)-25	10,32 ± 0,48	12,73 ± 2,02	17,53 ± 5,26	>20	17,79 ± 2,64	n.b.
PB 28	0,81 ± 0,34	8,35 ± 6,67	4,50 ± 1,07	6,99 ± 2,40	1,66 ± 0,48	8,13 ± 2,53
Haloperidol	9,63 ± 3,67	2,25 ± 1,39	>20	10,87 ± 1,91	23 ± 10*	16 ± 5*
Pentazocin	>20	3,49 ± 0,90	20,08 ± 5,31	>20	>20*	>20*

IC_{50} in µM, Mittelwerte ± SD, n ≥ 3, * IC_{50} stammen von Geiger et al.[138], n.b. = nicht bestimmt

Auch in der Lungenkrebszelllinie LCLC lässt sich klar darlegen, dass ein Cyclohexylmethyl-Rest an N4 sowie ein 1-Naphthylmethyl-Rest bzw. 4-Biphenylmethyl-Rest an N1 sich positiv auf die antiproliferierende Aktivität der Piperazine auswirken. Eben diese Strukturmerkmale erfüllen alle wirksamen Verbindungen:

(*R*)-8 < **(*R,S,R*)-16** < **(*R,S,S*)-16** < Haloperidol < **(*S*)-10** < **(*R*)-11** < **(*S*)-8**

In der MCF-7-Zelllinie sind ebenfalls diese Piperazinderivate am wirksamsten:

PB 28 < **(*R,S,R*)-16** ≤ **(*R,S,S*)-16** < **(*R*)-11** ≤ **(*R*)-8** < **(*S*)-8** < **(*S*)-10** < **(*R,R,S*)-17** < **(*R,S,S*)-18** < **(*S*)-12** < **(*R,R,S*)-18**

Die Blasenkrebszelllinie RT-4, die bekannt für eine hohe σ_2-Rezeptor-Dichte ist[133], verhält sich ähnlich wie die LCLC-Zelllinie. Auch hier sind wiederum nur die mono- bzw. bicyclischen Verbindungen aktiv, die einen Cyclohexylmethyl-Rest an N4 sowie einen großen Methoxy-/Naphthylmethyl- oder 4-Biphenylmethyl-Rest an N1 tragen:

(*S*)-8 < **(*R*)-8** < **(*S*)-10** < PB 28 < **(*R,S,R*)-16** = **(*R*)-11** < **(*R,S,S*)-16** < Haloperidol

Tabelle 4.3 Übersicht der IC_{50}-Konzentrationen aller getesteten Verbindungen an den (Teil-)Suspensionszelllinien RPMI 8226 und HL 60 mittels MTT-Assay.

Verbindung	RPMI 8226	HL 60
(*R*)-7	>20	>20
(*S*)-8	1,29 ± 1,28	>20
(*R*)-8	8,53 ± 3,50	17,35 ± 3,35
(*S*)-9	7,31 ± 3,95	>20
(*S*)-10	16,33 ± 3,23	23,03 ± 6,06
(*S*)-11	21,32 ± 6,46	>20
(*R*)-11	13,04 ± 4,90	>20
(*S*)-12	>20	>20
(*S*)-13	>20	>20
(*R,S,S*)-15	>20	>20
(*R,S,R*)-15	>20	>20
(*S,R,R*)-15	8,41 ± 4,34	>20
(*S,R,S*)-15	>20	>20
(*R,S,S*)-16	12,72 ± 4,07	11,17 ± 1,56
(*R,S,R*)-16	8,95 ± 3,56	14,67 ± 1,40
(*S,S,R*)-17	7,18 ± 2,58	>20
(*R,R,S*)-17	>20	>20
(*R,S,S*)-18	12,42 ± 3,58	>20
(*R,R,S*)-18	5,60 ± 2,17	>20
PB 28	9,29 ± 4,25	9,46 ± 3,14
Haloperidol	16,39 ± 6,15	>20
(+)-Pentazocin	>20	>20
Doxorubicin	1,30 ± 1,98	0,05 ±0,02 [a)]
Etoposid	3,67 ± 0,95	0,31 ± 0,07 [a)]

Verbindung	RPMI 8226	HL 60
Cisplatin	4,37 ± 3,04	0,4 ± 0,09[a)]
Melphalan	8,47 ± 0,44	1,04 ± 0,48[a)]
TRAIL	0,07 ± 0,08	n.b.

IC_{50} in µM, Mittelwerte ± SD, n ≥ 3, [a)] IC_{50}-Konzentrationen aus Bracht et al.[187], n.b. = nicht bestimmt.

Aus der Tabelle 4.3 geht hervor, dass in der Suspensionszelllinie HL 60 nur **(*R,S,S*)-16** und **(*R,S,R*)-16** zytotoxische Aktivität mit einer IC_{50} oberhalb von 10 µM zeigen, sowie **(*R*)-8** und **(*S*)-10** mit IC_{50}-Werten oberhalb von 15 µM, was wiederum die Cyclohexylmethyl- und (Methoxy-)Naphthylmethyl-Reste als wichtige Strukturelemente unterstreicht (PB 28 < **(*R,S,S*)-16** < **(*R,S,R*)-16** < **(*R*)-8** < **(*S*)-10**). Gleichzeitig wirkt auch der σ_1-Antagonist/σ_2-Agonist PB 28 im mikromolaren Bereich, während einige herkömmliche Chemotherapeutika deutlich geringere Konzentrationen für eine Wachstumshemmung benötigen.

Die Multiple Myelom-Zelllinie RPMI 8226, die eine hohe Dichte an σ_1-Rezeptoren aufweist[132], wird in ihrem Wachstum wie folgt gehemmt:

(*S*)-8 < **(*R,R,S*)-18** < **(*S,S,R*)-17** ≤ **(*S*)-9** < **(*S,R,R*)-15** ≤ **(*R*)-8** ≤ **(*R,S,R*)-16** < PB 28 < **(*R,S,S*)-18** ≤ **(*R,S,S*)-16** < **(*R*)-11** < **(*S*)-10** < **(*S*)-11**

Bekannte Chemotherapeutika, wie z. B. Cisplatin (IC_{50} 4,37 µM) oder das für die Therapie des Multiplen Myeloms angewandte Melphalan (IC_{50} 8,47 µM) zeigen wachstumshemmende Konzentrationen, die ebenfalls wie die σ-Liganden, im mikromolaren Bereich liegen.
Nachdem für jede einzelne Zelllinie eine Reihenfolge nach geringster IC_{50} aufgestellt worden ist, fasst Tabelle 4.4 die daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen zusammen:

Tabelle 4.4 Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

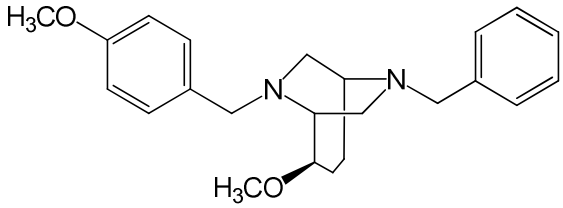
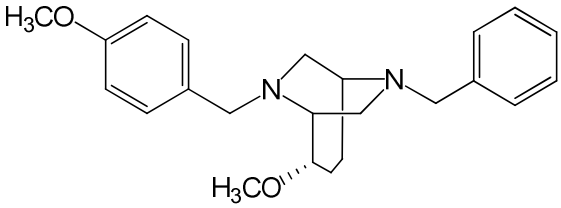
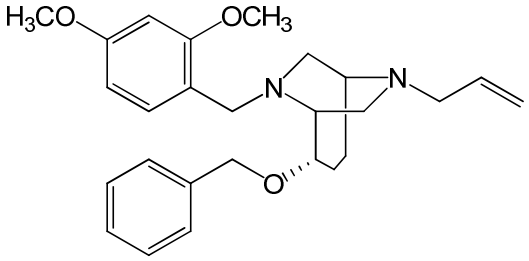
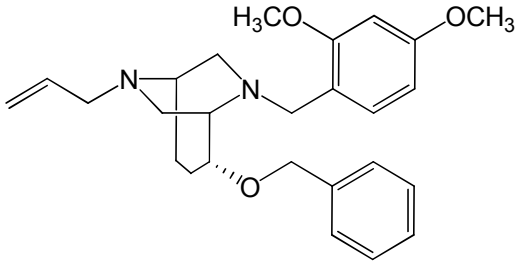
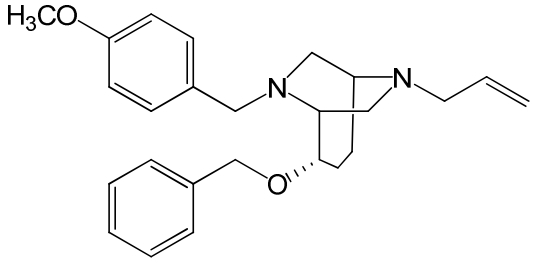
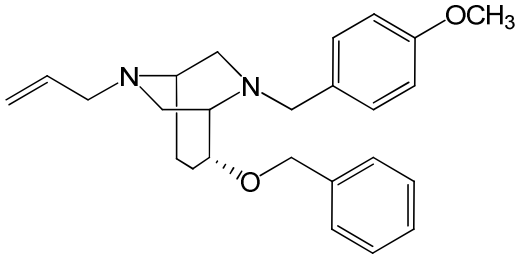
Struktur	Wirkung
Monocyclische Verbindungen	
Piperazine mit Alkylrest an N4	keine Wirkung (Ausnahme: A427-Zelllinie)
Vergrößerung des Restes an N4 durch Einführung eines Cyclohexylmethylrings	Wirkungssteigerung in allen Zelllinien Abnahme der Selektivität
Vergrößerung des Restes an N1 durch Einführung von Naphthylmethyl-oder Biphenylmethyl-Resten	Wirkungssteigerung in allen Zelllinien Abnahme der Selektivität
Stereochemie	kein genereller Trend erkennbar (bei den Verbindungen **(S)-11** und **(R)-11** ist das (R)-Enantiomer immer wirksamer)
Verknüpfung des Naphthylmethylringes	die Verknüpfung in Position 2 des Naphthylmethylringes führt zu verminderter Aktivität, Ausnahme: A427 Zelllinie
Einführung einer 6-Methoxygruppe in den 2-Naphthylmethylring	Erhöhung der wachstumshemmenden Eigenschaft, Ausnahme: A427 Zelllinie
Erweiterung der Hydroxyalkyl-Seitenkette in Position 2 des Piperazinrings	kein Trend erkennbar (in der Zelllinie 5637 nimmt die IC_{50} mit zunehmender Kettenlänge leicht ab)
Bicyclische Verbindungen	
Alkylrest an N2	keine Wirkung
Vergrößerung des Restes an N2 durch Einführung eines Cyclohexylmethylrings	Wirkungssteigerung

Struktur	Wirkung
Vergrößerung des Restes an N5 durch Austausch des Benzylrings gegen einen 1-Naphthylmethylrest	Wirkungssteigerung in allen Zelllinien, Abnahme der Selektivität
Stereochemie	kein Trend erkennbar (nur bei einem Diastereomerenpaar **(*R,S,S*)-18** /**(*R,R,S*)-18**)
Erweiterung der Hydroxyalkyl-Seitenkette in Position 7	kein Trend erkennbar
Vergrößerung der Überbrückung von Ethano- zur Propanobrücke	kein Trend erkennbar

Außerdem wurden überbrückte Piperazin-Derivate aus dem Arbeitskreis von Professor Wünsch (Universität Münster) zur Verfügung gestellt, die ebenfalls auf Rezeptoraffinität und Zytotoxizität untersucht wurden (Tabelle 4.5).[138,188,189] Dabei handelt es sich bei den Verbindungen von Dr. Ralf Holl um Propano-überbrückte Piperazine, mit 6-Allyl- (**(*R,S,S*)-20**, **(*S,R,R*)-20**, **(*R,S,S*)-21** und **(*S,R,R*)-21**) bzw. 8-(Di-)Methoxybenzyl-Resten (**(*R,R,S*)-19** und **(*R,S,S*)-19**) an den N-Atomen, sowie einem Benzylether an Position 2 des Piperazinrings. Durch Austausch des Allylrests gegen einen Benzylring, sowie des Benzylethers gegen eine Methoxygruppe, sollte der Effekt aromatischer Reste an den N-Atomen untersucht werden. In Analogie dazu wurden von Sunil Sunnam Derivate mit Butano-Brücke synthetisiert, und der Effekt des Substituenten in Position 2 (-OH bzw. $–OCH_3$) untersucht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verbindungen mit Benzylether in allen getesteten Zelllinien, mit Ausnahme der LCLC-Zelllinie und **(*R,S,S*)-21** in der 5637-Zelllinie, wirksam sind (d.h. IC_{50} < 20 µM). Dabei wirkt sich die Anzahl der Methoxygruppen (eine oder zwei) am Benzylring sowie die Stereochemie ((*R*)- bzw. (*S)*-Enantiomer) nicht auf die zytotoxische Wirkung aus. Der Austausch des Allylrests gegen einen Benzyl-Rest an N6 bzw. des Benzylethers gegen eine Methoxygruppe in Position 2 führt in den meisten Zelllinien zu einer verringerten antiproliferativen Aktivität, was sich in einer erhöhten IC_{50} bzw. keiner Aktivität (DAN-G-Zellen) wiederspiegelt (Ausnahme: LCLC-Zellen). Die Vergrößerung zur Butano-Überbrückung führt in den A427-, 5637- und LCLC-Zellen zu keiner Verbesserung

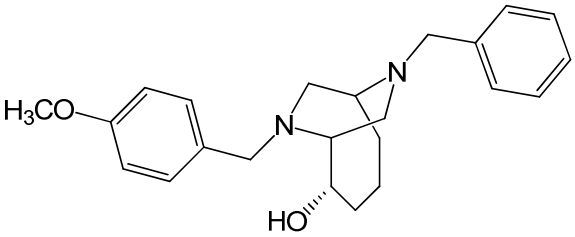
der wachstumshemmenden Eigenschaften. Vergleicht man die Butano-überbrückten Piperazine jedoch untereinander, so zeigt sich der Trend, dass ein unsubstituierter Ring (**(*S,S*)-24** und **(*S,S*)-25**) eine geringere IC_{50} liefert, als mit Hydroxy- oder Methoxy-Substitution.

Tabelle 4.5 Übersicht der überbrückten Piperazine von Holl und Sunnam.

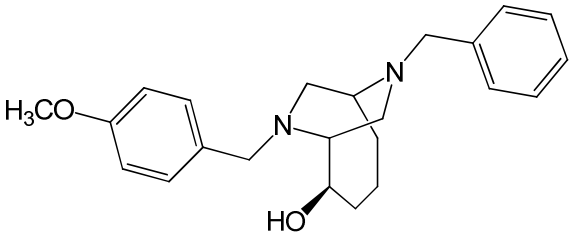
Propanobrücke	
(*R,R,S*)-19 **WMS 01-01** 	**(*R,S,S*)-19** **WMS 01-02** 
(*R,S,S*)-20 **WMS 11-07** 	**(*S,R,R*)-20** **WMS 11-08** 
(*R,S,S*)-21 **WMS 11-11** 	**(*S,R,R*)-21** **WMS 11-12** 

Butanobrücke

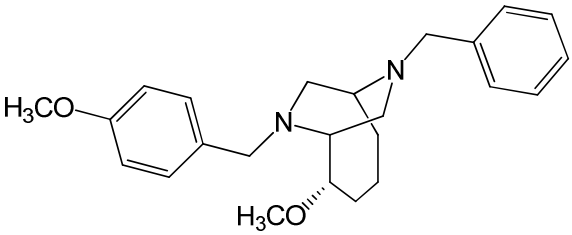
(*SR,RS,RS*)-22
WMS 21-12



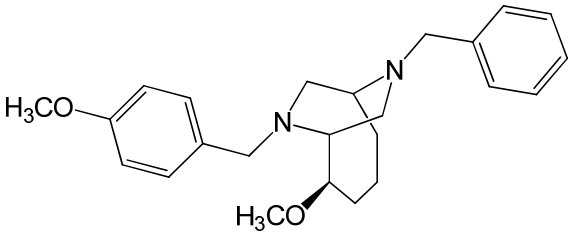
(*SR,SR,RS*)-22
WMS 21-01



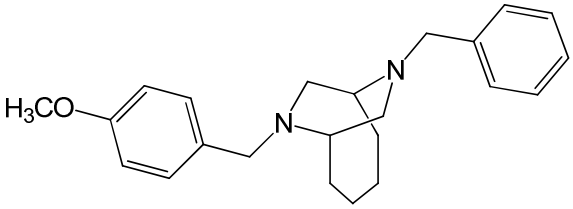
(*SR,RS,RS*)-23
WMS 21-13



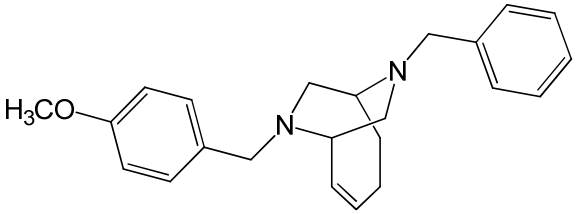
(*SR,SR,RS*)-23
WMS 21-02



(*S,S*)-24
WMS 21-06



(*S,S*)-25
WMS 21-08



Nachdem die Enantiomerenpaare **(*S*)-8** und **(*R*)-8** sowie **(*S*)-11** und **(*R*)-11** zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die Liganden waren, die das Wachstum ausgewählter Zelllinien im unteren mikromolaren Bereich hemmen konnten, wurden diese Verbindungen für wirkmechanistische Untersuchungen ausgewählt.

4.1.3 Lichtmikroskopische Veränderungen

Nach Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit den Enantiomerenpaaren werden die typischen Merkmale des apoptotischen Zelltodes sichtbar. Während die unbehandelten Kontrollzellen einheitlich rund wachsen, erkennt man nach bereits 12 h Behandlung erste Ausstülpungen der Zellen und die Formation von sogenannten „*apoptotic bodies*“ (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4, blaue Pfeile). Adhärente Zellen verlieren ihre Hafteigenschaften und die Zelldichte

nimmt ab (besonders bei **(*S*)-11** und **(*R*)-11**), da einige Zellen bereits lysiert und abgestorben sind. Für das Enantiomerenpaar **(*S*)-8** und **(*R*)-8** treten diese Effekte in abgeschwächter Weise auf, nach Behandlung mit **(*S*)-8** für 96 h hat sich die Zelldichte kaum verändert und auch die Zellverformungen sind deutlich schwächer ausgeprägt.

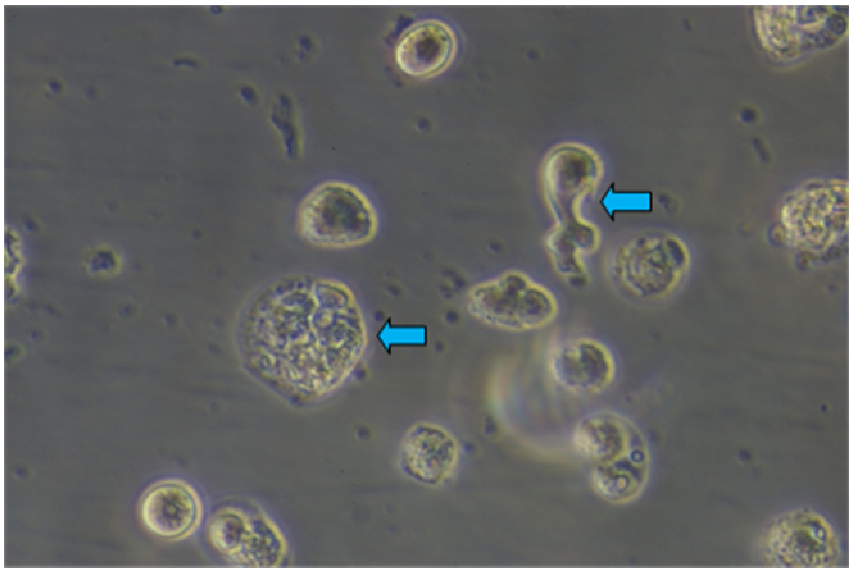


Abbildung 4.2 Typische morphologische Merkmale des apoptotischen Zelltodes.
Phasenkontrastphotographie (800 × Vergrößerung) nach Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 23 µM **(*R*)-11** für 48 h.

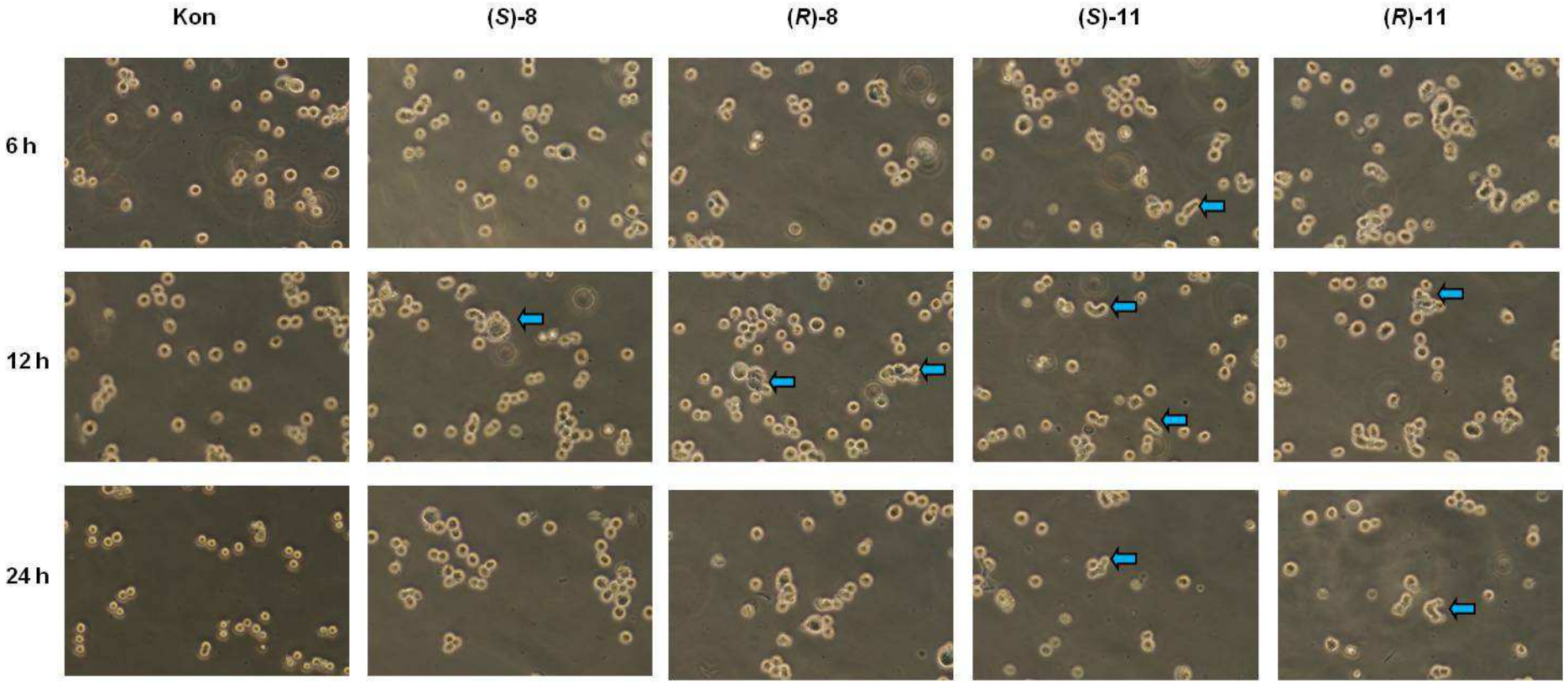


Abbildung 4.3 Lichtmikroskopische Aufnahmen von RPMI 8226-Zellen (I).
RPMI 8226-Zellen wurden für 0–24 h mit 3,6 µM **(*S*)-8**, 36 µM **(*S*)-11**, 15,3 µM **(*R*)-8** und 23 µM **(*R*)-11** inkubiert und unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 400 ×) mit einer digitalen Spiegelreflexkamera fotografiert. Blaue Pfeile kennzeichnen die apoptotischen Zellen

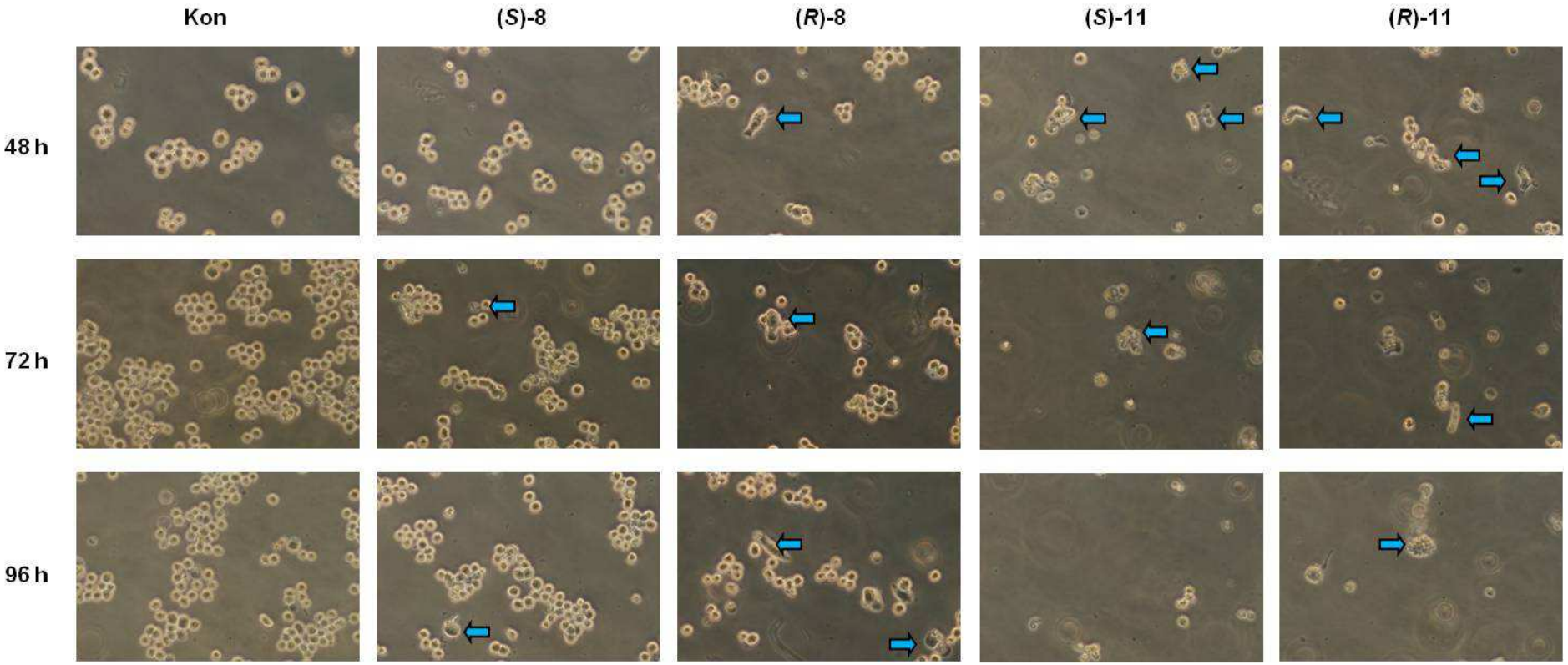


Abbildung 4.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen von RPMI 8226-Zellen (II).
RPMI 8226-Zellen wurden für 48–96 h mit 3,6 µM**(*S*)-8**, 36 µM **(*S*)-11**, 15,3 µM **(*R*)-8** und 23 µM **(*R*)-11** inkubiert und unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 400 ×) mit einer digitalen Spiegelreflexkamera fotografiert. Kon = unbehandelte Kontrollzellen, blaue Pfeile kennzeichnen die apoptotischen Zellen.

4.1.4 Chromatinkondensation

Zum Nachweis der DNA-Kondensation wurden RPMI 8226-Zellen mit den σ-Liganden 48 h inkubiert und anschließend mit DAPI/Methanol angefärbt. Die unbehandelten Kontrollzellen fluoreszieren nur leicht und mit kontinuierlicher Intensität, da bei ihnen das Chromatin gleichmäßig über den Kern verteilt vorliegt. Die Verdichtung des Chromatins (Kondensation), die während der Apoptose stattfindet, kann durch verstärkte Fluoreszenzintensität in allen behandelten Proben wahrgenommen werden, was Abbildung 4.5 verdeutlicht.

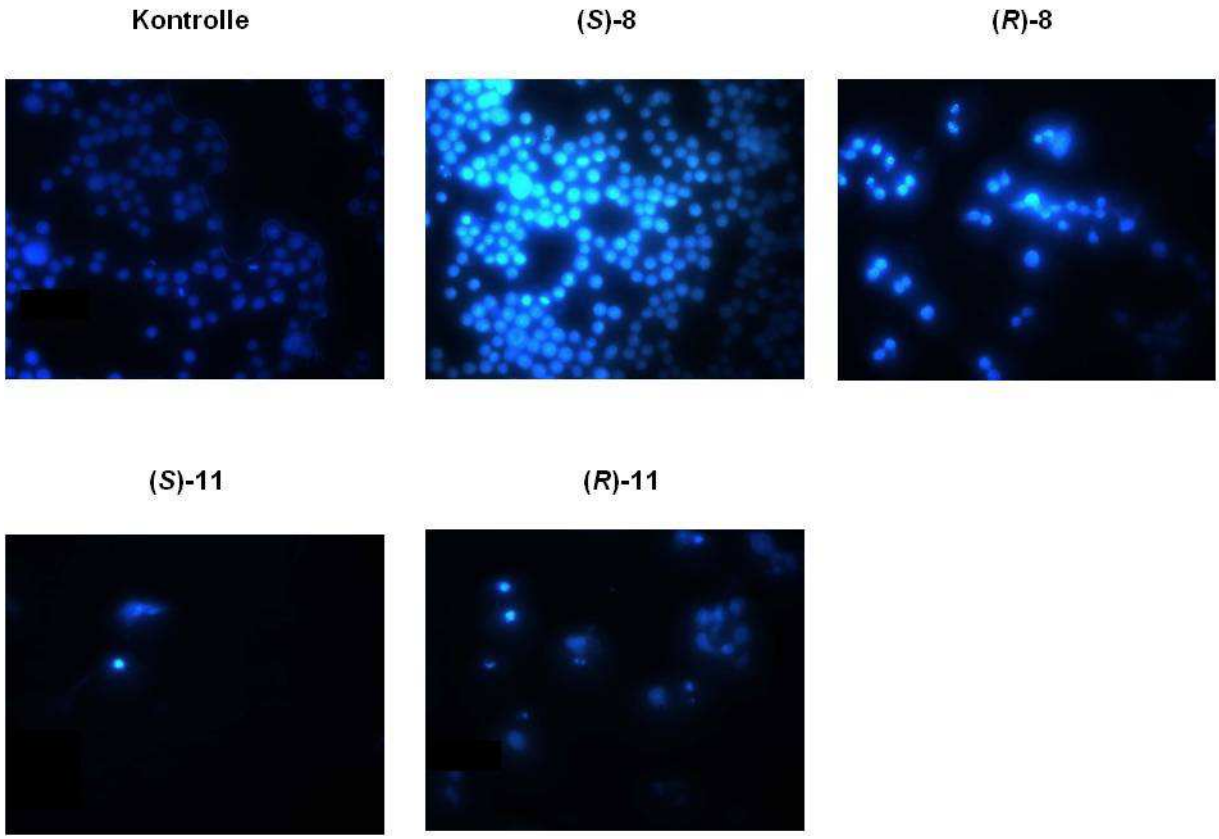


Abbildung 4.5 Detektion des kondensierten Chromatins.
RPMI 8226-Zellen wurden mit 3,6 µM **(*S*)-8**, 36 µM **(*S*)-11**, 15,3 µM **(*R*)-8** und 23 µM **(*R*)-11** für 48 h inkubiert, mit DAPI/Methanol angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.1.5 Detektion der DNA-Fragmentierung in Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt

Die DNA-Fragmentierung der Zellkerne führt zu Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt und kann zur Quantifizierung der Apoptose herangezogen werden. Durch Anfärbung der zellulären DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) lässt

sich nach der Methode von Nicoletti der DNA-Gehalt von Zellen bestimmen (siehe Abbildung 4.6).

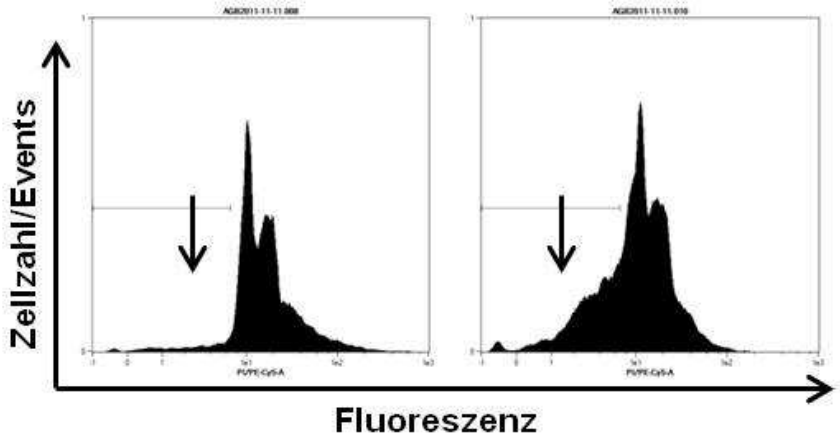


Abbildung 4.6 Schematische Darstellung der sub-G_1-Population.
Links: Unbehandelte Kontrollzellen; rechts: **(*S*)-11** behandelte Zellen nach 48 h. Anhand der dargestellten Histogramme kann der prozentuale Anteil der sub-G_1-Zellpopulation (Pfeil) mit der Macs Quantify-Software ermittelt werden.

Abbildung 4.7 zeigt, dass der Anteil der sub-G_1-Zellen nach Behandlung mit **(*S*)-11** für 24 h leicht zunimmt, während sich die anderen behandelten Zellen noch auf Kontrollniveau befinden. Nach 48 h erkennt man eine signifikante Zunahme der **(*S*)-11** und **(*R*)-11** behandelten Zellen, die für das *(S)*-Enantiomer stärker ausgeprägt ist. Die Enantiomere des Naphthylmethyl-Derivates hingegen ändern sich nur schwach in ihrem sub-G_1-Gehalt und verbleiben nahezu auf Kontrollniveau. Nach 72 h steigt der Gehalt nicht weiter an, sondern nimmt ab.

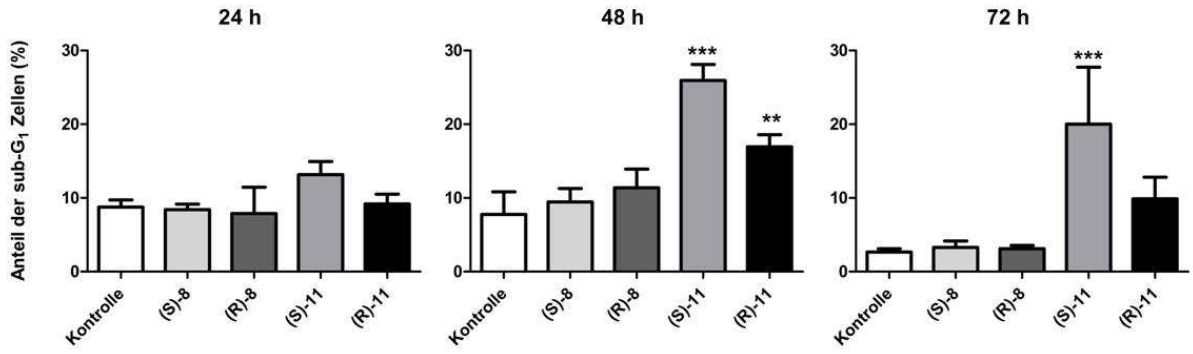


Abbildung 4.7 Quantitative Auswertung der sub-G_1-Zellpopulation.
RPMI 8226-Zellen wurden mit 3,6 µM **(*S*)-8**, 15,3 µM **(*R*)-8,** 36 µM **(*S*)-11**, und 23 µM **(*R*)-11** für 24, 48 und 72 h inkubiert, mit PI angefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. Der sub-G_1-Anteil wurde mittels Macs Quantify-Software quantitativ ausgewertet, $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$ (ANOVA/Dunnett).

4.1.6 Zellzyklusanalyse

Neben der sub-G_1-Phase lassen sich auch noch weitere Stadien des Zellzyklus nach der Methode von Nicoletti analysieren (siehe Kapitel 3.6.2), dabei nutzt man den unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus, der direkt proportional zur Fluoreszenzintensität des PI ist. Abbildung 4.8 zeigt die zeitabhängige Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit den σ-Liganden sowie nach Stimulation mit dem σ_1-Antagonist/σ_2-Agonisten PB 28 und dem Anthrazyklin Doxorubicin.

Während nach 24 h keine signifikanten Änderungen in der Zellverteilung beobachtet werden können, tritt bei den mit **(*S*)-11** behandelten Zellen nach 48 h ein leichter Rückgang der S- und G_2/M-Phase auf. Dies lässt zunächst auf einen G_1/S-Arrest schließen, da der Anteil der G_0/G_1-Phase jedoch nicht weiter anwächst, sondern nach 72 h gegenüber der Kontrolle abnimmt, scheint es, als ob die σ-Liganden keinen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben. Dies trifft auch für PB 28 zu. Doxorubicin als Positivkontrolle zeigt einen signifikanten Anstieg der G_2/M-Phase nach 24 h, während der Anteil an Zellen in den anderen beiden Phasen signifikant abnimmt. Somit entspricht dieses Ergebnis einem G_2/M-Arrest, welcher bereits zuvor in dieser Zelllinie für Doxorubicin beschrieben wurde.[190]

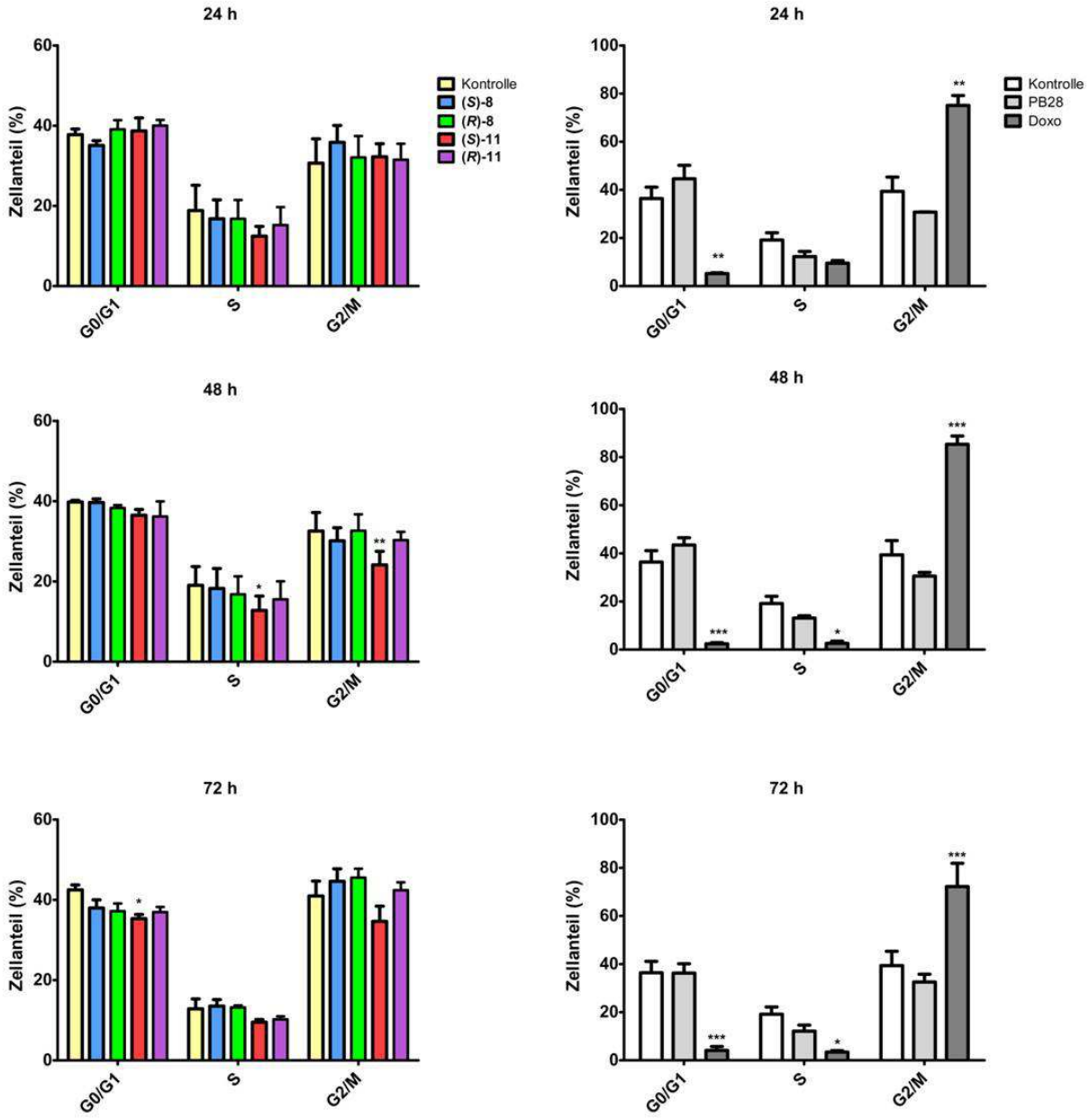


Abbildung 4.8 Zeitabhängige Zellzyklusanalyse.
Substanzzugabe (3,6 µM **(*S*)-8**, 15,3 µM **(*R*)-8,** 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** bzw. 1,3 µM Doxorubicin und 16,2 µM PB 28) für 24, 48 und 72 h und anschließende Anfärbung der RPMI 8226-Zellen mit PI, Vergleich gegen unbehandelte Kontrollzellen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni).

4.1.7 Nachweis der Apoptose mittels Annexin/PI-Färbung

Nachdem morphologisch die typischen apoptotischen Merkmale, sowie im Zellzyklus der Anstieg der sub-G_1-Zellen beobachtet werden konnte, sollten mithilfe der Annexin-V/PI-Doppelfärbung die apoptotischen Zellen identifiziert und von spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen differenziert werden. Abbildung 4.9 zeigt den prozentualen Anteil der frühen apoptotischen Zellen, deren Zellmembran noch

intakt ist und kein PI binden kann (Annexin-V positive/PI negative Zellen). Während **(*S*)-11**, **(*R*)-8** und **(*R*)-11** in signifikanter Weise Apoptose induzieren, ist dies bei **(*S*)-8** nicht der Fall. Nach 48 h Inkubation befindet sich der Anteil Annexin-V-positiver Zellen auf Kontrollniveau. Betrachtet man die Apoptose **(*S*)-11**- und **(*R*)-11**-behandelter Zellen, so nimmt diese zeitabhängig zu (Abbildung 4.10). Desweiteren zeigt sich, dass Doxorubicin kontinuierlich und am stärksten Apoptose in RPMI 8226-Zellen induziert. Nach Inkubation mit dem Topoisomerase-Hemmstoff Etoposid steigen die Annexin-V positiv/PI negativ angefärbten Zellen an und liegen nach 24 und 48 h nahezu auf konstantem Niveau von 40 %. Die Stimulation mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL führt bereits nach 6 h zu signifikanten Apoptosespiegeln, die bis 24 h zunehmen und dann nicht weiter ansteigen. Der σ_1-Antagonist/σ_2-Agonist PB 28 induziert über den analysierten Zeitraum Apoptose, mit Werten unterhalb von 30 %. Vergleicht man den Annexin-V positiven Zellanteil nach 48 h mit den bekannten Topoisomerase-Hemmstoffen Doxorubicin und Etoposid, so fällt dieser bei den σ-Liganden etwas geringer aus. Mit apoptotischen Anteilen von 18 % für **(*R*)-8**, 22 % für **(*R*)-11** und 27 % für **(*S*)-11** liegen sie jedoch im Bereich des Todesrezeptor-Liganden TRAIL (26 %) sowie des σ_1-Antagonist/σ_2-Agonisten PB 28 (24 %).

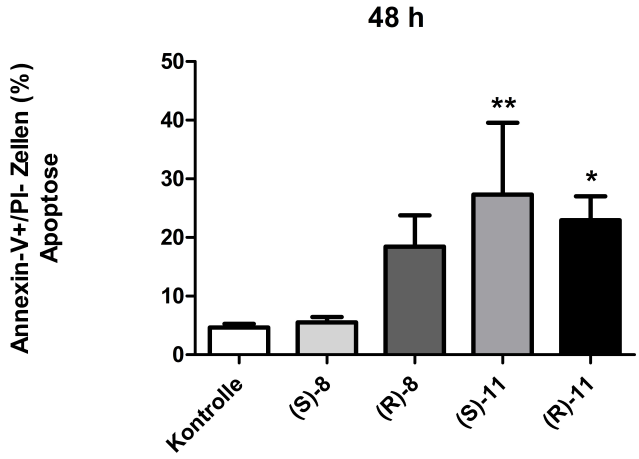


Abbildung 4.9 Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit σ-Liganden für 48 h.
RPMI 8226-Zellen wurden mit 3,6 µM **(*S*)-8**, 15,3 µM **(*R*)-8,** 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 48 h inkubiert, mit Annexin-V FITC/PI angefärbt und gegen unbehandelte Kontrollzellen verglichen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0,05$; **$p < 0,01$ (ANOVA, Dunnett).

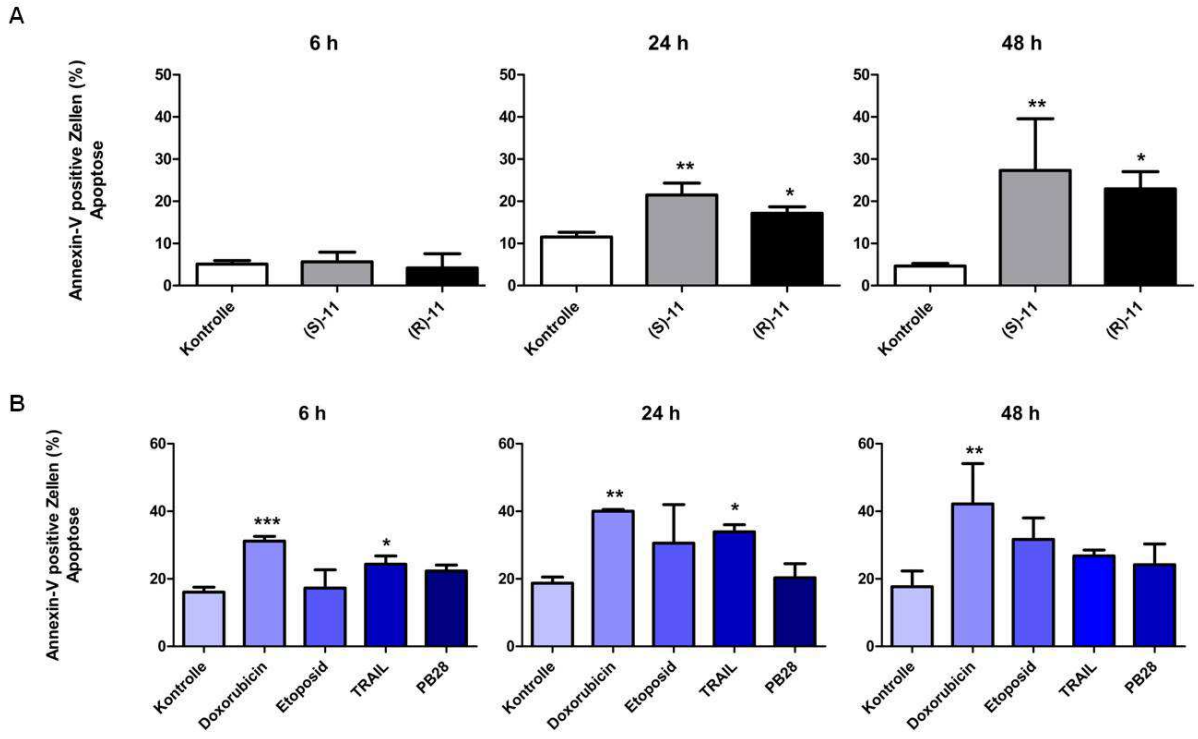


Abbildung 4.10 Zeitabhängige Apoptoserate nach 6, 24 und 48 h.
RPMI 8226-Zellen wurden mit (A) 36 µM **(*S*)-11** bzw. 23 µM **(*R*)-11** oder (B) 1,3 µM Doxorubicin, 3,7 µM Etoposid, 12 ng/ml TRAIL und 16,2 µM PB 28 für 6, 24 und 48 h inkubiert, mit Annexin-V FITC/PI angefärbt und gegen unbehandelte Kontrollzellen verglichen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$ (ANOVA, Dunnett).

Während bei Zellen, die sich in einem frühen Apoptosestadium befinden, die Zellmembran intakt ist und lediglich Annexin-V an das Phosphatidylserin bindet, verlieren spätapoptotische Zellen langsam ihre Membranintegrität und das PI kann an die DNA des Zellkernes gelangen und dort interkalieren. Eine Differenzierung zwischen spätapoptotischen und bereits toten Zellen ist somit nicht möglich. Man bezeichnet Annexin-V und PI positive Zellen als den gesamtapoptotischen Anteil (siehe Abbildung 4.11). Auch hier zeigt sich die Apoptoseinduktion der Substanzen **(*S*)-11**, **(*R*)-8** und **(*R*)-11** deutlich, während der Anteil des Naphthylmethylderivates **(*S*)-8** auf Kontrollniveau liegt.

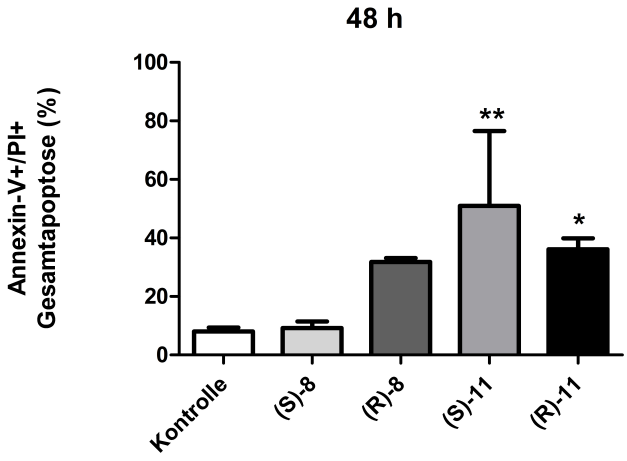


Abbildung 4.11 Anteil der gesamtapoptotischen Zellpopulation.
RPMI 8226-Zellen wurden mit 3,6 µM **(*S*)-8**, 15,3 µM **(*R*)-8**, 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 48 h inkubiert, mit Annexin-V FITC/PI angefärbt und gegen unbehandelte Kontrollzellen verglichen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0{,}05$; **$p < 0{,}01$ (ANOVA, Dunnett).

Die quantitative Auswertung der sub-G_1-Population zeigte bereits, dass nach 72 h kein weiterer Anstieg apoptotischer Zellen erfolgte. Dies kann auch mit der Doppelfärbung exemplarisch an **(*S*)-11** und **(*R*)-11** gezeigt werden, wie Abbildung 4.12 veranschaulicht. Während die Konzentrationen im Fall von **(*S*)-11** stabil bleiben, gehen sie beim **(*R*)-11** leicht zurück. Auch bei Doxorubicin, Etoposid und TRAIL werden keine weiteren Zunahmen frühapoptotischer Zellen nach 72 h detektiert, lediglich die PB 28 Stimulation der Zellen steigt weiter an.

Da die Enantiomere **(*S*)-11** und **(*R*)-11** in den bisherigen Versuchen vielversprechende Apoptose-Eigenschaften lieferten, wurden diese Biphenylmethyl-Derivate für weitere Experimente ausgewählt.

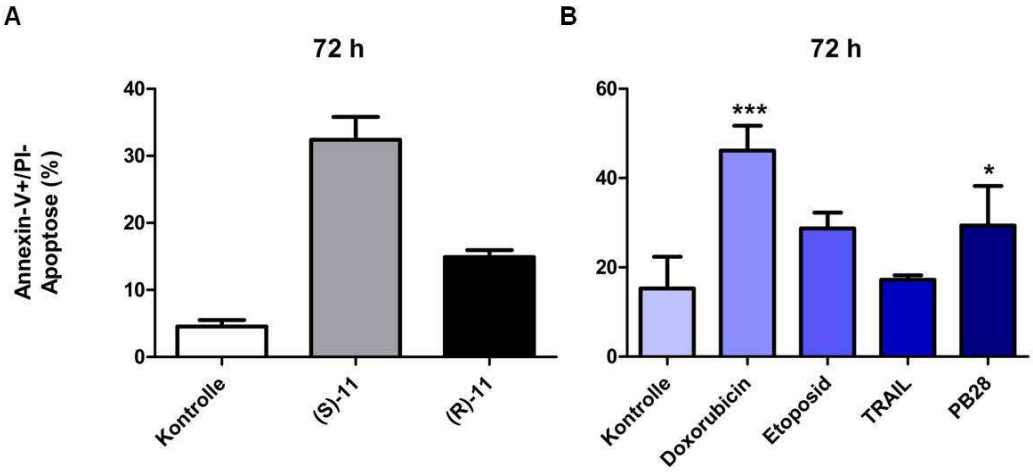


Abbildung 4.12 Apoptose nach 72 h.
RPMI 8226-Zellen wurden mit (A) 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** oder (B) 1,3 µM Doxorubicin, 3,7 µM Etoposid, 12 ng/ml TRAIL und 16,2 µM PB 28 für 72 h inkubiert, mit Annexin-V FITC/PI angefärbt und gegen unbehandelte Kontrollzellen verglichen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0{,}05$; ***$p < 0{,}001$ (ANOVA/Bonferroni).

4.1.8 (*S*)-11 und (*R*)-11 aktivieren Caspase-3

Caspasen sind wichtige Mediatoren während der Apoptose. Die typischen Membranausstülpungen, die lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnten, deuten bereits auf eine Beteiligung der Caspase-3 hin.[16] Der Nachweis auf Caspase-3-Aktivität erfolgte durchflusszytometrisch mit dem *Green Caspase 3 Staining Kit*. Abbildung 4.13 zeigt die zeitabhängige Zunahme Caspase-3 positiver Zellen. Während nach 24 h das **(*S*)-11** die Zellen etwas stärker anregt, liegt der aktivierte Anteil nach 48 h bei beiden Derivaten bei 53 %.

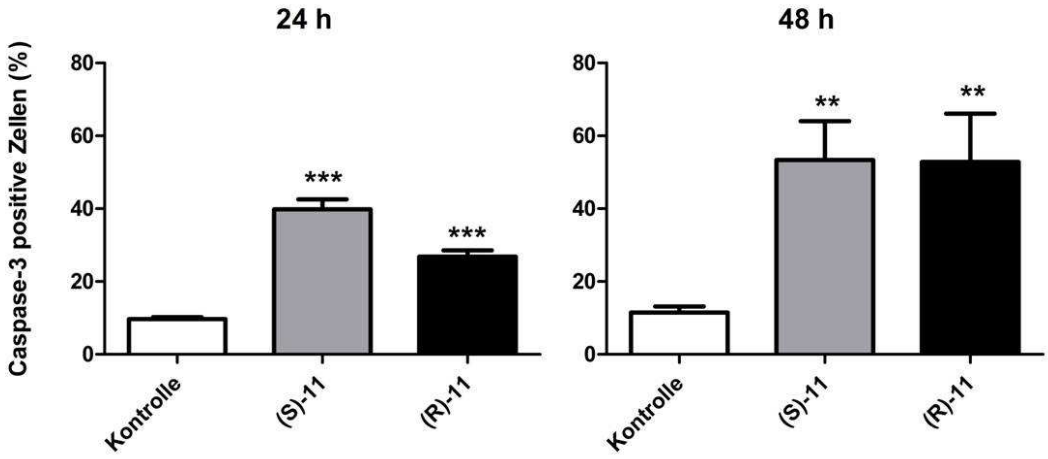


Abbildung 4.13 Prozentualer Anteil aktivierter Caspase-3.
RPMI 8226-Zellen wurden für 24 und 48 h mit **(*S*)-11** (36 µM) und **(*R*)-11** (23 µM) inkubiert, mit dem *Green Caspase 3 Staining-Kit* für die Durchflusszytometrie aufbereitet und gegen unbehandelte Kontrollzellen analysiert. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$ (ANOVA/Dunnett).

4.1.9 (*S*)-11 und (*R*)-11 führen zur Spaltung von PARP

Das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) ist ein klassisches Schlüsselmolekül der Apoptose, gespaltenes PARP ist ein Substrat der aktivierten Caspase-3. Diese spaltet das 116 kDa große Protein in ein 89 kDa großes Fragment. Der Nachweis der PARP-Fragmentierung erfolgte mittels Western Blot und zeigt in Abbildung 4.14 eine Expression des Spaltproduktes nach 6 h Behandlung mit **(*S*)-11**. Die PARP-Spaltung in Zellen, die mit **(*R*)-11** behandelt wurden, wird erst nach 12 h sichtbar und liefert weniger intensive Banden. Bei beiden Enantiomeren nimmt die Konzentration des gespaltenen Enzyms jedoch wieder ab und kann über den gesamten Behandlungszeitraum nicht aufrecht erhalten werden. Im Gegensatz dazu zeigen Doxorubicin behandelte Zellen eine Expression des Spaltproduktes ab 24 h, welche sich auch noch nach 96 h detektieren lässt (siehe Abbildung 7.2 im Anhang). Somit scheint die kurzzeitige PARP-Spaltung der untersuchten σ-Liganden eine eher untergeordnete Rolle im Verlauf des Zelltodes zu spielen.

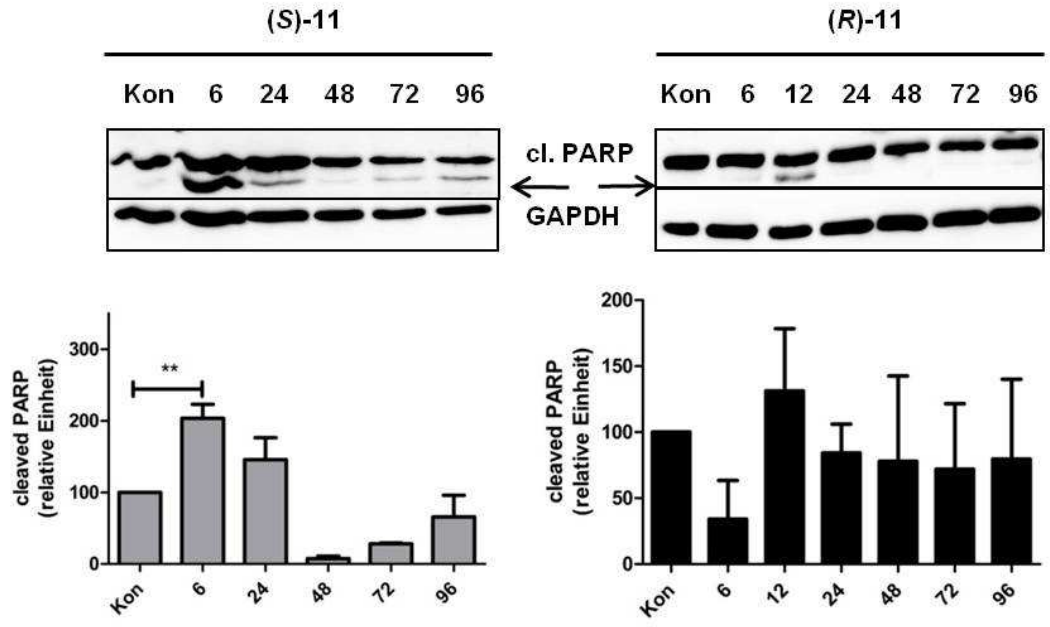


Abbildung 4.14 Zeitabhängige Detektion der PARP-Spaltung.
Repräsentative Western Blots nach Inkubation von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6-96 h. Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladungen (20 µg/Bahn) diente GAPDH als *Housekeeping*-Protein. Quantitative Bestimmung des PARP-Spaltprodukts (= *cleaved* PARP). Proteinbanden wurden auf GAPDH normalisiert und gegen unbehandelte Kontrollbanden (Kon) verglichen, Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, $^{**}p < 0{,}01$ (Anova/Dunnett).

4.1.10 (*S*)-11 und (*R*)-11 aktivieren Caspase-8 und Caspase-9.

Nachdem die Aktivierung der Effektorcaspase-3 nachgewiesen wurde, sollte in einer weiteren durchflusszytometrischen Analyse der beteiligte Apoptoseweg (extrinsisch/intrinsisch) bestimmt werden. Abbildung 4.15 zeigt die zeitabhängige Aktivierung von Caspase-8 und -9 nach Behandlung mit **(*S*)-11** und **(*R*)-11** für 24 und 48 h.

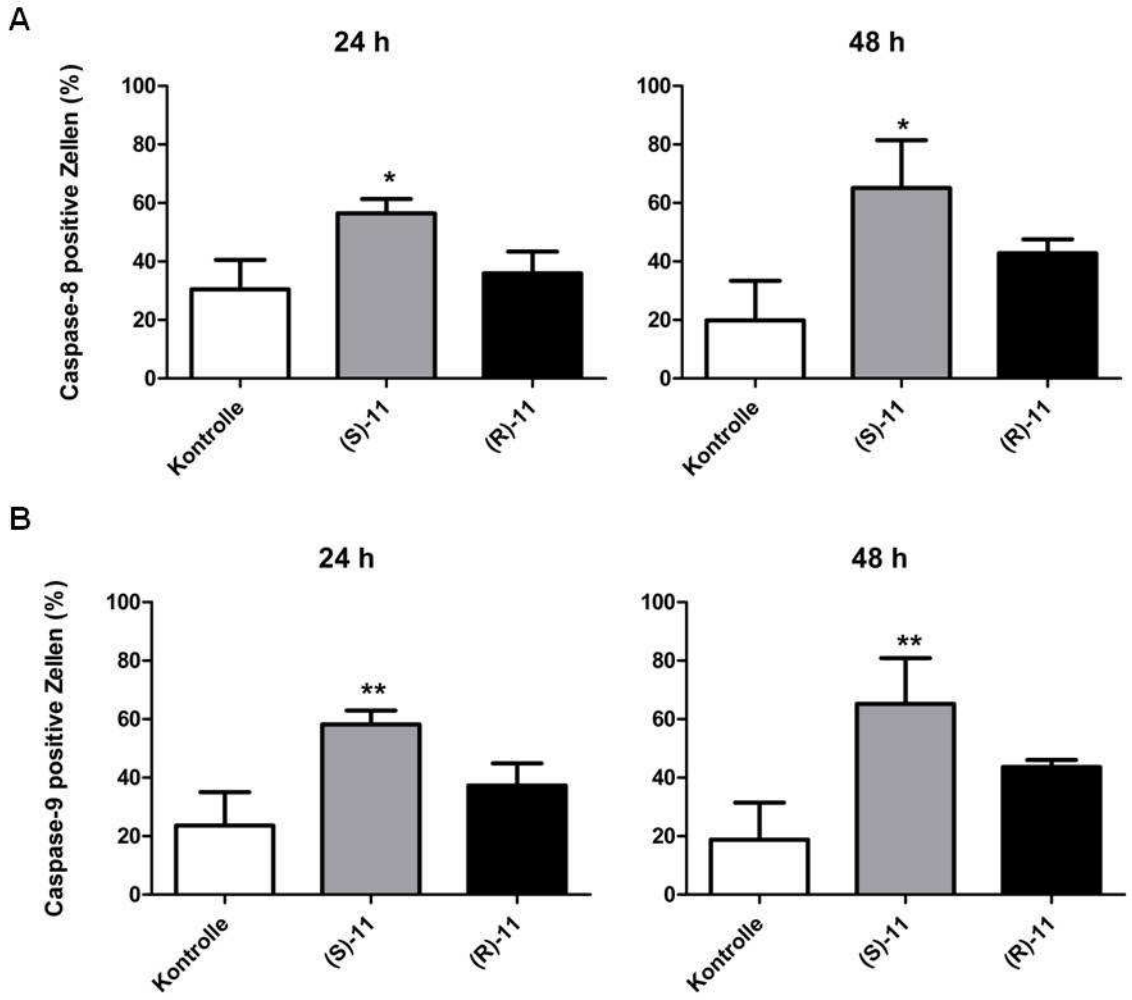


Abbildung 4.15 Prozentualer Anteil aktivierter Caspase-8 und -9.
RPMI 8226-Zellen wurden für 24 und 48 h mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** inkubiert, mit dem (A) Caspase-8-Kit und (B) Caspase-9-Kit für die Durchflusszytometrie aufbereitet und gegen unbehandelte Kontrollzellen analysiert. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0{,}05$; **$p < 0{,}01$ (ANOVA/Dunnett).

Die Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit beiden Enantiomeren führt sowohl zur Aktivierung von Caspase-8 als auch Caspase-9 nach 24 und 48 h. Dabei regt **(*S*)-11** die Aktivierung beider Caspasen stärker an, als das (*R*)-Enantiomer.

4.1.11 Keine Detektion von Caspase-9-Spaltprodukten im Western Blot

Nachdem durchflusszytometrisch sowohl die Aktivierung von Caspase-8 als auch von Caspase-9 nachgewiesen werden konnte, sollte dieses Ergebnis mittels Western Blot erneut bestätigt werden, um den Signalweg der σ-Ligand-induzierten Apoptose in RPMI 8226-Zellen genauer zu charakterisieren. Nach Behandlung der Zellen mit **(*S*)-11** und **(*R*)-11** für 6 bis 96 h wird eine Prozessierung der Caspase-8 detektiert,

wohingegen die Spaltung der Caspase-9 ausbleibt (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). Lediglich Doxorubicin behandelte Zellen zeigen Caspase-9-Spaltprodukte (siehe Abbildung 7.2 im Anhang).

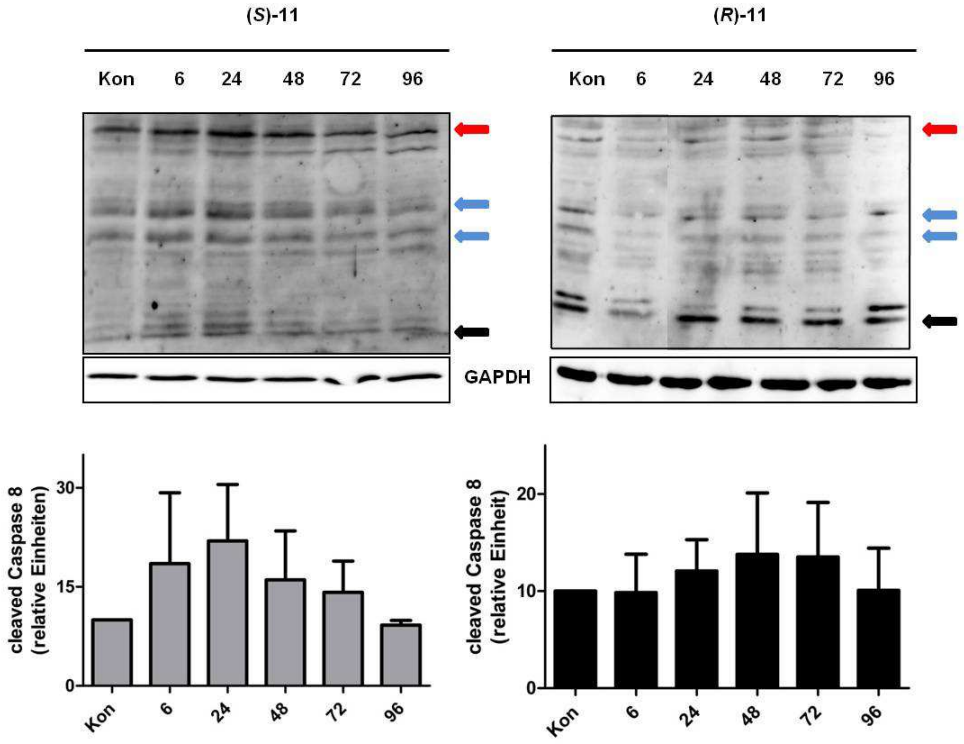


Abbildung 4.16 Zeitabhängige Detektion der Caspase-8-Spaltprodukte.
Repräsentative Western Blots nach Inkubation von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6–96 h. Roter Pfeil: Caspase-8 bei 55 kDa, blaue Pfeile: Zwischenprodukte bei 26–31 kDa, schwarzer Pfeil: Caspase-8-Spaltprodukt bei 18 kDa. Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladungen (20 µg/Bahn) diente GAPDH als *Housekeeping*-Protein. Quantitative Bestimmung des Caspase-8-Spaltprodukts (= *cleaved* Caspase-8). Proteinbanden wurden auf GAPDH normalisiert und gegen unbehandelte Kontrollbanden (Kon) verglichen, Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

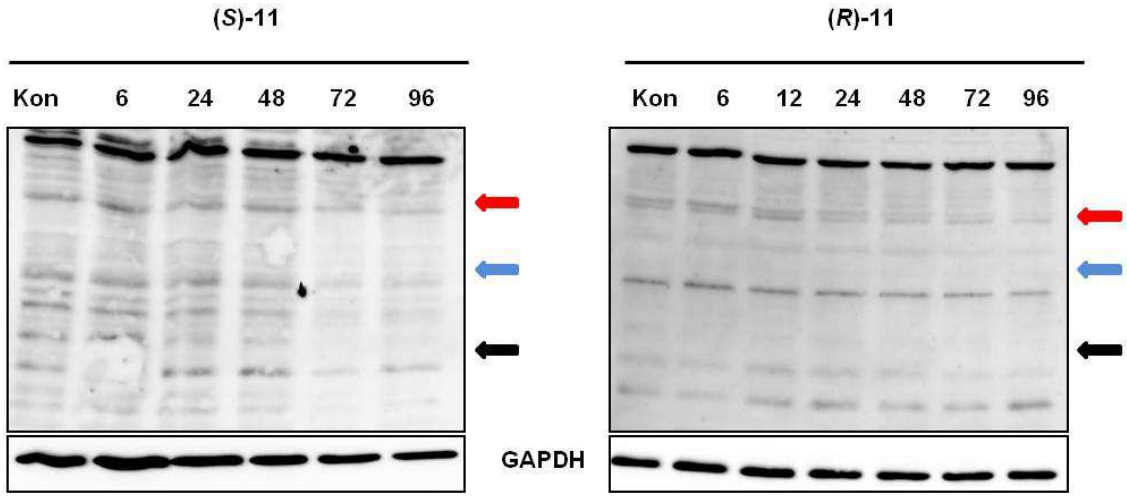


Abbildung 4.17 Zeitabhängige Detektion der Caspase-9-Spaltprodukte.
Repräsentative Western Blots nach Inkubation von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6–96 h. Roter Pfeil: Caspase-9 bei 45 kDa, blauer Pfeil: Zwischenprodukte bei 35–37 kDa, schwarzer Pfeil: Caspase-9-Spaltprodukt bei 25 kDa. Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladungen (20 µg/Bahn) diente GAPDH als Housekeeping-Protein, n = 3.

4.1.12 Die σ-Ligand-induzierte Apoptose ist Caspase-unabhängig

Nachdem eine Aktivierung von Caspase-3,-8 (und -9) detektiert werden konnte, sollte die Abhängigkeit der Apoptose von Caspasen untersucht werden. Die im Caspase-Kit enthaltene Probe des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK führt zu keiner Hemmung der Caspase-3 Aktivität nach Stimulation mit **(*R*)-11** für 24 und 48 h (Abbildung 4.18).

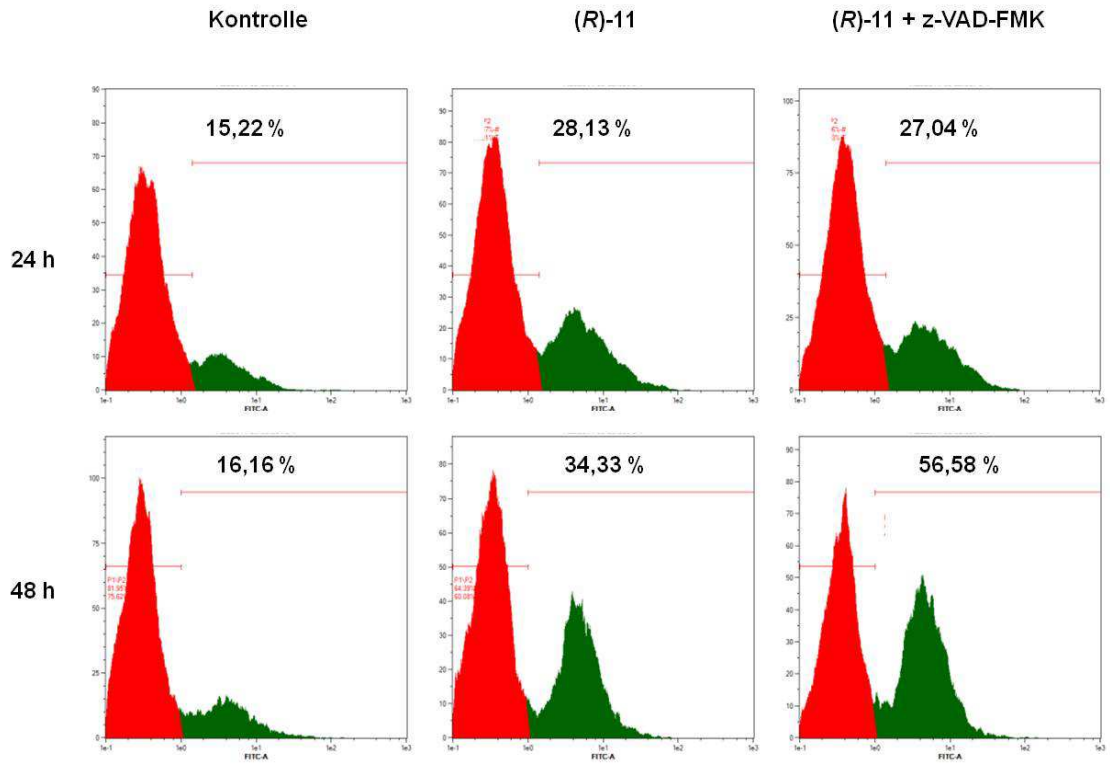


Abbildung 4.18 Einfluss des Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK auf die (*R*)-11 induzierte Caspase-3-Aktivierung.
Vorinkubation von RPMI 8226-Zellen für 1 h mit 1 µl/ml z-VAD-FMK und anschließende Stimulation mit **(*R*)-11** für 24 und 48 h. Durchflusszytometrische Bestimmung Caspase-3 positiver Zellen (grün) nach Anfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Caspase-3-Hemmstoff FITC-DEVD-FMK (2 µM).

Daher wurde dieser Hemmstoff in verschiedenen Konzentrationen für unterschiedliche Zeitintervalle mit RPMI 8226-Zellen vorinkubiert und die Apoptoserate nach Behandlung mit 36 µM **(*S*)-11** für 48 h zunächst mittels PI-Anfärbung im Durchflusszytometer bestimmt (Abbildung 4.19). Während die sub-G_1-Phase nach 1,5stündiger Vorinkubation mit 100 µM z-VAD-FMK von 29,3 % auf 16,9 % sinkt, führt auch eine dreistündige Vorinkubation mit 100 bzw. 120 µM Hemmstoff lediglich zu einem partiellen Rückgang der apoptotischen Zellen. Eine eindeutige Abnahme auf Kontrollniveau bleibt jedoch aus.

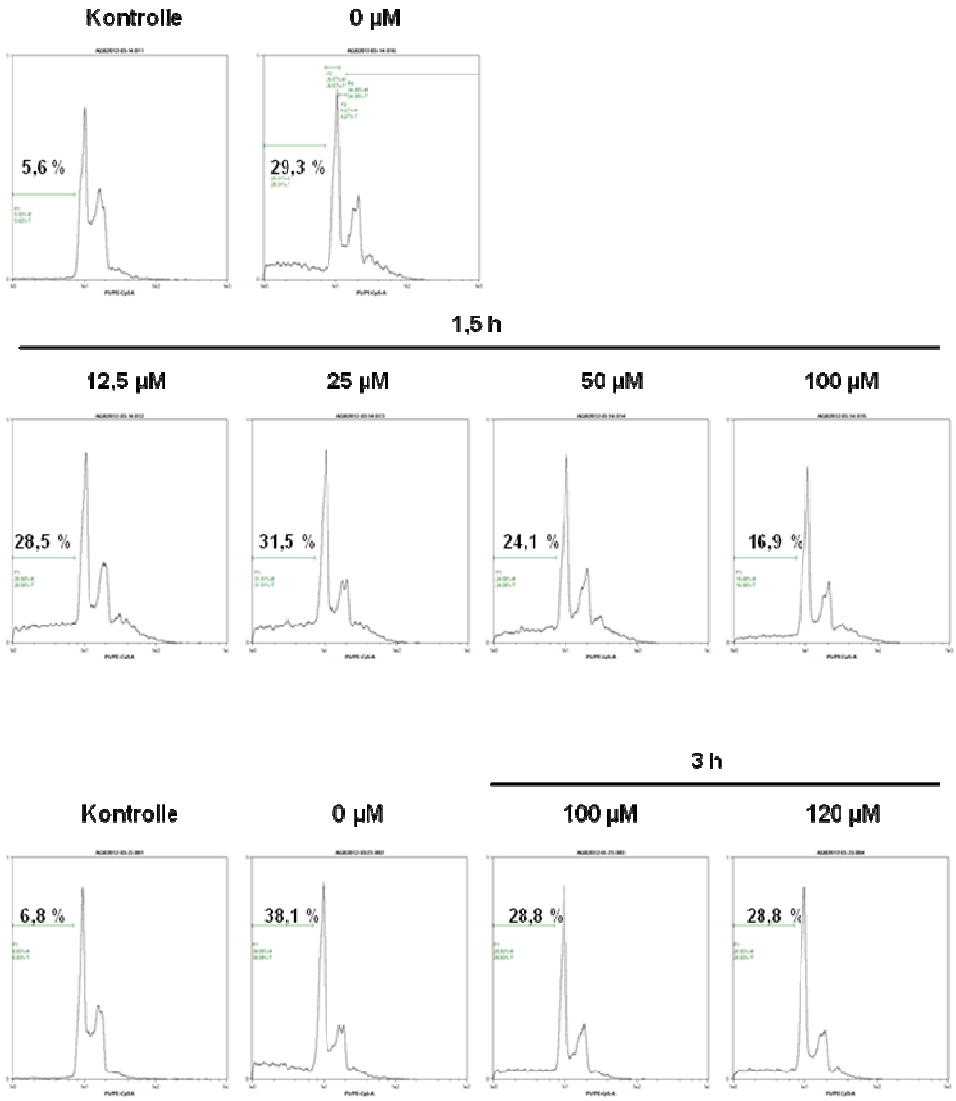


Abbildung 4.19 Einfluss des Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK auf die (*S*)-11-induzierte sub-G_1-Population.
Vorinkubation von RPMI 8226-Zellen für 1,5 bzw. 3 h mit z-VAD-FMK (0–120 µM), sowie anschließende Inkubation mit 36 µM **(*S*)-11** für 48 h. Nach Anfärbung der Zellkerne mit PI erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Ein weiterer Versuch zur Klärung der Caspase-unabhängigen Apoptose bestand in der Bestimmung des apoptotischen Zellanteils mittels Annexin-V/PI-Färbung. RPMI 8226-Zellen wurden 1 h mit 100 µM z-VAD-FMK inkubiert und nach Behandlung mit **(*S*)-11** für 48 h vermessen. Die Abbildung 4.20 veranschaulicht, dass sich die Gabe des Caspase-Inhibitors nicht auf den proapoptotischen Effekt des σ-Rezeptor-Liganden auswirkt. Auch die apoptotische Wirkung von Doxorubicin lässt sich durch den Inhibitor nicht beeinflussen (siehe Abbildung 7.1 im Anhang).

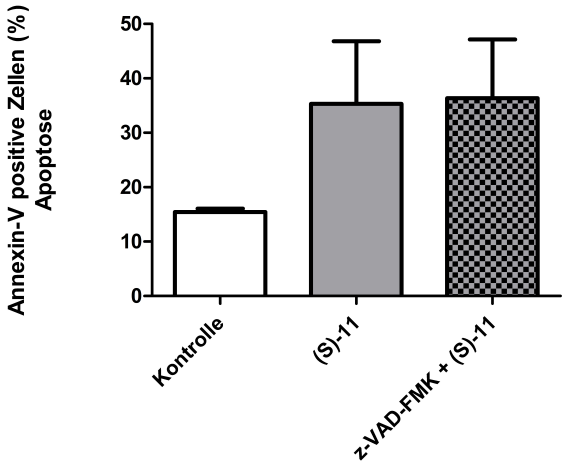


Abbildung 4.20 Einfluss des Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK auf die (*S*)-11 induzierte Apoptose. Vorinkubation von RPMI 8226-Zellen für 1 h mit 100 µM z-VAD-FMK, sowie anschließende Inkubation mit **(*S*)-11** für 48 h. Nach Anfärbung der Zellen mit Annexin-V/PI erfolgte die Messung im Durchflusszytometer. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

Beim z-VAD-FMK handelt es sich um einen unselektiven Caspasehemmstoff, der alle Caspasen bindet und auch unspezifische Auswirkungen auf andere Proteasen ausüben kann.[191] Daher wurde der nicht proteinogene Apoptoseinhibitor M50054 (2,2′-Methylenbis(1,3-cyclohexandion)) für eine weitere Bestimmung herangezogen, dessen Schutzfunktion in der Hemmung der Caspase-3-Aktivierung liegt.[192] Dieser wurde freundlicherweise von Frau Heidi Lemmerhirt synthetisiert.

In geringen Konzentrationen von 0,055 mM zeigt dieser Hemmstoff keine toxischen Eigenschaften auf die RPMI 8226-Zellen, er hemmt jedoch auch nicht die durch **(*S*)-11** induzierte Apoptose. Eine zehnfach höhere Konzentration von 0,55 mM wirkt sich toxisch auf die Kontrollzellen aus und führt zu einer überwiegenden Zahl an nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellen von 58 %, die nach Zugabe von **(*S*)-11** weiter auf 67 % ansteigt (Abbildung 4.21).

Nach den aufgeführten Untersuchungen mit den beiden Caspase-Inhibitoren lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass die σ-Ligand-induzierte Apoptose vermutlich unabhängig von Caspasen abläuft.

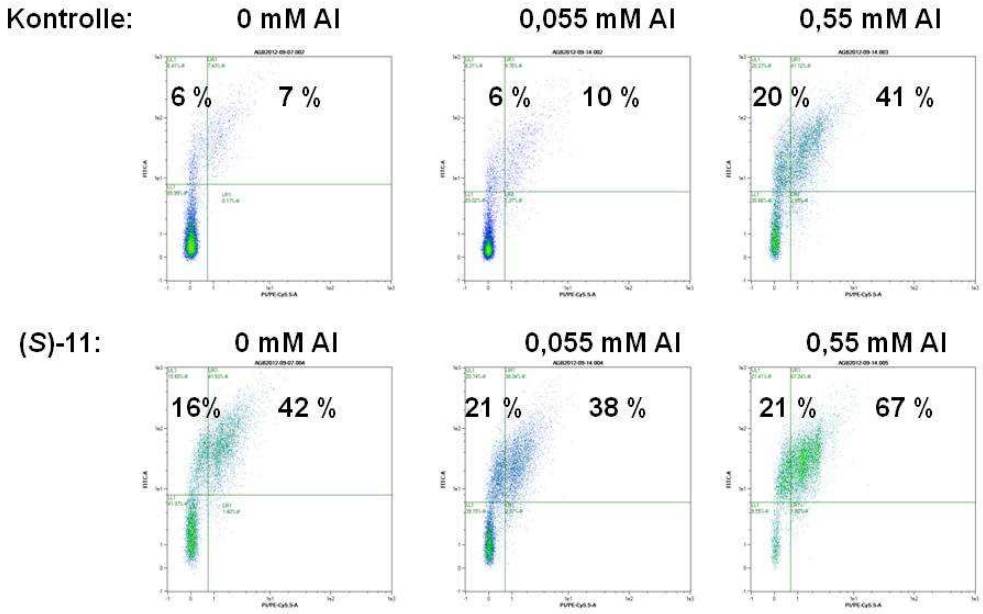


Abbildung 4.21 Einfluss des Apoptose-Inhibitors (AI) M50054 auf die (*S*)-11 induzierte Apoptose.
Vorinkubation von RPMI 8226-Zellen für 3 h mit 0,055 bzw 0,55 mM AI, sowie anschließende Inkubation mit **(*S*)-11** für 48 h. Nach Anfärbung der Zellen mit Annexin-V/PI erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

4.1.13 (*R*)-11 senkt das mitochondriale Membranpotential

Um den Effekt der Liganden auf das mitochondriale Membranpotential (MMP) zu analysieren, wurden stimulierte Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 behandelt und im Durchflusszytometer vermessen. Während eine Abnahme des MMP zu vermehrter Grünfluoreszenz führt, da der Farbstoff nicht in den Mitochondrien akkumulieren kann, sind bei einem intakten Membranpotential rot fluoreszierende JC-1-Aggregate in den Zellen detektierbar.

Abbildung 4.22 zeigt die Abnahme des MMP nach Behandlung mit **(*R*)-11**. Diese wird durch eine erhöhte Fluoreszenzintensität und der damit verbundenen Rechtsverschiebung des blauen Graphen im FITC-Kanal, aufgrund der zunehmenden Anzahl grüner JC-1-Monomere, sichtbar. Bereits nach 1 h wird eine leichte Fluoreszenzzunahme beobachtet, die nach 3 h deutlich und auch nach 24 h noch messbar ist. **(*R*)-11** permeabilisiert somit die Mitochondrienmembran zu einem frühen Zeitpunkt.

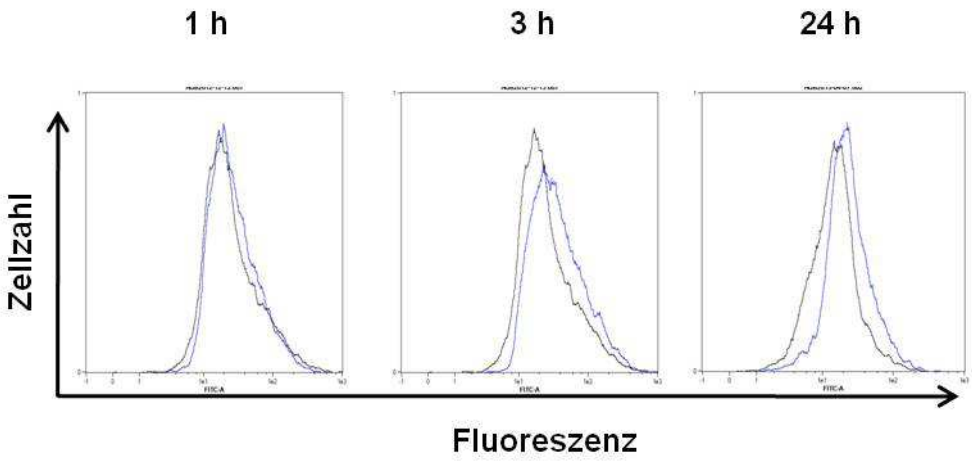


Abbildung 4.22 Durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials (MMP).
RPMI 8226-Zellen wurden mit **(*R*)-11** (23 µM) für 0 bis 24 h inkubiert, mit JC-1 angefärbt und im Durchflusszytometer vermessen (blaue Linie, schwarze Linie: unbehandelte Kontrollzellen). Repräsentative Histogramme nach 1, 3 und 24 h Inkubation.

4.1.14 Freisetzung vom *Apoptosis Inducing Factor* (AIF)

Beim AIF handelt es sich um ein mitochondriales Protein, dass nach Permeabilisierung der Mitochondrienmembran in das Zytosol freigesetzt wird und dort Caspase-unabhängig durch Chromatinkondensation oder DNA-Fragmentierung den Zelltod verursacht. Da die vorherigen Versuche bereits auf eine Caspase-unabhängige Form der Apoptose hinweisen und die Abnahme des MMP auf eine Beteiligung der Mitochondrien hindeutet, soll nun der Einfluss dieses Proteins näher betrachtet werden. Durch Aufbereitung zytosolischer Fraktionen kann mittels Western Blot die AIF-Expression analysiert werden. Die repräsentativen Blots in Abbildung 4.23 zeigen für beide Verbindungen eine leichte Zunahme des Proteins ab 6 h (**(*R*)-11**) bzw. ab 12 h (**(*S*)-11**) bis zur 72 h Inkubation verglichen mit der Kontrolle, danach scheint die Konzentration wieder leicht abzunehmen. Fasst man diese Beobachtungen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.13 zusammen, so kann man darauf schließen, dass **(*S*)-11** und **(*R*)-11** die Mitochondrien beschädigen.

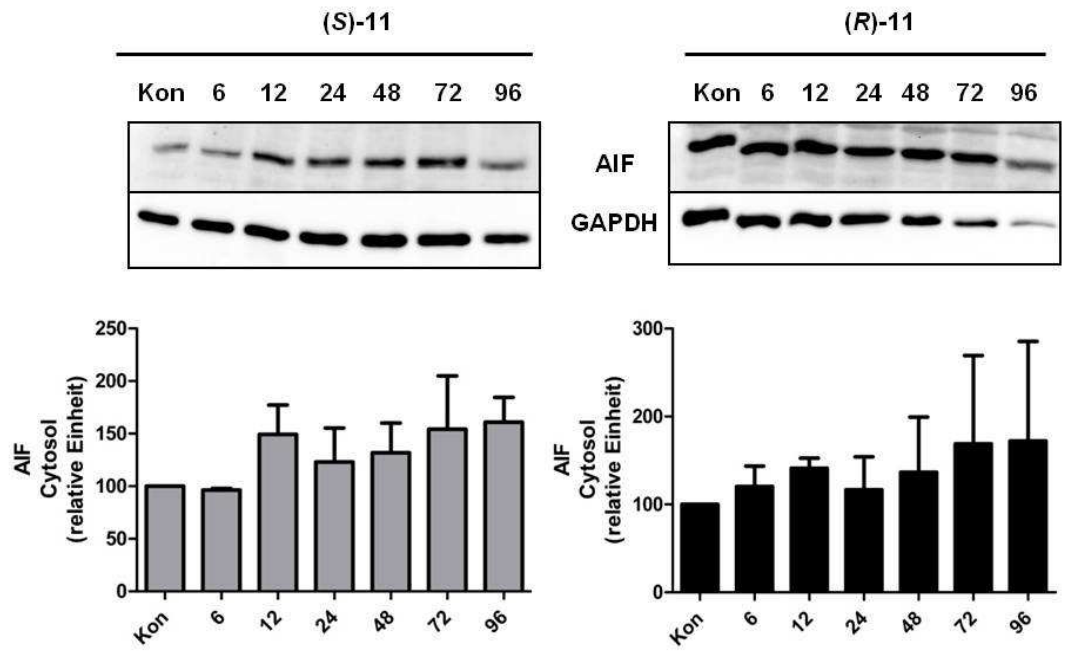


Abbildung 4.23 Zeitabhängige, zytosolische AIF-Expression.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6–96 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

4.1.15 Regulation von pro-und antiapoptotischen Proteinen

Eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kann mit einer Freisetzung von pro- und antiapoptotischen Faktoren einhergehen. Während die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine die mitochondriale Membran stabilisieren, können proapoptotische Multidomäne-Bcl-2 Proteine (z.B. Bax) durch Kanalbildung die Membranpermeabilisierung weitergehend fördern. Interaktionen mit anti-apoptotischen Mitgliedern führen jedoch zur Inaktivierung.

Western Blot Ergebnisse sollten daher Aufschluss über die Regulierung dieser Faktoren durch σ-Ligand-Behandlung geben. Abbildung 4.24 veranschaulicht, dass nach zeitabhängiger Inkubation mit dem jeweiligen Enantiomer ansteigende Bcl-2 Expressionen auftreten, die nach 72 h signifikant sind.

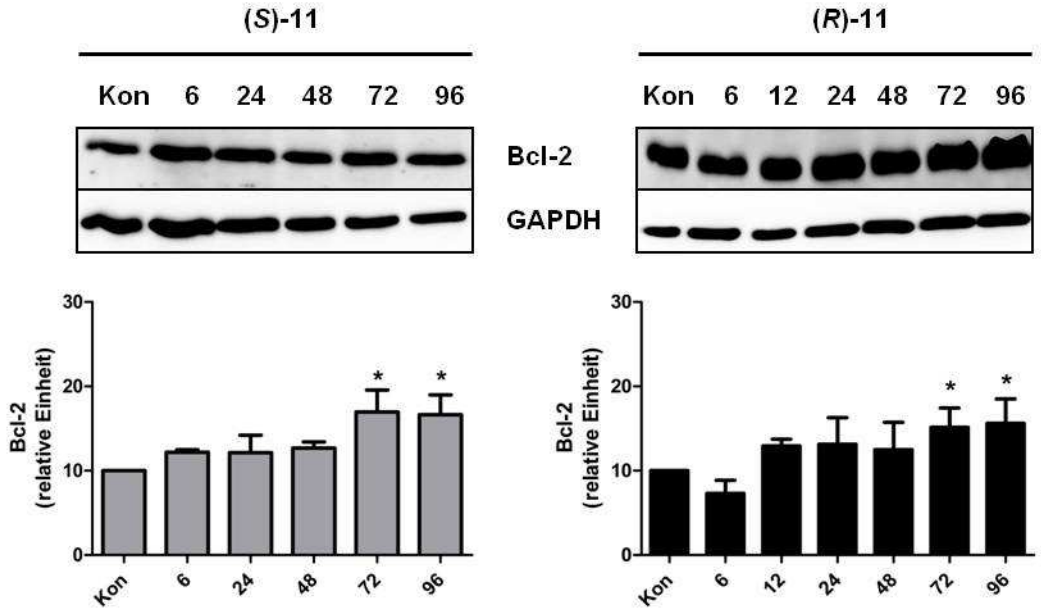


Abbildung 4.24 Zeitabhängige Bcl-2-Expression.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6–96 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *p < 0,05 (ANOVA/Dunnett).

Demgegenüber steht der zeitabhängige Rückgang der Bax-Konzentration beim **(*S*)-11**. Das (*R*)-Enantiomer liefert dagegen relativ gleichmäßige Werte (Abbildung 4.25).

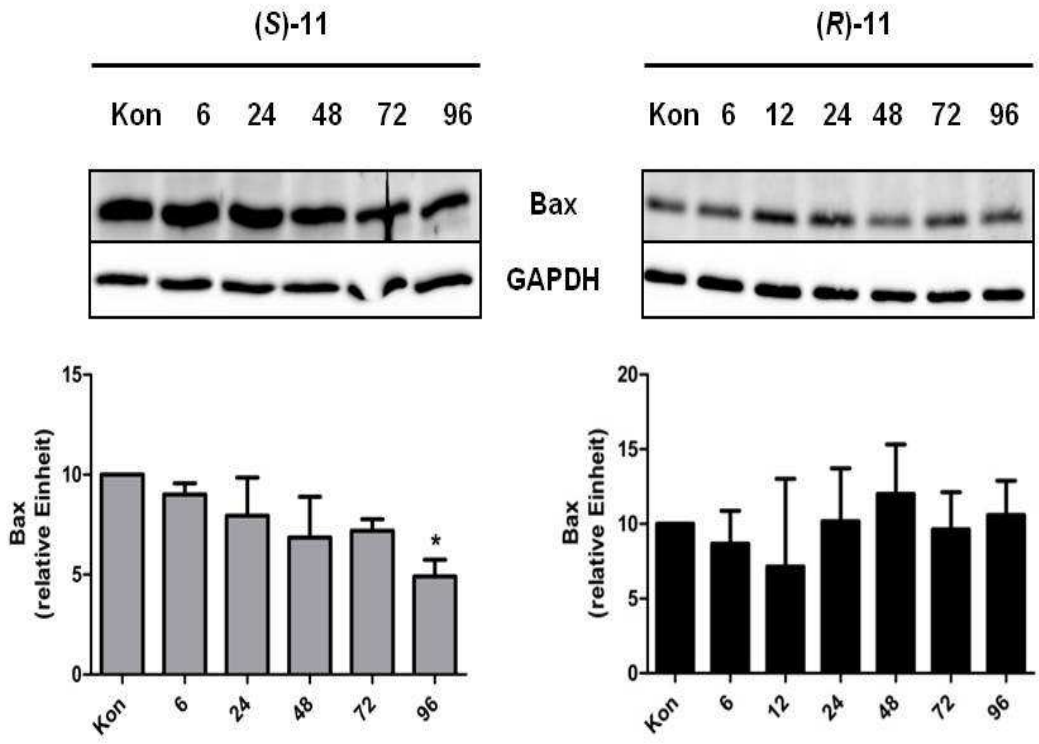


Abbildung 4.25 Zeitabhängige Bax-Expression.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6–96 h Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *p < 0,05 (ANOVA/Dunnett).

Desweiteren wurde die Expression des proapoptotischen BH_3-*only*-Proteins Bid mittels Western Blot untersucht. Dieses liegt frei im Zytosol vor und kann durch aktivierte Caspase-8 in das sogenannte *truncated* Bid gespalten werden, das zu den Mitochondrien gelangt und dort eine Permeabilisierung hervorruft. Dieser Schritt würde somit einen Amplifizierungs-*Loop* zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg darstellen. Die Western Blot Ergebnisse in Abbildung 4.26 widerrufen allerdings diesen Mechanismus, da die zeitabhängige Behandlung mit **(*S*)-11** zu keiner signifikanten Abnahme des zytosolischen Bid führt und relativ konstante Konzentrationen vorherrschen. Nach Exposition der Zellen mit **(*R*)-11** nimmt die Intensität der Bid-Bande im Western Blot sogar noch zu.

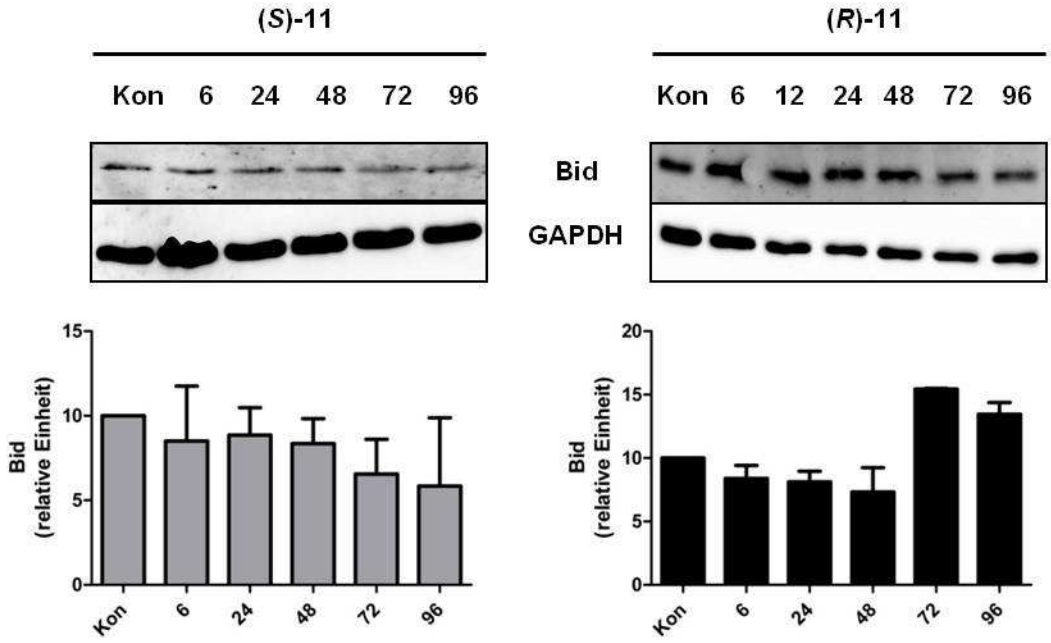


Abbildung 4.26 Zeitabhängige Bid-Expression.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM **(*S*)-11** und 23 µM **(*R*)-11** für 6–96 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

4.1.16 Einfluss von (*R*)-11 auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Apoptose wird oftmals durch Stimuli, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), ausgelöst. Daher sollte der Einfluss der σ-Liganden auf die ROS-Bildung durch Anfärbung mit 2′,7′-Dichlorfluorescindiacetat (2′,7′-DCFDA) untersucht werden. In Anwesenheit von ROS und intrazellulären Esterasen erfolgt die Abspaltung der Acetatgruppen zum fluoreszierenden 2′,7′-Dichlorfluorescein (2′,7′-DCF), welches im Durchflusszytometer erfasst werden kann. Die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von **(*S*)-11** und **(*R*)-11** führte jedoch zu keiner detektierbaren Menge von ROS, was Abbildung 4.27 repräsentativ für **(*R*)-11** veranschaulicht.

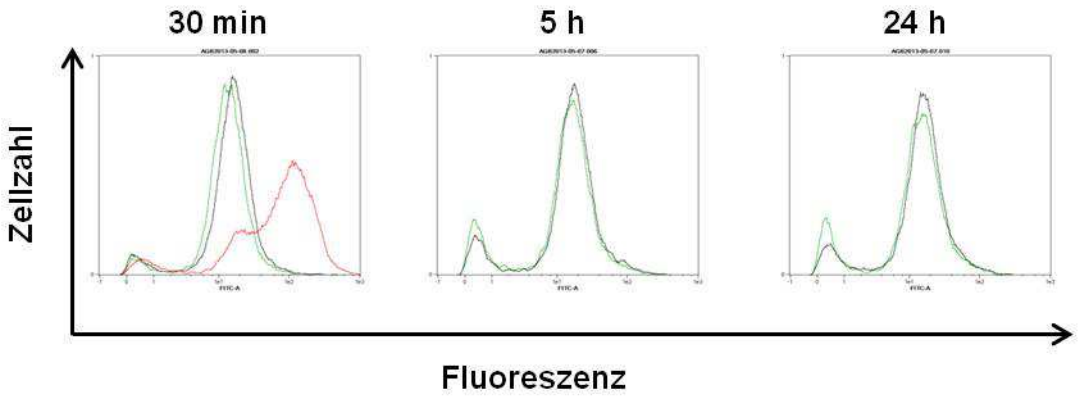


Abbildung 4.27 Detektion von ROS.
ROS-Level wurden mit der 2′,7′-DCFDA-Färbung mittels Durchflusszytometrie von RPMI 8226-Zellen nach Behandlung mit **(*R*)-11** (23 µM; 30 min, 5 h und 24 h; grüne Linie) ermittelt und gegen unbehandelte Kontrollzellen (schwarze Linie) verglichen. Als Positivkontrolle diente *tert*-Butylhydroperoxid (200 µM; rote Linie). Repräsentative Histogramme aus n ≥ 3 Experimenten sind abgebildet.

4.1.17 (*R*)-11 induziert zeitabhängig die Lipidperoxidation (LPO)

Es existieren stark oxidierende Radikale (z. B. das Hydroxylradikal $^{\bullet}$OH), die aufgrund geringer Redoxpotentiale in biologischen Systemen sehr kurzlebig sind, da sie mit vielen Molekülen reagieren können. Nachdem keine ROS nach Behandlung mit den σ-Liganden detektiert werden konnten, sollte der Einfluss des **(*R*)-11** an der Beteiligung von LPO analysiert werden. Nach dem Anfärben der behandelten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY 665/676 C_{11} und der Analyse im Durchflusszytometer sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 4.28 dargestellt.

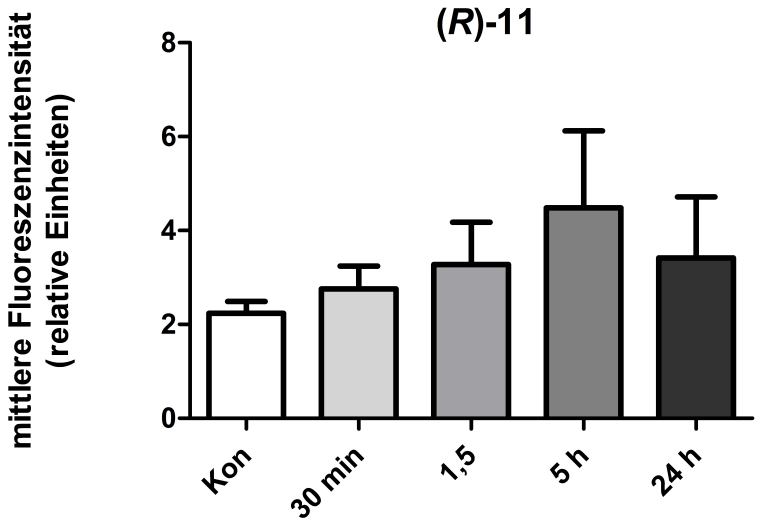


Abbildung 4.28 Einfluss von (*R*)-11 auf die Lipidperoxidation.
RPMI 8226-Zellen wurden mit 23 µM **(*R*)-11** für 30 min–24 h inkubiert und gegen unbehandelte Kontrollzellen verglichen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

Nach Stimulation der Zellen mit **(*R*)-11** wird ein leichter Anstieg der LPO-Aktivität nach 30 min verzeichnet, der bis 5 h zunimmt und nach 24stündiger Inkubation erhalten bleibt. Durch die große Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten, sind die ermittelten Daten für **(*R*)-11** jedoch nicht signifikant.

4.1.18 Funktion von Antioxidantien auf die (*R*)-11-induzierte LPO

Antioxidantien, wie das lipophile α-Tocopherol, sind in der Lage Radikale abzufangen und oxidative Spezies zu inaktivieren. Daher sollte der Einfluss von **(*R*)-11** nach einstündiger Vorinkubation mit α-Tocopherol auf die Ausbildung von LPO-Produkten untersucht werden. Abbildung 4.29 veranschaulicht die protektive Wirkung des Radikalfängers nach Behandlung mit **(*R*)-11** für 24 h. Während bei den mit ausschließlich σ-Rezeptor-Ligand behandelten Zellen eine deutliche Fluoreszenzzunahme messbar ist, sinkt die Intensität der Antioxidans-vorbehandelten Zellen auf den Ausgangswert von unbehandelten Kontrollzellen.

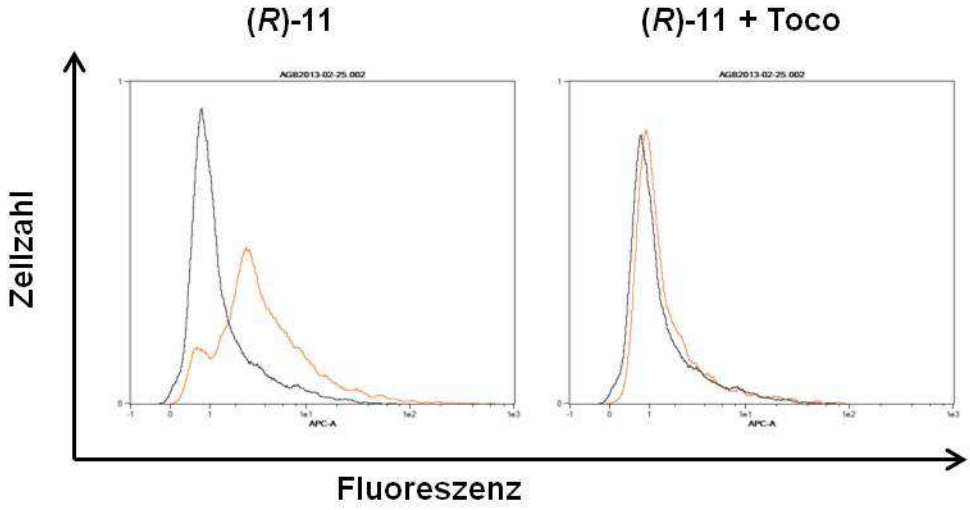


Abbildung 4.29 LPO-Detektion nach Vorbehandlung mit α-Tocopherol.
RPMI 8226-Zellen nach 24 h Inkubation mit 23 µM **(*R*)-11** (orangene Linie) ohne Antioxidans (linkes Histogramm) bzw. Vorinkubation mit α-Tocopherol (200 µM, rechtes Histogramm). Unbehandelte Zellen (schwarze Linie) dienten als Kontrolle. Repräsentatives Histogramm aus n ≥ 3 Experimenten.

Abbildung 4.30 verdeutlicht diesen Effekt und zeigt zusammenfassend die zeitabhängige LPO-Aktivierung durch **(*R*)-11**, die in Anwesenheit des lipophilen Radikalfängers auf das Ausgangslevel der Kontrollzellen absinkt. Eine Behandlung mit dem Antioxidans alleine hat keinen Einfluss auf die LPO-Produktion.

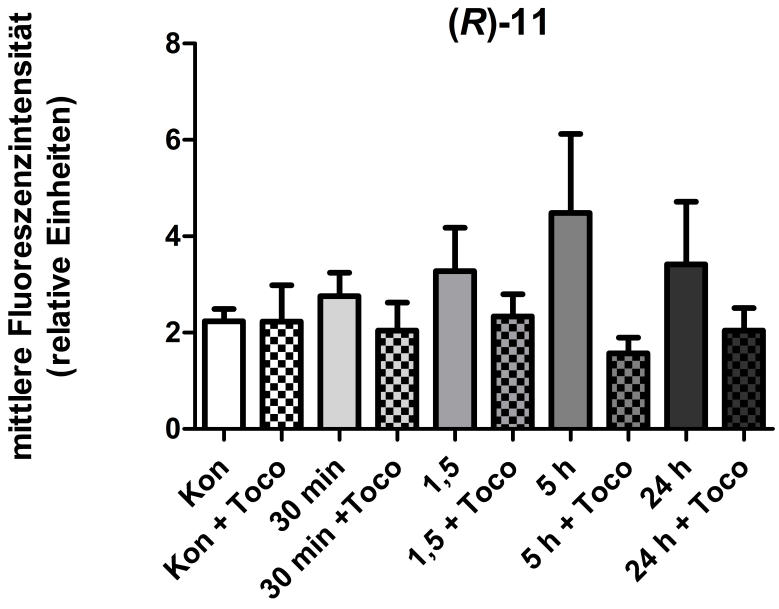


Abbildung 4.30 Einfluss des lipophilen Antioxidans α-Tocopherol auf die (*R*)-11-induzierte LPO. RPMI 8226-Zellen wurden für 1 h mit 200 µM α-Tocopherol vorinkubiert und anschließend mit 23 µM **(*R*)-11** für 30 min – 24 h inkubiert und gegen Zellen ohne Antioxidans-Behandlung verglichen. Kon = unbehandelte Kontrollzellen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

4.1.19 Funktion der LPO in der σ-Ligand-induzierten Apoptose

Nachdem der schützende Effekt des α-Tocopherols auf die LPO nachgewiesen werden konnte, sollte in einem weiteren Versuch die Rolle der LPO in der Apoptose näher untersucht werden. Dazu wurde neben dem lipophilen Antioxidans auch die Wirkung des hydrophilen *N*-Acetylcysteins (NAC) auf die Apoptoserate nach σ-Ligand-Stimulation untersucht.

Abbildung 4.31A zeigt, dass nach Vorbehandlung mit α-Tocopherol die Apoptoserate erst nach 48 h Behandlung mit **(*S*)-11** signifikant abnimmt, während nach 24 h noch kein Rückgang zu erkennen ist. Das (*R*)-Enantiomer zeigt den gleichen Trend in abgeschwächter Weise (Abbildung 4.31B).

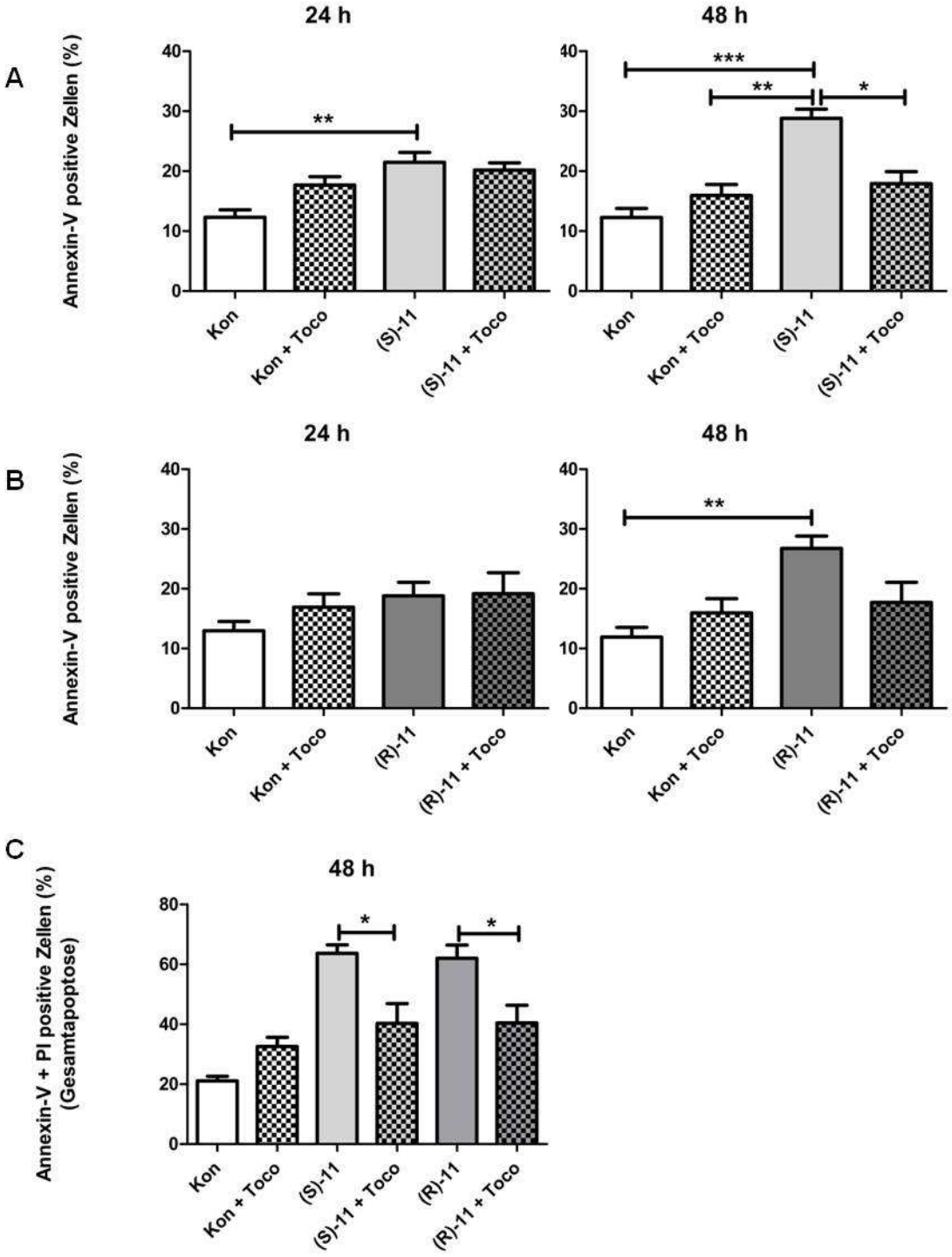


Abbildung 4.31 Funktion von α-Tocopherol auf die Apoptoserate.
RPMI 8226-Zellen wurden mit oder ohne α-Tocopherol (Toco, 200 µM, 1 h) vorinkubiert und anschließend mit (A) **(*S*)-11** (36 µM) bzw. (B) **(*R*)-11** (23 µM) für 24 h und 48 h behandelt, (C) Gesamtapoptotischer Anteil, Kon = unbehandelte Kontrollzellen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, **p* < 0,05; ***p* < 0,01 (ANOVA/Bonferroni).

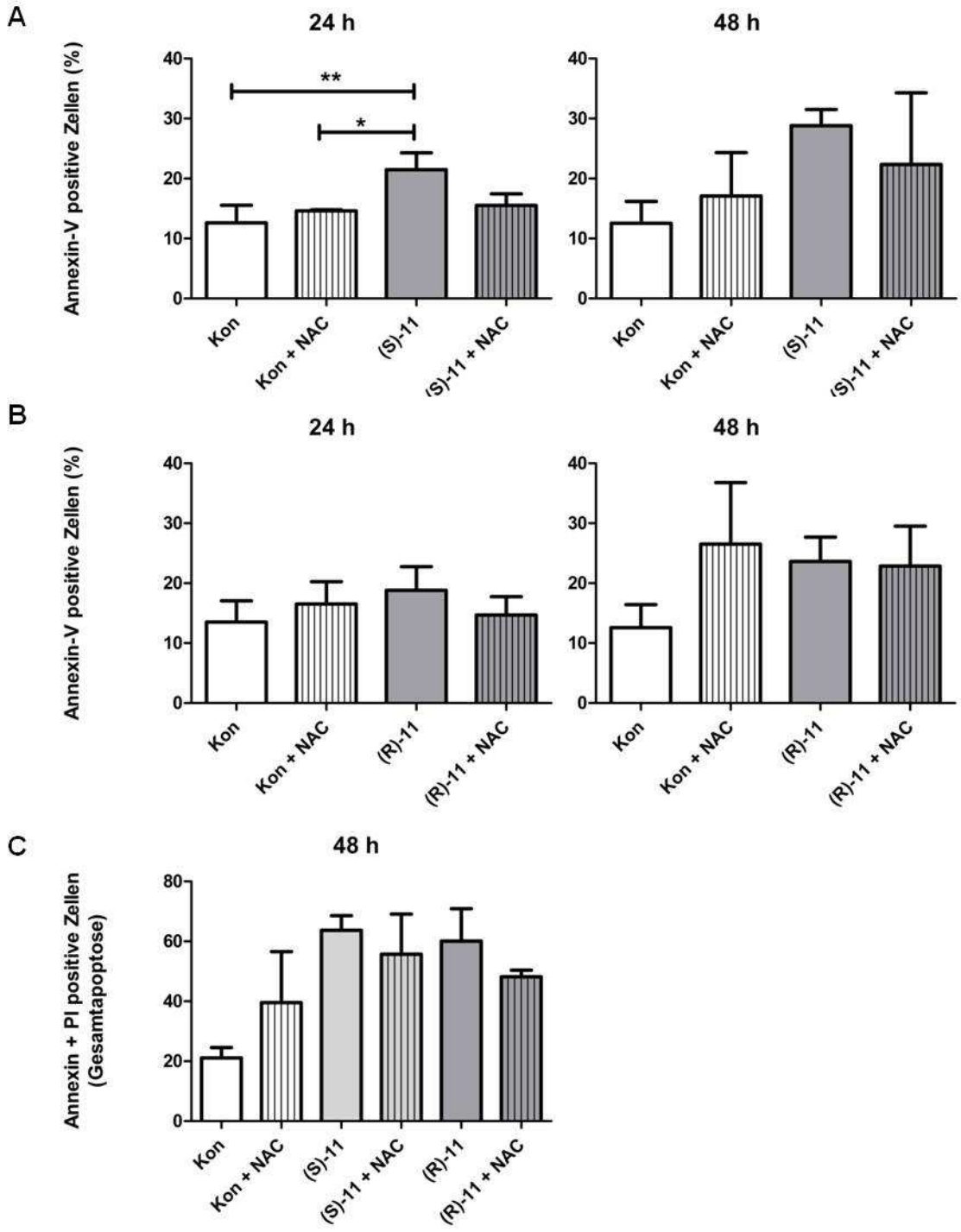


Abbildung 4.32 Funktion von *N*-Acetylcysein auf die Apoptoserate.
RPMI 8226-Zellen wurden mit oder ohne *N*-Acetylcysein (NAC, 15 mM, 1 h) vorinkubiert und anschließend mit (A) **(*S*)-11** (36 µM) bzw. (B) **(*R*)-11** (23 µM) für 24 h und 48 h behandelt, (C) Gesamtapoptotischer Anteil, Kon = unbehandelte Kontrollzellen. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA/Bonferroni).

Betrachtet man jedoch den gesamtapoptotischen Anteil (Annexin-V und PI positive Zellen) so verdeutlicht sich für beide Substanzen eine signifikante Abnahme der Apoptose nach Vorbehandlung mit dem lipophilen Radikalfänger und veranschaulicht damit dessen protektiven Effekt (Abbildung 4.31C). Die Behandlung mit dem

hydrophilen *N*-Aceylcystein ergibt für das (*S*)-Enantiomer einen leichten Rückgang der Annexin-V positiven Zellen, der jedoch nicht signifikant ist (Abbildung 4.32A), eine zellschützende Funktion tritt für das (*R*)-Enantiomer auch nach 48 h Behandlung nicht auf (Abbildung 4.32B). Der Vergleich mit dem Anteil gesamtapoptotischer Zellen verdeutlicht, dass nach NAC-Behandlung kein Schutzeffekt des hydrophilen Antioxidans vorliegt (Abbildung 4.32C).

4.1.20 Funktion der LPO auf die zytotoxischen Effekte von (*S*)-11und (*R*)-11

Nachdem der protektive Effekt des lipophilen α-Tocopherol auf die σ-Ligand-induzierte Apoptose gezeigt werden konnte, sollte darüber hinaus der schützende Einfluss des Antioxidans auch auf die zellwachstumshemmenden Eigenschaften der Verbindungen nachgewiesen werden. Abbildung 4.33 veranschaulicht diesen Schutzmechanismus: Während das Zellwachstum von **(*S*)-11** und **(*R*)-11** konzentrationsabhängig gehemmt wird, schützt α-Tocopherol um 100 % die behandelten RPMI 8226-Zellen vor der antiproliferativen Wirkung der beiden σ-Liganden.

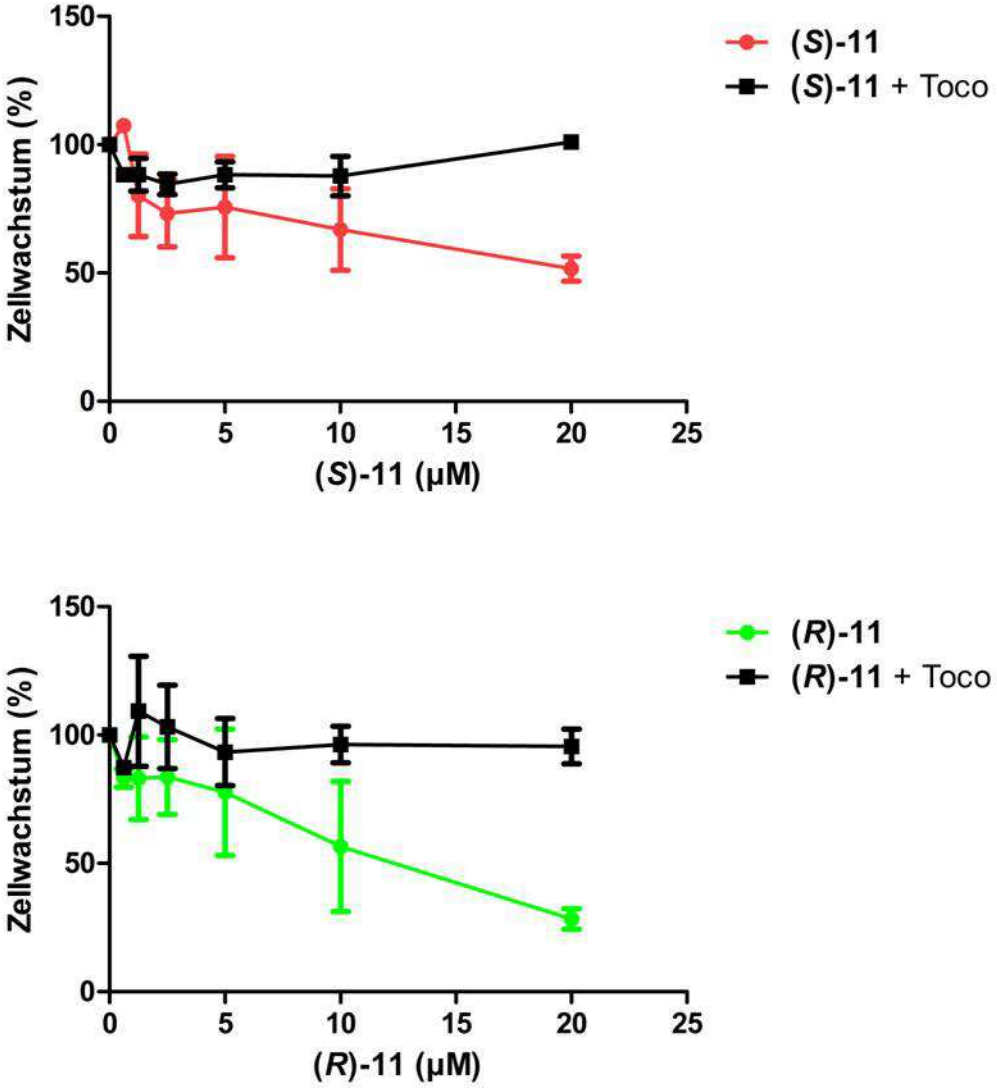


Abbildung 4.33 Einfluss von α-Tocopherol auf die zellwachstumshemmenden Eigenschaften. RPMI 8226-Zellen nach Behandlung mit **(*S*)-11** (rot), **(*R*)-11** (grün) oder in Kombination mit α-Tocopherol (200 µM) nach 1 h Vorinkubation (Toco, schwarz) für 72 h. Anschließende Analyse des Zellwachstums mittels MTT-Assay.

4.1.21 (*S*)-11und (*R*)-11 aktivieren die Autophagozytose

Neben der Apoptose ist in den letzten Jahren die Autophagozytose, als weiterer programmierter Zelltodmechanismus (Typ II) hervorgetreten und stellt mittlerweile ein intensives Forschungsgebiet dar. Neben der zellschützenden Eigenschaft, führen übermäßige Autophagozytoselevel zum Zelltod.

Daher wurde der Einfluss der σ-Rezeptor-Liganden in autophagischen Prozessen untersucht. Mittels Western Blot konnte zunächst die Expression der zwei klassischen Autophagozytosemarker LC3 und p62 nach Behandlung mit **(*S*)-11** und **(*R*)-11** verfolgt werden.

LC3 existiert in drei Isoformen (LC3A, LC3B und LC3C), in der vorliegenden Arbeit wurde die LC3B-Isoform ausgewertet. Während der Autophagozytose wird LC3 in die zytosolische LC3-I-Form gespalten. Infolge der Autophagosomenbildung wird diese durch Lipidation in die LC3-II-Form umgewandelt, die in der Doppelmembran der Autophagosomen lokalisiert ist und deren Bildung daher als Marker der Autophagozytose genutzt wird.

Abbildung 4.34 zeigt die zeitabhängige Expression der LC3-II-Bande nach Inkubation mit dem Biphenylmethyl-Enantiomer, die für beide Verbindungen nach 48 h signifikant ist. Während die Bande bei **(*S*)-11** nach 24 h deutlich ausgeprägt ist und dann nur noch leicht zunimmt, nimmt die Intensität bei **(*R*)-11** stetig zu.

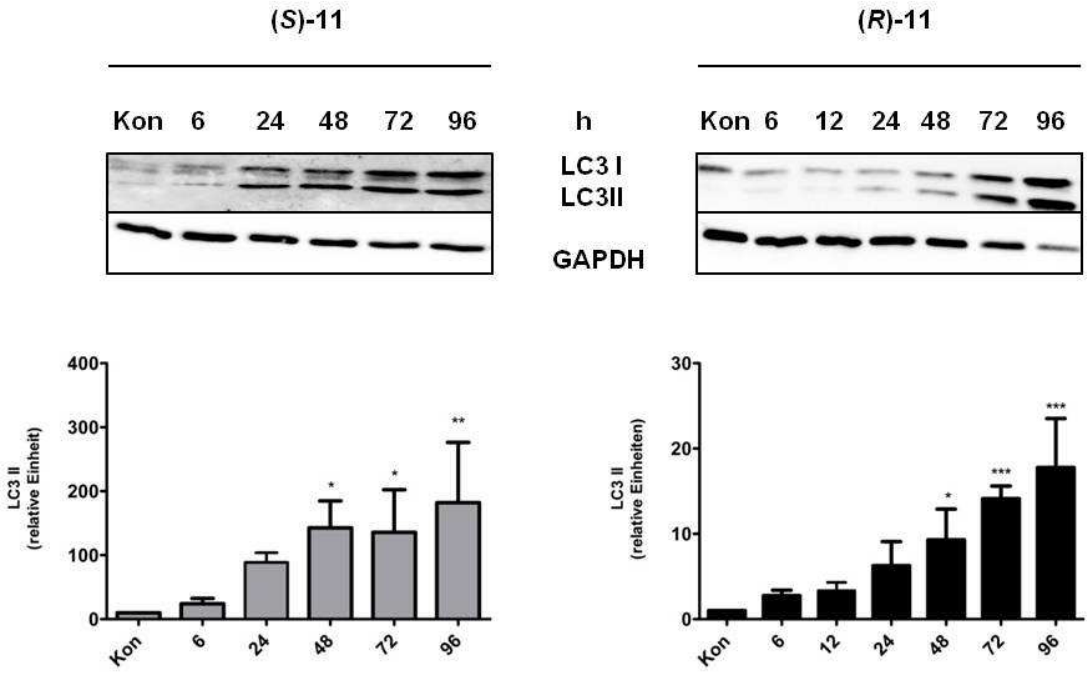


Abbildung 4.34 Zeitabhängige Expression von LC3-II im Western Blot.
Repräsentative Western Blots nach Inkubation von RPMI 8226-Zellen mit **(*S*)-11** (36 µM) und **(*R*)-11** (23 µM) für 6–96 h. Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladungen (20 µg/Bahn) diente GAPDH als *Housekeeping*-Protein. Quantitative Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, **p* < 0,05; ***p* < 0,01;****p* < 0,001 (ANOVA/Dunnett).

Interessanterweise nimmt auch die p62-Expression zu (Abbildung 4.35) anstatt ab, wie es bei der klassischen Autophagozytose zu erwarten wäre. Sequestosom 1 (SQSTM1) oder p62 (polyubiquitin-binding p62 protein) bindet an LC3 und führt Proteinaggregate zum Autophagosom, wo deren Abbau stattfindet. Während der Autophagozytose nehmen die p62-Spiegel daher gewöhnlich ab. Durch die

signifikante Zunahme während der Inkubation mit **(*S*)-11** bzw. **(*R*)-11** ist daher von einer unvollständigen Autophagozytose auszugehen. Doxorubicin induziert in der RPMI 8226-Zelllinie keine LC3-II-Expression und auch die p62-Banden sind nur schwach detektierbar (siehe Anhang Abbildung 7.3).

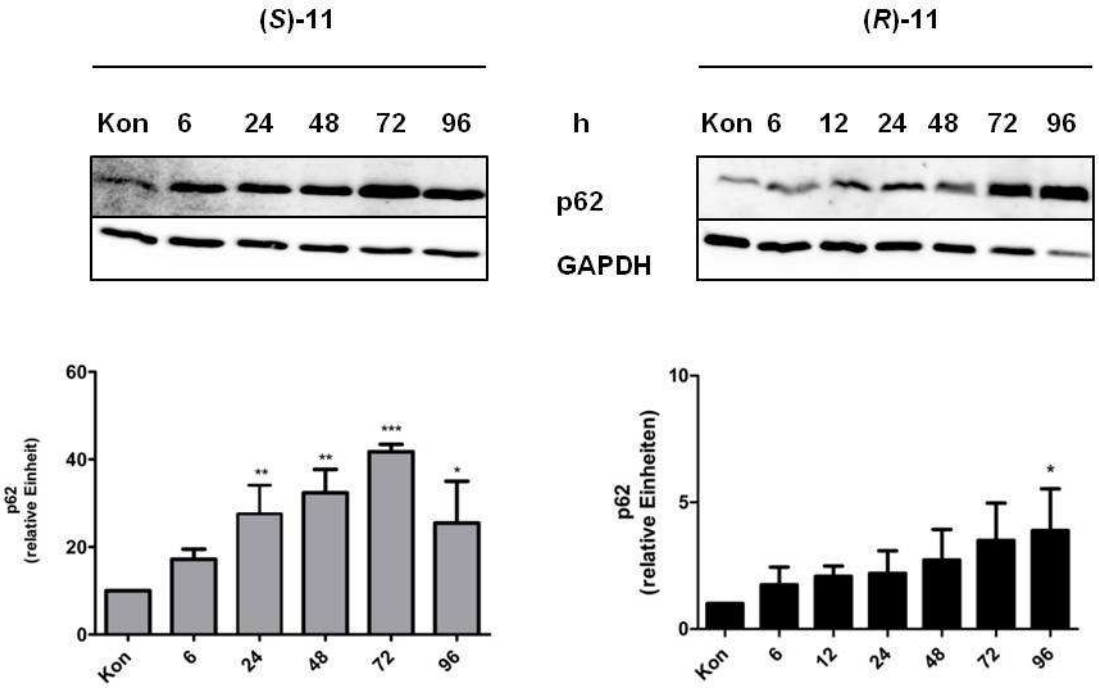


Abbildung 4.35 Zeitabhängige Expression von p62 im Western Blot.
(A) Repräsentative Western Blots nach Inkubation von RPMI 8226-Zellen mit **(*S*)-11** (36 µM) und **(*R*)-11** (23 µM) für 6 - 96 h. Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladungen (20 µg/Bahn) diente GAPDH als *Housekeeping*-Protein, n = 3. (B) Quantitative Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, **p* < 0,05; ***p* < 0,01****p* < 0,001 (ANOVA/Dunnett).

4.1.22 Zusammenhang von σ-Ligand-induzierter Autophagozytose und LPO-Produktion

Nachdem die durch σ-Liganden-induzierte LPO-Bildung nachgewiesen werden konnte, sollte in einem weiteren Versuch deren möglicher Einfluss auf die Autophagozytose untersucht werden. Nach Vorinkubation mit α-Tocopherol wurde die Expression von LC3 und p62 nach 48 h Behandlung mit **(*S*)-11** und **(*R*)-11** im Western Blot analysiert. Die Stimulation mit dem lipophilen Antioxidans verhindert die LC3-II-Bildung komplett, während die p62-Expression abgeschwächt wird (Abbildung 4.36). Somit kommt der LPO auch eine bedeutende Rolle in der Initiierung der Autophagozytose zu.

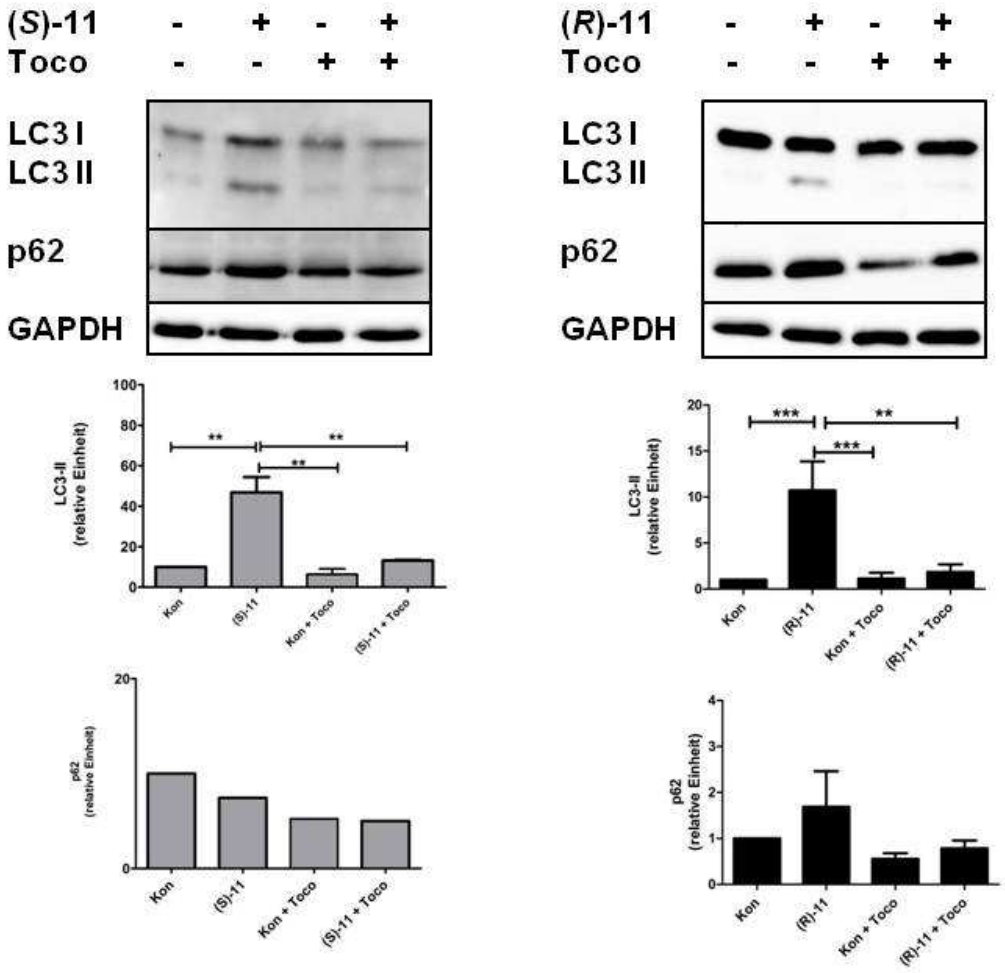


Abbildung 4.36 Einfluss von α-Tocopherol auf die Expression von LC3-II und p62.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit oder ohne α-Tocopherol (Toco, 200 µM, 1 h Vorinkubation) und 36 µM **(*S*)-11** oder 23 µM **(*R*)-11** nach 48 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH dient als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 bzw. n = 2 (bei **(*S*)-11** und p62) unabhängigen Experimenten, $^{**}p < 0{,}01$ $^{***}p < 0{,}001$ (ANOVA/Bonferroni).

4.1.23 Einfluss von Inhibitoren der Autophagozytose

Da die PARP-Spaltprodukte schon nach 6 h Substanzbehandlung im Western Blot detektierbar waren (Abbildung 4.14), die LC3-II-Bildung jedoch erst nach 24 h deutlich und nach 48 h signifikant war (Abbildung 4.34), scheint es, dass die Apoptose vor der Autophagozytose stattfindet. Demnach wäre kein Zellschutz seitens autophagischer Prozesse möglich. Um diese These zu bestätigen, wurden RPMI 8226-Zellen mit den Autophagozytose-Hemmstoffen 3-Methyladenin (3-MA) und Wortmannin 1 h vor Substanzzugabe vorbehandelt.

4.1.23.1 3-Methyladenin

3-MA ist ein Inhibitor in der frühen Phase der Autophagozytose und hemmt die Preautophagosom-Bildung.[193] Eine anhaltende Inkubation mit 3-MA in nährstoffreichem, unverbrauchtem Medium kann jedoch die Autophagozytose einleiten.[194]

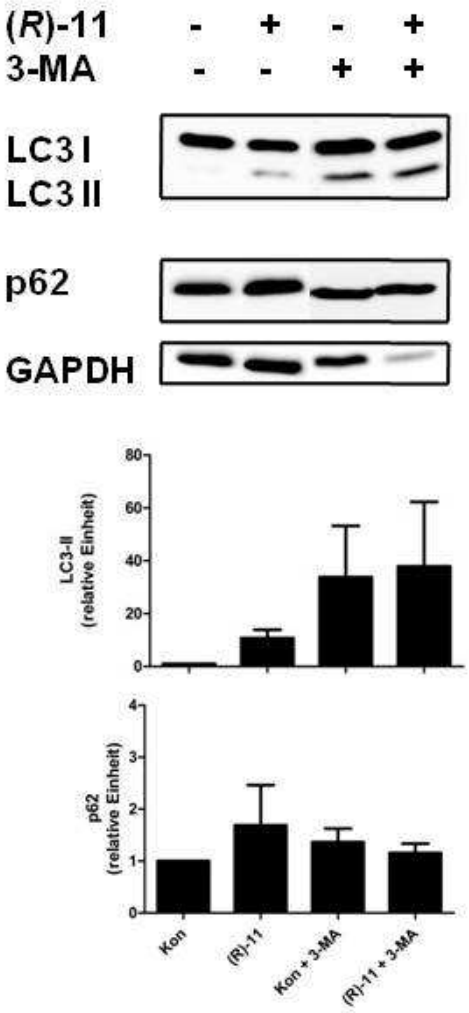


Abbildung 4.37 Einfluss von 3-MA auf die Expression von LC3-II und p62.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit oder ohne 3-MA (10 mM, 1 h Vorinkubation) und 23 µM **(*R*)-11** nach 48 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung der Zellen für 48 h mit 10 mM 3-MA allein und zusammen mit **(*R*)-11** führte zu einem Anstieg der LC3-II-Expression, so dass 3-MA hier nicht als Hemmer, sondern vielmehr als Initiator der Autophagozytose agiert (Abbildung 4.37).

4.1.23.2 Wortmannin

Beim Wortmannin handelt es sich um einen Hemmstoff, der in der späten Phase der Autophagozytose eingreift und die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen verhindert. Eine alleinige Behandlung der Zellen bei einer Konzentration von 2 µM wirkt sich nicht auf die LC3-II-Bildung aus, in Kombination mit **(*S*)-11 bzw. (*R*)-11** jedoch in signifikanter Weise (Abbildung 4.38). Die unveränderte p62-Expression ist ein weiterer Anhaltspunkt für einen unvollständigen Autophagozytose-Prozess.

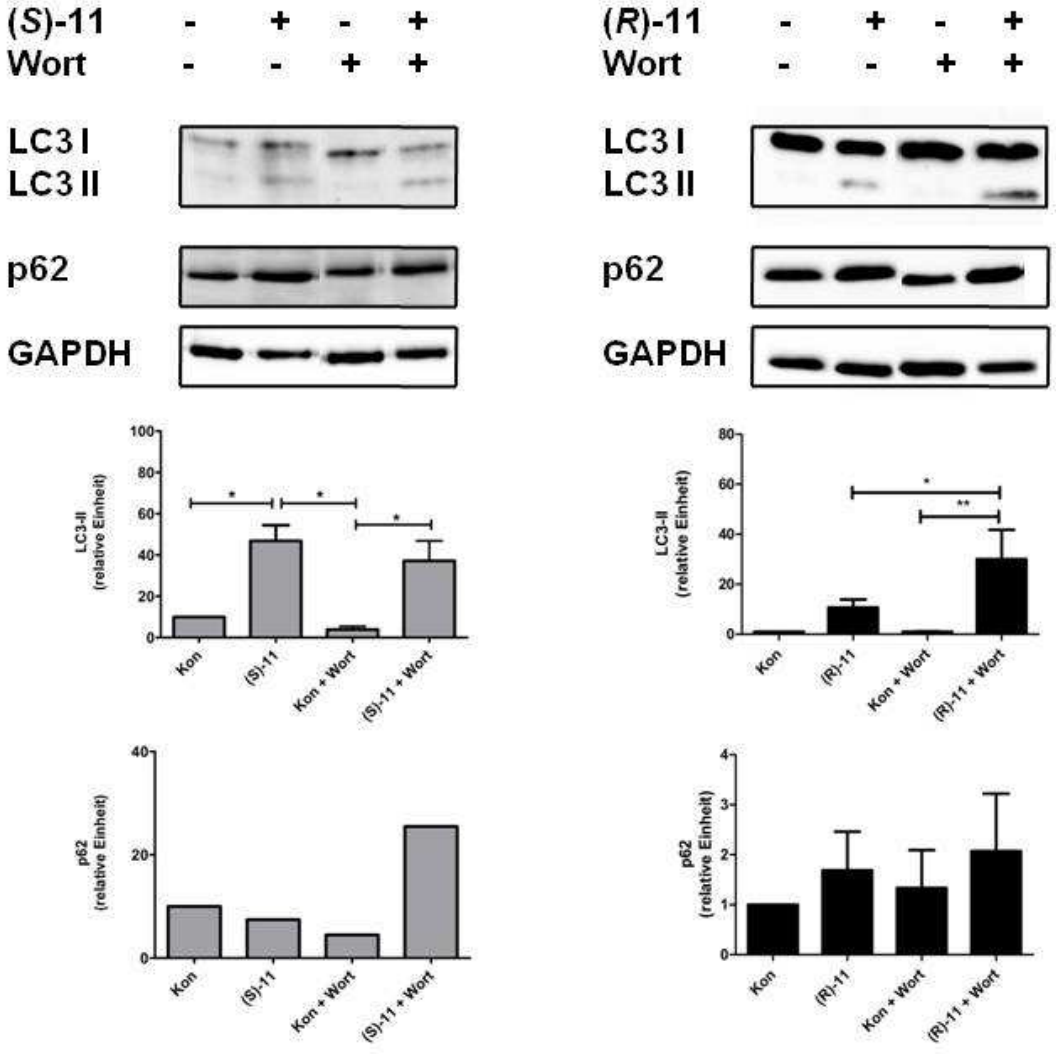


Abbildung 4.38 Einfluss von Wortmannin auf die Expression von LC3-II und p62.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit oder ohne Wortmannin (Wort, 1 µM, 1 h Vorinkubation) und **(*S*)-11** (36 µM) bzw. **(*R*)-11** (23 µM) nach 48 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH dient als Ladungskontrolle. Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden auf GAPDH normalisiert und als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *$p < 0,05$; **$p < 0,01$ (ANOVA/Bonferroni).

4.1.24 Einfluss von Wortmannin auf die Apoptoserate

Da Wortmannin erst die Fusion zum Autolysosom blockiert, ist es nicht verwunderlich nach Vorbehandlung LC3-II-Banden zu detektieren. Daher sollte in einem weiteren Versuch die Wirkung auf die Apoptose untersucht werden. Sollte die Autophagozytose zellschützend wirken, müsste eine Blockierung durch Wortmannin zu einer erhöhten Apoptoserate führen.

Die Vorinkubation mit dem Hemmstoff, in einer nicht toxischen Konzentration (1 µM), erzielte jedoch keine signifikante Änderung Annexin-V positiver Zellen nach 48 h verglichen mit den σ-Rezeptor-Liganden allein (Abbildung 4.39). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die durch σ-Liganden induzierte Autophagozytose keinen schützenden Effekt auf die Apoptose ausübt.

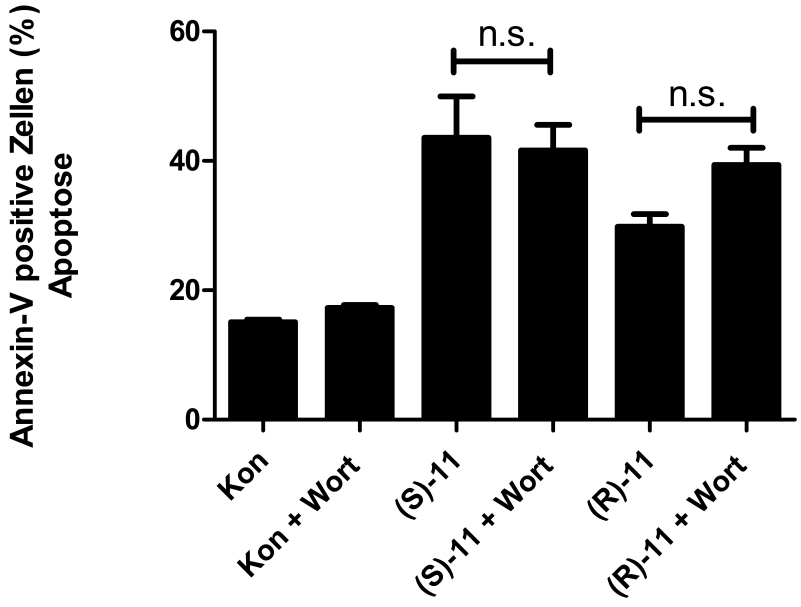


Abbildung 4.39 Einfluss von Wortmannin auf die Apoptoserate.

RPMI 8226-Zellen wurden 1 h mit Wortmannin (1 µM) vorinkubiert und anschließend mit 36 µM **(*S*)-11** bzw. 23 µM **(*R*)-11** für 48 h inkubiert und nach Doppelanfärbung mit Annexin-V/PI im Durchflusszytometer analysiert. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, n.s. = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni).

4.1.25 Kombinationsversuche mit (*R*)-8

4.1.25.1 Kombinierte Wirkung von (*R*)-8 mit Melphalan

Die Behandlung von Tumorpatienten mit mehreren Zytostatika in Kombination stellt bereits ein anerkanntes Therapieregime dar. Daher ist es von Interesse neue

Wirkstoffkandidaten mit bereits etablierten Chemotherapeutika auf deren ergänzende Fähigkeiten zu analysieren. In der Therapie des Multiplen Myeloms hat sich das Alkylans Melphalan als ein klassisches und seit langer Zeit eingesetztes Zytostatikum bewährt. Deshalb wurde die Kombination dieses Standardtherapeutikums mit dem σ-Rezeptor-Ligand **(*R*)-8** in RPMI 8226-Zellen eingesetzt. **(*R*)-8** besitzt von allen getesteten Substanzen die höchste Bindungsaffinität zum σ_1-Rezeptor (siehe Tabelle 7.1 im Anhang).

Abbildung 4.40 veranschaulicht, dass **(*R*)-8** und das Alkylans Melphalan in geringen toxischen Konzentrationen (jeweils $IC_{50}/2$) als Einzeltherapie ähnliche Apoptoseraten nach 48 h aufweisen. Die simultane Behandlung von **(*R*)-8** mit Melphalan führt zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung der Apoptoserate, verglichen mit der jeweiligen Monotherapie.

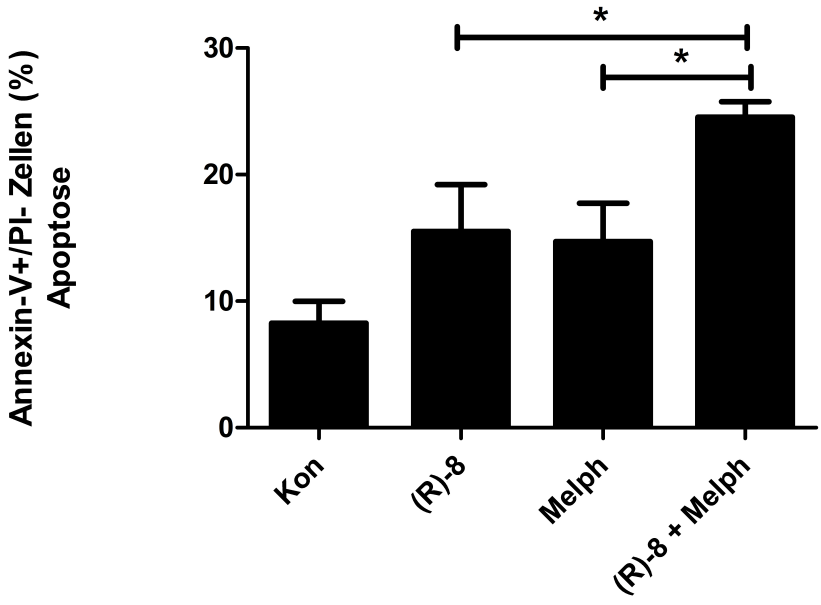


Abbildung 4.40 Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit (*R*)-8, Melphalan oder in Kombination.
RPMI 8226-Zellen wurden mit der jeweiligen $IC_{50}/2$-Konzentration für 48 h inkubiert und anschließend mit Annexin-V FITC/PI angefärbt. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, *p < 0,05; (ANOVA/Bonferroni).

Auch die Ergebnisse des MTT-Assays bestätigen diese Beobachtungen: Die im Zytotoxizitätsassay ermittelten Dosis-Wirkungskurven können für eine Kalkulierung des Combination Index (CI) nach der Methode von Chou und Talalay[172,173] für eine nicht-konstante Kombinationstherapie herangezogen werden. Es resultieren Werte < 1 (Tabelle 4.6), so dass von einer synergistischen Wirkung ausgegangen werden

kann (CI < 1: synergistischer Effekt; CI = 1: additiver Effekt; CI > 1: antagonistischer Effekt).

Tabelle 4.6 CI-Werte für die Kombination von (*R*)-8 mit 4,25 µM Melphalan.

Konzentration (*R*)-8 (µM)	CI
20,0	0,21054
10,0	0,43374
5,0	0,71014
2,5	0,74273
1,25	0,59161

Auch das resultierende normalisierte Isobologramm in Abbildung 4.41 zeigt, dass die Datenpunkte der verschiedenen Konzentrationen von **(*R*)-8** im synergistischen Bereich liegen.

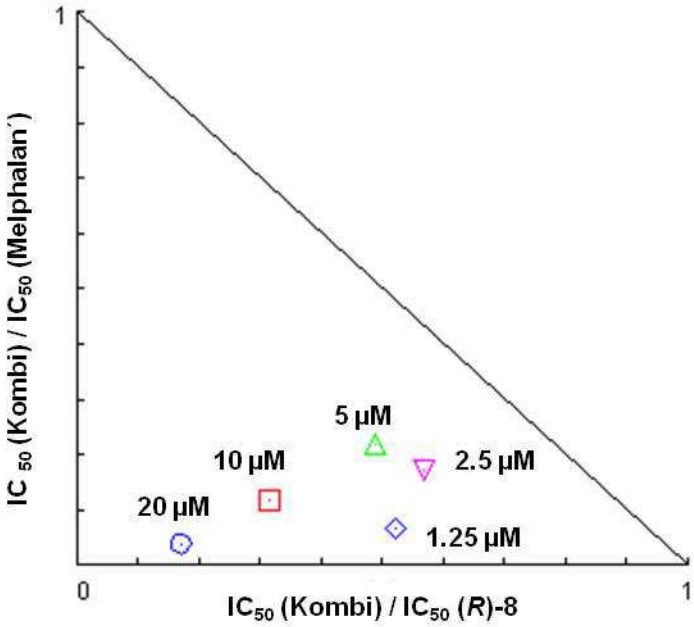


Abbildung 4.41 Normalisiertes Isobologramm.

RPMI 8226 Zellen wurden mit **(*R*)-8** und Melphalan (0–20 µM) alleine oder in einer Kombination aus **(*R*)-8** (0–20 µM) mit 4,25 µM Melphalan simultan für 72 h inkubiert und mittels MTT-Assay ausgewertet. Aus den generierten Dosis-Wirkungskurven wurde ein normalisiertes Isobologramm mit der Compusyn-Software[174] berechnet.

4.1.25.2 Kombinierte Wirkung von (*R*)-8 mit Haloperidol

Die Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit dem nicht selektiven σ_1-Antagonisten Haloperidol zeigt in Abbildung 4.42, dass dieser in Konzentrationen unterhalb von 20 µM nur sehr geringe antiproliferierende Eigenschaften besitzt (IC_{50}: 16,39 ± 6,15 µM). Die Stimulation der Zellen mit beiden Wirkstoffen veranschaulicht, dass der wachstumshemmende Effekt vom **(*R*)-8** zunächst aufgehoben wird. Während bei Konzentrationen von 5 µM **(*R*)-8** das Zellwachstum scheinbar angeregt wird, tritt bei 10 µM **(*R*)-8** ein leichter Rückgang der vitalen Zellen ein, welcher mit der Wirkung von Haloperidol allein korreliert. Auch die Berechnung des CI ergibt Werte > 1. Eine hohe Konzentration von 20 µM **(*R*)-8** vermag den antagonistischen Effekt des Haloperidols jedoch aufzuheben. Die zytotoxische Aktivität der σ-Ligand-Monotherapie wird jedoch nicht erreicht. Aufgrund der gegensätzlichen Wirkung scheint es sich bei **(*R*)-8** eher um einen σ_1-Agonisten zu handeln.

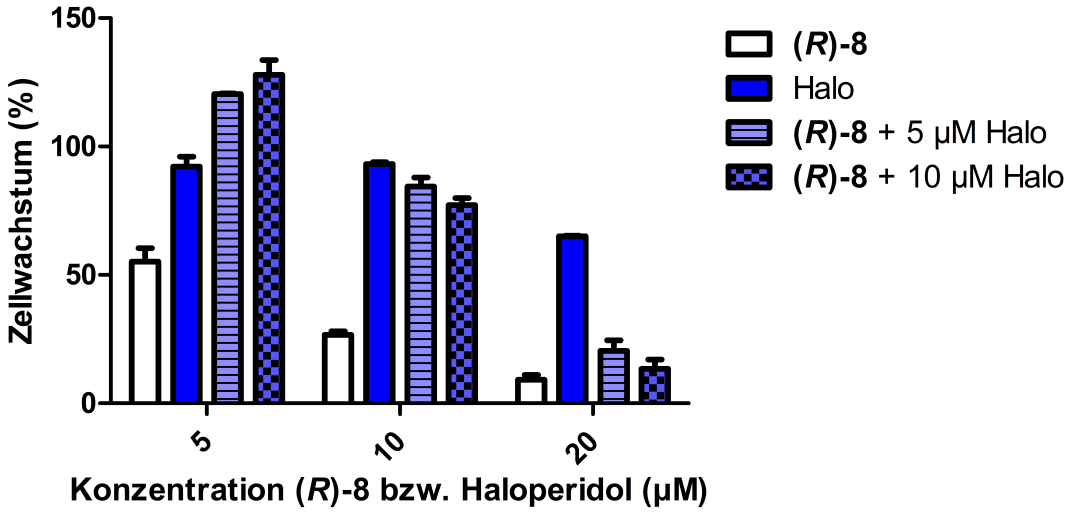


Abbildung 4.42 Einzel- und Kombinationstherapie von (*R*)-8 und Haloperidol.
RPMI 8226-Zellen wurden mit **(*R*)-8** oder Haloperidol (Halo, 5, 10 und 20 µM) bzw. einer simultanen Kombination aus **(*R*)-8** (5, 10 und 20 µM) mit 5 bzw. 10 µM Haloperidol für 72 h behandelt und mittels MTT-Assay vermessen, Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten.

4.1.25.3 Kombinierte Wirkung von (*R*)-8 mit PB 28

Betrachtet man die Wirkung von **(*R*)-8** mit dem σ_1-Antagonist/σ_2-Agonisten so führt die Messung apoptotischer Zellen nach subtherapeutischer Gabe zu einem Anstieg, der signifikant gegenüber der Monotherapie ist, wie Abbildung 4.43 veranschaulicht.

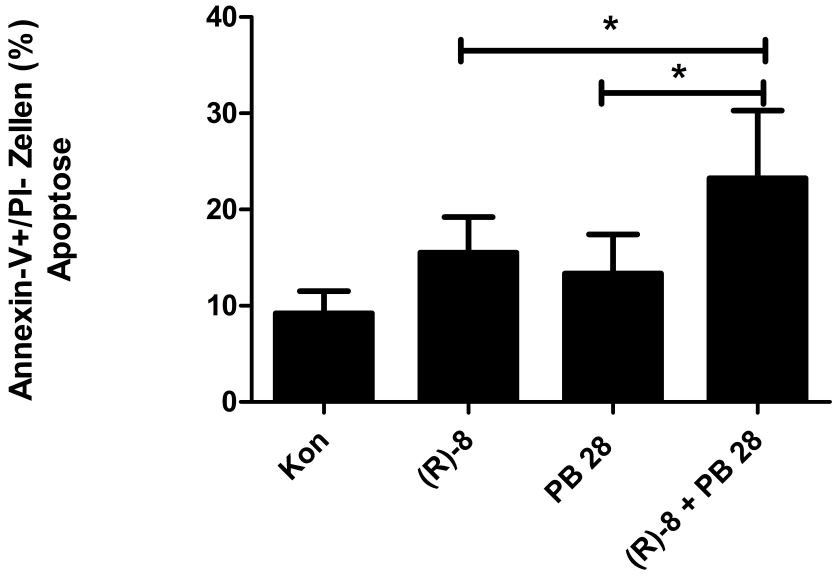


Abbildung 4.43 Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit (*R*)-8, PB 28 oder in Kombination.
RPMI 8226-Zellen wurden mit der IC_{50}/4 PB 28 bzw. IC_{50}/2 **(*R*)-8** für 48 h inkubiert und anschließend mit Annexin-V FITC/PI angefärbt. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, **p* < 0,05 (ANOVA/Bonferroni).

Für eine genaue Zuordnung der σ-Rezeptor-Liganden auf deren agonistische/antagonistische Eigenschaften bedarf es jedoch weiterer Versuche.

4.1.26 *In-vitro*-Metabolismusuntersuchungen mit (*S*)-8

Untersuchungen zum Metabolismus werden in der Wirkstoffentwicklung immer früher einbezogen, um teure *in-vivo* Testungen von Substanzen, die sich im Tierversuch als unwirksam erweisen, zu umgehen. Gebildete Metabolite können zur Wirkung von Arzneistoffen beitragen und sogar zu einer Giftung führen, wenn sie toxischer als die Ausgangssubstanz sind[195]. Eine frühzeitige Feststellung der Metabolitenstruktur ermöglicht diese auch *in-vitro* zu testen.
Daher wurde die metabolische Stabilität von **(*S*)-8** an ausgewählten Mikrosomen (induziert/nicht-induziert) in Abhängigkeit von NADPH untersucht, um festzustellen, ob das CYP 450 System am Metabolismus des σ-Rezeptor-Liganden beteiligt ist.
Wie in Abbildung 4.44 ersichtlich, wird **(*S*)-8** in Abhängigkeit von NADPH (das über die Glukose-6-Dehydrogenase aus NADP generiert wird) bereits nach den ersten 5 min deutlich abgebaut, während in Abwesenheit des Kosubstrates die Konzentration des σ-Rezeptor-Liganden nahezu konstant bleibt und erst nach 30 min vernachlässigbar abnimmt. Auch die Inkubation mit induzierten Mikrosomen führt zu

einer Abnahme von **(*S*)-8**. Die Metabolisierung erfolgt bei den Phenobarbital-induzierten Mikrosomen am schnellsten und effektivsten, bereits nach 5 min kann eine signifikante Abnahme des Wirkstoffes gegenüber der Kontrolle verzeichnet werden. Nach 60 min liegen nur noch 16 % der Verbindung vor, während in Abwesenheit von NADPH nach 60 min noch 67% vorhanden sind. Im Vergleich mit nicht-induzierten Mikrosomen nimmt der **(*S*)-8**-Gehalt in einem größeren Ausmaß ab. Dies deutet auf eine Verstoffwechselung über das Isoenzym 2B2 (ortholog zum menschlichen 2B6) hin. Auch bei den Dexamethason-induzierten Mikrosomen wird **(*S*)-8** signifikant metabolisiert, allerdings erst nach 30 min und in abgeschwächter Weise verglichen mit den nicht-induzierten Präparationen. In den Naphthoflavon-vorbehandelten Mikrosomen nimmt zwar die relative Konzentration des Wirkstoffes ab, allerdings findet dies auch im Ansatz ohne NADPH-Zugabe statt.

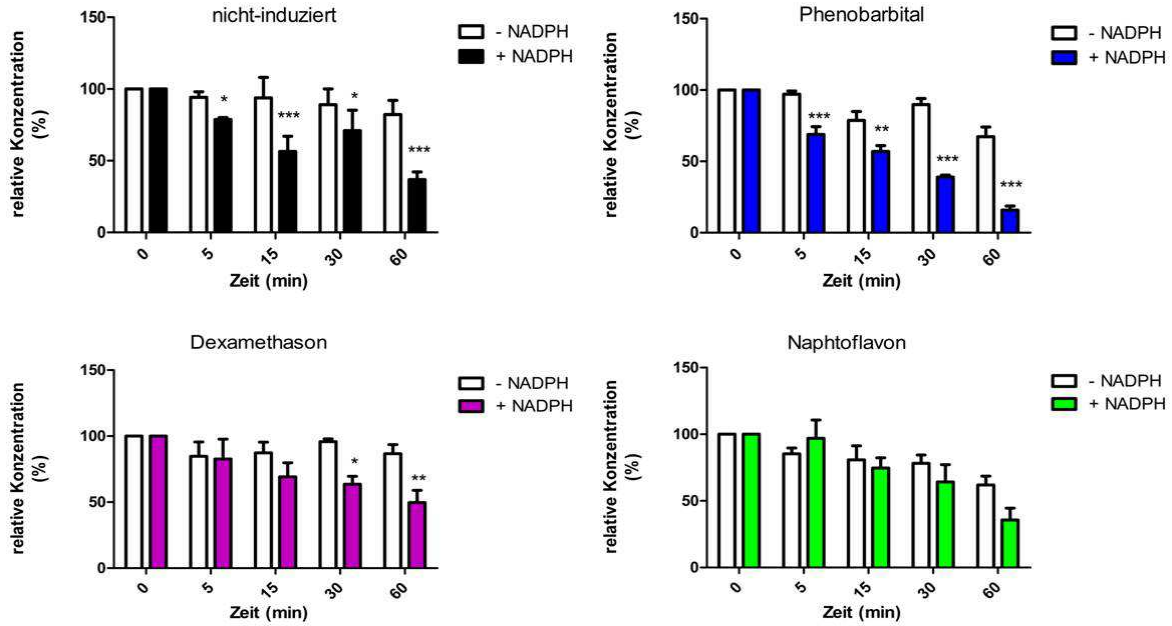


Abbildung 4.44 Metabolische Stabilität von (*S*)-8.
Inkubation der jeweiligen Mikrosomen mit 0,1 mM **(*S*)-8** für 0–60 min mit oder ohne NADPH und anschließende HPLC-Analyse. Auswertung der Peakflächen mittels HSM-Software. Die Peakflächen sind als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle, angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 (ANOVA/Bonferroni).

Der zeitabhängige Abbau von **(*S*)-8** in Phenobarbital-induzierten Rattenmikrosomen ist in Abbildung 4.45 nochmals im HPLC-Chromatogramm dargestellt. Der am Anfang der Reaktion (0 min Inkubation) detektierte Peak des **(*S*)-8** bei einer R_t von 26,0 min nimmt nach 60 min signifikant ab. Demgegenüber treten neue Peaks bei einer Retentionszeit von R_t = 7,36 min (und 6,53 min) sowie ein weiterer Peak bei R_t

= 16,51 min auf, die somit polarer sind als die Ausgangsverbindung. Auch im DAD-Chromatogramm der LC/MS-Bestimmung wird neben dem Hauptpeak ein weiterer Peak bei R_t = 4,198 min erfasst (Abbildung 4.46B).

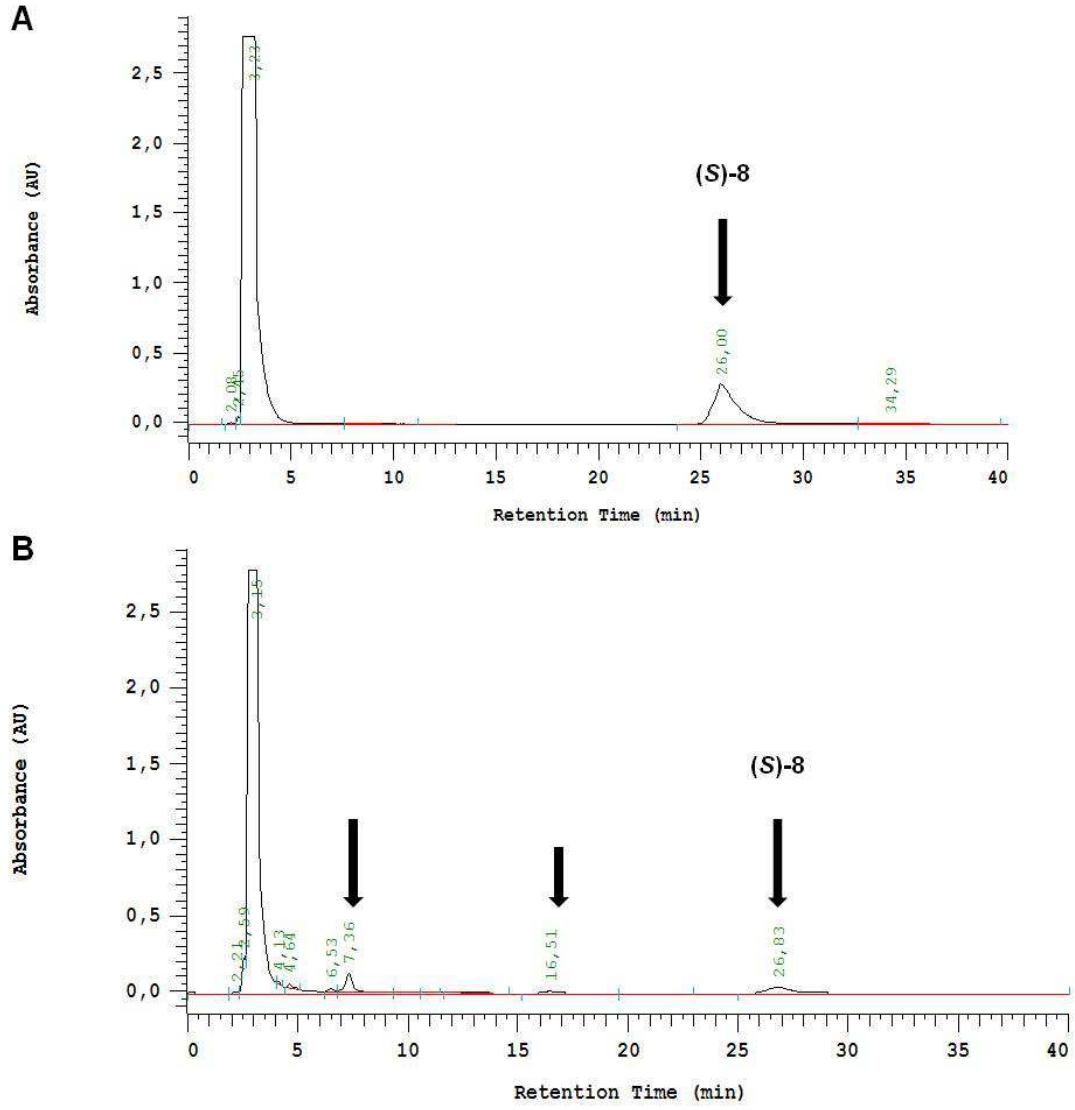


Abbildung 4.45 HPLC-Chromatogramme der Phenobarbital-induzierten (*S*)-8-Probe.
Phenobarbital-induzierte Ratten-Mikrosomen mit NRS und **(*S*)-8** nach (A) 0 min und (B) 60 min. Detektion bei λ = 220 nm.

Die Identifizierung gebildeter Metabolite ist von Nutzen, um metabolisch stabilere Liganden synthetisieren zu können. In Abbildung 4.46 sind zunächst die DAD- und Ionenchromatogramme (Elektronen-Spray-Ionisation) nach HPLC-Trennung von **(*S*)-8** nach 60 min Inkubation mit bzw. ohne NADPH abgebildet. Dem Hauptpeak bei einer R_t von 8,02 bzw. 8,60 min entspricht im Ionen-Chromatogramm ein Masse-Ladungs-Verhältnis von 367,27 *m/z*. Dem im DAD-Chromatogramm bei R_t = 4,20 min

entstehenden Peak kann im Ionen-Chromatogramm ein *m/z* von 383,2667 zugeordnet werden, dass zusätzlich in der NADP-inkubierten Probe auftritt.

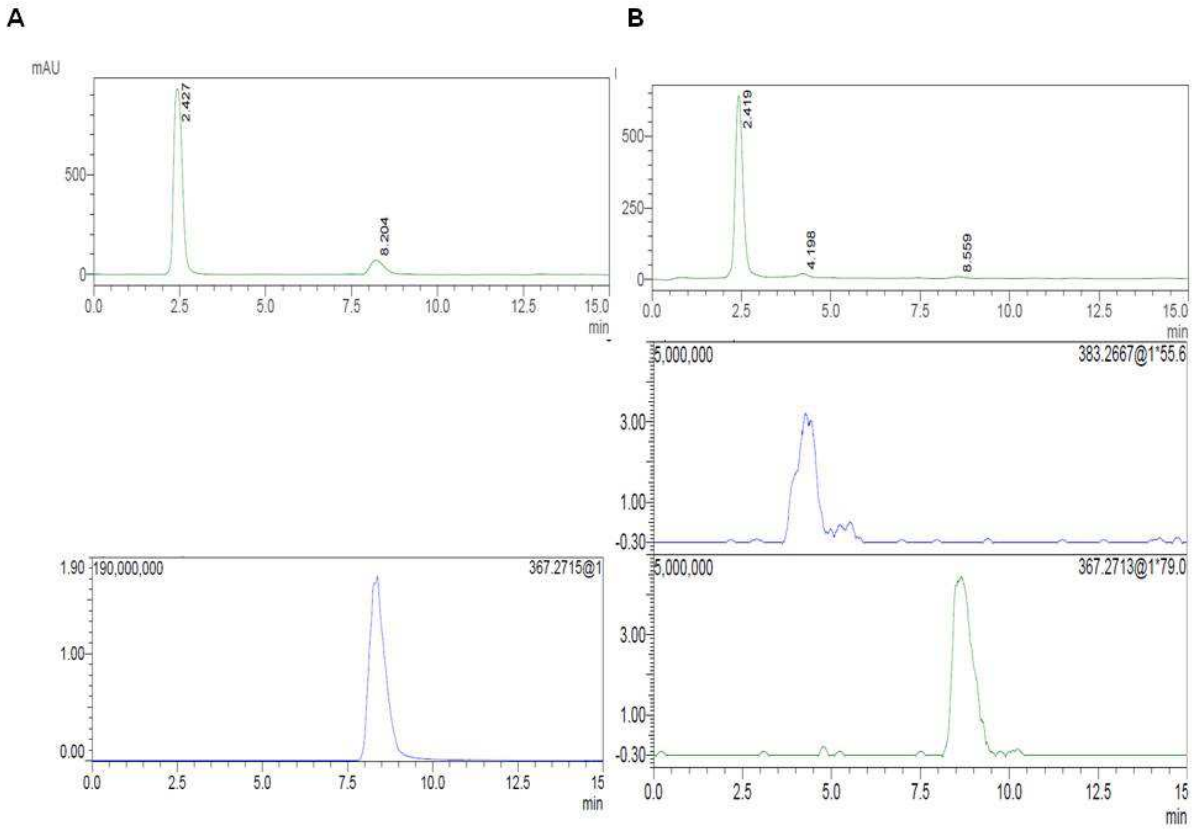


Abbildung 4.46 DAD- und Ionenchromatogramme nach HPLC Phenobarbital-induzierter (*S*)-8-Proben.
Phenobarbital-induzierte Ratten-Mikrosomen nach Inkubation mit **(*S*)-8** ohne (A) und mit NADPH (B) nach 60 min.

Um strukturelle Aussagen über den entstandenen Hauptmetaboliten treffen zu können, wurden LC/MS-Untersuchungen durchgeführt, in denen die zuvor theoretisch berechneten Molmassen mit denen im Spektrum detektierten verglichen wurden (siehe Abbildung 4.47). Das MS-Spektrum der Probe ohne NADPH nach 60 min Inkubation zeigt ein Ion im positiven Modus, das der Ausgangsverbindung **(*S*)-8** entspricht (*m/z* = 367,275). Im NADPH-Ansatz nach 60 min Inkubation tritt im Positivmodus neben **(*S*)-8** ein weiteres Ion mit *m/z* = 383,271 auf. Dieses wird vermutlich durch eine Hydroxylierung, als stattfindende Phase-I-Reaktion, begründet sein. Mehrere Strategien zur Synthese dieses postulierten Metaboliten, durch Frauke Weber in Münster, waren jedoch erfolglos und lieferten nicht die gewünschten Ausbeuten und Reinheiten.[186] Somit ließen sich keine Vergleichsspektren für eine endgültige Identifizierung des entstehenden Produktes aufnehmen.

Auch **(*R*)-11** wird vermutlich durch eine Hydroxylierung in einen hydrophileren Metaboliten umgewandelt. Dem berechneten Masse-Ladungs-Verhältnis im Positivmodus (*m/z* = 393,290) kann im MS-Spektrum ein *m/z*-Verhältnis von 393,288 zugeordnet werden. In Anwesenheit des Kosubstrates NADPH wird ein *m/z* von 409,287 detektiert, das mit der theoretischen Masse des hydroxylierten Derivates im Positivmodus korreliert (*m/z* = 409,285). Auch hier wird eine Hydroxylierung des aromatischen Ringsystems angenommen (MS-Spektren können dem Anhang in Abbildung 7.4 entnommen werden).

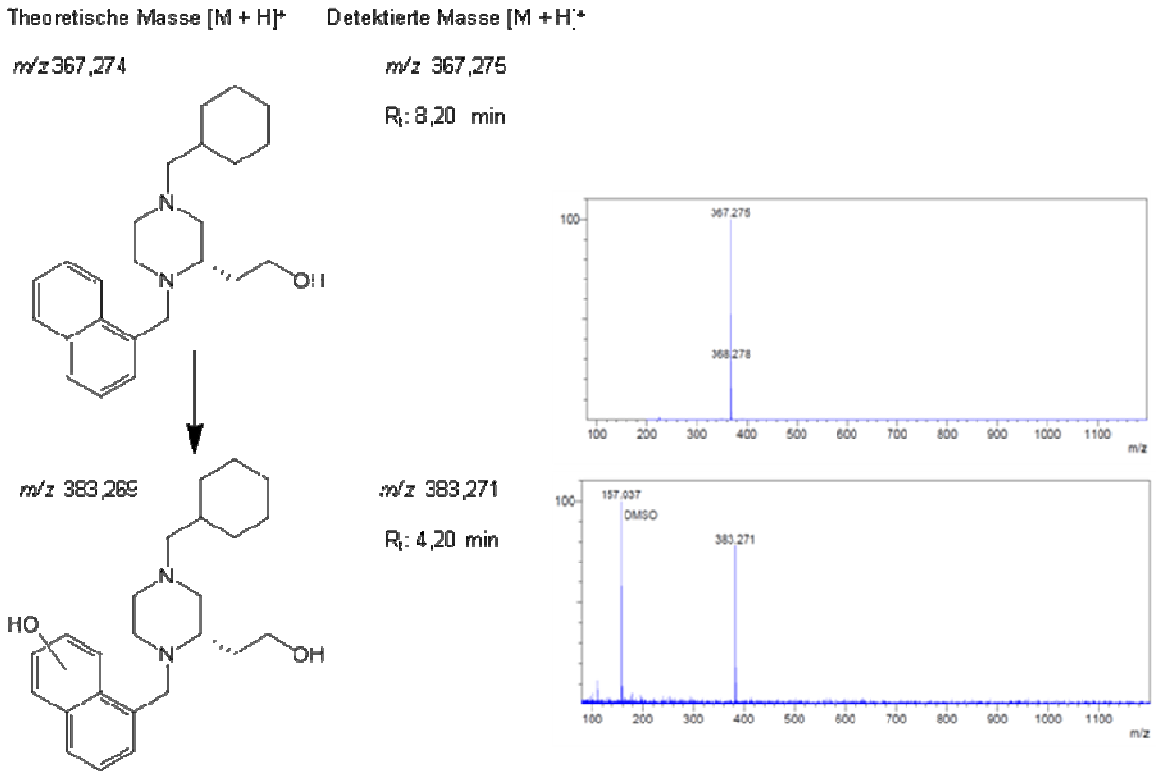
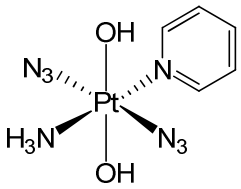


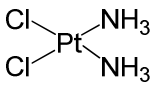
Abbildung 4.47 Postulierter Metabolit des (*S*)-8.
Links: **(*S*)-8** und das mögliche hydroxylierte Metabolitenprodukt, rechts: Massenspektren von **(*S*)-8** und seinem Metaboliten.

4.2 Ergebnisse der photodynamischen Untersuchungen von Pt^{IV}-Verbindungen

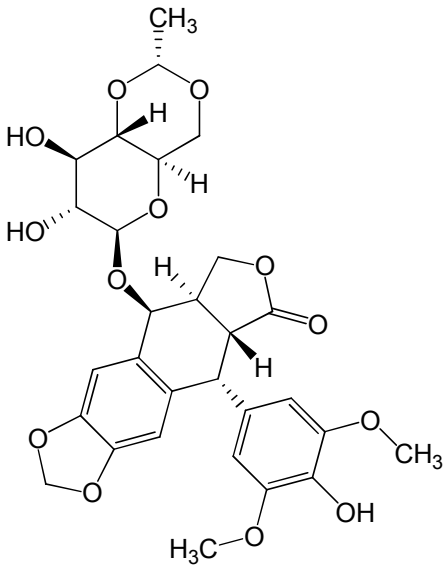
Pt^{IV}-Diazide stellen eine neue Klasse von Antitumorwirkstoffen dar und lassen sich aufgrund ihrer Lichtaktivierbarkeit in der PACT bzw. PDT einsetzen. Ein wichtiges Kriterium dafür ist, dass sie selektiv im Tumor durch Licht geeigneter Wellenlänge aktiviert werden und nicht bereits vorher in ihre aktive Form umgewandelt werden. Dazu bedarf es einer ausreichenden Stabilität in der Abwesenheit von Licht und gegenüber biologischen Reduktionsmitteln.[162,163] Für das im Arbeitskreis nachsynthetisierte photoaktivierbare *trans,trans,trans*-$[Pt(N_3)_2(OH)_2(NH_3)(py)]$ (FM 165, Name bezieht sich auf die erstmals durch Fiona Mackay (Universität Warwick, Arbeitskreis Peter Sadler, UK) charakterisierte Verbindung, siehe Abbildung 4.48) konnten in ersten Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse bezüglich der antiproliferierenden und DNA-bindenden Eigenschaften aufgeklärt werden.[162,196] Das ohne Photoaktivierung untoxische Pt^{IV}-Diazid bindet beispielsweise nach Bestrahlung mit Licht irreversibel an die DNA, unter Ausbildung von sogenannten *intrastrand cross-links*. Neben der DNA als Wirkstofftarget deuten erste Beobachtungen zu apoptotischen Vorgängen auf eine Apoptose-unabhängigen Verlauf des Zelltodes hin, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit belegt werden sollen. Desweiteren wird auch eine Beteiligung der Autophagozytose in Betracht gezogen, die ebenfalls analysiert wird.



FM 165



Cisplatin



Etoposid

Abbildung 4.48 FM 165 und die Referenzsubstanzen Cisplatin und Etoposid.

4.2.1 FM 165 induziert keine Apoptose

Während der Cisplatin-vermittelte Zelltod durch Apoptose verursacht wird, konnten nach Stimulation mit Pt^{IV}-Verbindungen keine typisch apoptotischen Merkmale in Zellen identifiziert werden, so dass man mittlerweile von einem abweichenden Wirkmechanismus ausgeht.[196,197] Um dies auch für HL 60-Zellen zu bestätigen, wurden diese mit 35 µM (IC_{50}) und 63 µM (IC_{90}) FM 165-Konzentrationen für 1 h inkubiert, für 30 min mit UV-Licht bestrahlt und nach weiterer 24 bzw. 48 h Inkubation mittels Annexin-V/PI-Doppelfärbung auf ihren apoptotischen Anteil hin untersucht. Abbildung 4.49 verdeutlicht, dass die FM 165 Behandlung nach 24 h zu keiner Apoptose-Aktivierung führt. Auch nach 48 h steigt der Annexin-V positive Anteil nur leicht und liegt für die IC_{90}-Konzentration noch unterhalb von 10 %. Verglichen mit den bekannten Chemotherapeutika Cisplatin (CDDP) und Etoposid, deren apoptotischer Anteil stetig steigt, zeigt sich also eindeutig, dass FM 165 keine Apoptose induziert.

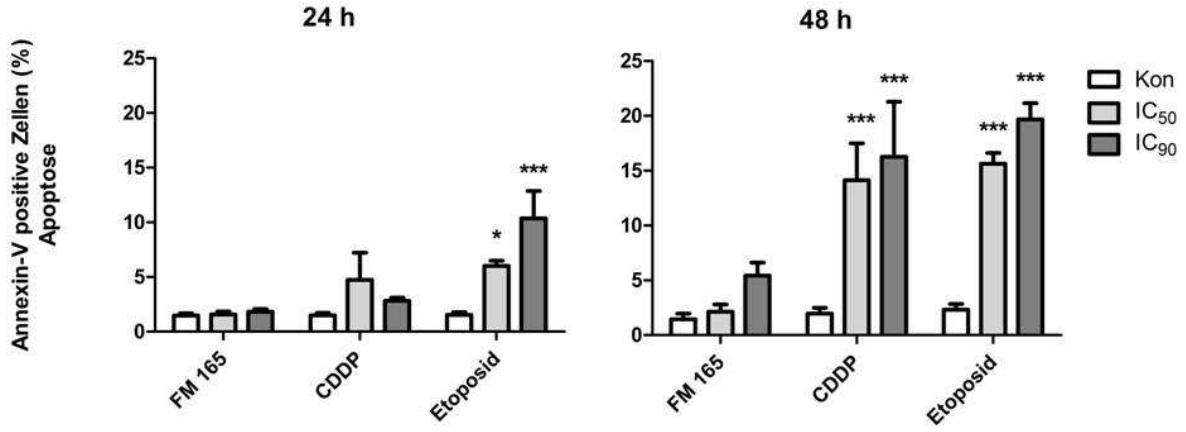


Abbildung 4.49 Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit lichtaktiviertem FM 165, Cisplatin und Etoposid.
HL 60-Zellen nach Vorinkubation mit FM 165 (35 und 63 µM) und Bestrahlung bei λ = 365 nm sowie nach Stimulation mit Cisplatin und Etoposid (jeweils mit 0,42 und 0,74 µM). Nach 24 bzw. 48 h wurden die Zellen mit Annexin-V FITC/PI angefärbt und mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Mittelwert $\pm$ SD von n = 3 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (ANOVA/Bonferroni).

4.2.2 FM 165 aktiviert die Autophagozytose

Da durch Anfärbung mit Annexin-V/PI die Apoptose als Wirkmechanismus von FM 165 ausgeschlossen werden konnte, sollte in einem weiterführenden Versuch die Wirkung des Pt^{IV}-Komplexes auf die Autophagozytose untersucht werden.

Dazu wurde mittels Western Blot die Expression der Autophagozytose-Marker LC3 und p62 analysiert. Abbildung 4.50 zeigt den signifikanten Anstieg der LC3-II-Bande nach Stimulation mit photoaktivierten FM 165. Dieser nimmt in Anwesenheit der lysosomalen Protease-Inhibitoren Pepstatin A und E64d weiter zu. Jene blockieren den Abbau des Autolysosomeninhaltes, was in einer erhöhten LC3-II-Expression resultiert. Die Verstärkung der LC3-II-Bande nach FM 165-Behandlung weist auf einen vollständigen autophagischen Fluss hin. Auch die abnehmende p62-Expression nach FM 165-Gabe bestätigt ebenfalls die Beteiligung autophagischer Prozesse. Cisplatin und Etoposid induzieren dagegen keine Autophagozytose, die Bandenintensität von LC3-II verbleibt auf Kontrollniveau und auch p62 nimmt nicht signifikant ab.

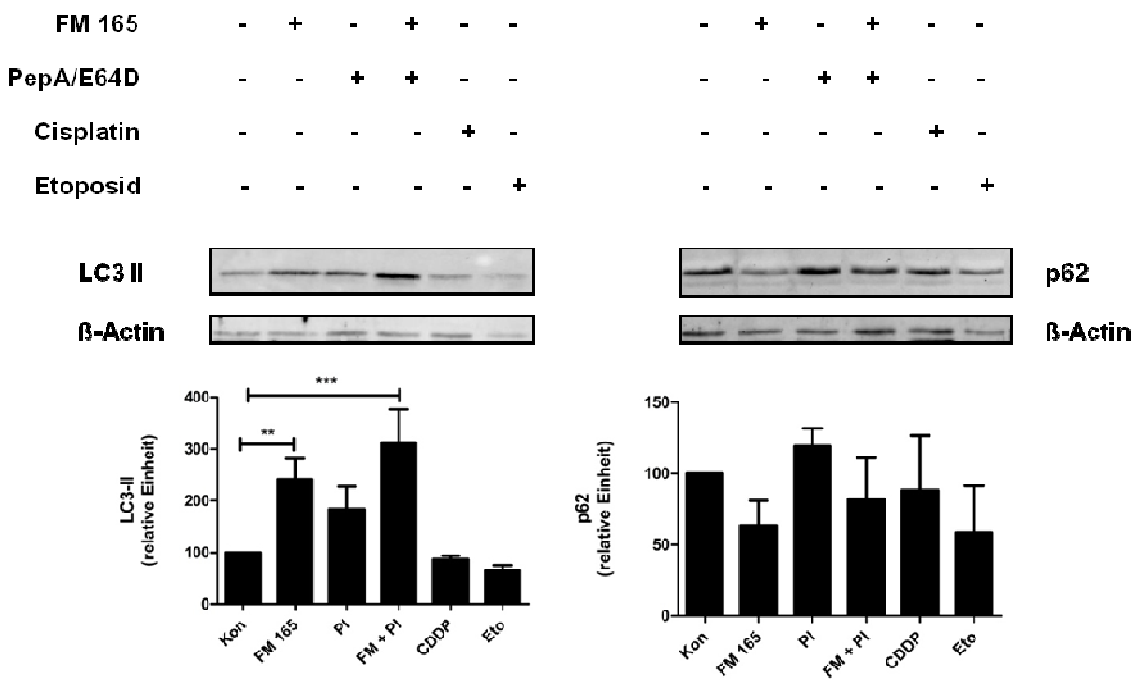


Abbildung 4.50 Expression von LC3-II und p62.
HL 60-Zellen wurden mit photoaktiviertem FM 165 (100 µM) in An- oder Abwesenheit der lysosomalen Protease-Inhibitoren Pepstatin A/E64d (PI, 10 µg/ml), Cisplatin (CDDP, 0,74 µM) oder Etoposid (Eto, 0,74 µM) inkubiert. Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladungen (20 µg/Bahn) diente β-Actin als *Housekeeping*-Protein. Quantitative Auswertung der Bandenintensitäten mittels LabImage 1D Software. Die Banden wurden als prozentualer Anteil, bezogen auf die Kontrolle (Kon), angegeben. Mittelwert ± SD von n = 3 unabhängigen Experimenten, $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$ (ANOVA/Dunnett).

4.2.3 FM 165 führt zur Bildung von ROS

Lichtaktivierte Pt^{IV}-Diazide sind in der Lage reaktive Stickstoffradikale (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), wie z. B. das Azid-Radikal ($^{\bullet}N_3$), zu produzieren, die dann oxidativen Stress in den Zellen auslösen können und so die Zellen schädigen.[163] Daher war es von Interesse auch eine mögliche ROS-Produktion durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2′,7′-DCFDA zu detektieren.

Abbildung 4.51 dokumentiert die zeitabhängige Zunahme der ROS-Spezies innerhalb der ersten vier Stunden. Zellen, die direkt nach der Bestrahlung vermessen werden (0 h), zeigen die gleiche geringe Fluoreszenzintensität, wie Kontrollzellen, die nur mit UV-Licht bestrahlt sind. Nach 2 und 4 h nimmt die Intensität signifikant zu, erreicht jedoch nicht die Intensität der Positivkontrolle *tert*-Butylhydroperoxid. Ab einer 6 h Inkubation nehmen die ROS-Konzentrationen wieder ab (nicht abgebildet), sodass es sich bei ihrer Bildung um einen sehr frühen Prozess handelt.

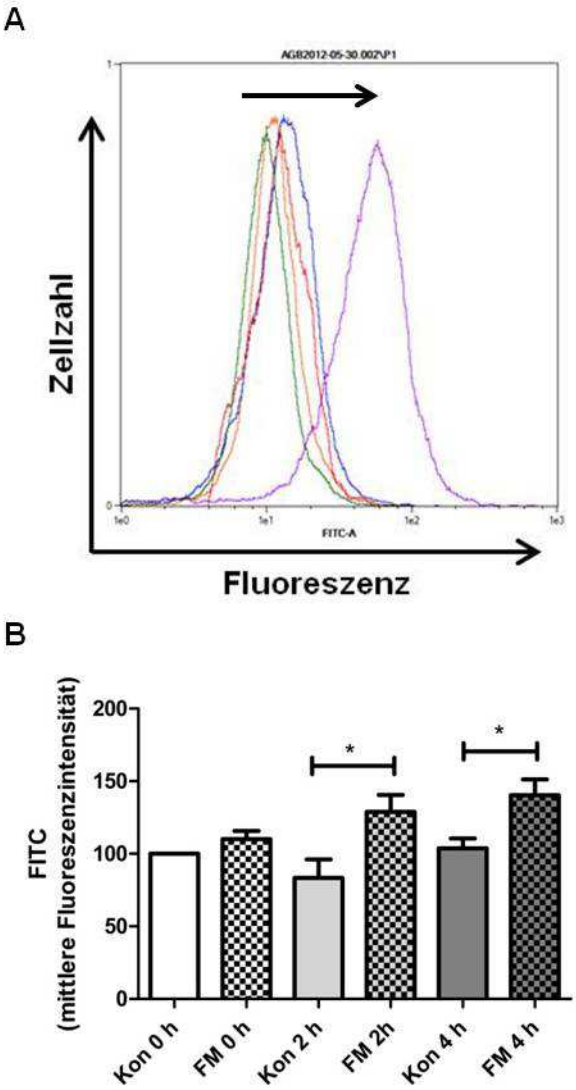


Abbildung 4.51 Effekt von FM 165 auf die ROS-Produktion.
(A) HL 60-Zellen nach Inkubation mit FM 165 und Bestrahlung bei λ = 365 nm für 0 (orangefarbene Linie), 2 (rote Linie) und 4 h (blaue Linie). Bei der grünen Linie handelt es sich um bestrahlte, unbehandelte Kontrollzellen und die violette Linie ist die Positivkontrolle mit 200 µM TBH. Der Pfeil symbolisiert die fluoreszenz-abhängige ROS-Zunahme. (B) Quantitative Auswertung, Kon = Kontrollzellen, die ohne Substanz für 30 min bestrahlt wurden. *p < 0,05 (Students t-Test, gepaart).

4.3 Gegenüberstellung der untersuchten Substanzklassen anhand ihres zellulären Wirkungsspektrums

Nachdem die zellwachstumshemmenden Eigenschaften der untersuchten σ-Rezeptor-Liganden **(*S*)-11** und **(*R*)-11** und der Diazido-Pt^{IV}-Verbindung FM 165 analysiert worden sind, können abschließend folgende Beobachtungen getroffen werden:

Nach Behandlung der Tumorzellen mit den jeweiligen Substanzklassen lassen sich grundlegende Unterschiede bereits im Lichtmikroskop erfassen. Während die

σ-Rezeptor-Liganden die typischen morphologischen Erscheinungen der Apoptose hervorrufen, ist dies beim FM 165 nicht der Fall. Dies belegt auch die Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI.[163] Während beide Verbindungsklassen keinen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben, kann bei den σ-Rezeptor-Liganden eine deutliche Apoptoserate nach Anfärbung mit Annexin-V-FITC erzielt werden. Photoaktiviertes FM 165 hingegen hemmt zwar das Zellwachstum zahlreicher humaner Tumorzellen, dies erfolgt jedoch Apoptose-unabhängig.[162]

Für beide Verbindungsklassen lassen sich Merkmale der Autophagozytose beobachten. Während diese Form des programmierten Zelltodes beim σ-Ligand-Enantiomerenpaar jedoch erst nach der Apoptose detektiert wird, erfolgt die Autophagozytose bei FM 165 schon nach kurzer Behandlungsdauer. Die Hemmung durch spezielle Autophagozytose-Inhibitoren weist bei der Platin^{IV}-Verbindung auf einen vollständigen Ablauf hin, im Gegensatz zur unvollendeten Form seitens der Liganden des σ-Rezeptors. Letztere initiieren ihre antiproliferative Wirkung vermutlich über LPO-Produkte, wohingegen die Pt^{IV}-Verbindung ROS-Konzentrationen erhöht. Tabelle 4.7 fasst die Beobachtungen noch einmal zusammen:

Tabelle 4.7 Gegenüberstellung der spezifischen Charakteristika von (*S*)-11 und (*R*)-11 als σ-Rezeptor-Liganden mit der photoaktivierbaren Pt^{IV}-Verbindung FM 165.

	(*S*)-11 und (*R*)-11 (σ-Rezeptor-Liganden)	**FM 165** (Pt^{IV}-Komplex)
Zellmorphologie	Apoptose-typisch	Apoptose-untypisch[196]
DAPI-Färbung	Chromatinkondensation	keine Chromatinkondensation[163]
Zellzyklus	kein Einfluss	kein Einfluss[162]
Apoptose	Annexin-V positiv	Annexin-V negativ
Oxidativer Stress		
ROS	negativ	positiv
LPO	positiv	negativ
Autophagozytose		
LC3-II-Expression	Zunahme,	Zunahme,

	(*S*)-11 und (*R*)-11 (σ-Rezeptor-Liganden)	**FM 165** (Pt^{IV}-Komplex)
	nach 24 h detektierbar	nach 6 h detektierbar
p62-Expression	unverändert	Abnahme
Inhibitoren	keinen bzw. unerwarteter (3-MA) Einfluss	mit Einfluss

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der zellwachstumshemmende Einfluss neuer σ-Rezeptor-Liganden sowie licht-aktivierbarer Pt^{IV}-Komplexe an einer Reihe humaner Krebszelllinien untersucht werden. Ferner sollten repräsentative wirksame Verbindungen auf ihre Fähigkeit Apoptose und Autophagozytose zu induzieren getestet, sowie der dazugehörige Wirkmechanismus genauer betrachtet werden.

5.1 σ-Liganden mit antiproliferierender Wirkung

Geiger et al.[138] und Holl et al.[188,198] konnten bereits mit ihren synthetisierten σ-Rezeptor-Liganden eine zytotoxische Aktivität in ausgewählten humanen Tumorzelllinien darlegen. Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Frauke Weber synthetisierten Verbindungen weisen zum Teil antiproliferierende Eigenschaften auf.

Im Ergebnisteil wurden die wichtigsten Struktur-Wirkungs-Beziehungen bereits definiert. Diese Ergebnisse sollen nun mit den Affinitätsdaten der in Münster durchgeführten Rezeptor-Bindungs-Studien diskutiert werden (Tabelle 7.1). Da für die folgende Diskussion die Rezeptordichte von Bedeutung ist, wird sich in diesem Kapitel hauptsächlich auf die Zelllinien bezogen, die eine hohe Dichte an σ_1-(RPMI 8226) bzw. σ_2-Rezeptoren (MCF-7 und RT-4) aufweisen.[132,133,147]

Nach dem Pharmakophormodell von Glennon (siehe Kapitel 1.5.1) begünstigt ein basisches Amin, das von zwei hydrophoben Gruppen umgeben ist, die Affinität zum σ_1-Rezeptor, wobei das Amin in einem Ringsystem positioniert sein kann.[97,98] Dies trifft auch für die Struktur der untersuchten σ-Rezeptor-Liganden zu. Hier sind jedoch zwei basische Amine in einem Piperazinring integriert, die beide mit hydrophoben Gruppen substituiert vorliegen.

Ein raumfüllendes Ringsystem am N1 (Naphthylmethyl-, Biphenylmethyl-Rest) hat einen positiven Effekt auf die Affinität beider Rezeptor-Subtypen und führt auch zur Zunahme der antiproliferativen Wirkung. Während ein Alkylrest am N4 des Piperazinrings, mit Ausnahme der A427-Zelllinie, keine Hemmung des Zellwachstums begünstigt, wirkt sich auch hier eine Vergrößerung zum Cyclohexylmethyl-Rest in allen Zelllinien positiv aus. Dies bestätigt sich desweiteren für die Affinität zum σ-Rezeptor und unterstreicht gleichzeitig die Aussage von

Glennon.[98] Da die Affinität für beide Subtypen jedoch zunimmt, geht dies mit einer Abnahme der σ_1/σ_2-Selektivität einher. Diese Beobachtungen konnten bereits Abate et al. für den σ_1-Antagonisten /σ_2-Agonisten PB 28 zeigen.[199] Die Autoren machten das Piperazin-N-Atom, an dem beim PB 28 ein Cyclohexyl-Rest gebunden ist, für die Subtypselektivität verantwortlich. Bei der Wahl der Seitenkette in Position 2 des Piperazins zeigt sich ebenso, dass die Rezeptoraffinität mit der antiproliferativen Aktivität korreliert: eine Hydroxyethyl-Seitenkette stellt sich in beiden Fällen als ideal heraus. Eine Verlängerung führt in den jeweiligen Assays zu keiner bzw. einer Verminderung der Aktivität. Die Stereochemie scheint bei den monocyclischen Verbindungen weder die Zytotoxizität noch die Rezeptoraffinität zu beeinflussen. Für die (*R*)-Enantiomere der N4-Cyclohexylmethylderivate können zwar teilweise 1–2 fach höhere Rezeptor-Affinitäten zu beiden Subtypen beobachtet werden. Signifikante Unterschiede werden jedoch nur im zytotoxischen Assay für das wirksame ***(R)*-11** identifiziert. Diese Verbindung ist in allen getesteten adhärenten Zelllinien, inklusive der σ_2-Rezeptor-reichen MCF-7- und RT-4-Zellen, gegenüber seinem *(S)*-Enantiomer ausschließlich wirksam. Einzige Ausnahmen sind hier die A427- und 5637-Zellen. Ein gravierender Unterschied wie z. B. für das H1-Antihistaminikum Cetirizin, bei dem die Affinität des (*R*)-Enantiomers an den H1-Rezeptor 33fach stärker ist als für das (*S*)-Enantiomer, wodurch eine Dosisreduzierung möglich ist[200], kann jedoch nicht beobachtet werden.

Auch für die überbrückten Piperazine (z. B. **(*R,S,R*)-15**) wirkt sich der Cyclohexylmethyl-Rest sowohl auf die Affinität als auch auf die Zytotoxizität positiv aus. Desweiteren erweist sich ein Hydroxymethyl-Rest an C7 als hochaffin und sehr selektiv gegenüber dem σ_1-Rezeptor (Diastereomere **(*S,S,R*)-17** und **(*R,R,S*)-17**). Betrachtet man die Zelllinien, die für eine Expression von σ_1-(RPMI 8226) und σ_2-(MCF-7 und RT-4) Rezeptoren bekannt sind, zeigt sich für **(*S,S,R*)-17** auch im zytotoxischen Assay eine übereinstimmende Selektivität gegenüber der RPMI 8226 Zelllinie. **(*R,R,S*)-17** kann das Wachstum dieser Zelllinie jedoch nicht hemmen und zeigt überraschenderweise eine antiproliferierende Wirkung in den größtenteils σ_2-Rezeptor-exprimierenden MCF-7-Zellen.

Die Einführung des 1-Naphthylmethyl-Restes in Position-5 (**(*R,S,S*)-16** und **(*R,S,R*)-16**) sorgt, im Vergleich mit einem Benzyl-Rest, für eine leichte Affinitätsabnahme zum σ_1-Rezeptor. Dieser Substituent liefert bei den monocyclischen Verbindungen die besten Ergebnisse. Die zytotoxische

Wirkungsstärke nimmt wieder in allen Zelllinien zu, was in einer abnehmenden Selektivität gegenüber den Zelllinien resultiert. Jedoch weist dieses Paar die geringste IC_{50} in der σ_2-Rezeptor-reichen MCF-7-Zelllinie auf, obwohl die Affinität zu diesem Subtyp minimal ist.

Holl et al. berichteten bei überbrückten Piperazin-Derivaten von einer Beeinflussung der Stereochemie auf die σ-Rezeptor-Affinität.[188] Während für die Diastereomere mit erweiterter Propanobrücke, **(*R,S,S*)-18** und **(*R,R,S*)-18**, ein großer Effekt bezüglich ihrer σ_1-Rezeptor-Affinität beobachtet wird (**(*R,S,S*)-18** keine Affinität, **(*R,R,S*)-18** Affinität im unteren nanomolaren Bereich), kann dies im MTT-Zytotoxizitätsassay mit der σ_1-Rezeptor-reichen RPMI 8226-Zelllinie nicht bestätigt werden. Hier haben beide Verbindungen eine IC_{50} im mikromolaren Bereich. Diese ist für **(*R,R,S*)-18** zwar zweifach geringer, die ausgeprägte Selektivität zum σ_1-Rezeptor im Bindungsassay kann damit jedoch nicht bestätigt werden. Interessanterweise hemmen beide Verbindungen das Wachstum der MCF-7-Zelllinie, die selektiv σ_2-Rezeptoren besitzt. Die RT-4 Linie wird jedoch nicht gehemmt, obwohl auch diese Zellen den σ_2-Rezeptor exprimieren. Die Vergrößerung zur Propanobrücke begünstigt jedoch die Zytotoxizität in RPMI 8226- und MCF-7-Zellen.

Auch PB 28 hemmt unselektiv das Wachstum aller eingesetzten Zelllinien. Obwohl dieser Ligand in MCF-7-Zellen eine 40fache Selektivität zum σ_2-Rezeptor aufweist[129], zeigen die zytotoxischen Ergebnisse, das zwar das Wachstum in den σ_2-Rezeptor-reichen MCF-7-Zellen im unteren mikromolaren Bereich liegt (IC_{50} 1,66 µM), die IC_{50}-Werte von RT-4- und RPMI 8226-Zellen jedoch nicht differieren.

Vergleicht man die zellwachstumshemmenden Eigenschaften der flexiblen, monocyclischen Verbindungen mit den weniger flexiblen Bicyclischen, so lässt sich feststellen, dass der Ligand mit der geringsten IC_{50} das monocyclische **(*S*)-8** in der RPMI 8226-Zelllinie darstellt, dass mit seinem Cyclohexylmethyl-, sowie Naphthylmethyl-Rest auch im Rezeptor-Bindungsassay zusammen mit seinem Enantiomer **(*R*)-8** zu den potentesten Verbindungen zählt. Während in der σ_2-Rezeptor-reichen MCF-7-Zelllinie die bicyclischen Diastereomere **(*R,S,S*)-16** und **(*R,S,R*)-16** am effektivsten das Zellwachstum hemmen, sind in der RT-4-Zelllnie wieder die monocyclischen Enantiomere **(*S*)-8** und **(*R*)-8** am Potentesten. Diese Daten veranschaulichen, dass eine konformative Fixierung durch die Überbrückung keinen Vorteil bezüglich der Zytotoxizität der Liganden mit sich bringt.

So lässt sich insgesamt feststellen, dass eine Korrelation zwischen der Struktur der potentiellen Verbindungen mit deren Rezeptoraffinität und antiproliferierenden Eigenschaften äußerst schwierig einzuordnen ist und keine eindeutigen Struktur-Wirkungs-Beziehungen untereinander getroffen werden können.

Möglicherweise können affine Verbindungen am Rezeptor aufgrund ihrer Funktion als Agonist/Antagonist unterschiedliche Effekte hervorrufen.[186] Auch die Lipophilie spielt eine wesentliche Rolle bei der Bindung von Liganden an σ-Rezeptoren. Je geringer die Lipophilie eines σ_2-Liganden, desto geringer ist auch oftmals dessen antiproliferative Wirkung.[199] Da die Bindestelle des σ-Rezeptors intrazellulär lokalisiert ist, müssen die potentiellen Liganden diese erst erreichen. Dazu bedarf es einer ausreichenden Lipophilie, um die Membranen zu passieren. Dies könnte auch die unterschiedlichen Konzentrationsbereiche, die zwischen Rezeptoraffinität (nm-Bereich) und antiproliferierender Wirkung (µM-Bereich) auftreten, erklären. Diese werden nicht nur bei den in dieser Arbeit untersuchten σ-Liganden beobachtet.[148,201] Eine weitere Begründung wäre, dass zunächst erst einmal alle σ-Rezeptoren mit dem Ligand besetzt werden müssen, um eine zytotoxisch messbare Wirkung zu erhalten.[202]

Die z. T. konträren Wechselwirkungen einiger Liganden mit den spezifischen σ_1-/σ_2-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien sowie die teils unselektive Hemmung verschiedener Zelllinien weist desweiteren auf die Beteiligung eines σ-Rezeptor-unabhängigen Signalweges hin.

5.2 σ-Liganden induzieren Apoptose

Nachdem die Enantiomerenpaare **(*S*)-8** und **(*R*)-8** sowie **(*S*)-11** und **(*R*)-11** das Wachstum ausgewählter Zelllinien im unteren mikromolaren Bereich hemmen konnten, wurden diese Verbindungen für weitere Untersuchungen ausgewählt. Verschiedene, unabhängige Untersuchungen ergeben, dass mit Ausnahme der Substanz **(*S*)-8** die Liganden Apoptose in der RPMI 8226-Zelllinie induzieren. Obwohl diese Verbindung die geringste IC_{50} (1,29 µM) besitzt, scheint sie in einem Apoptose-unabhängigen Mechanismus den Zelltod in RPMI 8226-Zellen einzuleiten. Zunächst deuten bereits die lichtmikroskopischen Untersuchungen auf einen apoptotischen Zelltod hin, da nach Inkubation mit den Testverbindungen die typischen *apoptotic bodies* detektiert werden können. Die anschließende Fluoreszenzfärbung des fragmentierten Chromatins mit DAPI bestätigt diese

Annahme. Mit Ausnahme von **(*S*)-8** konnte die Apoptose auch mittels Annexin-V/PI-Methode nachgewiesen werden. Da nach 72 h Inkubation mit den Verbindungen sowohl die Apoptoserate als auch der spätapoptotische/nekrotische Anteil nicht merklich zunimmt, liegt die Vermutung nahe, dass weitere Mechanismen zur Auslösung des Zelltodes in Frage kommen, was die Beobachtungen mit **(*S*)-8** zusätzlich unterstreichen.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen anderer σ-Rezeptor-Liganden überein: Die Chromatinkondensation wurde auch für den σ-Rezeptor-Liganden des reduzierten Haloperidols sowie für den σ_2-Liganden Siramesin beschrieben.[148,203] Spruce et al.[141] zeigten für die σ_1-Antagonisten Rimcazol und IPAG (1-(4-Iodophenyl)-3-(1-adamantyl)-guanidin) zunehmende sub-G_1-Level nach steigender Konzentration der Liganden. Auch die Apoptosebestimmung mittels Annexin-V FITC/PI ist für zahlreiche σ-Rezeptor-Liganden beschrieben. Während der Annexin-V positive Zellanteil des σ_1-Antagonisten/σ_2-Agonisten PB 28 (50 nM) bei Azzariti et al.[129] in der MCF-7-Zelllinie lediglich maximal 15 % beträgt, konnten Tucci et al.[204] bei vergleichbaren Konzentrationen eine Apoptoserate von 53 % erzielen.

Für einige σ-Rezeptor-Liganden, ist ein G_0/G_1-Phasen-Arrest beschrieben.[130,205] Dies bestätigt sich für die untersuchten Verbindungen und PB 28 in der RPMI 8226-Zelllinie nicht. In HL 60-Leukämiezellen konnte jedoch auch für PB 28 ein G_0/G_1-Phasen-Arrest beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso berichten Azzariti et al. von einem G_0/G_1-Phasen-Arrest durch PB 28 in MCF-7-Brustkrebszellen.[129] Somit scheint die Wirkung der σ-Rezeptor-Liganden Zelltyp-spezifisch zu sein. Weitere Untersuchungen an der MCF-7-Zelllinie sowie die Expression zellzyklusspezifischer Cycline (Cyclin D1, E2, A und B1) könnten diesbezüglich detailliertere Ergebnisse liefern.[206]

5.2.1 σ-Liganden aktivieren Caspasen

Die Aktivierung von Caspase-3 durch σ-Rezeptor-Liganden ist in der Literatur zahlreich beschrieben.[130,139,142] Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Liganden aktivieren diese Effektorcaspase signifikant und zeitabhängig. Die Detektion des PARP-Spaltproduktes ist ein weiteres Indiz für eine aktivierte Caspase-3. Beim PARP handelt es sich um ein DNA-Reparaturenzym das gleichzeitig ein Substrat aktivierter Caspase-3 darstellt. Durch Inaktivierung des PARP können DNA-Strangbrüche nicht mehr korrigiert werden, diese reichern sich

an und leiten den Zelltod ein. Da die PARP-Spaltung jedoch nur kurzzeitig (nach 6 bis 12 h) auftritt und dann wieder abnimmt, weist dies bereits auf eine eher untergeordnete Rolle während der Apoptose hin.

Weiterführende Versuche zeigen die Aktivierung der Initiatorcaspasen -8 und -9, sodass zu diesem Zeitpunkt weder auf den extrinsischen noch auf den intrinsischen Signalweg der Apoptose eindeutig geschlossen werden kann. Bereits Tucci et al. konnten für PB 28 eine Aktivierung der Caspasen-3, -8, -9 und -10 in RPMI 8226-Zellen feststellen.[204] Zur genaueren Bestimmung, welcher Signalweg durch die untersuchten σ-Rezeptor-Liganden eingeschlagen wird, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Jene zeigen lediglich die Expression von Caspase-8 Spaltprodukten. Da Doxorubicin als Positivkontrolle zur Detektion von Caspase-9 Spaltprodukten führt, kann eine Fehlfunktion des Antikörpers jedoch ausgeschlossen werden.

5.2.2 Die induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Caspasen

Die Apoptose kann jedoch auch unabhängig von Caspasen ablaufen. Dieser Mechanismus ist für σ-Rezeptor-Liganden bereits bekannt, insbesondere werden σ_2-Agonisten häufig mit dem Caspase-unabhängigen Zelltod in Verbindung gebracht.[129,141,147] Auch im Fall der hier untersuchten σ-Liganden handelt es sich um eine Caspase-unabhängige Form, da weder die Vorinkubation mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD-FMK noch der Apoptoseinhibitor M50054 die induzierte Apoptose in RPMI 8226-Zellen verhindern können. Bei dem Tripeptid z-VAD-FMK handelt es sich um einen unspezifischen Breitspektrum-Caspasehemmstoff, der konzentrationsabhängig zur Inhibierung sämtlicher Caspasen führt.[207] In hohen Konzentrationen (>100 µM) können auch andere Enzyme wie z.B. die Cathepsine gespalten werden, daher sollte er in Konzentrationen ≤ 100 µM eingesetzt werden.[191] Bei geringeren Dosen besteht jedoch die Gefahr, dass z-VAD-FMK zu keiner Hemmung der Caspasen beiträgt. Überraschenderweise konnte z-VAD-FMK auch in Doxorubicin behandelten RPMI 8226-Zellen keine Hemmeigenschaft aufweisen. Dies könnte durch eine Konzentrations-abhängige Hemmung des Inhibitors begründet sein, wie sie z. B. beim Siramesin beobachtet werden kann: Der vom σ_2-Liganden ausgelöste Zelltod kann in einer Konzentration von 20 µM vom z-VAD-FMK gehemmt werden, allerdings nicht bei einer 10 µM Konzentration.[130] Möglicherweise könnten weitere Untersuchungen mit selektiven Caspase-Inhibitoren, wie z. B. z-IETD-FMK für

Caspase-8, diesen Sachverhalt weiter absichern. Da die Vorinkubation mit dem Apoptosehemmstoff M50054 jedoch auch zu keiner abnehmenden Apoptoserate führt, stimmt dieser Befund mit dem des z-VAD-FMK-Inhibitors überein, so dass es sich wahrscheinlich um eine Caspase-unabhängige Apoptose handelt.

Der Caspase-unabhängige Zelltod geht mit der Permeabilisierung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran einher. Die Permeabilitätsänderung der inneren Membran ist mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verbunden. Durch diese Änderungen lösen letztlich die Proteine Endonuklease G und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF), ohne Beteiligung aktivierter Caspasen, den Zelluntergang aus.[208,209] Proapoptotische Proteine können durch Translokation bzw. Konformationsänderung ebenfalls zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran beitragen.[22] **(*R*)-11** führt in RPMI 8226-Zellen bereits nach 3 h zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Damit verbunden könnte eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran sein. Der leichte Rückgang der Bax-Expression weist auf eine Translokation zu den Mitochondrien hin, die die Permeabilisierung zusätzlich unterstreichen könnte. Bestätigt wird der Caspase-unabhängige Zelltod durch die Zunahme zytosolischer AIF-Level. Die relativ hohen Basalspiegel der Kontrolle, scheinen dabei vom Zelltyp und der jeweiligen Substanz abzuhängen.[210]

Diese Beobachtungen unterstreichen die Caspase-unabhängige Form des σ-Ligand-induzierten Zelltodes, welcher über die Mitochondrien vermittelt wird. Gleichzeitig wird noch einmal die untergeordnete Rolle der Caspasen verdeutlicht. Die frühen, mitochondrialen Ereignisse (Abnahme des MMP) benötigen nämlich keine Aktivierung der Caspasen, letztere scheinen erst in einem nachfolgenden Schritt gespalten zu werden.

5.2.3 Die Rolle der Bcl-2-Familie

Der Bcl-2-Familie bzw. deren Mitgliedern kommt eine wichtige Bedeutung bei der Kontrolle und Regulation der Apoptose zu. Sie steuern die Permeabilität der Mitochondrienmembran und wirken dabei pro- oder antiapoptotisch. Die Oligomerisierung proapoptotischer Mitglieder, wie Bax und Bak, in der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Zerstörung der Organisation von Lipiden in der Membran. Als Folge bilden sich Poren, die für größere Moleküle durchlässig sind.[21]

Die Western Blot Ergebnisse weisen auf eine Translokation von Bax in die Mitochondrien hin. Während sich für **(*S*)-11** eine signifikante Abnahme nach 96 h

zeigt, schwanken die Konzentrationen nach Inkubation mit **(*R*)-11**. Dies könnte mit der Aufbereitung des Zelllysates zusammenhängen, da es sich um ein Gesamtlysat handelt, in der das Vorhandensein mitochondrialer Bestandteile nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Den sinkenden Bax-Konzentrationen, stehen steigende Expressionsraten an antiapoptotischem Bcl-2 gegenüber, die bei beiden Enantiomeren nach 72 h signifikant sind. Da es sich um Gegenspieler der Apoptose handelt, liegt eine gegenseitige Beeinflussung dieser Proteine nahe. Die frühe Expression des Bcl-2-Proteins, die schon in der Kontrolle sichtbar wird, kann als Gegenregulation vor übermäßiger Apoptose betrachtet werden. Zunächst überwiegen jedoch die proapoptotischen Faktoren und Apoptose wird induziert. Infolge der zunehmenden Bcl-2-Expression stagniert die Apoptoserate. Dies konnte bereits in den Kapiteln 4.1.5 und 4.1.7 durch Anfärbung mit Annexin-V FITC und/oder PI gezeigt werden: nach 72 h nimmt weder der sub-G_1-Anteil noch die Apoptoserate nach Behandlung mit **(*R*)-11** weiter zu.

Der Schutzmechanismus antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie ist in der Literatur beschrieben.[211,212] Aufgrund deren Überexpression reagieren einige Tumore auf Chemotherapeutika nicht mit der gewohnten Apoptoseinduktion. Durch Bcl-2-Inhibitoren oder eine sogenannte Bcl-2-*Antisense*-Therapie kann die Bcl-2-Expression herunter reguliert und so der Apoptoreresistenz vorgebeugt werden.[213,214] Auch der σ_1-Rezeptor wurde bereits mit der Regulation von Bcl-2 in Verbindung gebracht.[215] Es wird dabei von einer Regulierung des Bcl-2- Proteins auf transkriptioneller Ebene berichtet, das zum Überleben der Zelle beiträgt.

Betrachtet man die Expression von Bid im Western Blot, so lässt sich kein Trend nach Inkubation mit den getesteten Substanzen feststellen. Die Werte bleiben nahezu konstant verglichen mit den Kontrollzellen. Bid wird nicht zum *truncated* Bid gespalten, was durch die fehlende Abnahme der Bid-Banden im Western Blot gezeigt wird. Eine Amplifizierung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg kann somit ausgeschlossen werden. Da die untersuchten Verbindungen eine Form des Zelltodes einleiten, in denen Caspasen eine untergeordnete Rolle spielen, wird dieser Zwischenschritt über die Bid-Spaltung auch nicht benötigt.

5.3 Die Lipidperoxidation ist der Apoptose vorangeschaltet

Unter physiologischen Bedingungen erzeugt der Zellorganismus ein bestimmtes Maß an ROS. Der Hauptanteil entsteht dabei aus der Elektronentransportkette der

Mitochondrien. Eine Überproduktion bzw. zu geringe Konzentrationen körpereigener Antioxidantien führen jedoch zur Bildung von oxidativem Stress.[72] Dieser ist oftmals am Caspase-unabhängigen Zelltod beteiligt.[9]

Aufgrund dieser Überlegungen sollte der Effekt der getesteten Verbindungen in Bezug auf die ROS-Bildung bestimmt werden. Nach Stimulation der RPMI 8226-Zellen mit **(*S*)-11** und **(*R*)-11** werden keine ROS mittels 2′,7′-DCF detektiert. Bei diesem Assay handelt es sich um einen generellen Nachweis von oxidativem Stress, es ist keine Methode um das Stickstoffmonoxidradikal, LPO-Produkte, Singulett-sauerstoff oder das Superoxidanionenradikal direkt nachzuweisen.[216] Da Letzteres den überwiegenden Anteil an ROS in den Mitochondrien ausmacht, könnten die nicht detektierbaren ROS eventuell mit einem anderen Farbstoff identifiziert werden, der selektiv das Superoxidanion misst, wie z.B. MitoSOX Red, einem Derivat des Hydroethidins.[217-219]

Da oxidativer Stress auch zur Peroxidation von Lipiden führen kann, sollte in einem weiteren Versuch die Anwesenheit der primär gebildeten Lipidperoxide bestimmt werden.

Die Lipidperoxidation tritt in beschädigtem Gewebe in einem größeren Umfang auf als in gesundem Gewebe. Im Verlauf kommt es oftmals zum Abbau zellulärer Membranlipide (Cholesterol, Phospholipide), indem freie Radikale an der Phospholipidmembran eine verzweigte Kettenreaktion auslösen. Es entstehen kurzlebige Lipid-(Hydro)peroxide, welche zu stabileren Sekundärprodukten, meist Aldehyden, weiterreagieren. Diese bilden mit Aminosäuren oder Peptiden Addukte, die normalerweise durch das Proteasom abgebaut werden. Exzessive Adduktbildung führt auf Proteinlevel jedoch zur Hemmung membrangebundener Enzyme, mitochondrialer Dysfunktion und schließlich zum Zusammenbruch des Zytoskeletts.[220] Die reaktiven Aldehyde können auch mit Makromolekülen, wie der DNA, reagieren. Ein Hauptprodukt der LPO, das Malondialdehyd, verursacht beispielsweise Genotoxizität in Säugerzellen, Chromosomenanomalien in Hautfibroblasten der Ratte sowie DNA-Einzelstrangbrüche in CHO-Zellen (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters).[76,221] Auch für das zytotoxische 4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal (HNE), das am meisten untersuchte Produkt der LPO, konnten ähnliche Eigenschaften beobachtet werden. Die HNE-induzierte Apoptose kann desweiteren über zerstörte Organellen (Mitochondrien, Lysosomen), durch Aktivierung von Stresssensorproteinen (z. B. p53) oder über die direkte Bindung von

Schlüsselregulatoren, wie dem Todesrezeptor Fas erfolgen.[76] Auch eine Beteiligung von HNE an der Autophagozytose-Aktivierung glatter Muskelzellen *in-vitro* ist beschrieben.[222]

In der vorliegenden Arbeit wird die LPO direkt aus der Summe der entstehenden, Hydroperoxide ermittelt. Die Inkubation mit **(*R*)-11** ergibt dabei steigende LPO-Konzentrationen, welche bereits nach 30 min leicht zunehmen und auch nach 24 h noch nachgewiesen werden können. Damit tritt die LPO zeitlich gesehen noch vor den morphologischen Zeichen des Zelltodes in Erscheinung, die erst ab 6 h im Lichtmikroskop detektiert werden. Somit kann auch die These wiederlegt werden, dass es sich bei den Membranausstülpungen um frühe Effekte der LPO handeln könnte, wie sie bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielen.[223]

Antioxidantien können der ROS-Entstehung durch Abfangen der Radikale entgegenwirken. Neben den antioxidativen Enzymen (Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase) gibt es physiologische Antioxidantien, wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und α-Tocopherol (Vitamin E). Letzterem wird selbst eine prooxidative Bedeutung nachgesagt, die jedoch *in-vivo* nicht bestätigt werden konnte.[224,225] Beim *N*-Acetylcystein handelt es sich dagegen um ein hydrophiles, nicht-physiologisches Antioxidans. Die Zugabe des lipophilen α-Tocopherols schwächt die σ-Ligand-vermittelte LPO-Bildung effektiv ab, wobei es selbst den LPO-Spiegel der RPMI 8226-Zellen nicht beeinflusst. Ostenfeld et al. beobachteten für Siramesin ebenfalls eine frühe Produktion von ROS. In weiterführenden Untersuchungen ließen sich morphologische Effekte sowie der Zelltod nur durch lipophile Antioxidantien verhindern, so dass die LPO als möglicher Mechanismus für diesen σ_2-Liganden postuliert wurde.[148] Auch in der vorliegenden Arbeit lassen sich die apoptotischen Effekte von **(*S*)-11** und **(*R*)-11** nur durch das lipophile Antioxidans vermindern, während das hydrophile *N*-Acetylcystein keinen signifikanten Zellschutz nach Vorinkubation aufweist. Darüber hinaus zeigen auch die Ergebnisse des MTT-Assays, dass die zytotoxischen Eigenschaften dieser σ-Rezeptor-Liganden durch die Gabe von α-Tocopherol vollkommen aufgehoben werden können. Demnach agiert die LPO oberhalb der Apoptose und der σ-Ligand-induzierte Zelltod wird durch die LPO initiiert.

5.4 σ-Liganden induzieren eine unvollständige Autophagozytose

Lange Zeit wurde die Apoptose als wichtigster Mechanismus des induzierten Zelltodes angesehen. Mittlerweile untersucht man auch intensiv die Autophagozytose (als sogenannten *Type II programmed cell death*), deren genauer Mechanismus jedoch noch nicht exakt aufgeklärt werden konnte. Dabei dient die Autophagozytose in erster Linie der Zelle als Überlebensmechanismus unter Stressbedingungen, was in einem „Selbstverdau" der Zelle bzw. ihrer Organellen mündet. Übermäßiger Stress unterstützt jedoch die Autophagozytose beim Übergang in den Zelltod und einige Substanzen können auf diese Weise direkt einen zytotoxischen Prozess begünstigen.[46,150,151,226] Darüber hinaus scheinen Apoptose und Autophagozytose auch miteinander verknüpft zu sein. Inbal et al. berichten von zwei Ca^{2+}/Calmodulin regulierten Kinasen, DAPK (*Death Associated Protein Kinase)* und DRP-1 (*DAPK Related Protein-1)*, die sowohl Membranausstülpungen als auch Autophagozytose auslösen.[65] Auch von einer Caspase-8-Regulation durch autophagische Prozesse ist die Rede.[227]

Für σ-Rezeptor-Liganden sind bisher die σ_2-Liganden bekannt für ihre Fähigkeit Autophagozytose auszulösen, allen voran das Siramesin.[67,130] Auch **(*S*)-11** und **(*R*)-11** induzieren Autophagozytose. Die Western Blot Ergebnisse zeigen die zeitabhängige Expression der LC3-II-Bande, die bei beiden Verbindungen erstmals nach 24 h deutlich zu erkennen ist und dann signifikant zunimmt. Ordnet man die Entstehung zeitlich ein, so lässt sich feststellen, dass die LC3-II-Bande erst nach den Spaltprodukten des PARP (ab 6 h), sowie nach Detektion des zytosolischen AIF-Proteins, das direkt messbar ist, auftritt. Daher scheint die Autophagozytose ein spätes Ereignis zu sein, das erst nach der Apoptose induziert wird. Dies lässt zu diesem Zeitpunkt auch schon vermuten, dass es sich um keinen zytoprotektiven Prozess handelt, da die Autophagozytose dann der Apoptose vorangestellt sein müsste, um die Zellen vor dem Zelltod zu schützen.

Überraschenderweise nimmt auch die Expression des p62 zu. Da es sich um einen Autophagozytosemarker handelt, der während des klassischen Prozesses abgebaut werden sollte, scheint die durch **(*S*)-11**- und **(*R*)-11**-induzierte Form nicht vollständig abzulaufen. Die Piperazin-Derivate aktivieren nur die Initialphase, während die Reifung der Autolysosomen bzw. spätere Stadien der Autophagozytose blockiert werden. Die unvollständige Autophagozytose wurde auch für das Diterpenoid Geransäure in einer humanen Leberkarzinom-Zelllinie beschrieben. Auch

Geransäure übermitteltet über die Mitochondrien einen Caspase-unabhängigen Zelltod.[228] Desweiteren konnten Schmukler et al. für Neureguline (Proteine der EGF (*Epidermal Growth Factor*)-Familie) in einer Prostatakarzinom-Zelllinie eine ROS-abhängige, unvollständige Form mit erhöhten p62-Spiegeln identifizieren.[229]

ATG4, eine Cystein-Endoprotease, reagiert sehr sensitiv auf oxidativen Stress. Bei Oxidation eines Cystein-Restes, der in der Nähe des ATG4 lokalisiert ist, wird die komplette Ausbildung des Autophagosoms verhindert.[230] Diese Reaktion wird hauptsächlich mit Wasserstoffperoxid beschrieben, welcher im ROS-Assay nicht detektiert werden konnte. Dennoch wäre eine σ-Ligand-induzierte Produktion von oxidativem Stress zur Hemmung des ATG4 denkbar. Um diese Hypothese zu stützen, bedarf es aber weiterer Versuche.

Eine p62-Überexpression wird mit zahlreichen Funktionen in Verbindung gebracht, daher können in diesem Moment keine Rückschlüsse auf die Rolle der induzierten p62-Expression gezogen werden. Zum Einen korreliert sie mit einem aggressiven Fortschreiten von Brust-, Lunge- und Prostatatumoren,[231-234] zum Anderen stehen erhöhte p62-Konzentrationen mit der Modulation des Keap1(*kelch-like ECH-associated protein 1)*-Nrf2 (*Nuclear factor erythroid* 2-related factor 2)-Signalweges in Zusammenhang, einem der wichtigsten zellschützenden Signalwege gegenüber oxidativem Stress.[235,236] Eine Nrf2-Überaktivierung seitens p62-Akkumulation ist mit einer zytotoxischen Aktivität in Leberzellen verbunden. Auch zahlreiche Krebsarten weisen veränderte Gene dieses Signalweges auf.[237]

Rossi et al. zeigten kürzlich, dass der aktive Metabolit des trizyklischen Antidepressivums Clomipramin, Desmethylclomipramin, den autophagischen Fluss blockiert, p62-Konzentrationen erhöht sowie in Kombinationstherapie, den zytotoxischen Effekt des Chemotherapeutikums Doxorubicin, ansteigen lässt.[238]

Auch die simultane Therapie von **(*R*)-8** mit dem Alkylans Melphalan führt zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen verglichen mit der jeweiligen Monotherapie. Mit den Ergebnissen des MTT-Assays konnte sogar ein synergistischer Effekt berechnet werden. Auch von einer Beteiligung des p62 am extrinsischen Apoptoseweg und als NF-κB-Mediator gibt es Hinweise.[239,240]

Welche Auswirkungen der σ-Ligand-vermittelte p62-Anstieg auf die RPMI 8226-Zellen hat, muss somit in weiteren Versuchen untersucht werden.

5.4.1 Die Autophagozytose wird durch die LPO beeinflusst

Die Aktivierung der Autophagozytose durch die LPO ist für zahlreiche Gewebe und Organismen dokumentiert.[222,241] Da bereits gezeigt werden konnte, dass der σ-Ligand-induzierte Zelltod über die LPO-Produktion abläuft, sollte die Rolle der LPO in der induzierten Autophagozytose näher betrachtet werden.

α-Tocopherol blockiert dabei die σ-Ligand-vermittelte LC3-II-Expression nahezu komplett, so dass von einer Beteiligung der LPO auch an der Autophagozytose ausgegangen werden kann. Die p62-Konzentrationen nehmen nach Vorinkubation mit dem Antioxidans ebenso ab, was wiederum für die unvollständige Autophagozytose spricht.

Die während der LPO entstehenden elektrophilen Verbindungen sind wie das p62 Substrate, die den Keap-1/Nrf2-Signalweg initiieren können.[242] Denkbar wäre, dass die Zelle zunächst über diesen Weg versucht, den oxidativen Stress abzubauen. Dies spricht auch für die späte Detektion der LC3-II-Bande (nach den ersten Anzeichen der Apoptose) und der damit verbundenen Autophagosomenbildung. Der antioxidative Schutzmechanismus könnte aufgrund übermäßiger LPO-Raten nicht aufrecht erhalten werden, so dass zusätzlich die Autophagozytose aktiviert werden müsste. In normalen Dosen aktiviert p62 das Nrf2 und unterstützt den zytoprotektiven Vorgang. Die hohen LPO-Raten könnten jedoch eine p62-Akkumulation veranlassen, den autophagischen Fluss blockieren und zu einer dauerhaften Aktivierung des Nrf2-Signalweges führen, der jedoch in diesem Ausmaß zytotoxische Wirkungen nach sich zieht.[235,237] Zur Überprüfung dieser Annahme, müsste zunächst die Beteiligung des Keap-1/Nrf-2-Signalweges analysiert werden.

5.4.2 Effekte der Autophagozytose-Inhibitoren

In den üblichen Fällen tritt die Autophagozytose vor der Apoptose in Erscheinung, um die Zellen vor beschädigten Organellen zu schützen und dem Zelltod vorzubeugen. Eine Behandlung mit Autophagozytose-Inhibitoren könnte daher den protektiven Mechanismus der Zelle unterbrechen und deren Untergang bewirken. Demnach müsste die Zugabe mit bekannten Hemmstoffen zu einer verminderten LC3-II-Expression sowie einer ansteigenden Apoptoserate führen. Die Behandlung mit 3-MA, einem Hemmer früher autophagischer Prozesse, führt zum gegenteiligen Effekt, nämlich einer gesteigerten Expression von LC3-II, womit 3-MA in diesem Fall

als Aktivator der Autophagozytose angesehen werden kann. Dies könnte mit den Versuchsbedingungen zusammenhängen, da in nährstoffreichen Zellmedium eine verlängerte 3-MA Inkubation die Aktivierung der Autophagozytose einleitet.[194] In der vorliegenden Arbeit werden Inkubationszeiten von 48 h benötigt, da erst ab diesem Zeitpunkt signifikante Expressionen der LC3-II-Bande detektiert werden. Nach Vorinkubation mit 3-MA (10 mM) für 1 h wurde das Medium nicht gewechselt, so dass 3-MA bis zur Probenaufbereitung nach weiteren 48 h, zusammen mit der Testsubstanz, im Medium verblieb. Da bereits die Probe ohne σ-Rezeptor-Ligand zur LC3-II-Detektion führt, scheint sich dies auch im vorliegenden Versuch zu bestätigen. Die Studie von Zeng et al. berichtet allerdings, dass eine Vorinkubation von RPMI 8226-Zellen mit 5 mM 3-MA für 24 h zu keiner Aktivierung autophagischer Prozesse führt.[243]

Eine nicht abnehmende LC3-II-Expression muss jedoch nicht zwangsläufig in einer Aktivierung der Autophagozytose münden. Pan et al. begründeten ihre Ergebnisse durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie. Dort konnte eine 10 mM 3-MA Behandlung von RPMI 8226-Zellen für 24 h die Bildung autophagischer Vakuolen nach Stimulation mit Chemotherapeutika verringern, gleichzeitig ließen sich in Western Blot-Analysen jedoch keine verminderten LC3-II-Banden detektieren.[244] Dies unterstreicht wiederum die hemmenden Eigenschaften des 3-MA, die bereits bei der Ausbildung des Phagosoms zum Autophagosom auftreten.

Auch Wortmannin erhöht die LC3-II-Expressionslevel und kann die Aktivierung der Autophagozytose nicht verhindern. Da es sich um einen Inhibitor handelt, der erst im späteren Verlauf eingreift und die Autophagosomenfusion mit den Lysosomen blockiert, ist dies auch nicht weiter überraschend. Im Gegensatz zu 3-MA zeigen die unbehandelten Proben keine LC3-II-Bande, was verdeutlicht, dass Wortmannin in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellen hat. Interessanterweise steigt auch die p62-Expression nach Wortmannin-Gabe. Die große Standardabweichung weist aber auf Schwankungen während der Detektion im Western Blot hin.

Da bereits ein unvollständiger Verlauf der Autophagozytose postuliert wurde, unterstützen die Ergebnisse diesen Vorgang. Die untersuchten σ-Liganden aktivieren also die Autophagozytose bis zur Autophagosomenbildung, die anschließende Fusion mit Lysosomen kann jedoch nicht mehr stattfinden. Eine Analyse mittels

Transmissions-Elektronen-Mikroskopie könnte weitere Informationen über den Ablauf der induzierten Autophagozytose liefern.

Weiteren Einfluss auf diesen Prozess hat das Gleichgewicht zwischen dem anti-apoptotischen Bcl-2 und dem Autophagozytose-Protein Beclin-1, was wiederum die Vernetzung dieser beiden Mechanismen unterstreicht. Unter nährstoffarmen Bedingungen vermag Bcl-2, durch direkte Bindung an Beclin-1, die Autophagozytose in einigen Tumorzelllinien (u.a. MCF-7-Brustkrebszellen) zu blockieren.[245] Demgegenüber führt die Überexpression von Bcl-2 in transformierten MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*)-Zellen, die mit Etoposid behandelt wurden, zu ansteigenden Autophagozytoseraten. Es scheint also, dass die regulierenden Effekte des Bcl-2 von der jeweiligen Zelllinie und der Art des Stimulus abhängen. Bei der Etoposid-induzierten Autophagozytose handelt es sich um keine physiologische Stimulation, wie es beim Nährstoffmangel der Fall ist.[63] Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch die ansteigenden Bcl-2-Konzentrationen nach Behandlung mit den σ-Liganden zur Aktivierung der Autophagozytose beitragen könnten.

5.4.3 Die σ-Ligand-induzierte Autophagozytose ist nicht zellschützend

Durch die Fähigkeit der Autophagozytose zytotoxischen Substanzen entgegenzuwirken, in dem defekte Zellorganellen und Proteine beseitigt und Tumorzellen vor Chemotherapie-induziertem Stress geschützt werden, kommt der Hemmung der Autophagozytose eine bedeutende Rolle in der Krebstherapie zu. Auch Ostenfeld et al. konnten nachweisen, dass 3-MA die Zytotoxizität des σ_2-Liganden Siramesin erhöht.[67] Auf der anderen Seite können Substanzen direkt über die Autophagozytose den Zelltod einleiten.[151,226]

Es wurde bereits angedeutet, dass aufgrund der zeitlichen Abläufe die Autophagozytose erst nach der Apoptose aktiviert wird und demnach nicht zellschützend wirken kann. Auch der Versuch mit dem Autophagozytose-Hemmer Wortmannin unterstreicht diese These und lässt die Vermutung eines unvollständigen Verlaufes zu. Die Vorinkubation mit einer nicht toxischen Konzentration des Inhibitors zeigt keinen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen nach **(*S*)-11** Stimulation. Der Anstieg **(*R*)-11**-behandelter Zellen ist nach statistischer Auswertung mit ANOVA/Bonferroni nicht signifikant, man erkennt jedoch eine leichte Zunahme der Annexin-V positiven Fraktion. Da sich die Enantiomere bisher immer gleich verhalten haben und der inhibierende Effekt des Wortmannins in anderen

Studien deutlich ausgeprägter ist, wird diese Differenz als vernachlässigbar angesehen und die Autophagozytose als nicht schützend bestätigt.

5.5 Kombinationstherapien

Die Kombination zweier oder mehrerer Chemotherapeutika ist ein oft praktizierter Ansatz in der Tumortherapie. So lassen sich die Gesamtdosen der eingesetzten Therapeutika und damit deren Nebenwirkungen verringern. Da die Toxizität oftmals der limitierende Faktor eines Chemotherapeutikums darstellt, ist dies ein sehr wichtiger Vorteil. Ein weiterer Aspekt ist die verzögerte Ausbildung von Resistenzen gegenüber der Einzeltherapie.[246] Gerade die untersuchten RPMI 8226-Zellen, bei denen es sich um Zellen des Multiplen Myeloms handelt, neigen zu einer schnellen Resistenzentwicklung gegenüber herkömmlichen Therapeutika, wie z. B. Melphalan.[247,248]

Spezielles Interesse liegt auf Substanzen, die in der Monotherapie ähnliche Effekte hervorrufen und nach kombinierter Gabe zu additiven (Wirkung addiert sich auf) oder super-additiven (synergistischen) Wirkungen führen, d. h. den erwarteten Effekten aus der individuellen Therapie übertreffen.

Diese Effekte sind bereits für einige σ_2-Rezeptor-Liganden beschrieben.[129,131,139] Auch beim untersuchten **(*R*)-8** lassen sich synergistische Effekte in Kombination mit dem Alkylans Melphalan aufzeigen. Bei der Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus der beobachteten Effekte, könnte Melphalan beispielsweise für eine gesteigerte Affinität des **(*R*)-8** an den σ-Rezeptor sorgen. Auch eine Wechselwirkung mit dem Effluxtransporter P-Glykoprotein wäre denkbar, so wie es bereits für PB 28 mit dem Anthrazyklin Doxorubicin in MCF-7-Zellen beschrieben ist.[129] Generell lassen sich solche Aussagen jedoch schwer belegen, da Substanzen mehrere Wirkungsmechanismen aufweisen können und diese nicht zwangsläufig Synergismus hervorrufen müssen.[246] Dennoch könnte die Kombinationstherapie mit σ-Rezeptor-Liganden eine sinnvolle Option in der Tumortherapie darstellen.

Den σ_1-Antagonisten wird eine antiproliferierende Wirkung nachgesagt, während die entsprechenden σ_1-Agonisten keine hemmenden Eigenschaften aufweisen. Die Behandlung von σ_1-Rezeptor-reichen RPMI 8226-Zellen mit dem bekannten σ_1-Antagonisten Haloperidol weist jedoch auf eine eher schwache Wirkungsstärke, mit einem IC_{50}-Wert von 16,39 ± 6,15 µM, hin. Dies könnte an der Unselektivität des Haloperidols liegen, welches auch an andere Rezeptoren, darunter auch dem

σ_2-Subtyp, bindet.[144] Da die Kombinationstherapie mit **(*R*)-8** dessen zytotoxische Wirkung in geringen Dosen aufhebt, könnte es sich beim **(*R*)-8** um einen σ_1-Agonisten handeln. Dessen antiproliferierende Wirkung würde dann eher auf eine Affinität zum σ_2-Rezeptor begründet sein.

Die kombinierte Gabe von **(*R*)-8** mit dem σ_1-Antagonist /σ_2-Agonisten PB 28 führt zu einer leichten, aber signifikanten Zunahme der Apoptoserate. Dies könnte die Annahme unterstützen, dass es sich beim **(*R*)-8** ebenso um einen σ_2-Agonisten handelt, was für die Caspase-unabhängige Wirkungsweise sprechen würde, die hauptsächlich den σ_2-Agonisten zugeschrieben wird. Wie bereits beschrieben müssen die Kombinationsbehandlungen nicht unbedingt Hinweise zum Agonist/Antagonist-Mechanismus liefern. Die erhaltenen Ergebnisse sollten daher durch weitere Versuche manifestiert werden. Anstatt einer Kombinationstherapie mit bekannten Agonisten/Antagonisten wäre die Untersuchung des Bindungsverhaltens in Gegenwart von Phenytoin denkbar. Dieser allosterische σ_1-Modulator beeinflusst die Bindungseigenschaften von σ_1-Liganden.[249,250] In einem weiteren Ansatz könnte der Calciumeinstrom in die Zelle gemessen werden, da dieser durch σ-Rezeptor-Liganden kontrolliert werden kann.[84,251]

5.6 Fremdstoffmetabolismus von (*S*)-8

Bei den meisten Fremdstoffen (Xenobiotika), die der Körper aufnimmt, handelt es sich um lipophile Verbindungen, die an Plasmaproteine gebunden, zahlreiche Organe erreichen können. Durch enzymatisch vermittelte Reaktionen werden die Fremdstoffmoleküle dabei zu hydrophilen, leichter eliminierbaren Spezies umgewandelt. In der Phase-I-Reaktion werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen in das Fremdstoffmolekül eingebaut bzw. verändert. Sie schafft meistens erst die Voraussetzung für die anschließende Phase-II-Reaktion, in der eine Konjugation des Xenobiotikums bzw. des Phase-I-Metaboliten mit körpereigenen Molekülen (z.B. Glucuronidierung) erfolgt. Anschließend kann die Substanz dann renal oder biliär ausgeschieden werden.[195] Untersuchungen zum Metabolismus werden in der Wirkstoffentwicklung aber auch durchgeführt, um entstehende Verbindungen bereits *in-vitro* zu charakterisieren. So kann beispielsweise eine unwirksame Verbindung in ihre aktive Wirkform überführt werden („Prodrug“). Im Gegensatz dazu kann jedoch auch ein Wirkverlust eintreten[195].

Erste Studien an **(*S*)-8** zeigen eine Zeit- und NADPH-abhängige Metabolisierung des σ-Rezeptor-Liganden, die anhand der LC/MS-Untersuchungen auf eine Oxidation der Ausgangssubstanz hinweisen. Durch die Anwesenheit des aromatischen Naphthylmethyl-Substituenten scheint eine aromatische Hydroxylierung als Phase-I-Reaktion am wahrscheinlichsten, welche im Naphthylring-System präferentiell in Position 4 erfolgt. Der Angriff an anderen Seiten ist jedoch auch möglich.[252] Da die Synthese dieses postulierten Metaboliten misslang, konnten jedoch keine Vergleichsspektren mittels HPLC und LC/MS zur exakten Identifizierung unternommen werden. Die MS-Daten mit der Biphenylmethyl-Verbindung **(*R*)-11** unterstreichen jedoch die Hypothese einer Oxidation. Und auch für spirozyclische σ-Rezeptor-Liganden konnten ebenfalls Oxidationsreaktionen *in-vitro* nachgewiesen werden.[253,254]

Die meisten, am Fremdstoffmetabolismus beteiligten, Enzyme gehören dabei der Cytochrom P450 (CYP 450)-Familie an. Beim CYP 450-System handelt es sich um Hämproteine, die Eisen-Protoporphyrin IX-Komplexe als prosthetische Gruppe besitzen und in der Phospholipidmatrix des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Diese Eisen-Porphyrin-Komplexe sind für den Elektronentransfer der Phase-I-Reaktionen zuständig. Da die Leber den Großteil an CYP 450 besitzt, finden hier die meisten Metabolisierungsreaktionen statt. Daneben können auch in weiteren Organen wie z.B. der Haut, der Lunge, dem Darm und im Blut Transformationsprozesse ablaufen. Es existiert eine Vielzahl von Isoenzymen mit breiter Substratspezifität, beim Menschen sind CYP 3A4, 2D6, 1A2 und 2C9 die wichtigsten Vertreter. Durch die Inkubation mit Arzneimittel-induzierten Mikrosomen können Rückschlüsse auf die, an der Metabolisierung beteiligten, Isoenzyme getroffen werden.[195,252,255] Da **(*S*)-8** die höchste metabolische Aktivität in Phenobarbital-induzierten Präparationen zeigt, wird zunächst das Isoenzym CYP 2B2 für die ablaufende Reaktion im Rattenorganismus verantwortlich gemacht. Im Menschen existiert ortholog dazu das CYP 2B6-Isoenzym.[256] Für weitere Untersuchungen und eine exakte Quantifizierung sollten jedoch noch weitere Versuche mit einem internen Standard herangezogen werden. Somit ließen sich die schwankenden Konzentrationen der Kontrollproben ohne NADPH, durch Ermittlung der Wiederfindungsrate des internen Standards, eventuell korrigieren.

5.7 Weiterführende Fragestellungen

In dieser Arbeit konnten den untersuchten σ-Rezeptor-Liganden einige vielversprechende Eigenschaften bezüglich ihrer Wirkungsweise in der RPMI 8226-Zelllinie zugeschrieben werden. Durch die nähere Betrachtung des Wirkmechanismus könnten diese Verbindungen eine neue Therapiealternative zu herkömmlichen Zytostatika im Multiplem Myelom und möglicherweise auch anderen Tumoren darstellen. Der Einfluss dieser Liganden müsste dazu in weiteren Zelllinien, insbesondere den σ_2-Subtyp-reichen Zellen (MCF-7, RT-4), analysiert werden.

Die Mitochondrien-kontrollierte Apoptose-Induzierung, die bereits vor der Caspase-Aktivierung erfolgt, könnte durch Nachweis weiterer Caspase-unabhängiger Proteine, wie z. B. der Endonuklease G manifestiert werden. Außerdem könnten auch andere proapoptotische Proteine, wie etwa Smac/Diablo (siehe Kapitel 1.1.4.2) aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt werden und eine zusätzliche Bedeutung einnehmen. Durch Überexpression oder *Knock out*-Versuche pro- bzw. antiapoptotischer Proteine ließen sich weitere Rückschlüsse auf deren Apoptose-Beteiligung schließen.

Zur Aufklärung des Autophagozytose-Prozesses bedarf es wichtiger Transmissions-Elektronen-Mikroskopie-Versuche, die morphologische Hinweise zu zeitlichen Abläufen liefern könnten. Ebenso sollten weitere Schlüsselmoleküle (u.a. ATG4, Nrf2) detektiert werden.

Ein wichtiger Aspekt liegt in der Anwendung der getesteten Substanzen in Zellen von gesundem Gewebe, das keinen Tumor darstellt und darüberhinaus in *in-vivo*-Studien, um das Nebenwirkunspotential dieser σ-Rezeptor-Liganden abzuklären.

Die Lichtaktivierung untoxischer Pt^{IV}-Komplexe im Tumorgewebe ist ein vielversprechender Ansatz zur Erhöhung der Selektivität gegenüber herkömmlichen Pt-Antitumormitteln. Auch für FM 165 konnte bereits belegt werden, dass es ohne Photoaktivierung nur eine geringe antiproliferierende Wirkung zeigt.[162] Daher sollte im Folgenden dieser Pt^{IV}-Komplex, auf seine Fähigkeiten Apoptose und Autophagozytose zu induzieren, überprüft werden.

5.8 Photoaktiviertes FM 165 induziert keine Apoptose

Der FM 165 vermittelte Zelltod wird nicht durch die Apoptose induziert. Die Annexin-V-FITC/PI-Doppelanfärbung zeigt eindeutig den äußerst geringen Anteil (< 10 %) apoptotischer Zellen im Vergleich zu den signifikanten Konzentrationen Annexin-V-gefärbter Zellen der Positivkontrollen Etoposid und Cisplatin. Diese Daten stehen somit im Einklang zu den bereits durchgeführten mikroskopischen Beobachtungen mit Platin-Diazido-Komplexen.[196,197]

Auch weiterführende Versuche der Arbeitsgruppe um Julie Woods (Universität Dundee), in denen FM 165 in der A2780-Zelllinie (Eierstockkarzinom) keine Aktivierung von Caspase-3 und -7 nach photodynamischer Therapie erzielen konnte, belegen diese Argumentation.[257] Desweiteren ließen sich auch keine PARP-Spaltprodukte im Western Blot nachweisen, die jedoch nach Cisplatin-Behandlung detektierbar waren. Diese Ergebnisse beweisen, dass die photoaktivierbaren Pt^{IV}-Verbindungen in verschiedenen humanen Krebszelllinien einen Apoptose-unabhängigen Zelltod einleiten.

5.9 FM 165 aktiviert die Autophagozytose

Wie bereits erwähnt, kommt der Autophagozytose als sogenannter Typ II des programmierten Zelltodes eine wichtige Funktion zu. Da die Apoptose als möglicher Wirkmechanismus der untersuchten Pt^{IV}-Verbindungen nahezu ausgeschlossen werden kann, war es von Interesse diesen alternativen Mechanismus näher zu betrachten. Die frühe Aktivierung der Autophagozytose, die durch Expression der Proteine LC3-II und p62 bereits nach 6 h-Behandlung mit FM 165 nachgewiesen werden kann, deutet auf eine Beteiligung dieses Mechanismus hin. Im Gegensatz zur RPMI 8226-Zelllinie lassen sich die LC3-II-Banden jedoch nur separat, d. h. ohne die entsprechende LC3-I-Bande detektieren. Durch den im Western Blot mit

aufgetragenen Marker können die Banden dennoch der lipidierten Form zugeschrieben werden. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster der LC3-Banden scheinen von der jeweiligen Zelllinie abzuhängen. Es konnte *in-vivo* gezeigt werden, dass die Regulation der Autophagozytose Organ-spezifisch ist.[258] Desweiteren ist die LC3-I-Form wesentlich instabiler als die PE-konjugierte Form und könnte schon bei der Aufbereitung der Proben für den Western Blot abgebaut werden.[259]

Um den Autophagozytose-Fluss näher zu untersuchen, wurden HL60-Zellen mit den Protease-Inhibitoren E64d und Pepstatin A vorbehandelt. Durch Hemmung der lysosomalen Enzyme mit diesen Protease-Inhibitoren kann der Vesikelinhalt nicht abgebaut werden und die Autophagozytose wird an dieser Stelle unterbrochen. Folglich kommt es zu einer Anreicherung von Autolysosomen und einer damit verbundenen LC3-II-Dichte. Ebenso kann der Abbau des p62 während autophagischer Prozesse nicht erfolgen, was sich in einer stabilen Expression des p62 im Western Blot wiederspiegelt. Wie erwartet führte die Vorbehandlung mit Protease-Inhibitoren von HL60-Zellen, die mit photoaktiviertem FM165 behandelt wurden, zu Anstiegen der LC3-II- und p62-Bande im Western Blot. Dieses Ergebnis ist ein starker Beweis, dass eine Photoaktivierung des FM165 die Krebszellen zur Autophagozytose anregt.

5.10 Photoaktiviertes FM 165 führt zur frühen ROS-Bildung

Nachdem in früheren Studien das alkylierende Potential des FM 165 an die DNA gezeigt werden konnte[196], sollte überprüft werden ob auch eine mögliche Bildung reaktiver Stickstoffspezies (RNS), z. B. in Form von Azidradikalen, durch FM 165 für dessen zytotoxische Wirkung in Betracht gezogen werden kann. RNS können die Zellen schädigen und zur Bildung weiterer ROS führen.[163] Die Bestrahlung der Zellen nach FM 165-Inkubation führt zu einer zeitabhängigen ROS-Produktion. Da diese noch vor der Detektion der Autophagozytose stattfindet, scheint deren Aktivierung über ROS möglich zu sein. Weitere Untersuchungen mit Antioxidantien, wie z. B. *N*-Acetylcystein, könnten Aufschluss geben, inwieweit sich eine Hemmung der ROS auf autophagische Prozesse auswirkt.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei verschiedene Wirkstoffklassen auf ihre Fähigkeit Apoptose und Autophagozytose zu aktivieren analysiert werden.

Dabei wurden 39 σ-Rezeptor-Liganden zunächst auf ihre antiproliferativen Eigenschaften in acht humanen Krebszelllinien untersucht. Anhand der Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnte gezeigt werden, dass sich große, raumfüllende Substituenten an beiden N-Atomen des Piperazin-Grundgerüstes positiv auf die Hemmung des Zellwachstums auswirken.

Zeitgleich wurden an der Universität Münster Studien zur Bindungsaffinität durchgeführt, die für die im zytotoxischen Assay zu diesem Zeitpunkt potentesten Verbindungen **(*S*)-8**, **(*R*)-8**, **(*S*)-11** und **(*R*)-11**, in einer leichten Präferenz für den σ_1-Rezeptor resultierten. Auch die, ebenfalls in Münster, durchgeführten Studien zur Charakterisierung des humanen σ_1-Rezeptors an der RPMI 8226-Zelllinie waren ein Kriterium für die Auswahl dieser Zelllinie an allen weiteren Versuchen dieser Arbeit.

Die Behandlung der multiplen Myelom-Zelllinie RPMI 8226 mit dem Enantiomerenpaar **(*S*)-11** und **(*R*)-11** führte zur zeitabhängigen Induktion der Apoptose, die mit den typischen Charakteristika wie morphologische Membranausstülpungen, Annexin-V positive Zellen und der Chromatinkondensation einherging. Die Detektion von aktivierter Caspase-3, -8 und -9 im Durchfluss-zytometer deutete zunächst auf eine Beteiligung beider Signalwege der Apoptose hin. Da im Western Blot keine Caspase-9-Spaltprodukte detektiert werden konnten und auch die Vorinkubation mit dem Breitband-Caspase-Inhibitor z-VAD-FMK keinen Effekt auf die Apoptoserate bewirkte, scheinen die Caspasen im σ-Ligand-vermittelten Zelltod eine untergeordnete Rolle einzunehmen. Dies wurde zusätzlich durch die Versuche mit dem Apoptoseinhibitor M50054 bestärkt.

Die frühe Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials verbunden mit der zunehmenden Konzentration des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) im Zytosol der RPMI 8226-Zellen deuten ebenfalls auf eine Caspase-unabhängige Form der Apoptose hin, die besonders für σ_2-Agonisten bereits beschrieben ist. Und auch in diesem Projekt zeigen die σ-Liganden zytotoxische Aktivitäten, wenn sie eine Affinität zum σ_2-Rezeptor aufweisen.[186] Somit könnte dem σ_2-Subtyp eine besondere Rolle im Zelltod der untersuchten Verbindungen zukommen.

Neben der Apoptose können **(*S*)-11** und **(*R*)-11** auch die Autophagozytose induzieren. Dieser Prozess scheint jedoch der Apoptose nachgeschaltet zu sein und weist darauf hin, dass es sich nicht um einen Schutzmechanismus der Zelle handelt, sondern eher in einer direkten Form des programmierten Zelltodes vom Typ II begründet ist. Dieser ist bisher noch nicht für σ-Rezeptor-Liganden beschrieben und könnte einen Vorteil gegenüber anderen Vertretern dieser Wirkstoffklasse darstellen. Da der autophagische Prozess jedoch nicht vollständig abläuft bedarf es weiterer Untersuchungen, inwieweit sich die Autophagozytose auf den Zelltod auswirkt.

Eine Gemeinsamkeit von σ-Ligand-induzierter Apoptose und Autophagozytose liegt in ihrer Aktivierung durch die Lipidperoxidation. Es wurde ein sehr früher Anstieg von LPO-Produkten detektiert, der sich nur durch das lipophile Antioxidans α-Tocopherol beeinflussen ließ. Desweiteren konnte die antiproliferierende Wirkung von **(*S*)-11** und **(*R*)-11** im MTT-Assay komplett blockiert werden, und auch die Apoptoseraten wurden durch den Radikalfänger signifikant erniedrigt. Die Hemmung der LC3-II-Expression im Western Blot durch α-Tocopherol verdeutlicht auch hier die Beteiligung der LPO an der Autophagozytose. In den durchgeführten Experimenten ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Enantiomerenpaar ausmachen, mit Ausnahme des Zytotoxizitätsassays.

Die Abbildung 6.1 fasst die erhaltenen Ergebnisse in einer Übersicht zusammen.

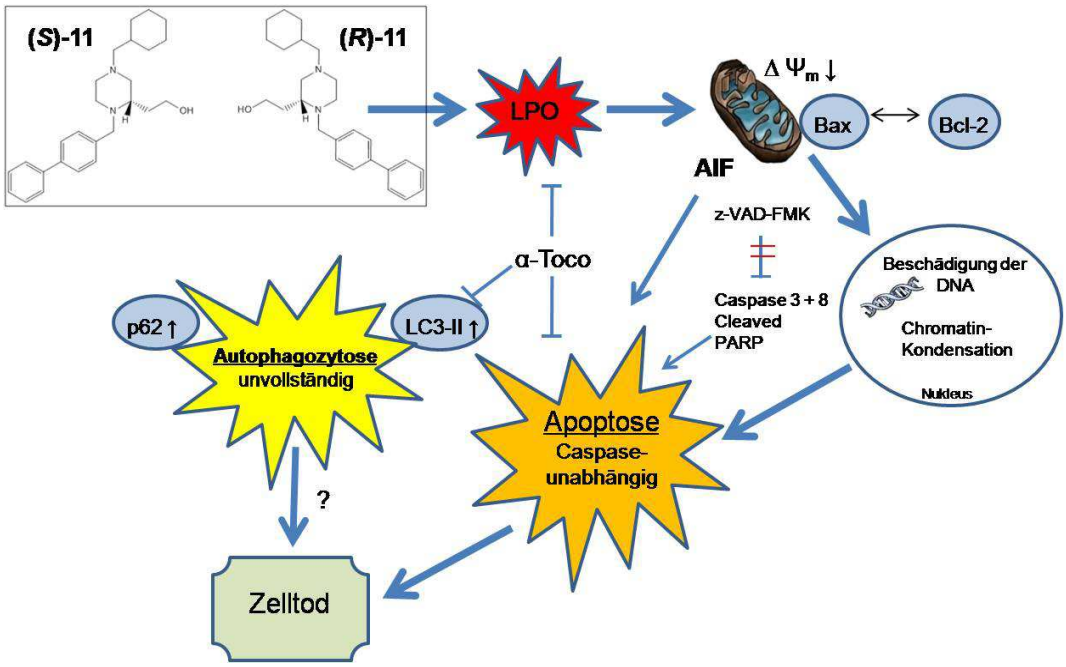


Abbildung 6.1 Postulierter Wirkmechanismus der untersuchten σ-Rezeptor-Liganden.

Die antiproliferierenden Eigenschaften der photoaktivierbaren Pt^{IV}-Verbindung FM 165 können nicht mit der Apoptose als Zelltodmechanismus begründet werden. In diesem Fall lassen sich keine morphologischen Charakteristika nachweisen und auch die Annexin-V Anfärbung fällt negativ aus. Die weiteren Untersuchungen zeigen jedoch auch die Aktivierung der Autophagozytose durch Expression von LC3-II und p62 im Western Blot. Eine Hemmung lysosomaler Enzyme durch die Protease-Inhibitoren E64d und Pepstatin A führt zu erhöhten LC3-II-Konzentrationen sowie einer p62-Akkumulation. Im Gegensatz zu den σ-Rezeptor-Liganden deutet dies eher auf eine vollständige Verlaufsform hin. Da die Autophagozytose bereits nach 6 h-Behandlung mit FM 165 detektiert wird, ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich zunächst um eine zellschützende Funktion handeln könnte. Auch beim FM 165 scheinen oxidative Vorgänge eine wichtige Rolle hinsichtlich der Autophagozytose-Aktivierung zu übernehmen. Nach erfolgter Photoaktivierung der Zellen lassen sich ansteigende ROS-Konzentrationen verzeichnen, die nach 2 h deutlich werden und somit noch vor der Autophagozytose entstehen.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die zwei unterschiedlichen Wirkstoffklassen das Zellwachstum ausgewählter humaner Tumorzelllinien hemmen können, ihre antiproliferierenden Eigenschaften aber auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Im Hinblick auf die stetige Zunahme von Krebserkrankungen und deren Resistenzentwicklungen ist es von Vorteil unterschiedliche Angriffspunkte von Wirkstoffkandidaten vorweisen zu können, um in Zukunft noch individualisierter und zielgerichteter Tumore behandeln zu können.

7 Anhang

Tabelle 7.1 Übersicht der K_i-Werte der synthetisierten Piperazin-Derivate von Frauke Weber.[186]

Substanz	σ_1 (gp)[a] K_i (nM) ± SEM	σ_2 (rat)[b] K_i (nM) ± SEM	σ_1 (hum)[c] K_i (nM) ± SEM	σ_2 (hum)[d] K_i (nM) ± SEM
(*S*)-1	28 %[e]	27 %[e]	n.d.	n.d.
(*S*)-2	3 %[e]	0 %[e]	n.d.	n.d.
(*S*)-3	17 %[e]	3 %[e]	711 ± 310	n.d.
(*S*)-4	279[f]	10 %[e]	n.d.	n.d.
(*S*)-5	491[f]	16 %[e]	n.d.	n.d.
(*S*)-6	46 ± 1	877[f]	107 ± 13	n.d.
(*S*)-7	4.2 ± 1.1	116[f]	21 ± 4	168 ± 23
(*R*)-7	1.9 ± 0.4	60 ± 11	23 ± 8	251[f]
(*S*)-8	1.9 ± 0.6	26 ± 12	29 ± 10	16 ± 4
(*R*)-8	0.9 ± 0.2	14 ± 4	7.5 ± 2.7	37 ± 21
(*S*)-9	4.7 ± 1.8	69 ± 24	6.8 ± 2.3	n.d.
(*S*)-10	43 ± 10	253[f]	27 ± 4	n.d.
(*S*)-11	3.5 ± 0.5	73 ± 45	34 ± 8	43 ± 13
(*R*)-11	7.8 ± 2.4	38 ± 1	29 ± 7	39 ± 11
(*S*)-12	275[f]	690[f]	71 ± 12	n.d.
(*S*)-13	52 ± 12	348[f]	54 ± 26	n.d.
(*R,S,R*)-14	0 %[e]	7 %[e]	n.d.	n.d.
(*R,S,S*)-15	4.8 ± 0.7	36 ± 9	3.2 ± 0.4	n.d.
(*R,S,R*)-15	6.9 ± 1.6	134[f]	2.4 ± 0.2	n.d.
(*S,R,R*)-15	23 ± 13	197[f]	2.8 ± 1.0	n.d.
(*S,R,S*)-15	5.7 ± 2.6	501[f]	1.6 ± 0.4	n.d.
(*R,S,S*)-16	11.4[f]	51 ± 16	13 ± 5	n.d.
(*R,S,R*)-16	7.1 ± 1.8	157[f]	7.2 ± 3.9	n.d.
(*S,S,R*)-17	3.5 ± 2.2	321[f]	3.9 ± 0.7	n.d.
(*R,R,S*)-17	2.1[f]	701[f]	3.5 ± 1.7	n.d.
(*R,S,S*)-18	13 %[e]	0 %[e]	25 %[e]	n.d.
(*R,R,S*)-18	1.6 ± 0.1	139[f]	2.2 ± 1.1	n.d.
(+)-Pentazocin[250]	5.4 ± 0.5		36 ± 5.2	

Substanz	σ_1 (gp)[a] K_i (nM) ± SEM	σ_2 (rat)[b] K_i (nM) ± SEM	σ_1 (hum)[c] K_i (nM) ± SEM	σ_2 (hum)[d] K_i (nM) ± SEM
Haloperidol[250]	6.6 ± 0.9		40 ± 5.3	
PB 28[129]	13[g]	0.28[g]		

[a]Meerschweinchenhirn, [b]Rattenhirn, [c]RPMI 8226 Zellen, [d]RT-4 Zellen, [e]Inhibition der Bindung des Radioliganden bei einer Testsubstanz-Konzentration von 1 µM, [f]Einzelbestimmung, [g] MCF-7 Zellen

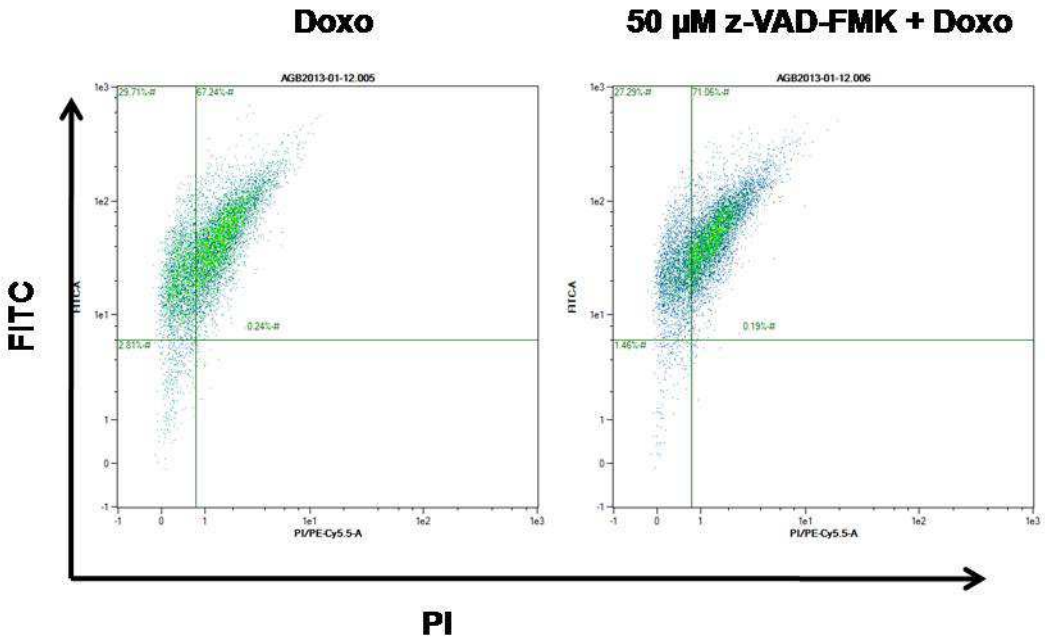


Abbildung 7.1 Repräsentative *Dot Plots* apoptotischer Zellen mit oder ohne z-VAD-FMK

RPMI 8226-Zellen nach 48 Behandlung mit 1 µm Doxorubicin (Doxo) mit oder ohne Vorinkubation für 1,5 h mit 50 µM z-VAD-FMK und anschließender Anfärbung mit Annexin-V FITC und PI.

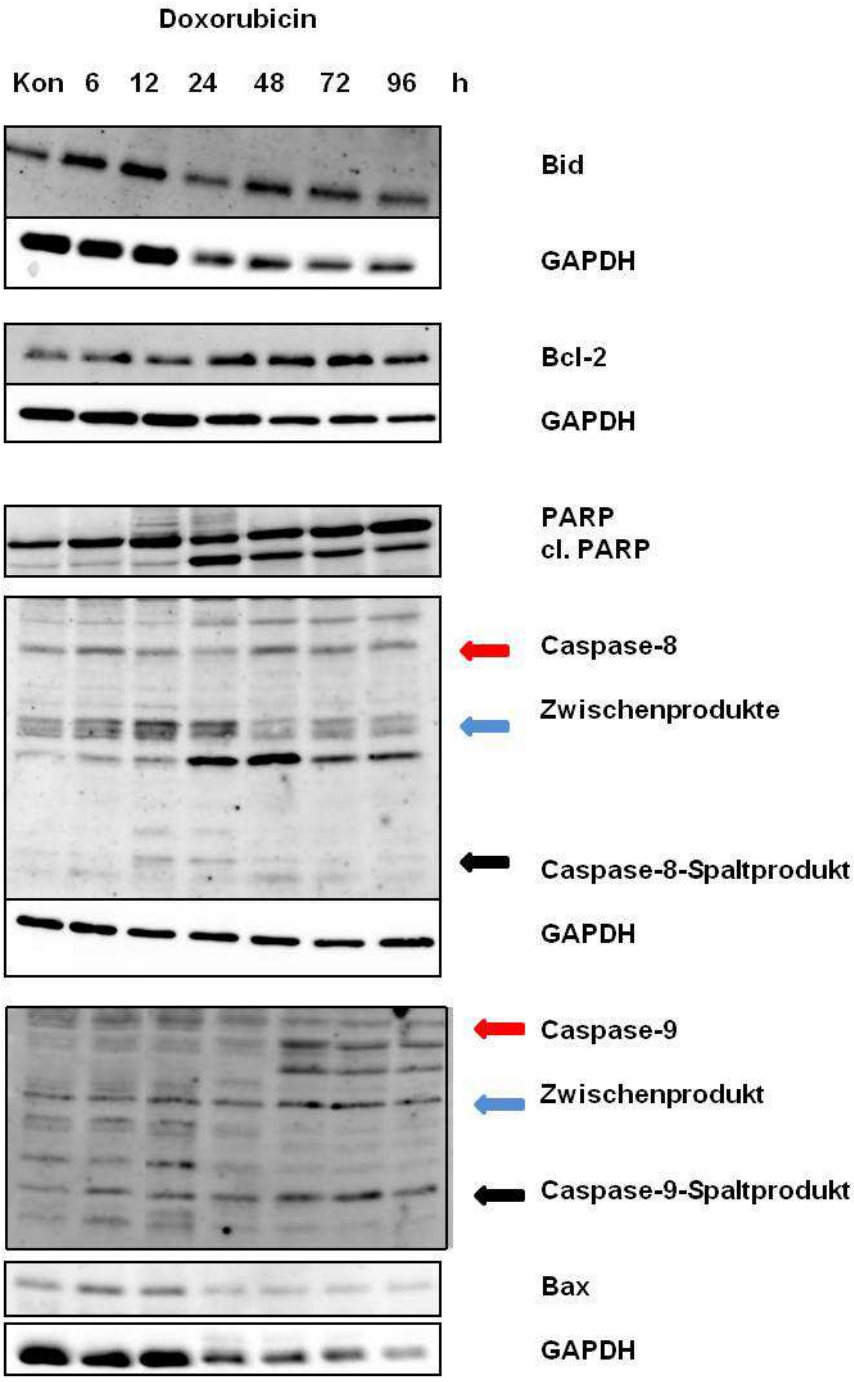


Abbildung 7.2 Expression ausgewählter Proteine nach Doxorubicin-Behandlung.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 36 µM 3 nm Doxorubicin für 6–96 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle, Kon = unbehandelte Kontrollzellen.

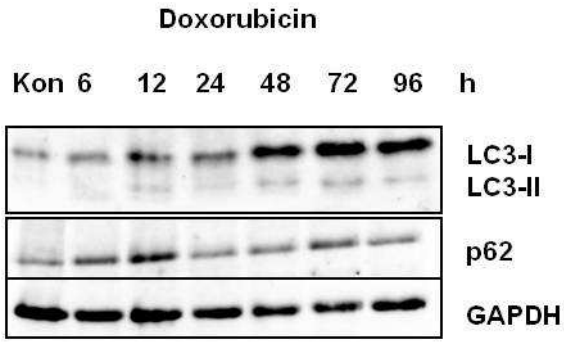


Abbildung 7.3 Expression der Autophagozytose-Marker LC3-II und p62 nach Doxorubicin-Behandlung.
Behandlung von RPMI 8226-Zellen mit 3 nm Doxorubicin für 6–96 h. Repräsentative Western Blots sind abgebildet, GAPDH diente als Ladungskontrolle, Kon = unbehandelte Kontrollzellen.

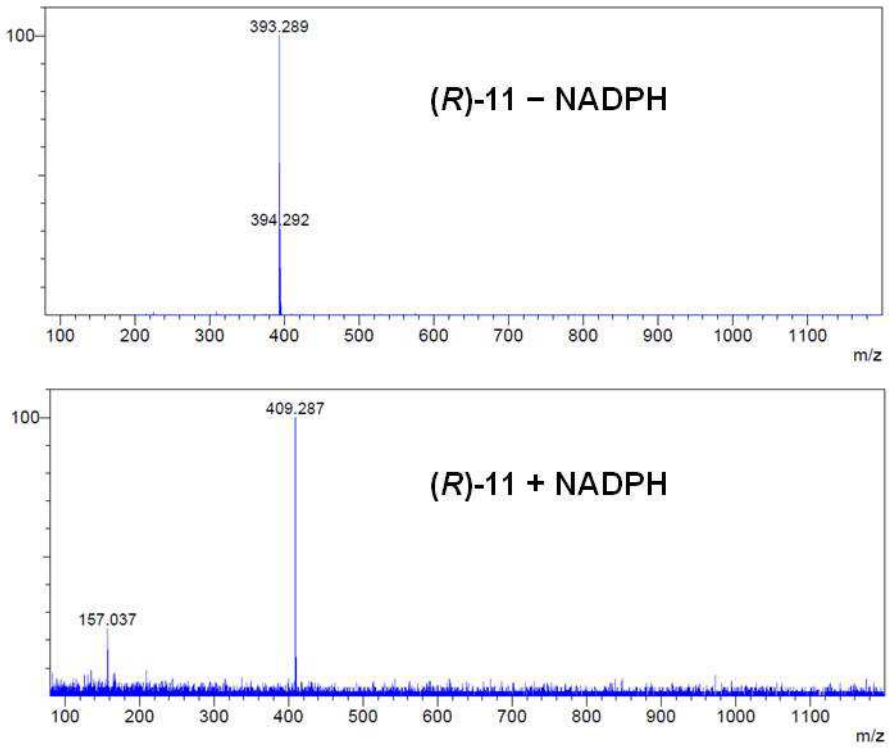


Abbildung 7.4 Massenspektren der Phenobarbital-induzierten Mikrosomen nach Behandlung mit (*R*)-11 mit oder ohne NADPH.

8 Literaturverzeichnis

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**;26(4):239-&.

2. Gumienny TL, Lambie E, Hartwieg E, Horvitz HR, Hengartner MO. Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. *Development* **1999**;126(5):1011-1022.

3. Mori C, Nakamura N, Kimura S, Irie H, Takigawa T, Shiota K. Programmed cell-death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* **1995**;242(1):103-110.

4. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* **2000**;108(4):317-330.

5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**;100(1):57-70.

6. Golstein P, Ojcius DM, Young JDE. Cell-death mechanisms and the immune-system. *Immunol Rev* **1991**;121:29-65.

7. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**;35(4):495-516.

8. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **2007**;26(2):225-239.

9. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **1999**;18(54):7719-7730.

10. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell* **2008**;135(7):1161-1163.

11. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* **2001**;276(2):1071-1077.

12. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **2000**;301(1):5-17.

13. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* **1993**;14(3):126-130.

14. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **2004**;16(6):663-669.

15. Witting A. **2000**. http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/witting-anke-2000-11-21/HTML/abb1.jpg. (abgerufen am 12.12.13).

16. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2011.

17. Kessel D, Vicente MGH, Reiners JJ, Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* **2006**;38(5):482-488.

18. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmend cell-death (Apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* **1990**;40(10):2353-2362.

19. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* **1999**;53:577-628.

20. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **2004**;23(16):2950-2966.

21. Green DR. Means to an end - Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

22. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**;407(6805):770-776.

23. Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy. Volume 615; 2008. p 13-23.

24. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem* **2009**;284(33):21777-21781.

25. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang GP, Iyer S et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis - Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* **1999**;274(33):22932-22940.

26. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **1998**;17(6):1675-1687.

27. Maillard S, Gauduchon J, Marsaud V, Gouilleux F, Connault E, Opolon P et al. Improved antitumoral properties of pure antiestrogen RU 58668-loaded liposomes in multiple myeloma. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2006**;100(1-3):67-78.

28. Li HL, Zhu H, Xu CJ, Yuan JY. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **1998**;94(4):491-501.

29. Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann B, Steiner V et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **1997**;388(6638):190-195.

30. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **2006**;25(34):4798-4811.

31. Mizutani Y, Katsuoka Y, Bonavida B. Low circulating serum levels of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) in patients with bladder cancer. *Int J Oncol* **2012**;40(4):1246-1250.

32. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **2001**;8(3):613-621.

33. Fu R, Shin E. **2008**. https://winshipcancer.emory.edu/spore-ed/project2.htm. (abgerufen am 10.10.2013).

34. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 FAMILY: Regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **1998**;16:395-419.

35. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev Cell* **2011**;21(1):92-101.

36. Zhai D, Jin C, Huang Z, Satterthwait AC, Reed JC. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem* **2008**;283(15):9580-9586.

37. Chipuk JE, Green DR. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle* **2009**;8(17):2692-2696.

38. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **2005**;17(4):525-535.

39. Giam M, Huang DCS, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* **2008**;27:S128-S136.

40. Shamas-Din A, Brahmbhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2011**;1813(4):508-520.

41. Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**;310(3):956-962.

42. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* **2001**;276(19):16391-16398.

43. Yu SW, Wang HM, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **2002**;297(5579):259-263.

44. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **2004**;23(16):2785-2796.

45. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **2004**;6(4):463-477.

46. Notte A, Leclere L, Michiels C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol* **2011**;82(5):427-434.

47. Burscha W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Frohwein U, Schulte-Hermann R et al. Cell death and autophagy: Cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology* **2008**;254(3):147-157.

48. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **2004**;36(12):2445-2462.

49. Zeng C, Rothfuss J, Zhang J, Chu W, Vangveravong S, Tu Z et al. Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signalling pathways. *Br J Cancer*;106(4):693-701.

50. Lieff J. **2011**. http://jonlieffmd.com/wp-content/uploads/2013/06/P62. (abgerufen am 10.10.2013).

51. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. Annu Rev Genet. Volume 43; 2009. p 67-93.

52. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **1998**;395(6700):395-398.

53. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **2000**;408(6811):488-492.

54. Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy. *Autophagy* **2007**;3(4):323-328.

55. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **2007**;282(33):24131-24145.

56. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **2005**;171(4):603-614.

57. Bhogal RH, Weston CJ, Curbishley SM, Adams DH, Afford SC. Autophagy A cyto-protective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress. *Autophagy* **2012**;8(4):545-558.

58. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *Plos One* **2009**;4(7).

59. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: The role of autophagy. *Carcinogenesis* **1996**;17(8):1595-1607.

60. Nixon RA. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci* **2006**;29(9):528-535.

61. Ventruti A, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* **2007**;7(5):443-451.

62. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **2004**;304(5676):1500-1502.

63. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **2004**;6(12):1221-1228.

64. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* **2005**;1(2):66-74.

65. Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* **2002**;157(3):455-468.

66. Levy JM, Thorburn A. Modulation of pediatric brain tumor autophagy and chemosnsitivity. *Neuro-Oncology* **2011**;13:I32-I32.

67. Ostenfeld MS, Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Fehrenbacher N, Olsen OD, Groth-Pedersen L et al. Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy* **2008**;4(4):487-499.

68. Rizzieri DA, Feldman E, DiPersio JF, Gabrail N, Stock W, Strair R et al. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* **2008**;14(9):2756-2762.

69. Yuan RR, Kay A, Berg WJ, Lebwohl D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* **2009**;2.

70. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**;39(1):44-84.

71. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* **1997**;39(1):1-18.

72. Gutteridge JMC. Lipid-peroxidaion and anioxidants as biomarkers of tissue-damage. *Clin Chem* **1995**;41(12B):1819-1828.

73. Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszynska T et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* **2000**;47(4):889-899.

74. McCord JM, Day ED. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett* **1978**;86(1):139-142.

75. Gasparovic AC, Lovakovic T, Zarkovic N. Oxidative Stress and Antioxidants: Biological Response Modifiers of Oxidative Homeostasis in Cancer. *Period Biol* **2010**;112(4):433-439.

76. Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* **2010**;44(10):1098-1124.

77. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med* **1991**;11(1):81-128.

78. Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **1976**;197(3):517-532.

79. Vaupel DB. Naltrexone fails to antaginoze the sigma-effects of PCP and SKF 10,047 in the dog. *Eur J Pharmacol* **1983**;92(3-4):269-274.

80. Su TP. Evidence for Sigma-Opioid receptor - binding of [H-3]-labeled SKF-10047 to Etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *J Pharmacol Exp Ther* **1982**;223(2):284-290.

81. Hellewell SB, Bruce A, Feinstein G, Orringer J, Williams W, Bowen WD. Rat-liver and kidney contain high-densities of sigma(1) and sigma(2) receptors - characterization by ligand-binding and photoaffinity-labeling. *Eur J Pharmacol (Mol Pharmacol Sect)* **1994**;268(1):9-18.

82. Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, Decosta B, Rice KC. Sigma-receptors - biology and function. *Pharmacol Rev* **1990**;42(4):355-402.

83. Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB et al. A proposal for the classification of sigma binding-sites. *Trends Pharmacol Sci* **1992**;13(3):85-86.

84. Megalizzi V, Le Mercier M, Decaestecker C. Sigma receptors and their ligands in cancer biology: overview and new perspectives for cancer therapy. *Med Res Rev* **2012**;32(2):410-427.

85. Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E et al. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma(1)-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**;93(15):8072-8077.

86. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem Biophys Res Commun* **1996**;229(2):553-558.

87. Seth P, Fei YJ, Li HW, Huang W, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *J Neurochem* **1998**;70(3):922-931.

88. Pan YX, Mei JF, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, Pasternak GW. Cloning and characterization of a mouse sigma(1) receptor. *J Neurochem* **1998**;70(6):2279-2285.

89. Moebius FF, Reiter RJ, Hanner M, Glossmann H. High affinity of sigma(1)-binding sites for sterol isomerization inhibitors: Evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C-8-C-7 isomerase. *Br J Pharmacol* **1997**;121(1):1-6.

90. Su TP, London ED, Jaffe JH. Steroid binding at sigma-receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune-systems. *Science* **1988**;240(4849):219-221.

91. Su TP, Hayashi T, Vaupel DB. When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine Meets the Sigma-1 Receptor. *Sci Signal* **2009**;2(61).

92. Ishikawa M, Ishiwata K, Ishii K, Kimura Y, Sakata M, Naganawa M et al. High occupancy of sigma-1 receptors in the human brain after single oral administration of fluvoxamine: A positron emission tomography study using C-11 SA4503. *Biol Psychiatry* **2007**;62(8):878-883.

93. Prasad PD, Li HW, Fei YJ, Ganapathy ME, Fujita T, Plumley LH et al. Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J Neurochem* **1998**;70(2):443-451.

94. Palmer CP, Mahen R, Schnell E, Djamgoz MBA, Aydar E. Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines. *Cancer Res* **2007**;67(23):11166-11175.

95. Pal A, Chu UB, Ramachandran S, Grawoig D, Guo LW, Hajipour AR et al. Juxtaposition of the steroid binding domain-like I and II regions constitutes a ligand binding site in the sigma-1 receptor. *J Biol Chem* **2008**;283(28):19646-19656.

96. Fontanilla D, Hajipour AR, Pal A, Chu UB, Arbabian M, Ruoho AE. Probing the steroid binding domain-like I (SBDLI) of the sigma-1 receptor binding site using N-substituted photoaffinity labels. *Biochemistry (Mosc)* **2008**;47(27):7205-7217.

97. Glennon RA, Ablordeppey SY, Ismaiel AM, Elashmawy MB, Fischer JB, Howie KB. Structural features important for sigma(1) receptor-binding. *J Med Chem* **1994**;37(8):1214-1219.

98. Glennon RA. Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma(1)) receptor binding: Application of the "deconstruction reconstruction elaboration" approach. *Mini-Rev Med Chem* **2005**;5(10):927-940.

99. Zampieri D, Mamolo MG, Laurini E, Florio C, Zanette C, Fermeglia M et al. Synthesis, biological evaluation, and three-dimensional in silico pharmacophore model for sigma(1) receptor ligands based on a series of substituted benzo[d]oxazol-2(3H)-one derivatives. *J Med Chem* **2009**;52(17):5380-5393.

100. Xu J, Zeng C, Chu W, Pan F, Rothfuss JM, Zhang F et al. Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nat Commun* **2011**;2.

101. McLean S, Weber E. Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain. *Neuroscience* **1988**;25(1):259-269.

102. Bowen WD. Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials. *Pharm Acta Helv* **2000**;74(2-3):211-218.

103. Bermack JE, Debonnel G. The role of sigma receptors in depression. *J Pharmacol Sci* **2005**;97(3):317-336.

104. Maurice T, Su T-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther* **2009**;124(2):195-206.

105. Kulkarni SK, Dhir A. Sigma-1 receptors in major depression and anxiety. *Expert Rev Neurother* **2009**;9(7):1021-1034.

106. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor ligands - Potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Cns Drugs* **2004**;18(5):269-284.

107. Hashimoto K, Ishiwata K. Sigma receptor ligands: Possible application as therapeutic drugs and as radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des* **2006**;12(30):3857-3876.

108. Mishina M, Ishiwata K, Ishii K, Kitamura S, Kimura Y, Kawamura K et al. Function of sigma(1) receptors in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* **2005**;112(2):103-107.

109. Maurice T. Improving Alzheimer's disease-related cognitive deficits with sigma(1) receptor Agonists. *Drug News Perspect* **2002**;15(10):617-625.

110. Novakova M, Ela C, Bowen WD, Hasin Y, Eilam Y. Highly selective sigma receptor ligands elevate inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* **1998**;353(2-3):315-327.

111. Wolfe SA, Culp SG, Desouza EB. Sigma-receptors in endocrine organs - identification, characterization, and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary. *Endocrinology* **1989**;124(3):1160-1172.

112. Aydar E, Palmer CP, Djamgoz MBA. Sigma receptors and cancer: Possible involvement of ion channels. *Cancer Res* **2004**;64(15):5029-5035.

113. Hayashi T, Su TP. sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: Roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**;306(2):718-725.

114. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-Mitochondrion interface regulate Ca2+ signaling and cell survival. *Cell* **2007**;131(3):596-610.

115. Su T-P, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci* **2010**;31(12):557-566.

116. Ortega-Roldan JL, Ossa F, Schnell JR. Characterization of the Human Sigma-1 Receptor Chaperone Domain Structure and Binding Immunoglobulin Protein (BiP) Interactions. *J Biol Chem* **2013**;288(29):21448-21457.

117. Zeng CB, Vangveravong S, Xu JB, Chang KC, Hotchkiss RS, Wheeler KT et al. Subcellular localization of sigma-2 receptors in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer Res* **2007**;67(14):6708-6716.

118. Hayashi T, Su TP. Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98(2):491-496.

119. Crawford KW, Coop A, Bowen WD. sigma(2) receptors regulate changes in sphingolipid levels in breast tumor cells. *Eur J Pharmacol* **2002**;443(1-3):207-209.

120. Zhang HL, Cuevas J. Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. *J Neurophysiol* **2002**;87(6):2867-2879.

121. Renaudo A, L'Hoste S, Guizouarn H, Borgese F, Soriani O. Cancer cell cycle modulated by a functional coupling between sigma-1 receptors and Cl- channels. *J Biol Chem* **2007**;282(4):2259-2267.

122. Kennedy C, Henderson G. Inhibition of potassium currents by the sigma receptor ligand (+)-3-(3-Hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine in sympathetic neurons of the mouse isolated hypogastric ganglion. *Neuroscience* **1990**;35(3):725-733.

123. He Y-L, Zhang C-L, Gao X-F, Yao J-J, Hu C-L, Mei Y-A. Cyproheptadine enhances the I(K) of mouse cortical neurons through sigma-1 receptor-mediated intracellular signal pathway. *Plos One* **2012**;7(7):e41303.

124. Martina M, Turcotte M-EB, Halman S, Bergeron R. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *Journal of Physiology-London* **2007**;578(1):143-157.

125. Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. *Science* **2009**;323(5916):934-937.

126. Balasuriya D, Stewart AP, Crottes D, Borgese F, Soriani O, Edwardson JM. The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav1.5 Voltage-gated Na+ Channel with 4-Fold Symmetry. *J Biol Chem* **2012**;287(44):37021-37029.

127. Hammadi M, Oulidi A, Gackiere F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *Faseb J* **2013**;27(4):1600-1609.

128. Parys JB, Decuypere JP, Bultynck G. Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca2+-release channel in autophagy. *Cell Commun Signal* **2012**;10.

129. Azzariti A, Colabufo NA, Berardi F, Porcelli L, Niso M, Simone GM et al. Cyclohexylpiperazine derivative PB28, a sigma(2) agonist and sigma(1) antagonist receptor, inhibits cell growth, modulates P-glycoprotein, and synergizes with anthracyclines in breast cancer. *Mol Cancer Ther* **2006**;5(7):1807-1816.

130. Zeng C, Rothfuss J, Zhang J, Chu W, Vangveravong S, Tu Z et al. Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signalling pathways. *Br J Cancer* **2012**;106(4):693-701.

131. Kashiwagi H, McDunn JE, Simon PO, Goedegebuure PS, Vangveravong S, Chang K et al. Sigma-2 receptor ligands potentiate conventional chemotherapies and improve survival in models of pancreatic adenocarcinoma. *J Transl Med* **2009**;7.

132. Brune S, Schepmann D, Lehmkuhl K, Frehland B, Wuensch B. Characterization of Ligand Binding to the sigma(1) Receptor in a Human Tumor Cell Line (RPMI 8226) and Establishment of a Competitive Receptor Binding Assay. *Assay Drug Dev Technol* **2012**;10(4):365-374.

133. Schepmann D, Lehmkuhl K, Brune S, Wuensch B. Expression of sigma receptors of human urinary bladder tumor cells (RT-4 cells) and development of a competitive receptor binding assay for the determination of ligand affinity to human sigma(2) receptors. *J Pharm Biomed Anal* **2011**;55(5):1136-1141.

134. Vilner BJ, John CS, Bowen WD. Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor-cell lines. *Cancer Res* **1995**;55(2):408-413.

135. Wheeler KT, Wang LM, Wallen CA, Childers SR, Cline JM, Keng PC et al. Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *Br J Cancer* **2000**;82(6):1223-1232.

136. Caveliers V, Everaert H, John CS, Lahoutte T, Bossuyt A. Sigma receptor scintigraphy with N-[2-(1 '-piperidinyl)ethyl]-3-I-123-iodo-4-methoxybenzamide of patients with suspected primary breast cancer: First clinical results. *J Nucl Med* **2002**;43(12):1647-1649.

137. Brent PJ, Pang GT. Sigma-binding site ligands inhibit cell-proliferation in mammary and colon-carcinoma cell-lines and melanoma-cells in culture. *Eur J Pharmacol* **1995**;278(2):151-160.

138. Geiger C, Zelenka C, Weigl M, Froehlich R, Wibbeling B, Schepmann D et al. Synthesis of bicyclic sigma receptor ligands with cytotoxic activity. *J Med Chem* **2007**;50(24):6144-6153.

139. Hornick JR, Xu J, Vangveravong S, Tu Z, Mitchem JB, Spitzer D et al. The novel sigma-2 receptor ligand SW43 stabilizes pancreas cancer progression in combination with gemcitabine. *Mol Cancer* **2010**;9.

140. Hornick JR, Spitzer D, Goedegebuure PS, Mach RH, Hawkins WG. The Novel Sigma-2 Receptor Ligand SW43 Induces Apoptosis in Pancreas Cancer. *Ann Surg Oncol* **2010**;17:S71-S71.

141. Spruce BA, Campbell LA, McTavish N, Cooper MA, Appleyard MVL, O'Neill M et al. Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* **2004**;64(14):4875-4886.

142. Riganas S, Papanastasiou I, Foscolos GB, Tsotinis A, Serin G, Mirjolet J-F et al. New Adamantane Phenylalkylamines with sigma-Receptor Binding Affinity and Anticancer Activity, Associated with Putative Antagonism of Neuropathic Pain. *J Med Chem* **2012**;55(22):10241-10261.

143. Yang S, Bhardwaj A, Cheng J, Alkayed NJ, Hurn PD, Kirsch JR. Sigma receptor agonists provide neuroprotection in vitro by preserving bcl-2. *Anesth Analg* **2007**;104(5):1179-1184.

144. Colabufo NA, Berardi F, Contino M, Niso M, Abate C, Perrone R et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of some sigma(2) agonists and sigma(1) antagonists in tumour cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2004**;370(2):106-113.

145. Megalizzi V, Mathieu V, Mijatovic T, Gailly P, Debeir O, De Neve N et al. 4-IBP, a sigma(1) receptor agonist, decreases the migration of human cancer cells, including glioblastoma cells, in vitro and sensitizes them in vitro and in

vivo to cytotoxic insults of proapoptotic and proautophagic drugs. *Neoplasia* **2007**;9(5):358-369.

146. Riganas S, Papanastasiou I, Foscolos GB, Tsotinis A, Bourguignon J-J, Serin G et al. Synthesis, sigma(1), sigma(2)-receptors binding affinity and antiproliferative action of new C1-substituted adamantanes. *Biorg Med Chem* **2012**;20(10):3323-3331.

147. Crawford KW, Bowen WD. Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res* **2002**;62(1):313-322.

148. Ostenfeld MS, Fehrenbacher N, Hoyer-Hansen M, Thomsen C, Farkas T, Jaattela M. Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer Res* **2005**;65(19):8975-8983.

149. Platini F, Perez-Tomas R, Ambrosio S, Tessitore L. Understanding Autophagy in Cell Death Control. *Curr Pharm Des* **2010**;16(1):101-113.

150. Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, Song YS, Oh JS, Park BS et al. Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol* **2012**;41(4):1443-1454.

151. Garcia-Escudero V, Gargini R. Autophagy induction as an efficient strategy to eradicate tumors. *Autophagy* **2008**;4(7):923-925.

152. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2004**;1(4):279-293.

153. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2010**;7(2):61-75.

154. Ma LW, Moan J, Berg K. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy - A comparison of its photobiological properties with those of 2 other photosensitizers. *Int J Cancer* **1994**;57(6):883-888.

155. Wohrle D, Hirth A, Bogdahn-Rai T, Schnurpfeil G, Shopova M. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem Bull* **1998**;47(5):807-816.

156. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2005**;2(3):175-191.

157. Kandela IK, Bartlett JA, Indig GL. Effect of molecular structure on the selective phototoxicity of triarylmethane dyes towards tumor cells. *Photochem Photobiol Sci* **2002**;1(5):309-314.

158. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* **2009**;85(5):1053-1074.

159. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PAM. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* **2002**;34(3):221-241.

160. Chen B, Roskams T, Xu Y, Agostinis P, de Witte PAM. Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer* **2002**;98(2):284-290.

161. Vandenbogaerde AL, Cuveele JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, deWitte PA. Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J Photochem Photobiol B* **1997**;38(2-3):136-142.

162. Westendorf AF. Synthese und Charakterisierung von photoaktivierbaren *trans*-Pt^{IV}-Diaziden und Evaluierung ihrer DNA-bindenden und antiproliferierenden Eigenschaften an Krebszellen unter Einfluss von Licht [Dissertation]. Greifswald: Universität Greifswald; **2012**.

163. Bednarski PJ, Korpis K, Westendorf AF, Perfahl S, Gruenert R. Effects of light-activated diazido-Pt-IV complexes on cancer cells in vitro. *Phil Trans R Soc A* **2012**;371(1995).

164. Farrer NJ, Salassa L, Sadler PJ. Photoactivated chemotherapy (PACT): the potential of excited-state d-block metals in medicine. *Dalton Transactions* **2009**(48):10690-10701.

165. Kratochwil NA, Bednarski PJ. Relationships between reduction properties and cancer cell growth inhibitory activities of cis-dichloro- and cis-diiodo-Pt(IV)-ethylenediamines. *Arch Pharm* **1999**;332(8):279-285.

166. Vogler A, Kern A, Huttermann J. Photo-chemical reductive *trans*-elimination from *trans*-diazidotetracyanoplatinate(IV). *Angewandte Chemie (Int Edit English)* **1978**;17(7):524-525.

167. Hall MD, Hambley TW. Platinum(IV) antitumour compounds: their bioinorganic chemistry. *Coord Chem Rev* **2002**;232(1-2):49-67.

168. Kreye M. Optische Spektroskopie zur Untersuchung der Reaktivität komplexer Oxide [Dissertation]. Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig; 2004.

169. Kapuscinski J, Szer W. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res* **1979**;6(11):3519-3534.

170. Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Strekowski L, Boykin DW, Jones RL. Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA - intercalation of a classical groove-binding molecule. *J Am Chem Soc* **1989**;111(13):5008-5010.

171. Bernhardt G, Reile H, Birnböck H, Spruß T, Schönenberger H. Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity. *J Cancer Res Clin Oncol* **1992**;118(1):35-43.

172. Chou T-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res* **2010**;70(2):440-446.

173. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **2006**;58(3):621-681.

174. Chou TC, Martin N. **2005**. http://www.combosyn.com/feature.html. (abgerufen am 15.12.2013).

175. Andree HAM, Reutelingsperger CPM, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant-alpha (VAC-alpha) to planar phospholipid-bilayers. *J Biol Chem* **1990**;265(9):4923-4928.

176. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **1998**;31(1):1-9.

177. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M et al., Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Weinheim. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **2011**.

178. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* **1998**;273(49):32608-32613.

179. Concha NO, Abdel-Meguid SS. Controlling apoptosis by inhibition of caspases. *Curr Med Chem* **2002**;9(6):713-726.

180. Dominguez-Rebolledo AE, Martinez-Pastor F, Fernandez-Santos MR, del Olmo E, Bisbal A, Ros-Santaella JL et al. Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C-11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. *Reprod Domest Anim* **2010**;45(6):e360-e368.

181. Smiley ST, Reers M, Mottolahartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial-membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88(9):3671-3675.

182. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**;72(1-2):248-254.

183. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **1970**;227(5259):680-&.

184. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**;76(9):4350-4354.

185. Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem* **1991**;37(9):1472-1481.

186. Weber F. Synthese und Beziehungen zwischen Struktur, Sigma-Rezeptoraffinität und cytotoxischer Aktivität von überbrückten Piperazin-Derivaten und deren flexibler Analoga [Dissertation]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität; **2012**.

187. Bracht K, Boubakari, Grunert R, Bednarski PJ. Correlations between the activities of 19 anti-tumor agents and the intracellular glutathione concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: comparisons with the National Cancer Institute data. *Anti-Cancer Drugs* **2006**;17(1):41-51.

188. Holl R, Schepmann D, Froehlich R, Gruenert R, Bednarski PJ, Wuensch B. Dancing of the Second Aromatic Residue around the 6,8-Diazabicyclo[3.2.2]nonane Framework: Influence on sigma Receptor Affinity and Cytotoxicity. *J Med Chem* **2009**;52(7):2126-2137.

189. Sunnam SK, Schepmann D, Rack E, Froehlich R, Korpis K, Bednarski PJ et al. Synthesis and biological evaluation of conformationally restricted sigma(1) receptor ligands with 7,9-diazabicyclo[4.2.2]decane scaffold. *Org Biomol Chem* **2010**;8(24):5525-5540.

190. Supiot S, Gouard S, Charrier J, Apostolidis C, Chatal JF, Barbet J et al. Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res* **2005**;11(19):7047S-7052S.

191. Rozman-Pungercar J, Kopitar-Jerala N, Bogyo M, Turk D, Vasiljeva O, Stefe I et al. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ* **2003**;10(8):881-888.

192. Tsuda T, Ohmori Y, Muramatsu H, Hosaka Y, Takiguchi K, Saitoh F et al. Inhibitory effect of M50054, a novel inhibitor of apoptosis, on anti-Fas-antibody-induced hepatitis and chemotherapy-induced alopecia. *Eur J Pharmacol* **2001**;433(1):37-45.

193. Li L, Ishdorj G, Gibson SB. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment. *Free Radical Biol Med* **2012**;53(7):1399-1410.

194. Wu YT, Tan HL, Shui GH, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR et al. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *J Biol Chem* **2010**;285(14):10850-10861.

195. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Ruth P, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2008.

196. Westendorf AF, Woods JA, Korpis K, Farrer NJ, Salassa L, Robinson K et al. Trans, trans, trans-[Pt-IV(N-3)(2)(OH)(2)(py)(NH3)]: A Light-Activated Antitumor Platinum Complex That Kills Human Cancer Cells by an Apoptosis-Independent Mechanism. *Mol Cancer Ther* **2012**;11(9):1894-1904.

197. Bednarski PJ, Grunert R, Zielzki M, Wellner A, Mackay FS, Sadler PJ. Light-activated destruction of cancer cell nuclei by platinum diazide complexes. *Chem Biol* **2006**;13(1):61-67.

198. Holl R, Schepmann D, Bednarski PJ, Gruenert R, Wuensch B. Relationships between the structure of 6-substituted 6,8-diazabicyclo [3.2.2]nonan-2-ones and their sigma receptor affinity and cytotoxic activity. *Biorg Med Chem* **2009**;17(4):1445-1455.

199. Abate C, Perrone R, Berardi F. Classes of Sigma(2) (sigma(2)) Receptor Ligands: Structure Affinity Relationship (SAfiR) Studies and Antiproliferative Activity. *Curr Pharm Des* **2012**;18(7):938-949.

200. Gillard M, Van Der Perren C, Moguilevsky N, Massingham R, Chatelain P. Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H-1 histamine receptors: Contribution of Lys(191) and Thr(194). *Mol Pharmacol* **2002**;61(2):391-399.

201. Vilner BJ, Decosta BR, Bowen WD. Cytotoxic effects of sigma-ligands -sigma-receptor mediated alterations in cellular morphology and viability. *Journal of Neuroscience* **1995**;15(1):117-134.

202. Rybczynska AA, Dierckx RA, Ishiwata K, Elsinga PH, van Waarde A. Cytotoxicity of sigma-receptor ligands is associated with major changes of cellular metabolism and complete occupancy of the sigma-2 subpopulation. *J Nucl Med* **2008**;49(12):2049-2056.

203. Brent PJ, Pang G, Little G, Dosen PJ, VanHelden DF. The sigma receptor ligand, reduced haloperidol, induces apoptosis and increases intracellular-free calcium levels [Ca2+](i) in colon and mammary adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**;219(1):219-226.

204. Tucci M, Quatraro C, Dammacco F, Silvestris F. Role of Active Drug Transporters in Refractory Multiple Myeloma. *Curr Top Med Chem* **2009**;9(2):218-224.

205. Nordenberg J, Perlmutter I, Lavie G, Beery E, Uziel O, Morgenstern C et al. Anti-proliferative activity of haloperidol in B16 mouse and human SK-MEL-28 melanoma cell lines. *Int J Oncol* **2005**;27(4):1097-1103.

206. Clarke PR, Allan LA. Cell-cycle control in the face of damage - a matter of life or death. *Trends Cell Biol* **2009**;19(3):89-98.

207. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* **1999**;442(1):117-121.

208. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **2008**;18(4):157-164.

209. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang XD. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1999**;15:269-290.

210. Zhang Z, Teruya K, Eto H, Shirahata S. Fucoidan Extract Induces Apoptosis in MCF-7 Cells via a Mechanism Involving the ROS-Dependent JNK Activation and Mitochondria-Mediated Pathways. *Plos One* **2011**;6(11).

211. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of Bcl-2 protects prostate-cancer cells from apoptosis *in-vitro* and confers resistance to androgen depletion *in-vivo*. *Cancer Res* **1995**;55(19):4438-4445.

212. Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **2002**;21(15):2283-2294.

213. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, diStefano F, Ross P et al. BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* **1997**;349(9059):1137-1141.

214. Low SY, Tan BS, Choo HL, Tiong KH, Khoo AS-B, Leong C-O. Suppression of BCL-2 synergizes cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* **2012**;314(2):166-175.

215. Meunier J, Hayashi T. Sigma-1 Receptors Regulate Bcl-2 Expression by Reactive Oxygen Species-Dependent Transcriptional Regulation of Nuclear Factor kappa B. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**;332(2):388-397.

216. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **2004**;142(2):231-255.

217. Ubezio P, Civoli F. Flow cytometric detection of hydrogen-peroxide production induced by doxorubicin in cancer-cells. *Free Radical Biol Med* **1994**;16(4):509-516.

218. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**;103(41):15038-15043.

219. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G, Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**;358(1):203-208.

220. Eckl PM, Ortner A, Esterbauer H. Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutat Res* **1993**;290(2):183-192.

221. Bird RP, Draper HH, Basrur PK. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian-cells - Production of micronuclei and chromosomal-aberrations. *Mutat Res* **1982**;101(3):237-246.

222. Hill BG, Haberzettl P, Ahmed Y, Srivastava S, Bhatnagar A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* **2008**;410:525-534.

223. Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL et al. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *ArterioscIerThrombVasc Biol* **2002**;22(1):101-107.

224. Bowry VW, Ingold KU, Stocker R. Vitamin-E in human low-density-lipoprotein - When and how this antioxidant becomes a prooxidant. *Biochem J* **1992**;288:341-344.

225. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**;338(1):668-676.

226. Liu N, Tai S, Ding BX, Thor RK, Bhuta S, Sun Y et al. Arsenic trioxide synergizes with everolimus (Rad001) to induce cytotoxicity of ovarian cancer cells through increased autophagy and apoptosis. *Endocr-Relat Cancer* **2012**;19(5):711-723.

227. Hou W, Han J, Lu CS, Goldstein LA, Rabinowich H. Autophagic degradation of active caspase-8 A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **2010**;6(7):891-900.

228. Okamoto K, Sakimoto Y, Imai K, Senoo H, Shidoji Y. Induction of an incomplete autophagic response by cancer-preventive geranylgeranoic acid (GGA) in a human hepatoma-derived cell line. *Biochem J* **2011**;440:63-71.

229. Schmukler E, Shai B, Ehrlich M, Pinkas-Kramarski R. Neuregulin Promotes Incomplete Autophagy of Prostate Cancer Cells That Is Independent of mTOR Pathway Inhibition. *Plos One* **2012**;7(5).

230. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **2007**;26(7):1749-1760.

231. Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Hisasue SI, Suzuki K, Tsukamoto T et al. Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology* **2006**;48(2):157-161.

232. Thompson HGR, Harris JW, Wold BJ, Lin F, Brody JP. p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* **2003**;22(15):2322-2333.

233. Rolland P, Madjd Z, Durrant L, Ellis IO, Layfield R, Spendlove I. The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr-Relat Cancer* **2007**;14(1):73-80.

234. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* **2012**;103(4):760-766.

235. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* **2010**;12(3):213-U217.

236. Jain A, Lamark T, Sjottem E, Larsen KB, Awuh JA, Overvatn A et al. p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *J Biol Chem* **2010**;285(29):22576-22591.

237. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* **2009**;34(4):176-188.

238. Rossi M, Munarriz ER, Bartesaghi S, Milanese M, Dinsdale D, Guerra-Martin MA et al. Desmethylclomipramine induces the accumulation of autophagy markers by blocking autophagic flux. *J Cell Sci* **2009**;122(18):3330-3339.

239. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR et al. Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **2009**;137(4):721-735.

240. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappa B mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* **2008**;13(4):343-354.

241. Kissova I, Deffieu M, Samokhvalov V, Velours G, Bessoule J-J, Manon S et al. Lipid oxidation and autophagy in yeast. *Free Radical Biol Med* **2006**;41(11):1655-1661.

242. Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-Usmar VM. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J* **2012**;442:453-464.

243. Zeng R, Chen Y, Zhao S, Cui G-h. Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin in vitro via regulating intracellular ROS and SIRT1. *Acta Pharmacol Sin* **2012**;33(1):91-100.

244. Pan Y, Gao Y, Chen L, Gao G, Dong H, Yang Y et al. Targeting Autophagy Augments In Vitro and In Vivo Antimyeloma Activity of DNA-Damaging Chemotherapy. *Clin Cancer Res* **2011**;17(10):3248-3258.

245. Pattingre S, Tassa A, Qu XP, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **2005**;122(6):927-939.

246. Tallarida RJ. Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacol Ther* **2007**;113(1):197-209.

247. Dingli D, Rajkumar SV. How best to use new therapies in multiple myeloma. *Blood Rev* **2010**;24(3):91-100.

248. Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, Voorhees PM, Orlowski M, Orlowski RZ. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* **2009**;113(19):4667-4676.

249. Marrazzo A, Cobos EJ, Parenti C, Arico G, Marrazzo G, Ronsisvalle S et al. Novel Potent and Selective sigma Ligands: Evaluation of Their Agonist and Antagonist Properties. *J Med Chem* **2011**;54(10):3669-3673.

250. Brune S. Charakterisierung des human Sigma 1- Rezeptors: Entwicklung eines Bindungsassays und Untersuchung der Proein-Ligand-Interaktionen durch zielgerichtete Mutagenese und Molecular Modeling [Dissertation]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster 2012.

251. Niso M, Abate C, Ferorelli S, Cassano G, Gasparre G, Perrone R et al. Investigation of sigma receptors agonist/antagonist activity through N-(6-methoxytetralin-1-yl)- and N-(6-methoxynaphthalen-1-yl)alkyl derivatives of polymethylpiperidines. *Biorg Med Chem* **2013**;21(7):1865-1869.

252. Testa B, Krämer SD. The Biochemistry of Drug Metabolism: Priciples, Redox Reactions, Hydrolyses: VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich (Switzerland) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany); 2008.

253. Maestrup EG, Wiese C, Schepmann D, Hiller A, Fischer S, Scheunemann M et al. Synthesis of spirocyclic sigma(1) receptor ligands as potential PET radiotracers, structure-affinity relationships and in vitro metabolic stability. *Biorg Med Chem* **2009**;17(10):3630-3641.

254. Wiese C, Maestrup EG, Schepmann D, Miguel Vela J, Holenz J, Buschmann H et al. Pharmacological and metabolic characterisation of the potent sigma(1) receptor ligand 1 '-benzyl-3-methoxy-3H-spiro 2 benzofuran-1,4 '-piperidine. *J Pharm Pharmacol* **2009**;61(5):631-640.

255. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* **2002**;34(1-2):83-448.

256. Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V et al. Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* **1999**;9(3):295-306.

257. Mackay FS, Woods JA, Heringova P, Kasparkova J, Pizarro AM, Moggach SA et al. A potent cytotoxic photoactivated platinum complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**;104(52):20743-20748.

258. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **2004**;15(3):1101-1111.

259. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **2008**;4(2):151-175.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Katharina Korpis

Curriculum Vitae

Veröffentlichungen

Fachjournals

Weber F, Brune S, Korpis K, Bednarski PJ, Wünsch B. Synthesis and pharmacological evaluation of hydroxyethyl piperazines with high σ_1 affinity. *J Med Chem* 2014; Epub ahead of print

Korpis K, Weber F, Brune S, Wünsch B and Bednarski PJ. Involvement of apoptosis and autophagy in the death of RPMI 8226 multiple myeloma cells by two enantiomeric sigma receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 2014; 22(1):221-233

Bednarski PJ, Korpis K, Westendorf AF and Perfahl S. Effects of light-activated diazido-Pt^{IV} complexes on cancer cells *in vitro*. *Phil Trans R Soc A* 2013; 371(1995):20120118

Westendorf AF, Woods JA, Korpis K, Robinson K, Appleyard V, Murray K, Grünert R, Farrer NL, Salassa L, Thompson AM, Sadler PJ and Bednarski PJ. *Trans, trans*, *trans*-[$Pt^{IV}(N_3)_2(OH)_2(py)(NH_3)$]: A light-activated antitumor platinum complex that kills human cancer cells by an apoptosis-independent mechanism. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(9):1894-1904

Kamper C, Korpis K, Specker E, Anger L, Neuenschwander M, Bednarski PJ and Link A. Sustainable synthesis and automated deposition: an accessible discovery screening library of fragment-like purins. *Mol Diversity* 2012; 16(3):541-551

Sunnam S, Schepmann D, Rack E, Fröhlich R, Korpis K, Bednarski PJ and Wünsch B. Synthesis and biological evaluation of conformationally restricted sigma (1) receptor ligands with 7,9-diazabicyclo[4.2.2]decane scaffold. *Org Biomol Chem* 2010; 8(24):5525-5540

Eingereichte Manuskripte

Korpis K, Weber F, Wünsch B, Bednarski PJ. Antiproliferative activity of hydroxyethyl piperazine-based sigma receptor ligands on cancer cells alone and in combination with Melphalan. *J Pharm Pharmacol*; eingereicht, Dezember 2013

Posterbeiträge

Korpis K, Weber F, Wünsch B and Bednarski PJ. Involvement of apoptosis and autophagy in the tumor cell death caused by new sigma receptor ligands. 17th International AEK Cancer Congress, Heidelberg (2013)

Korpis K, Weber F, Wünsch B and Bednarski PJ. New heterocyclic sigma-receptor ligands and their role in the activation of apoptotic pathways. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Greifswald (2012)

Korpis K, Weber F, Wünsch B and Bednarski PJ. New heterocyclic sigma-receptor ligands and their testing as potential anticancer drugs. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Innsbruck (2011)

Korpis K, Weber F, Wünsch B and Bednarski PJ. Development of sigma-receptor binding heterocyclic derivatives with cytotoxic activity (II). Jahrestagung der Central European Society for Anticancer drug Research (CESAR), Greifswald (2011)

Korpis K, Weber F, Wünsch B and Bednarski PJ. Development of sigma-receptor binding heterocyclic derivatives with cytotoxic activity (I). Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Braunschweig (2010)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Patrick J. Bednarski für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Durch das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine Anregungen konnte ich viele Einblicke in die Wissenschaft gewinnen sowie neue Methoden erlernen und ausprobieren. Für Fragen und Diskussionen stand er dabei jederzeit und geduldig zur Verfügung.

Mein weiterer Dank gilt:

Professor Dr. B. Wünsch, Dr. Frauke Weber und Dr. Stefanie Brune für die Zusammenarbeit am Sigma-Rezeptor-Projekt, den konstruktiven Besprechungen und Diskussionsrunden in Greifswald, verbunden mit den Besuchen in der Fischerhütte

Besonders danke ich Frauke für die verlässliche Nachsynthese der Liganden

Frau Dr. R. Grünert für die Einführung in Zellkulturtechniken, die stete Unterstützung und die vielen Gespräche

Dr. Aron Westendorf, für die Aufnahme in den Arbeits- und Kollegenkreis, die Einführungen im Labor sowie die gute Arbeitsatmosphäre in Raum 313

Frau Dr. A. Bodtke für die Aufnahme der LC/MS-Spektren, Frau R. Stober für das Autoklavieren der Zelllabormaterialien sowie G. Schuster und A. Schüttler für die Herstellung der Pufferlösungen und den vielen Sachen, die einfach so nebenbei anfielen sowie Frau S. Ewert für die vielen Bestellungen

Professor Dr. C. Ritter und seinem Arbeitskreis für die Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und Bereitstellung des Durchflusszytometers

Dr. Thomas Emmrich für seine Geduld und die vielen Hilfestellungen und Tipps, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Dr. G. Radau, Dr. A. Bodtke, Dr. T. Emmrich, Frau B. Rüger, Ulrike Schulz und Nicole Rüger für die gute ASA-II-Zusammenarbeit und die Unterstützung am Ende meiner Promotionszeit

Dr. Magdalena Buczkowska für die netten Gespräche und die Süßigkeiten im ersten Jahr

Riad Schulz für die zahlreichen Diskussionen über Durchflusszytometrie, Western Blot und Statistik

Anne Kruse für die nette Aufnahme in Greifswald und die TC- und Greys Anatomy-Abende

Stefanie Perfahl für die Mittagessen außerhalb der Mensa, die BVB-Abende, die Verpflegung und Unterhaltungen während der Heimfahrten und allen weiteren Aktivitäten

allen Spielern der wöchentlichen Badminton-Sessions

Felix Wilde für die Hilfe bei Abbildungen

meinen Korrekturlesern

Ulrike Schulz, Dr. Marcus Freitag, Khattab El Gaglab, Heidi & Christian Lemmerhirt, Katja Beese und Nicole Rüger und Steven „Stevie“ Behnisch für die zahlreichen Stunden in der Teeküche und den Grillabenden im Sommer und Winter

den Surfmädels Anne und Lena

Björn für die Unterstützung besonders während der Schreibphase

sowie meiner Familie und Freunden für ihre (telefonische) Unterstützung, der Motivation aus der Ferne und ihrem Verständnis.