

Antitumorigene Effekte eines  
Thia-analogen Indirubin-N-Glykosids  
auf Melanom- und Plattenepithel-  
karzinomzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

am Institut der Biowissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von: Franziska Wendt

---

**Gutachter:**

Prof. Dr. Burkhard Hinz, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. Inna Sokolova, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Prof. Dr. Christoph Ritter, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Institut für Pharmazie

**Jahr der Einreichung:** 2023

**Jahr der Verteidigung:** 2023

---

Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „ONKTHER-H“ angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-0002/18). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.



**EUROPÄISCHE UNION**  
Europäischer Sozialfonds



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER  
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	Hautkrebs.....	6
1.2	Angiogenese .....	7
1.3	Autophagie.....	8
1.4	Formen des regulierten Zelltodes .....	8
1.5	Hämoxygenase-Signalweg .....	12
1.6	Indirubin und seine Derivate .....	15
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1	Material .....	18
3.2	Methoden .....	18
3.2.1	Allgemein .....	18
3.2.2	(Sub-)Kultivierung der Hautkrebs-Zellen.....	18
3.2.3	Subkultivierung der HUVEC-Zellen.....	19
3.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	19
3.2.5	Kryokonservierung .....	19
3.2.6	Stimulation von adhärenen Zellen.....	19
3.2.7	Viabilitäts- und Proliferationsanalysen .....	20
3.2.8	Caspase-Aktivität .....	21
3.2.9	Proteinexpressionsanalysen .....	21
3.2.9.1	Isolation von gesamtzellulären Proteinen.....	21
3.2.9.2	Isolation mitochondrialer und zytosolischer Proteine .....	21
3.2.9.3	Analyse der Proteinkonzentration .....	22
3.2.9.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	22
3.2.9.5	Western Blot .....	23
3.2.10	Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR.....	24
3.2.11	Elektronenmikroskopie .....	27
3.2.12	Seahorse-Analysen .....	27
3.2.13	Durchflusszytometrie.....	29
3.2.13.1	Zellzyklusanalysen mit Propidiumiodid.....	29
3.2.13.2	Apoptosenachweis mittels Annexin V und Propidiumiodidfärbung .....	29
3.2.13.3	Nachweis des oxidativen Stresses durch CellROX™ green staining .....	30
3.2.14	Nachweis von Tubulogenese mittels tube formation-Assay.....	30
3.2.15	Statistik.....	31
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
4.1	Einfluss des Indirubin-N-Glykosids KD87 auf die Viabilität und Proliferation von Melanom- und Plattenepithelkarzinomzellen .....	32
4.2	Einfluss von KD87 auf diverse Apoptosemerkmale .....	34

---

4.3	Untersuchung einer möglichen KD87-induzierten Autophagie .....	37
4.4	Einfluss von KD87 auf den Ceramid-Signalweg .....	39
4.5	Elektronenmikroskopische Analysen .....	39
4.6	Charakteristika der KD87-vermittelten Induktion von HO-1 .....	41
4.7	Effekt von KD87 auf die mitochondriale Atmung .....	44
4.8	Einfluss von KD87 auf weitere Zelltodmöglichkeiten .....	49
4.9	Analyse der Tubulogenese humaner Endothelzellen nach Behandlung mit KD87 konditionierten Medien .....	50
5.	<b>Diskussion</b> .....	<b>52</b>
6.	<b>Fazit</b> .....	<b>59</b>
7.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

APAF-1	<i>Apoptotic Protease-activating Factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5A	ATP-Synthase F1-Untereinheit Alpha
BCA	Bicinchoninsäure
BID	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domains</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX2	Cyclooxygenase 2
CsA	Cyclosporin A
CuPPIX	<i>Copper(II) Protoporphyrin IX</i>
CYPD	Cyclophylin D
Cyt c	Cytochrom c
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Thymidintriphosphat
ECAR	<i>Extracellular acidification rate</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
Fe <sup>2+</sup>	Eisen
FITC	Fluorescein isothiocyanate

FSC	Forward scatter
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
HCQ	Hydroxychloroquin
HO	Hämoxygenase
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MPT	<i>Mitochondrial permeability transition</i>
MPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NDUFB8	<i>Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B8</i>
NFKB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMSC	<i>Non-melanoma skin cancer</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2</i>
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i>
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI	Propidiumiodid
PPIF	Peptidylprolyl Isomerase F
PTPC	<i>Permeability transition core complex</i>
qRT-PCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

RCD	<i>Regulated cell death</i>
RIPK-1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SCC	<i>Sideward scatter</i>
SDHB	<i>Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SnPPIX	<i>Tin-protoporphyrin IX</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween®20</i>
TE	Trypsin-EDTA
UCM	Unkonditioniertes Medium
UQCRC2	<i>Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 2</i>
UV-A	Ultraviolettstrahlung A
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-Disulfonat
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zellarten der Haut und die verschiedenen Hautkrebsarten (entnommen aus [7]).	6
Abbildung 2: Überlappung der Apoptose- und Nekroptose-Signalwege.	12
Abbildung 3: Oxidativer Abbau von Häm.	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Strukturformeln von Indirubin und den in dieser Arbeit untersuchten Indirubin-Derivaten.	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der qRT-PCR.	25
Abbildung 6: Temperaturprotokoll der qRT-PCR.	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mito Stress Tests.	28
Abbildung 8: Einfluss von Indirubin-N-Glykosiden in Zeitabhängigkeit auf die metabolische Aktivität und die Zellzahl von Melanom- und Plattenepithelkarzinomzellen.	33
Abbildung 9: Proliferation und Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit KD87.	34
Abbildung 10: Einfluss von KD87 auf die Caspasenaktivierung und die Auslösung von später Apoptose/Nekrose.	35
Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Spaltung des Apoptoseproteins PARP durch KD87.	36
Abbildung 12: Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf den KD87-vermittelten Zelltod.	37
Abbildung 13: Untersuchung der möglichen KD87-vermittelten Autophagie-Induktion.	38
Abbildung 14: Analyse der Beteiligung des Ceramid-Signalweges am KD87-vermittelten Zelltod.	39
Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Untersuchung von A375- und A431-Zellen nach Behandlung mit Indirubinderivaten KD87 und KD88.	40
Abbildung 16: Einfluss von KD87 auf die HO-1 Expression auf mRNA- und Proteinebene.	42
Abbildung 17: Inhibitorversuche zur möglichen Rolle von HO-1 im KD87-vermittelten Zelltod.	43
Abbildung 18: Untersuchung einer möglichen ROS-Freisetzung nach Behandlung mit KD87.	44
Abbildung 19: Einfluss von KD87 auf die mitochondriale Sauerstoffsverbrauchsrate (OCR) und extrazelluläre Versauerungsrate (ECAR).	45
Abbildung 20: Wirkung von KD87 auf die Freisetzung von mitochondrialem Cyt c in das Zytosol.	46
Abbildung 21: Wirkung des HO-1-Inhibitors SnPPiX in Gegenwart von KD87 oder allein auf die mitochondriale und zytosolische Proteinkonzentration von HO-1.	47
Abbildung 22: Effekte von KD87 allein oder in Gegenwart von SnPPiX auf die Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe und der Freisetzung von mitochondrialem Cyt c.	49
Abbildung 23: Einfluss von CsA auf die KD87-vermittelte Reduktion der metabolischen Aktivität von A375- und A431-Zellen.	50
Abbildung 24: Einfluss von konditionierten Medien auf die Tubulogenese von HUVECs.	51

**Supplementverzeichnis**

Supplement 1: Untersuchung der Proliferation nach Behandlung mit KD88. ....	XL
Supplement 2: Untersuchung der Caspasenaktivierung nach Behandlung mit KD88. ....	XLI
Supplement 3: Einfluss von Autophagieinhibitoren auf KD87-ausgelösten Zelltod. ....	XLII
Supplement 4: Energieprofil und Zeitverläufe der OCR und ECAR nach Behandlung mit KD87. ....	XLIII
Supplement 5: Repräsentative Western Blots der Expression der Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in mitochondrialer Fraktion. ....	XLIV
Supplement 6: Einfluss von KD87 auf eine mögliche Ferroptose. ....	XLV
Supplement 7: Einfluss von KD87 auf eine mögliche Onkose oder Nekrose. ....	XLVI

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Antikörperverdünnungen für Western Blot.....	24
Tabelle 2: qPCR Reaktionsansatz.....	26
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	XXX
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	XXXIII
Tabelle 5: Kits.....	XXXIII
Tabelle 6: Zelllinien.....	XXXIV
Tabelle 7: Primäre Antikörper für Western Blot.....	XXXIV
Tabelle 8: Sekundäre Antikörper für Western Blot.....	XXXV
Tabelle 9: Genexpressionsassays.....	XXXV
Tabelle 10: Geräte.....	XXXV
Tabelle 11: Software.....	XXXVI
Tabelle 12: Zusammensetzung Lauf- und Trenngel für SDS-Page.....	XXXVII
Tabelle 13: Puffer und Lösungen.....	XXXVIII

## Zusammenfassung

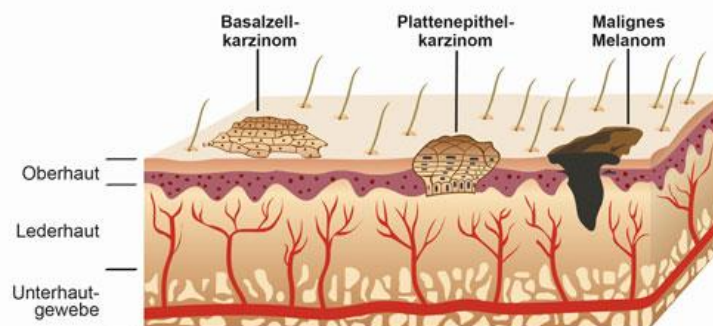
Indirubin ist seit vielen Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin von großer Bedeutung und rückt aktuell in den Fokus wissenschaftlicher Diskussionen hinsichtlich seiner antikanzerogenen Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wird auf den potenziellen Nutzen der antitumorigenen Eigenschaften neuer pharmakologisch relevanter Moleküle in Bezug auf die krankheitsassoziierten Merkmale von Hautkrebs eingegangen. Der Fokus liegt auf der Entschlüsselung des möglichen Wirkmechanismus von zwei neuartigen thia-analogen Indirubinderivaten (KD87, KD88). Zur Betrachtung der möglichen Antitumoraktivität wurden verschiedene Parameter in in vitro Analysen bezüglich der Tumorzell-Viabilität, -Proliferation, -Autophagie, -Apoptose und -Angiogenese mit Schwerpunkt auf der Rolle der Hämoxygenase-1 (HO-1) untersucht. Als Modellzelllinien der anstehenden Untersuchungen dienten eine Melanom (A375)- und eine Plattenepithelzellkarzinomzelllinie (A431).

In beiden Zelllinien wies das N-glykosylierte Indirubinderivat KD87 – im Gegensatz zur nicht-glykosylierten Verbindung KD88 – eine starke Toxizität auf und induzierte sowohl die Caspaseaktivität als auch einen Zellzyklusarrest. Elektronenmikroskopische Untersuchungen beider Zelllinien zeigten ein Anschwellen der Mitochondrien sowie einen Verlust der Cristae-Strukturen. In weiteren Untersuchungen zur möglichen Schädigung der Mitochondrien konnte erstmals unter Einsatz von Seahorse-Analysen nachgewiesen werden, dass ein Indirubinderivat über eine Schädigung des mitochondrialen Stoffwechsels den Zelltod auslöst. Mittels Inhibitorversuchen wurde eine kausale Involvierung der Hämoxygenase-1 in die durch KD87 verursachte Senkung der metabolischen Aktivität beider Zelllinien gezeigt. Zudem konnten antiangiogene Eigenschaften der Substanz KD87 nachgewiesen werden. Zusammenfassend liefern die gewonnenen Daten dieser Arbeit wichtige neue Erkenntnisse über die möglichen grundlegenden zellulären und molekularen Wirkmechanismen des Indirubinderivats KD87 auf Hautkrebszellen, wobei verschiedene neue Aspekte der tumorhemmenden Wirkung von KD87 identifiziert wurden. Somit bilden die Ergebnisse die Grundlage für weitere Untersuchungen der Wirkung von KD87 und anderen thia-analogen Indirubinderivaten auf Hautkrebszellen.

## 1. Einleitung

### 1.1 Hautkrebs

Hautkrebs gehört zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen weltweit und umfasst im Wesentlichen drei Tumorkategorien: kutanes Melanom, Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom (s. Abbildung 1) [1,2]. Die zwei letztgenannten werden unter dem Begriff nicht-melanozytärer Hautkrebs (*non-melanoma skin cancer*, NMSC) zusammengefasst. Das Basalzellkarzinom ist die am weitesten verbreitete maligne Erkrankung der Welt und macht etwa 77 % aller NMSC-Erkrankungen aus [3]. Allein in den USA treten jedes Jahr etwa 4 Millionen neue Fälle auf. Aufgrund einer niedrigen Sterblichkeitsrate (< 1 % [4]) wird diese Art von Hautkrebs in vielen Krebsregistern nicht erfasst [5]. Plattenepithelkarzinome (*squamous cell carcinoma*, SCC) sind nach Angaben der globalen Krebsbeobachtungsstelle (GLOBOCAN) in 2020 für über eine Million aller neuen Krebserkrankungen weltweit verantwortlich gewesen, was etwa 20 % aller Hautkrebserkrankungen entspricht [3]. Somit zählen SCC zu den Krebsarten, die am häufigsten metastasieren [6]. SCC entstehen zumeist in chronisch sonnenexponierten Arealen der Haut, wachsen bei Nichtbehandlung in das Gewebe hinein und zerstören es [7].



**Abbildung 1: Zellarten der Haut und die verschiedenen Hautkrebsarten (entnommen aus [7]).**

Bei dem kutanen (auch: maligne) Melanom handelt es sich um eine Neoplasie der pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten [8]. Das kutane Melanom macht etwa 2 % aller Hautkrebserkrankungen aus, besitzt allerdings die höchste Mortalitätsrate unter den Hautkrebserkrankungen [9]. Laut GLOBOCAN wurden im Jahr 2020 ca. 320.000 neue Fälle von kutanen Melanomen mit etwa 57.000 Todesfällen gemeldet [3,10]. Die 5-Jahres-Überlebensrate für das maligne Melanom liegt bei 93 %, wobei zwischen Primärerkrankungen und Erkrankungen mit Metastasierungen unterschieden werden muss [11]. Die Früherkennung der Erkrankung ist von großer Bedeutung [12]. Als Risikofaktoren von Hautkrebserkrankungen gelten ein heller Hauttyp und UV-Strahlung, vorrangig UV-A, aus natürlichen, aber auch künstlichen Quellen [9,13]. Ebenso

spielen Kombinationen aus umweltbedingten, genetischen und phänotypischen Faktoren eine Rolle [14]. Präventivmaßnahmen zur Vermeidung einer Erkrankung sind die regelmäßige Nutzung von (Sonnen-)Creme mit Lichtschutzfaktor, Meidung der (Mittags-) Sonne, das Bedecken der Haut durch Kleidung und generell eine Verminderung der Exposition mit UV-Strahlung [9]. Die Therapieoptionen und Erfolgchancen der Behandlung sind abhängig vom Stadium der Krankheit, in welchem die Diagnose gestellt wird [15]. Für das Plattenepithelkarzinom im Frühstadium ist die Standardtherapie eine chirurgische Entfernung des Tumors. Ist eine Operation nicht möglich, gibt es Alternativen, wie z.B. Kryotherapie, lokale Immuntherapie, Chemotherapie oder Strahlentherapie [16]. Die klassische Chemotherapie des malignen Melanoms kann zu erheblichen Nebenwirkungen führen, u.a. Zerstörung von Knochenmarksgewebe und Haarausfall [17], sodass heute als Erstlinientherapien verschiedene Optionen zielgerichteter und immunologischer Behandlungen, mit z.B. Checkpoint-Inhibitoren wie Nivolumab oder Ipilimumab, bevorzugt werden [12,17–19]. Die zunehmende Weiterentwicklung zielgerichteter Therapieoptionen spiegelt sich im Anstieg der Überlebensraten wider [20]. Durch die Verbesserung der Behandlungsstrategien sank die Mortalitätsrate des malignen Melanoms der Haut zwischen 2014 und 2018 um 5,7 % [11]. Die Wirksamkeit dieser Therapien wird jedoch durch krebsspezifische Reaktivität, Resistenzentwicklung und Toxizität eingeschränkt [21,22]. Folglich besteht ein stetiger Bedarf an neuen verbesserten Therapieoptionen.

## 1.2 Angiogenese

Die normale Funktion des Gewebes hängt mit einer ausreichenden Sauerstoffversorgung zusammen [23]. Dafür wird durch Angiogenese das im Rahmen der Vaskulogenese geformte primitive vaskuläre Netzwerk zu einem hierarchisch geordneten mikrovaskulären Transportsystem umgebaut. Hierbei interagieren Endothel- und glatte Muskelzellen, um neue Blutgefäße zu bilden. Aber auch Hypoxie, Entzündungsreaktionen, oxidativer Stress und weitere Faktoren können zur Entstehung neuer Blutgefäße führen [23]. Bei diesem Prozess kann zwischen zwei Arten der Angiogenese unterschieden werden: Sprossende und nicht-sprossende Angiogenese [24]. Die nicht sprossende Angiogenese bezeichnet den Vorgang der Spaltung bereits bestehender Gefäße in Längsrichtung durch Umorganisation von Endothelzellen [24]. Bei der sprossenden Angiogenese migrieren Endothelzellen in den Extrazellularraum und formieren sich zu Röhrrchen (sog. *tube formation*). Diese Röhrrchen bilden das neue Gefäßlumen [24]. Für physiologische Prozesse bei Erwachsenen tritt die Angiogenese z.B. während der Wundheilung oder dem weiblichen Zyklus auf [25]. Eine verstärkte Neovaskularisierung tritt bei verschiedenen Krankheitsbildern, z.B. rheumatoider Arthritis, Psoriasis und der Tumorentwicklung, auf [26]. Bereits ab einem Durchmesser von 1 – 2 mm benötigt ein Tumor Gefäßanschluss, um weiter wachsen zu können [27]. Ohne den Ab- und Antransport von toxischen Metaboliten, Sauerstoff sowie Nährstoffen entstünde im Zentrum des Tumors ein nekrotischer Bereich [27]. Tumor-induziert gebildete Gefäßstrukturen erscheinen im Vergleich abnormal sowie chaotisch im Aufbau [23].

### 1.3 Autophagie

Stehen dem Organismus nur begrenzte Ressourcen zur Verfügung, beginnen die Zellen Makromoleküle abzubauen und für die Synthese von lebenswichtigen Bestandteilen und Energie zu verwerten [28,29]. Hierbei wird von Autophagie gesprochen, einem hochkonserviertem Überlebensmechanismus in eukaryotischen Zellen. Autophagie bezeichnet in erster Linie die adaptive Reaktion von Zellen auf ungünstige Umweltbedingungen, wie z.B. Hunger [29]. Die durch Stoffwechselstörungen oder Nährstoffentzug ausgelöste Autophagie findet unselektiv statt. Hingegen kann Autophagie unter bestimmten Bedingungen, wie für die Beseitigung beschädigter Strukturen, zum Schutz der Zelle selektiv wirken [29]. Zu diesen Strukturen zählen fehlgefaltete oder aggregierte Proteine, aber auch beschädigte Organellen, wie z.B. Peroxisomen, das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien [30]. Obwohl Autophagie eine zytoprotektive Rolle erfüllt, kann diese unter bestimmten Bedingungen auch als Treiber der Apoptose wirken [29]. Sowohl Autophagie als auch Apoptose unterstehen gemeinsamen wechselseitig regulatorischen Mechanismen. So kann Autophagie Apoptose negativ regulieren, indem spezifisch (proapoptotische) Proteine abgebaut werden [31,32]. Gleichsam kann eine exzessive Autophagie in Autosis umschlagen, einer Form eines nicht-apoptotischen Zelltods [33]. Als Nachweis für die autophagische Aktivität von Zellen wird das Mikrotubuli-assoziierte Protein LC3-I/II genutzt [34]. Während der Autophagie nehmen Autophagosomen zytoplasmatische Komponenten auf. Dabei wird die zytosolische Form von LC3-I an Phosphatidylethanolamin konjugiert, um das LC3-Konjugat LC3-II zu bilden [34]. Dieses rekrutiert an die autophagosomale Membran, wo es in einem späteren Schritt durch lysosomale Hydrolasen abgebaut wird. Somit stellt der lysosomale Umsatz zu LC3-II einen quantitativen Marker der autophagischen Aktivität der Zelle dar [34].

### 1.4 Formen des regulierten Zelltodes

Neben dem zufälligen und spontan eintretendem Zelltod, der das Resultat starker äußerer Umwelteinflüsse wie Hitze, Scherkräfte, Drücken ist [35], besitzen Eukaryonten Systeme, die das Absterben von Zellen bei nicht behebbaren Störungen der Homöostase regeln [20,36,37]. Letztere sind von der Aktivierung festgelegter Signalwege abhängig und können somit durch pharmakologische oder genetische Interventionen moduliert werden [38]. Kann der Stress auf zellulärer Ebene nicht beseitigt werden, wird der regulierte Zelltod (*regulated cell death*, RCD) als Sicherheitsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase aktiviert [38]. Zu diesen Mechanismen gehört auch die RCD-Variante des programmierten Zelltods. Hierbei handelt es sich um ein vorbestimmtes Ereignis im Leben der Zelle als Teil der postembryonalen Entwicklung [35]. Neben dieser Form des Zelltodes sind derzeit weitere programmierte Formen bekannt, darunter Apoptose, Nekroptose und durch mitochondrialen Permeabilitätsübergang (*mitochondrial permeability transition*, MPT) gesteuerte Nekrose oder Apoptose.

Der Begriff Apoptose wurde erstmalig 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben und stellt die elementare Form des programmierten Zelltods dar [39]. Auf physiologischer Ebene tritt Apoptose während der Entwicklung und Alterung als Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer gesunden Zellpopulation im Gewebe auf [40]. Zusätzlich wirkt Apoptose auch als Abwehrmechanismus, etwa bei Immunreaktionen oder wenn Zellschädigungen durch Krankheit oder toxische Stoffe auftreten [40]. Je nach Zelltyp ist ein anderes Maß an Schädigung für den Zelltod notwendig [41]. Die Apoptose erhält die Integrität der Zellmembran und erfolgt Caspase-abhängig [42,43]. Durch Aussenden apoptotischer Signale wird die Zelle durch Phagozyten erkannt und eliminiert [42]. Zu den morphologischen Veränderungen während der Apoptose zählen u.a. Zellschrumpfen, Pyknosis, Chromatinkondensation und Einschluss von Zellfragmenten unter Bildung von Apoptosekörpern [39]. Diese Veränderungen sind sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch nachweisbar [44]. Bisher sind drei verschiedene Signalwege bekannt, die einen apoptotischen Zelltod auslösen können: der intrinsische (mitochondriale), der extrinsische (*death receptor*) und der Perforin/Granzym Signalweg [40].

Der intrinsische Signalweg der Apoptose (s. Abbildung 2), auch bekannt als mitochondriale Apoptose [45], kann sowohl durch positive als auch negative Signale induziert werden [40]. Negative Signale zeichnen sich durch die Abwesenheit von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen aus, die unter normalen Umständen pro-apoptotische Moleküle inhibieren. Wird die Zelle reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Hypoxie, Strahlung oder Toxinen ausgesetzt, induziert dies intrinsische Apoptosewege [46]. Hierbei oligomerisieren zwei Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, BAX und BAK-1, in die äußere Membran der Mitochondrien [47]. Es kommt zur Veränderung der Membranpermeabilität und zur Bildung einer mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP) [47]. Durch MPTP können mitochondriale Faktoren, darunter Cytochrom c (Cyt c), in das Zytosol freigesetzt werden [48] und kleine Moleküle in die Mitochondrien eindringen [49]. Demnach ist die strukturelle Veränderung der äußeren Mitochondrienmembran ein wichtiger Schritt in der Signaltransduktion der intrinsischen Apoptose [47]. Die Bindung des freigesetzten Cyt c an den *apoptotic protease-activating factor 1* (APAF-1) bedingt eine Konformitätsänderung, durch die eine Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomäne zugänglich wird. An dieser Domäne kommt es zur Bindung von Desoxy Adenosintri-phosphat (dATP), was zu einer weiteren Konformitätsänderung führt. Es kommt zum Zusammenschluss mehrerer APAF-1 Moleküle zu einem sogenannten Apoptosom [50]. Das Apoptosom enthält in seinem offenen Zentrum mehrere freigelegte *caspase activation and recruitment domains* (CARD-Domänen), die in der Lage sind, Procaspase-9-Proteine zu rekrutieren und aktivieren. Die Caspase-9-Enzyme sind in der Lage, die Exekutionscaspase-3 zu aktivieren, welche wiederum in ihrer aktivierten Form die Apoptose antreiben kann [48]. Die aktivierte Form der Caspase-3 ist wiederum verantwortlich für verschiedene biochemische, immunologische und



morphologische Merkmale, darunter die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche und DNA-Fragmentierung [38]. Zudem erfolgt der durch Caspasen vermittelte Zelltod durch die Spaltung von für das Überleben essenziellen Schlüsselproteinen wie z.B. *(ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-1). Im physiologischen Kontext spielt PARP-1 eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden als Reaktion auf verschiedene zelluläre Stressfaktoren [51]. Die Spaltung von PARP-1 durch Caspasen führt zur Bildung von zwei spezifischen Fragmenten: einem 89 kDa katalytischen Fragment und einem 24 kDa Fragment mit einer DNA-bindenden Domäne. Die Spaltung von PARP-1 und der Nachweis des katalytisch aktiven Fragments ist entsprechend ein Apoptosemarker [51].

Ebenso führt der MPTP zu einer sofortigen Dissipation des mitochondrialen Transmembranpotenzials (MOMP, *mitochondrial outer membrane potential*), osmotischer Schwellung der mitochondrialen Matrix und Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen [38,52].

Eine Möglichkeit, die Faktoren des Zellstoffwechsels zu messen, bietet der Seahorse-XFe-Analyzer. Dieser misst in Echtzeit sowohl die Sauerstoffverbrauchsrate als auch die extrazelluläre Versauerungsrate von lebenden Zellen. Somit wird eine parallele Analyse der mitochondrialen Respiration und Glykolyse ermöglicht. Dies wiederum ermöglicht Aussagen zu oxidativer Phosphorylierung, Glykolyse und Substratverbrauch zu treffen. Durch Zugabe verschiedener Substrate und Inhibitoren während der Messung kann deren Einfluss auf die mitochondriale Respiration der Zellen unmittelbar gemessen werden.

Der extrinsische Signalweg, auch bekannt als Todesrezeptor-Signalweg (*death receptors*), wird durch die Bindung von Todesliganden (*death ligands*) an Todesrezeptoren aktiviert (s. Abbildung 2) [53]. Diese Bindung ruft eine Konformitätsänderung des Rezeptors auf der inneren Zellmembranseite hervor, wodurch Procaspase-8-Protein rekrutiert und aktiviert werden kann. Caspase-8 kann wiederum das Procaspase-3-Protein aktivieren und somit Apoptose auslösen [53]. Abhängig von der zytosolischen Verfügbarkeit des *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP), einem Caspase-3/7-inhibierendem Protein, ist die Aktivierung der Caspase-3 durch Caspase-8 stark auf die Caspase-8-vermittelte proteolytische Spaltung von *BH3 interacting domain death agonist* (BID) angewiesen [49].

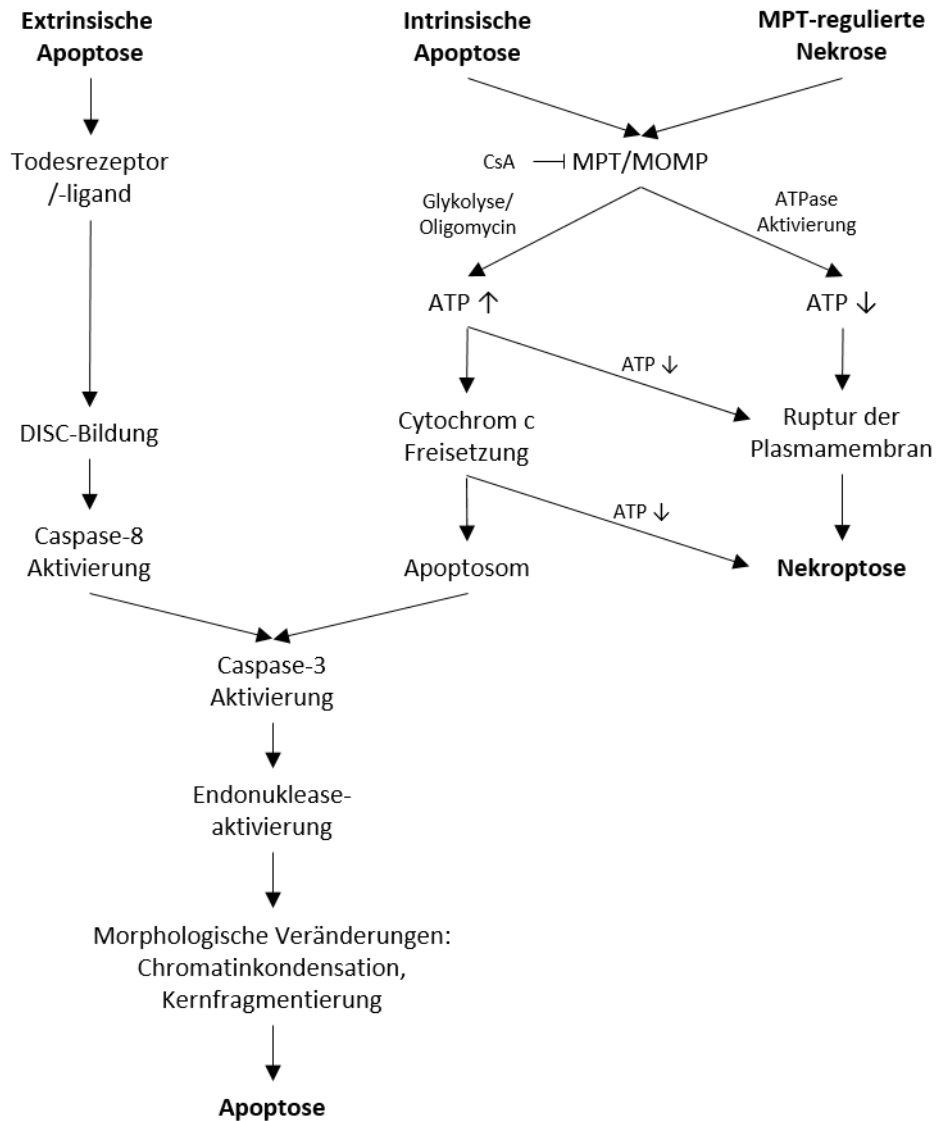
Eine Alternative zur Apoptose ist die Nekrose, ein toxischer Prozess, bei welchem die Zelle energieunabhängig und nicht programmiert stirbt [40]. Morphologische Merkmale der Nekrose umfassen Karyolyse, Zellschwellung, Vakuolen im Zytoplasma, kondensierte, geschwollene oder rupturierte Mitochondrien sowie Lysosomen und die Ablösung von Ribosomen [40]. Final folgt der Verlust der Membranintegrität; es kommt zur Freisetzung von zytoplasmatischen Inhalten und zur Provokation einer Immunantwort [40]. Die Signalwege, die zu regulierter Nekrose, auch Nekroptose genannt, führen, überschneiden sich zum Teil mit den molekularen Kaskaden, die Apoptose kontrollieren und exekutieren (s. Abbildung 2) [54]. Bei der Nekroptose handelt es sich um eine

Subform des Zelltodes, die einen nekrotischen Morphotyp aufweist, jedoch durch bestimmte genetische oder pharmakologische Interventionen ausgelöst wird [52,55]. So ist die Auslösung der Nekroptose abhängig von der Aktivierung des *RIPK-1-like protein receptor-interacting protein kinase-3* (RIPK3) und der Pseudokinase *mixed lineage kinase domain-like* (MLKL) [38] und lässt sich durch den Einsatz des zielgerichteten RIP-1-Inhibitors Necrostatin-1 verzögern [38]. Dieser Effekt ist jedoch davon abhängig, dass Nekroptose einzig über RIPK-1 vermittelt wird. Interessanterweise konnte Nekroptose in Zellen ohne Mitochondrien nachgewiesen werden [56], was darauf schließen lässt, dass Nekroptose auch Mitochondrien-unabhängig stattfinden kann [38]. Abhängig von der Dauer und Intensität des toxischen Stimulus oder Stress kann Apoptose in Nekrose und *vice versa* umschlagen (s. Abbildung 2). So gibt es Signaltransduktoren, die von beiden Zelltodwegen genutzt werden und negative Rückkopplungsschleifen, in denen eine Zelltodform eine andere inhibiert (Zusammenfassung siehe Review [55]). Dies geschieht u.a. in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Caspasen und intrazellulärem ATP [57,58].

Im Vergleich zu dem Verlust von MOMP beschreibt MPT einen Anstieg in der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran. Dieser kann sowohl reguliert als auch unreguliert ausgelöst werden [59]. Eine Konformationsänderung des Multiproteinkomplexes (*permeability transition pore complex*, PTPC) zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran sorgt für den Verlust des Membranpotentials, die osmotische Schädigung der Organellen und die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung [59–61]. Es kommt zu einem Abfall der ATP-Verfügbarkeit. Die strukturelle Zusammensetzung des PTPC befindet sich derzeit noch in Aufklärung. Bislang konnte ein Schlüsselprotein identifiziert werden, die Peptidylprolyl-Isomerase F (PPIF, auch bekannt als CYPD) [62]. Sowohl in Zellen ohne CYPD als auch unter Einsatz des chemischen CYPD-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) konnte die MPT-regulierte Nekrose verzögert werden [35].

Eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und Signalübertragung übernehmen Ceramide. Diese induzieren nachweislich Apoptose in verschiedenen Krebsarten und bilden in der Haut die oberste (Schutz-)Schicht der Epidermis [63]. Die Ceramidsynthese findet entweder durch Hydrolyse von Sphingolipiden über Sphingomyelinase oder *de novo* über Serin-Palmitoyltransferase, 3-Ketosphinganin-Reduktase und Ceramid-Synthasen statt [64,65]. Hier haben Ceramide Auswirkungen auf p53, einem wichtigen Merkmal der Apoptose [66]. Weiterhin sind Ceramide in der Lage sowohl Genexpressionen von z.B. Cyclooxygenase-2 (COX-2) [67] als auch Enzyme und Transkriptionsfaktoren zu regulieren [63], die mit der Apoptose in Verbindung stehen. Darüber hinaus kann die Interaktion von Ceramiden und LC3 zu einem autophagischen Zelltod führen. Bei diesem werden Autophagosomen an die Mitochondrien rekrutiert werden und Mitophagie, eine selektive Degradierung der Mitochondrien durch Autophagie, ausgelöst [68,69]. Im unreguliert ausgelösten Modus durch Induktoren wie ROS, Thiol-reaktive Substanzen, Oxidanzien und chemische

Substanzen in hohen Konzentrationen, kommt es zu einer unstrukturierten Fehlfaltung der PTPC-Proteine, wodurch Inhibitoren wirkungslos werden [59].

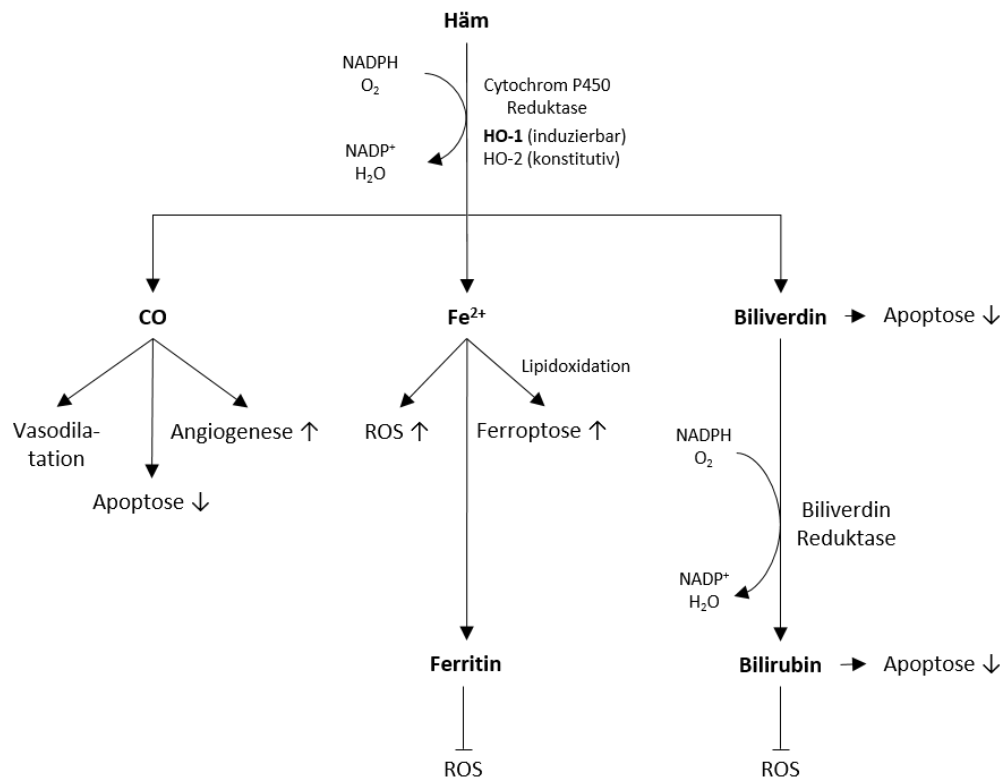


**Abbildung 2: Überlappung der Apoptose- und Nekroptose-Signalwege.** Das Gleichgewicht zwischen ATP-Verfügbarkeit und mitochondrialen Permeabilitätsübergang (MPT) bzw. mitochondrialer Permeabilisierung der äußeren Membran (MOMP) ist entscheidend für die Art des Zelltods. (adaptiert nach [40,52,59]). CsA Cyclosporin A

### 1.5 Hämoxygenase-Signalweg

Das Hämoxygenase (HO)-System ist Hauptakteur des zellulären Häm-Stoffwechsels, bei welchem Häm zu Bilirubin, CO und Fe<sup>2+</sup> verstoffwechselt wird [70]. In den letzten Jahren wurde dem HO-System im Zusammenhang mit der Entstehung und Entwicklung von Krebs erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt [71].

Derzeit sind zwei Isoformen der Hämoxigenase beim Menschen bekannt: HO-1 und HO-2 [72,73]. Eine weitere Isoform, HO-3, konnte bisher nur in der Ratte nachgewiesen werden [74]. Während HO-2 auf Basalniveau exprimiert wird [73], kann HO-1 durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden [72]. Hierzu zählen u.a. oxidativer Stress, Zytokine, Prostaglandine und Häm [75]. Die Regulation von HO-1 erfolgt primär auf transkriptioneller Ebene [76]. Aufgrund der potenziell zytoprotektiven Eigenschaften von HO-1, ist es nicht verwunderlich, dass bei einer Vielzahl an Krebsarten, wie z.B. Blasenkrebs [77], Lungenkrebs [78], Melanom [79] und Glioblastoma [80], die Expression von HO-1 hochreguliert ist. Die enzymatisch aktive Form von HO-1 ist 32 kDa groß und nach der Synthese vorrangig an der glatten Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert [81,82]. Gleichsam kann HO-1 auch in Caveolae, den Mitochondrien und dem Zellkern nachgewiesen werden, wohin es unter Stress und pathologischen Bedingungen transportiert wird [83–85]. In den Mitochondrien beeinflusst HO-1 die mitochondriale Biogenese und Dynamik, erhöht den  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt und die ROS-Bildung [86]. Somit kann mitochondrial gerichtetes HO-1 eine mitochondriale Dysfunktion hervorrufen [87]. Im Zellkern finden sich neben der vollständigen auch die verkürzte Form t-HO-1, wobei diese die Expression der Gene reguliert, die an der Angiogenese und der Bildung von antiapoptotischen Proteinen, anti-oxidativen Enzymen sowie an Metastasenbildung und mitochondrialer Biogenese beteiligt sind [86]. Beim Abbau von Häm durch Hämoxigenasen (s. Abbildung 3) [86] bildet HO-1 mit Häm und Cytochrom-P450 einen Komplex, bei dem NADPH unter Zuhilfenahme von molekularem Sauerstoff als Elektronendonator dient [88]. Das entstandene Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase in Bilirubin umgewandelt. Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin wirken antioxidativ, indem sie ROS neutralisieren [86]. Kohlenmonoxid (CO), ein weiteres Produkt des Häm-Abbaus, spielt bei der Vasodilatation von Blutgefäßen eine Rolle und induziert die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen [86]. Weiterhin induziert CO die Bildung antiapoptotischer Faktoren und fördert die Angiogenese [86]. Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) besitzt eine prooxidative Aktivität, indem es mittels Fenton-Reaktion die ROS-Bildung induziert [86]. Durch die Aktivierung von HO-1 und die darauffolgende Expression von Ferritin kann dies abgefangen werden [86].



**Abbildung 3: Oxidativer Abbau von Häm.** An die ER-Membran gebundenes HO-1 interagiert mit dem Elektronendonator NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase und einem Sauerstoffmolekül und baut Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und zweiwertigem Eisen (Fe<sup>2+</sup>) ab. Die NADPH-Biliverdin-Reduktase reduziert Biliverdin zu Bilirubin, indem sie NADPH als Elektronendonator verwendet. Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin wirken u.a. antiapoptotisch und anti-oxidativ indem sie ROS abfangen oder neutralisieren (adaptiert nach [86,88]).

Seit Entdeckung der HO-1-Induzierbarkeit im Jahre 1986 [72] wurden die zugrunde liegenden Mechanismen und potenziellen Auslöser der HO-1 Expression bereits mehrfach untersucht und in zusammenfassenden Arbeiten umfassend dargestellt [88–91]. Als Induktoren der HO-1-Expression gelten endogene und exogene Substanzen, die zellulären Schaden oder oxidativen Stress verursachen, wie z.B. Metalloporphyrine (u.a. Häm), Schwermetalle, Lipidperoxidasen, Zytokine, Wachstumsfaktoren und ROS, sowie Hypoxie und UV-A-Strahlung.

Die Transkription von *HMOX1*, dem Gen, das für HO-1 kodiert, wird durch verschiedene stressabhängige Transkriptionsfaktoren eng reguliert. Zu diesen zählen Hitzeschockfaktoren, der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB), der *nuclear factor erythroid 2* (Nrf2) und das Aktivator-Protein 1 (AP-1) [91]. In gesundem Gewebe ist die Induktion von HO-1 eine zytoprotektive Maßnahme, um die Zelle bei einem Anstieg von z.B. ROS zu schützen [92].

In schnell proliferierenden (Krebs-)Zellen ist HO-1 häufig hochreguliert [93] und nimmt Einfluss auf die Zellzyklusregulation [94]. Diese Effekte sind zelltypspezifisch und können in verschiedenen

Gewebe gegenläufig sein. So führte eine erhöhte HO-1-Expression in Melanomzellen zur Proliferation [95], während die Hemmung der HO-1-Enzymaktivität durch Einsatz von Zinnprotoporphyrin IX (SnPPIX) diesen proliferationsfördernden Effekt umkehrte [94,95]. Im Gegensatz hierzu ist HO-1 u.a. in glatten Muskelzellen ein negativer Regulator des Wachstums. Hier verringerte die Hochregulation von HO-1 die Zellproliferation, während die Hemmung von HO-1 die antiproliferative Wirkung aufhob [96].

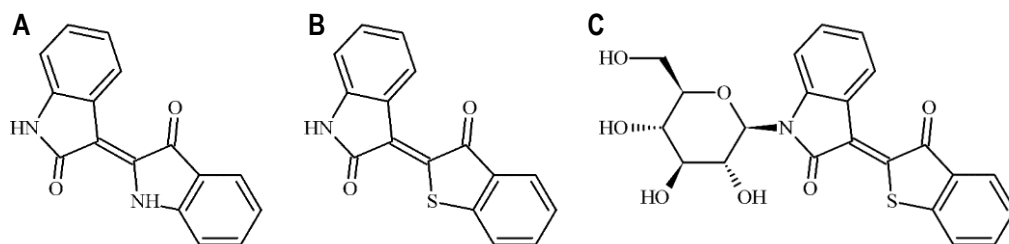
Die proliferativen Effekte von HO-1 können mit dessen antioxidativer Potenz in Verbindung gebracht werden, da ROS in vielen Zelltypen Apoptose auslöst [97]. Darüber hinaus wurden Substrate des HO-Signalweges, wie Bilirubin und Biliverdin, als antiapoptotische Mediatoren in Darmkrebszellen nachgewiesen [98]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CO sowohl die Freisetzung von mitochondrialem Cyt c inhibiert als auch die Expression des Onkoproteins p53 hemmt [94].

Neben seinen zytoprotektiven Eigenschaften wurde HO-1 in Endothelzellen als proangiogenes Enzym beschrieben, dessen Abwesenheit mit einer verminderten *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Expression einhergeht [99]. Folglich führte die Hochregulation des HO-1-Gens *HMOX1* zur Produktion von VEGF, welches wiederum Proliferation, Migration und *tube formation* begünstigt [100]. VEGF-stimulierende Effekte durch HO-1 konnten ebenfalls in glatten Muskelzellen und Keratinozyten nachgewiesen werden [96,101]. Zudem konnte in neueren Studien zu Apoptose [102–104] und Mitophagie [105] gezeigt werden, dass die pharmakologische Induktion von HO-1 eine proapoptotische Wirkung ausübt.

## 1.6 Indirubin und seine Derivate

Danggui Longhui Wan, eine Kräutermischung der traditionellen chinesischen Medizin, wird eingesetzt, um verschiedene chronische Krankheiten zu behandeln [106]. Ein aktiver Bestandteil der Kräutermischung ist Qing Dai (lat. Indigo naturalis). Die Wirkung von Qing Dai wird dem rot gefärbten Indirubin (3,2'-Bisindol) zugesprochen, einem Isomer des blauen 2,2'-Bisindol-Indigo [106,107]. Aufgrund seines geringen Molekulargewichtes von 262,26 g/mol zählt Indirubin zu den *small molecules*, einer heterogenen Gruppe organischer Verbindungen mit einem maximalen Molekulargewicht von 900 g/mol [108]. Etwa 90 % aller Pharmaka sind *small molecules* [109]. Abhängig von der Substanzgruppe sind *small molecules* in der Lage resorbiert zu werden oder in die Zelle einzudringen und auf molekulare Signalwege einzuwirken [110]. So auch Indirubin, welches in klinischen Versuchen eine krebshemmende Wirkung bei chronisch-myeloischer und chronisch-granulozytärer Leukämie gezeigt hat [111,112]. Für das zellpermeable Indirubin-3'-Monoxim und dessen Derivate konnten eine Vielzahl intrazellulärer Proteine als mögliche Ziele der Antitumor-Aktivität identifiziert werden. Hierzu zählen z.B. Cyclin-abhängige Kinasen, die Glykogensynthase- $\beta$  sowie der Signaltransduktor und Aktivator der Transkription-3 [106,113–116]. Ausgehend von der erstmaligen Isolierung der N-Glykoside von Indirubin aus dem terrestrischen *Streptomyces sp.* GW

48/1497 [117] wurden eine Reihe von Indirubin-N-Glykosiden [118] und thia-analogen Indirubin-N-Glykosiden [119,120] synthetisiert, die sich als antiproliferativ und zytotoxisch gegen verschiedene Tumorzelllinien erwiesen. Dabei zeigten Indirubin-N-Glykoside eine höhere antiproliferative Aktivität auf MCF-7-Brustkrebszellen [118] als nicht-glykosyliertes Indirubin [121]. Bereits 2010 wurde in einer ersten Arbeit die Zytotoxizität von thia-analogen Indirubin-N-Glykosiden an verschiedenen Melanomzelllinien untersucht [120]. Die verschiedenen thia-analogen Indirubinderivate zeigten hierbei eine antiproliferative und apoptotische Wirkung in den getesteten Zelllinien. Hinsichtlich der Wirkung von Indirubinen auf den Tumorzelltod wurde neben Induktion von Apoptose wiederholt auf die Beteiligung mitochondrialer Prozesse hingewiesen [116,119,122,123].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Strukturformeln von Indirubin und den in dieser Arbeit untersuchten Indirubin-Derivaten.** A Indirubin. B KD88: 3-[3'-Oxo-Benzo[ $\beta$ ]thiophen-2'-(Z)-yliden]-oxindol. C KD87: 3-[3'-Oxo-Benzo[ $\beta$ ]thiophen-2'-(Z)-yliden]-1-( $\beta$ -D-Glukopyranosyl)-oxindol.

## 2. Zielsetzung

Indirubin ist seit vielen Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin von großer Bedeutung und erhält stetig mehr Aufmerksamkeit in Bezug auf seine antikanzerogene Wirkung. Insbesondere Indirubinderivate mit potenziell verbesserten Löslichkeits- und Wirkeigenschaften sind derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Wirkmechanismus von zwei neuartigen thia-analogen Indirubinderivaten (KD87, KD88) zu analysieren und in den aktuellen Kontext der Hautkrebstherapie zu setzen. Zur Betrachtung der möglichen Antitumoraktivität wurden verschiedene Ebenen der Tumorentwicklung wie die metabolische Tumorzell-Aktivität sowie Tumorzell-Proliferation, -Autophagie, -Apoptose und -Angiogenese untersucht. Als mechanistischer Schwerpunkt wurde hierbei die funktionelle Rolle einer Indirubin-induzierten HO-1-Hochregulation untersucht. Als Modellzelllinien der durchgeführten Untersuchungen wurden eine Melanom- (A375) und eine Plattenepithelzellkarzinomzelllinie (A431) verwendet. Hierbei wurde eine potenzielle Indirubin-induzierte HO-1-Expression zunächst auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Diese Regulation wurde schließlich hinsichtlich ihres Mechanismus und auf funktioneller Ebene mit Hilfe von entsprechenden Inhibitoren untersucht. Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde mittels Durchflusszytometrie und in Viabilitätsassays unter Verwendung des Glutathion-Vorläufers N-Acetylcystein (NAC) analysiert. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf Experimenten zur Wirkung von Indirubinen auf die Funktionalität von Mitochondrien.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen der Auswirkungen von KD87 und anderen thia-analogen Indirubinderivaten auf Hautkrebszellen. Darüber hinaus können die Ergebnisse dieser Arbeit die bestehenden Erkenntnisse über die antitumorigenen Eigenschaften von KD87 ergänzen.



### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1 Material**

Alle im experimentellen und auswertenden Teil dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, Materialien, Geräte und Software sowie die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen wurden in tabellarischer Form aufgelistet und dem Anhang dieser Arbeit beigelegt.

#### **3.2 Methoden**

##### **3.2.1 Allgemein**

Die Melanomzelllinie A375 als auch die Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 wurden in DMEM (Glukosegehalt 4,5 mg/ml, GlutaMAX™-Zusatz, Pyruvat), ergänzt mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötales Kälberserum (FCS) in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> (T75) in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wurden in speziellem Endothelzellmedium (*Endothelial Cell Growth Medium Kit*) kultiviert.

##### **3.2.2 (Sub-)Kultivierung der Hautkrebs-Zellen**

Zur Kultivierung wurde ein Kryokonservierungsröhrchen mit kryokonservierten A375- bzw. A431-Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension sofort in eine TC75-Flasche mit 12 ml vorgewärmtem DMEM GlutaMAX™ überführt. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches, ebenfalls vorgewärmtes DMEM GlutaMAX™ ausgetauscht. Dabei wurden Reste des Kryokonservierungsmediums (DMEM GlutaMAX™, 10 % DMSO (v/v)) sowie nicht haftende, abgestorbene Zellen entfernt. Die Subkultivierung der Zellen (A375 und A431) erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80-90 %. Es wurde zunächst der Überstand abgesaugt und der Zellrasen mit vorgewärmten PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden ca. 3 ml 1X Trypsin-EDTA (TE) auf die Zellen gegeben und für 3-5 min im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst. Die Aktivität des 1X TE wurde mit 7 ml DMEM GlutaMAX™ abgestoppt und die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen durch Zentrifugation (5 min, 200 × g) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml DMEM GlutaMAX™ resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. 3.2.4) wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 0,5 – 1 × 10<sup>6</sup> Zellen pro Zellkulturflasche ausgesät. Eine Passagierung der Zellen erfolgte alle 3-5 Tage.

### 3.2.3 Subkultivierung der HUVEC-Zellen

Grundsätzlich erfolgte die Passagierung der HUVECs nach dem Protokoll aus Abschnitt 3.2.2. Anstelle von DMEM GlutaMAX™ wurde das *Endothelial Cell Growth Medium Kit* (PromoCell) verwendet.

### 3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zellauszählgerät (LUNA-II™). Als Vorbereitung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt und 10 µl dieser Suspension auf einen Zählobjektträger gegeben. Trypanblau ist ein von o-Toluidin abgeleiteter Azofarbstoff, der durch defekte Zellmembranen in die Zellen gelangt. Gefärbte Zellen gelten daher als tot. Im Gegensatz dazu sind lebensfähige Zellen nicht mit Trypanblau anzufärben. Zellen mit einer Größe von 10–30 µm wurden automatisch gezählt und auf ihre Lebensfähigkeit untersucht.

### 3.2.5 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung erleichtert die langfristige Lagerung von Zellen. Zu diesem Zweck wurden subkonfluente Zellmonolayer geerntet und die Zellzahl wie oben beschrieben ermittelt. Nach einer zusätzlichen Zentrifugation (200 × g, 5 min) wurde das Zellpellet in dem Kryokonservierungsmedium (DMEM GlutaMAX™ 10 % DMSO (v/v)) mit einer Enddichte von  $1 \times 10^6$  lebensfähigen Zellen pro ml resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1.5 ml pro Kryokonservierungsfläschchen in einem Gefrierbehälter bei -80 °C über Nacht gelagert. Der spezielle Gefrierbehälter, der mit vorgekühltem (-20 °C) Isopropanol gefüllt war, ermöglichte eine kontrollierte Absenkung der Temperatur um 1 °C pro min. Am nächsten Tag wurden die Fläschchen zur Langzeitlagerung bei -196 °C in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

### 3.2.6 Stimulation von adhärennten Zellen

Die Zellkulturexperimente wurden in Zellkulturplatten verschiedener Formate durchgeführt. Proliferations- und Viabilitätsanalysen (s. 3.2.7) wurden im 96-well-Format mit 5.000 Zellen/100 µl/well durchgeführt. Die Aussaat zur Gewinnung konditionierter Medien für *tube formation*-Assays (s. 3.2.14) wurde im 24-well Format (100.000 Zellen/500 µl/well) durchgeführt. Für die Analyse der Protein- und mRNA-Expressionen und die Durchflusszytometrie-Experimente (s. 3.2.9, 3.2.10, 0) wurden die Experimente im 6-well-Format mit 200.000 Zellen/ml/well durchgeführt.

Für die Aussaat der Zellen wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst (s. 3.2.2) und anschließend die Zellzahl und Lebensfähigkeit, wie unter Abschnitt 3.2.4 beschrieben, analysiert. Die abgelösten Zellen wurden in den entsprechenden Volumina DMEM GlutaMAX™ resuspendiert, in die Vertiefungen der Zellkulturplatte übertragen und 24 Stunden lang in befeuchteter Atmosphäre (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen vor der Behandlung mit den

Testsubstanzen lichtmikroskopisch auf Konfluenz und Lebensfähigkeit untersucht. Anschließend wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Alle Inkubationen wurden in serumfreien Zellkulturmedium (0 %-DMEM GlutaMAX™) durchgeführt. Bei Ko-Inkubationsexperimenten wurde zusätzlich eine einstündige Vorinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in 0 %-DMEM GlutaMAX™ weiter verdünnt. Die endgültige DMSO-Konzentration in den Inkubaten betrug 1 % (v/v). Die Substanzen SnPPIX und NAC wurden nicht in DMSO gelöst, daher sind die Vehikel für SnPPIX in den Inkubaten zusätzlich 0,1 % (v/v) Natriumhydroxidlösung (NaOH, 1 M), respektive für N-Acetylcystein (NAC) zusätzlich 0,1 % (v/v) PBS.

### **3.2.7 Viabilitäts- und Proliferationsanalysen**

Die metabolische Aktivität, als ein Maß der Viabilität der Zellen, kann mittels eines indirekten Verfahrens, dem WST-1-Test, bestimmt werden. Hierbei wird das wasserlösliche WST-1-Reagenz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) durch mitochondriale Dehydrogenasen im Rahmen der metabolischen Zellaktivität zu löslichem Formazan-Farbstoff umgesetzt. Die Menge des gebildeten Farbstoffes korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur. Das Reagenz WST-1 wurde nach der entsprechenden Inkubationszeit in einer Endverdünnung von 1:10 zugegeben und die Zellen für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert bevor der Farbumschlag mittels photometrischer Analyse mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (450/690 nm) quantifiziert wurde.

Für die indirekte Quantifizierung der viablen Zellzahl wurden die Zellen über Nacht mit eiskaltem 100 %igem Ethanol fixiert, bevor sie 30 min lang mit Kristallviolett-Färbelösung (0,1 % (w/v) Kristallviolett in 10 % (v/v) Ethanol) inkubiert wurden. Nach gründlichem Abwaschen des überschüssigen Farbstoffs und anschließenden Trocknen der Zellen wurde der in den Zellen verbliebene Farbstoff mit 10 % (v/v) Essigsäure gelöst und die Farbstoffintensität mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (570 nm) gemessen.

Zur Untersuchung der Proliferation wurde Bromdesoxyuridin (BrdU) verwendet. BrdU ist ein synthetisches Nukleosid, das ein Analogon zu Thymidin bzw. Desoxyuridin ist. BrdU entsteht durch die Verbindung von Desoxyribose und der Nukleinbase 5-Bromuracil und wird zur diagnostischen Markierung von proliferierenden Zellen in vitalen Geweben verwendet [124]. BrdU wird von den Zellen aufgenommen und anschließend in seiner phosphorylierten Form in neu synthetisierte DNA integriert, wodurch das Nukleotid Desoxythymidintriphosphat (dTTP) ersetzt wird. Somit korreliert die BrdU-Markierung von Zellen direkt mit der Geschwindigkeit der DNA-Synthese während der Synthese-(S-)Phase des Zellzyklus. Mit Antikörpern, die gegen BrdU gerichtet sind, kann die inkorporierte Chemikalie nachgewiesen werden, was auf sich aktiv replizierende Zellen hinweist. Die

für die Antikörpermarkierung erforderliche Öffnung der Zellmembranen und Denaturierung der DNA wird durch Säurezugabe erreicht.

A375- und A431-Zellen wurden in 96-well-Platten und mit den entsprechenden Testsubstanzen über 48 Stunden behandelt. 24 Stunden vor der Analyse wurden 10  $\mu$ M BrdU-Reagenz zugegeben. Die Auswirkungen der Testsubstanzen auf die Proliferation von A375- und A431-Zellen wurden mit dem *BrdU Cell Proliferation enzyme-linked immunosorbent assay kit* gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifiziert. Die Absorption wurde bei 450/690 nm mit einem Mikroplattenlesegerät gemessen. Zellen, die kein BrdU-Reagenz erhalten hatten, dienten als Leerwert.

### **3.2.8 Caspase-Aktivität**

Die Analyse der Caspase-3- und -7-Aktivität wurde mit dem Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay gemäß den Anweisungen des Herstellers (Promega) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden A375- und A431-Zellen in 96-well-Platten ausgesät und mit der entsprechenden Testsubstanz für 6 oder 24 Stunden inkubiert. Das Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Reagenz wurde in gleichen Volumenanteilen gemäß den Herstellerangaben zugegeben und bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Lichtausschluss inkubiert. Die Lumineszenz wurde mit einem Mikroplattenlesegerät gemessen.

### **3.2.9 Proteinexpressionsanalysen**

#### **3.2.9.1 Isolation von gesamtzellulären Proteinen**

A375- und A431-Zellen wurden in 6-well-Platten mit den entsprechenden Testsubstanzen behandelt. Nach Abschluss der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Überstände gesammelt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1X TE abgelöst. Überstand, PBS-Waschung und abgelöste Zellen wurden vereint und durch Zentrifugation (200  $\times$  g, 4 °C) für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und erneut 5 min lang zentrifugiert (200  $\times$  g, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet mit Lysepuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 13) resuspendiert, über Nacht bei -20 °C lysiert und anschließend 5 min (20.817  $\times$  g, 4 °C) zentrifugiert. Der resultierende Überstand, der das gesamtzelluläre Protein enthält, wurde gesammelt und für die weitere Proteinanalyse aufbewahrt.

#### **3.2.9.2 Isolation mitochondrialer und zytosolischer Proteine**

A375- und A431-Zellen wurden wie bei den Experimenten zur Isolierung gesamtzellulärer Proteine ausgesät, behandelt und geerntet. Das resultierende Zellpellet wurde mit 0,9 % NaCl gewaschen (5 min, 500  $\times$  g, 4 °C). Zur Isolierung der Mitochondrien und zur Gewinnung der zytosolischen Proteinfraktion wurde das Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers für die Standardvorbereitung verwendet. Die Fraktion mit den zytosolischen Proteinen wurde gemäß Anweisung des Herstellers bei -20 °C zur weiteren Analyse gelagert. Zur Extraktion des mitochondrialen Proteins wurde die resultierende mitochondriale Fraktion mit

Lysepuffer behandelt, zentrifugiert und entsprechend Protokoll zur Isolierung des gesamten zellulären Proteins gesammelt.

### **3.2.9.3 Analyse der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) bestimmt. In einer Vertiefung einer 96-well-platte wurden 1 µl Lysat mit 9 µl Aqua ad injectabilia gemischt, was eine Endverdünnung von 1:10 ergab. Anschließend wurden 200 µl Arbeitslösung (50:1-Mischung aus Reagenz A und Reagenz B, wie im Kit enthalten) dazugegeben. Die Standards und Proben wurden in doppelter bzw. dreifacher Ausführung analysiert. Nach der Inkubation (37 °C, 30 min) wurde die Absorption bei 570 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden, unter Berücksichtigung der Probenverdünnung, anhand der Kalibrierfunktion einer Standardkurve von 0 – 1 mg/ml Rinderserumalbumin quantifiziert.

### **3.2.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden [125]. Durch die Verwendung des anionischen Detergens SDS wird die Ladung der Proteine überdeckt, was zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen führt. Proteine und SDS binden in einem Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein [126]. Sowohl die negative SDS-Ladung (verursacht Abstoßung) als auch die Erwärmung der Proben (95 °C, 10 min) führen zur Denaturierung (d. h. Linearisierung) der Proteine. Dies ermöglicht die Trennung der Proteine nach ihrer Proteinlänge, welche proportional zum Molekulargewicht ist. Große Proteine haben eine spätere Retentionszeit als kleine Proteine, was zu unterschiedlichen Migrationsmustern im Gel führt. Die SDS-PAGE wurde mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell System von BioRad durchgeführt. Für die Elektrophorese wurden Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10 % oder 15 % und Dicke von 1 mm oder 1,5 mm verwendet, um Proben mit 25 – 50 µg Gesamtprotein zu trennen. Die Proben wurden durch Mischen mit Aqua ad injectabilia auf gleiche Proteinkonzentrationen und Probenvolumina eingestellt. Der dauerhafte Abbau von Disulfidbindungen wurde durch Zugabe von 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol zu jeder Probe sichergestellt. Die Proben wurden zusätzlich mit Bromphenolblau versetzt, um die Migrationsfront sichtbar zu machen. Mittels Mikroliterspritze wurden die Proteinproben in die Taschen des Gels übertragen. Für die Größenabschätzung der Proteine wurde gleichzeitig ein vorgefärbter SDS-PAGE-Standard verwendet. Die Auftrennung im elektrischen Feld wurde in Elektrophoresepuffer bei 15 mA/Gel (Sammelgel) bzw. 25 mA/Gel (Trenngel) durchgeführt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Migrationsfront das Ende des Gels erreichte.

### 3.2.9.5 Western Blot

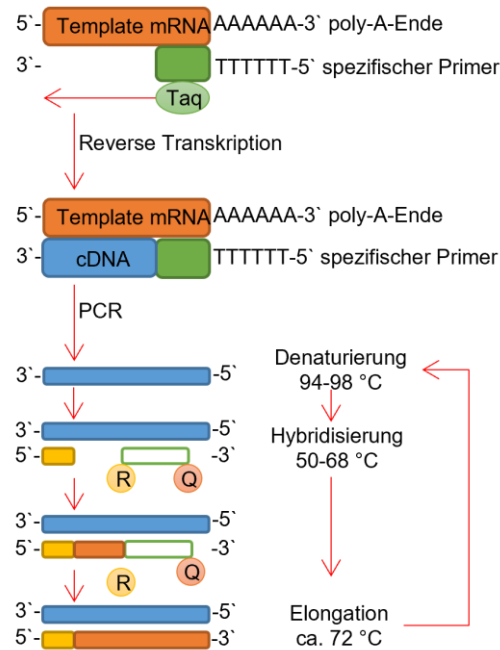
Unmittelbar im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe eines *wet*-Transfersystems auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde extradickes Blottingpapier und Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und 5 min in Transferpuffer vorinkubiert. Das Blotting-Sandwich wurde in folgenden Schichten von unten nach oben zusammengebaut: Blottingpapier - Gel - Nitrozellulosemembran - Blottingpapier. Durch vorsichtiges Rollen über jede Schicht mit einem Glasröhrchen wurden Luftblasen entfernt und das Blotting-Sandwich komprimiert. Der Transfer wurde über 70 min bei 400 mA (konstant) durchgeführt. Nach Abschluss des Transfers wurden die Membranen mittels Ponceau-Färbung auf einen erfolgreichen Übertrag der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran überprüft. Im Anschluss wurden die Membranen in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit TRIS-gepufferter Kochsalzlösung/Tween® 20 (TBS-T) gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Rollenmischer bei 30 Umdrehungen pro min durchgeführt. Die Blockierung der freien Nitrocellulose-Bindungsstellen wurde durch 1-stündige Inkubation in 5 % (v/v) Milchpulver in 1 X TBS-T sichergestellt. Die Inkubation mit den spezifischen primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Membranen mit TBS-T gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit geeigneten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Alle hier verwendeten Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Antikörperbindung wurde mittels Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) sichtbar gemacht und durch densitometrische Analyse mit der Quantity One 1-D-Analysesoftware quantifiziert. Hierfür wurden die Membranen in ein unbeleuchtetes ChemiDoc XRS-Geldokumentationssystem (Bio-Rad Laboratories) gelegt und mit 2 ml ECL-Detektionslösung bedeckt. Die Lichtemission wurde in Intervallen von bis zu 360 s (z. B. für Cyt c) oder maximal 60 s (für  $\beta$ -Aktin) detektiert, wobei die Startzeiten von der Signalstärke abhängig waren. Für die Quantifizierung wurden ausschließlich Bilder verwendet, die keine überbelichteten Signale aufwiesen. Die Expression der Proteine wurde auf GAPDH bzw.  $\beta$ -Aktin (gesamtzelluläre Proteine) oder VDAC bzw. GAPDH (mitochondriale bzw. zytosolische Proteine) normalisiert und mit den membraneigenen Vehikelkontrollen verglichen. Um eine Membran auf mehrere Proteine hin untersuchen zu können, müssen bereits eingesetzte primäre und sekundäre Antikörper entfernt bzw. inaktiviert werden. Dieser Vorgang wird allgemein als „Strippen“ bezeichnet. Dazu werden die Membranen mit 5 ml eines 1X-Stripping-Puffers für 20 min inkubiert, im Anschluss gewaschen, erneut mit 5 % Milch blockiert und anschließend mit einem anderen primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Detektion des letztgewünschten Proteins wurden die Membranen erneut gestriipt und danach mit 1 X TBS-T und deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Membranen luftgetrocknet und in Klarsichthüllen aufbewahrt.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörperverdünnungen für Western Blot**

Primärantikörper	Molekulargewicht [kDa]	Sekundärantikörper	Verdünnung	% Milch
Cytochrom c	14	rabbit	1:1000	1
VDAC	30	mouse	1:1000	1
HO-1	32	rabbit	1:1000	1
HO-2	36	rabbit	1:1000	1
GAPDH	37	rabbit	1:1000	1
β-Aktin	42	mouse	1:1000	1
PARP	116/89	rabbit	1:1000	1
LC3AB	14/16	rabbit	1:500	5
OxPhos Cocktail	54/48/29/22/18	mouse	1:1000	1
anti-rabbit IgG	-	-	1:1000	1
anti-mouse IgG	-	-	1:1000	1

### 3.2.10 Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR

Die Kombination aus reverser Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) mit anschließender Quantifizierung (q) wird als qRT-PCR bezeichnet. Diese Methode ermöglicht die In-vitro-Amplifikation von DNA mit Hilfe einer DNA-Polymerase (s. Abbildung 5) [127,128]. Die Untersuchung von Genexpressionsmustern anhand von RNA-Proben wird durch die Verwendung einer RNA-abhängigen Polymerase, auch bekannt als reverse Transkriptase, ermöglicht. Dieses Enzym transkribiert RNA in DNA. Die Ein-Schritt-RT-PCR, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurde, wurde erstmals 1990 beschrieben [129]. Bei dieser Methode wird eine hitzestabile Taq-Polymerase verwendet, was die Reaktionszeit verkürzt und zudem die Genauigkeit der Reaktion verbessert [129].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der qRT-PCR.** Die Taq-Polymerase (Taq) erkennt die zielspezifischen Primer (grün), welche an die Template mRNA (orange) binden. Mittels Reverse Transkriptase-Aktivität synthetisiert Taq cDNA (blau) und es entsteht ein mRNA:cDNA-Hybrid. Dieser Hybrid, und später auch die doppelsträngigen DNA-Fragmente, werden mittels Hitze getrennt (Denaturierung). Die Sonden und sequenzspezifischen Primer hybridisieren, abhängig von ihrer Länge, bei ca. 50–68 °C. Die Verlängerung der Primer-DNA (Elongation) erfolgt bei ca. 72 °C. Dabei wird die Sonde schrittweise durch neu synthetisierte DNA ersetzt. Durch die Trennung des Reporter-Fluorophors (R, z.B. FAM) und des Quenchers (Q) wird die hemmende Wirkung des Quenchers aufgehoben, so dass das Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden kann. Nach der Elongation beginnt der nächste, von insgesamt 40, PCR-Zyklus mit der Denaturierung der synthetisierten Produkte.

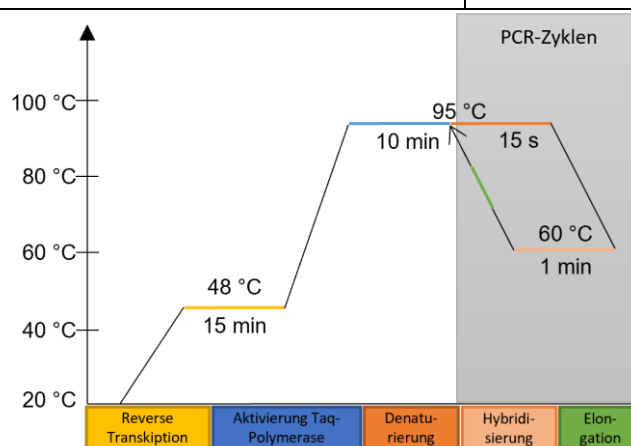
Die Anwendung von fluoreszenzmarkierten Sonden ermöglicht die Quantifizierung der amplifizierten DNA in Echtzeit. Sie wird daher als Echtzeit- oder quantitative PCR (qPCR) bezeichnet. Bei diesem Verfahren nimmt die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der PCR-Produkte zu. In diesem Projekt wurden sogenannte FAM-Sonden verwendet. Diese Sonden sind am 3'-Ende an einen Quencher und am 5'-Ende an den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) gekoppelt. Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase trennt während der DNA-Synthese die Reporter-Fluorophore von der Sonde. Der zunehmende Abstand zwischen Quencher und Fluorophoren ermöglicht die Messung der Reporter-Fluoreszenz. Dies geschieht am Ende eines jeden Elongationszyklus. Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von HO-1 und HO-2 wurden A375- und A431-Zellen analog der Bestimmung gesamtzellulärer Proteine ausgesät und behandelt. Zur Ernte der Zellen wurden die Überstände mit abtrypsinierten Zellen vereint und pelletiert (5 min, 500 × g). Das resultierende Pellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 980 µl RLT-Puffer, versetzt mit 20 µl Dithiothreitol (DTT), resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gemäß den Vorgaben des Herstellers isoliert. Die



RNA wurde in einem RNase-freien Reaktionsgefäß gesammelt, die Konzentration der RNA mittels NanoDrop ermittelt und die Proben bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die Expressionsniveaus der Ziel-mRNAs wurden mittels qRT-PCR unter Verwendung des TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step-Kits bestimmt. Primer und Sonden für humanes Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA), HO-1 und HO-2 waren TaqMan® Genexpressionsassays. Alle Experimente wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Ein RNA-Template-freier Mastermix wurde wie in Tabelle 2 aufgeführt hergestellt. Anschließend wurden 5 µl der RNA-Vorlage (500 ng) auf eine MicroAmp™-Reaktionsplatte übertragen, bevor 15 µl des Mastermixes hinzugefügt wurden. Alle Komponenten wurden lichtgeschützt und für die Zeit der Vorbereitung auf Eis gelagert. Die Reaktionsplatte wurde vor Beginn des Verfahrens mit einer optischen Klebefolie versiegelt. Die qRT-PCR wurde nach dem in Abbildung 6 dargestellten Temperaturprotokoll durchgeführt. Das Niveau der mRNA-Expression wurde durch den Vergleich der Schwellenwert-Zyklen ( $C_T$ -Werte) analysiert. Die mRNA-Spiegel von HO-1 und HO-2 wurden auf PPIA normalisiert und die Proben mit den entsprechenden Vehikelkontrollen verglichen. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert.

**Tabelle 2: qPCR Reaktionsansatz**

Komponenten für 1 Reaktionsansatz	Volumen [µl]
TaqMan® RT-PCR Mix (2X)	10
TaqMan® Genexpressionsmix (20X)	1
TaqMan® RT Enzymmix (40X)	0,5
RNase-freies Wasser	3,17
PPIA (60X)	0,33
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15</b>



**Abbildung 6: Temperaturprotokoll der qRT-PCR.** Die reverse Transkription fand bei 48 °C für 15 min statt. Im Anschluss wurde die Taq-Polymerase für 10 min bei 95 °C aktiviert, gefolgt von 40 PCR-Zyklen. DNA wurde

bei 95 °C für 10 s denaturiert und die Primer-Hybridisierung erfolgte nach Abkühlung auf 60 °C. Nach 1 min wurde die Temperatur erneut auf 95 °C erhöht. Während der Aufheizperiode fand die Elongation statt.

### **3.2.11 Elektronenmikroskopie**

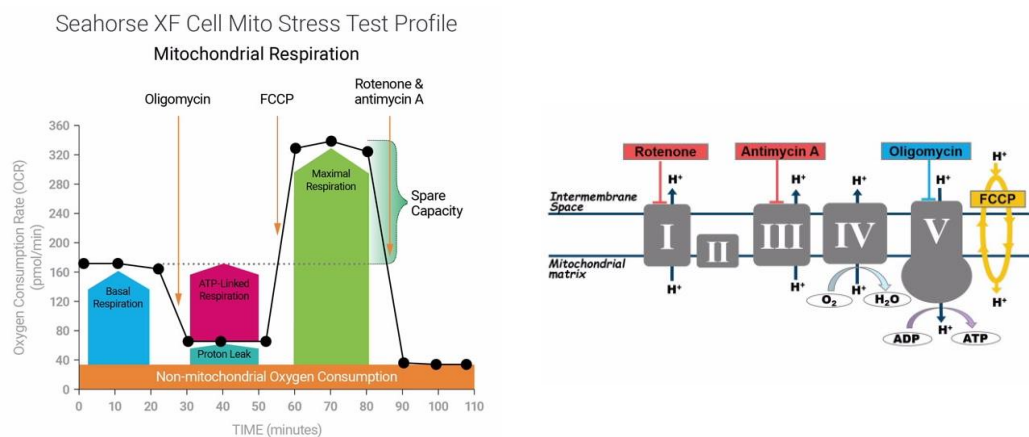
A375- und A431-Zellen wurden, wie bei den Experimenten zur gesamtzellulären Proteinisolierung kultiviert, behandelt und geerntet. Die geernteten Zellen wurden mit PBS gewaschen (5 min, 1000 × g) und im Anschluss in einer Lösung (2 % Glutaraldehyd und 1 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3) fixiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Nach zweimaligem Waschen in 0,1 M Phosphatpuffer wurden die Zellen in niedrigschmelzender Agarose in 0,05 M HEPES-Puffer bei 40 °C resuspendiert, zentrifugiert und als Pellet nach dem Aushärten der Agarose in selbiger eingeschlossen. Die Probenblöcke wurden anschließend in einer 1%igen Osmiumtetroxidlösung über 2 Stunden nachfixiert, gewaschen und in einer ansteigenden Konzentrationsreihe von Aceton dehydriert. Die Harzinfiltration wurde mit einer Inkubation aus einer 1:1-Mischung aus Aceton und Eponharz (48 % Epon 812, 30 % Methyladinsäureanhydrid, 20,7 % 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid und 1,3 % 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) begonnen, gefolgt von reinem Eponharz für 4 Stunden. Im Anschluss wurden die Probenblöcke in Silikongummiformen mit frischem Harz überführt und bei 60 °C für 2 Tage ausgehärtet. Die weitere Bearbeitung umfasste das Trimmen der Harzblöcke (Leica EM Trim2, Leica Microsystems) und das anschließende Schneiden auf einem Ultramikrotom (Ultracut S, Reichert) mit einem Diamantmesser (Diatome). Die 0,5 µm dünnen Schnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt, um die Bereiche für die ultrastrukturelle Untersuchung sichtbar zu machen und auszuwählen. Ultradünne Schnitte mit einer Dicke von etwa 50 - 70 nm wurden auf Kupfergitter übertragen und mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt, bevor sie mit einem Zeiss EM902 Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV (Carl Zeiss) untersucht wurden. Digitale Bilder wurden mit einer seitlich montierten 1x2k FT-CCD-Kamera (Proscan) unter Verwendung der iTEM-Kamerasteuerung und Bildgebungssoftware (Olympus Soft Imaging Solutions) aufgenommen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen (Abbildung 16) wurden am Elektronenmikroskopischen Zentrum, Universitätsmedizin Rostock erstellt und unserem Institut anschließend zur Verfügung gestellt. Die Quantifizierung der geschädigten Mitochondrien erfolgte visuell anhand der zur Verfügung gestellten Bilder. Zu diesem Zweck wurden die Unversehrtheit der Mitochondrienmembran, der Grad der Schwellung und die Intaktheit der Cristae-Struktur untersucht. Dargestellt wurde die Gesamtanzahl aller (geschädigter) Mitochondrien bezogen auf die Gesamtanzahl analysierter Mitochondrien.

### **3.2.12 Seahorse-Analysen**

Die mitochondriale Atmung und die Glykolyse, zwei Wege zur Energieerzeugung, beinhalten den zellulären Verbrauch von Sauerstoff bzw. den Ausfluss von Protonen. Mittels markierungsfreier

Sensoren misst der Seahorse XFe24 Analyzer (Agilent Technologies, Inc.) extrazelluläre Veränderungen der Proben. Hierdurch sind Rückschlüsse auf die Zellatmung, Glykolyse und ATP-Produktion möglich. Die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR) und der extrazellulären Versauerungsrate (*extracellular acidification rate*, ECAR) erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Hierfür wurden A375- und A431-Zellen auf speziellen Seahorse 24XFe-Platten in einer Dichte von 25.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und 24 Stunden lang in DMEM GlutaMAX™ inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen 24 Stunden lang in 0 %-DMEM GlutaMAX™ mit KD87 behandelt. Zu Beginn der Seahorse XFe-Analyse wurde das Medium auf ungepuffertes XF-Basismedium, pH 7,4, ergänzt mit 10 mM Glukose, 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat, gewechselt und für 1 Stunde inkubiert. Die Substanzen aus dem Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit wurden den Ports in den Endkonzentrationen gemäß den Anweisungen des Herstellers zugesetzt (Port A: 1,5 µM Oligomycin, Port B: 2,5 µM FCCP für A375-Zellen, 1,0 µM FCCP für A431-Zellen und Port C: 0,5 µM Rotenon und 0,5 µM Antimycin A). OCR und ECAR pro Vertiefung wurden auf die nach dem Experiment ermittelte Proteinmenge normiert. Zu diesem Zweck wurden 10 µl Lysepuffer pro Vertiefung hinzugefügt und die Lysate gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde wie bereits beschrieben mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit bestimmt (s. 3.2.9.3). Die Berechnung der Basalatmung (*basal respiration*), der auf der ATP-Produktion basierenden Atmung (*ATP-linked respiration*), der Reservekapazität (*spare capacity*) und des Protonenlecks (*proton leak*) erfolgte mit dem Seahorse XF Cell Mito Stress Test Report Generator (Agilent Technologies, Inc.).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mito Stress Tests.** (links) Typisches Verlaufprofil einer Mito Stress Test Messung nach Zugabe von Oligomycin, FCCP, Rotenone/AntimycinA zu den jeweiligen Zeit- und Messpunkten. (rechts) Schematische Darstellung der durch die Inhibitoren und Aktivatoren beeinflussten Atmungskettenkomplexe. Oligomycin inhibiert Komplex V. FCCP schaltet den Elektronengradienten aus und Rotenon/AntimycinA inhibieren die Komplexe I und III. Abbildung entnommen aus [130].

### **3.2.13 Durchflusszytometrie**

#### **3.2.13.1 Zellzyklusanalysen mit Propidiumiodid**

Die Zellzyklusanalyse wurde mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt. Bei PI handelt es sich um einen membranundurchlässigen DNA-Farbstoff, sodass die Zellen zunächst fixiert werden müssen, um die Zellmembran für den Farbstoff permeabel zu machen. Die Färbung mit PI ermöglicht eine Aussage über den DNA-Gehalt der Zelle und die jeweilige Teilungsphase, G1/G0, S-Phase oder G2/M. Hierzu wurden A375- und A431-Zellen wie bereits beschrieben im 6-well-Format ausgesät und behandelt. Nach der Behandlung wurden die schwimmenden Zellen gesammelt und mit den adhären Zellen kombiniert, die durch Ablösen mit Accutase™ geerntet worden sind. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (400 × g, 5 min, 4 °C) pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl doppelt-destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert und durch Zugabe von 700 µl 100 %igem Ethanol über Nacht fixiert. Für die DNA-Färbung wurden die Zellen erneut pelletiert (Zentrifugation bei 1000 × g, 5 min) und mit PBS gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und mit RNase (Endkonzentration 100 µg/ml) bei 37 °C für 20 min inkubiert. PI (Endkonzentration 50 µg/ml) wurde unter Ausschluss von Licht zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Proben mit 50.000 Ereignissen pro Probe mit einem AccuriC6™ Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert.

#### **3.2.13.2 Apoptosenachweis mittels Annexin V und Propidiumiodidfärbung**

Der durchflusszytometrische Nachweis der Apoptose erfolgte unter Verwendung eines Fluorescein-Isocyanat (FITC)-Annexin-V-Apoptose-Detektionskits gemäß den Anweisungen des Herstellers (BD Biosciences). Während der Apoptose durchlaufen die Zellen bestimmte morphologische Veränderungen, wie den Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran, die Schrumpfung der Zelle und die Kondensation von Zytoplasma und Zellkern. Annexin V ist ein phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, das auf der Außenseite apoptotischer, aber nicht viabler Zellen freiliegt. Da sowohl Apoptose als auch Nekrose zum Verlust der Membranintegrität von Zellen führen, ermöglicht die gleichzeitige Färbung mit PI lediglich die Unterscheidung zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen. Zellen, die als lebensfähig gelten, sind sowohl für FITC-Annexin V als auch für PI negativ; Zellen in früher Apoptose sind positiv für FITC-Annexin V, aber negativ für PI. Zellen in später Apoptose sind sowohl für FITC-Annexin V als auch PI positiv. Zur Probenvorbereitung wurden A375- oder A431-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, wie beschrieben behandelt und vergleichbar den Proben zur Zellzyklusanalyse geerntet. Das entstehende Zellpellet wurde anschließend in 1 ml 1X Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert. 100 µl dieser Lösung wurden dann mit 2 µl FITC-Annexin V und 1 µl PI für 15 min im Dunkeln inkubiert. 50.000 Ereignisse pro Probe wurden mit einem AccuriC6™ Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert.

### 3.2.13.3 Nachweis des oxidativen Stresses durch CellROX™ green staining

Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurde mit dem CellROX™ Durchflusszytometrie Kit (fisher scientific) die Analyse des oxidativen Stresses durchgeführt. Das CellROX™ Reagenz ist eine zellpermeable Sonde, die, wenn sie in Gegenwart von ROS oxidiert wird, an die DNA bindet und ein starkes fluorogenes Signal mit Absorptions-/Emissionsmaxima von 508/525 nm zeigt. Weiterhin kann die gleichzeitige Färbung mit SYTOX™ *red dead cell stain* eine Unterscheidung zwischen oxidativ gestressten, nicht gestressten und toten Zellen ermöglichen. Analog zu den Zellzyklusanalysen wurden A375- und A431-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und behandelt. Nach der gewünschten Behandlungsdauer wurden die Zellen geerntet und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl 0 %-DMEM GlutaMAX™ resuspendiert und die Anzahl der Zellen pro FACS-Röhrchen mittels Zellzählung (s. 3.2.4) auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Als Positivkontrolle wurde der ROS-Induktor *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP, 100 µM) genutzt, welcher unmittelbar vor der ROS-Färbung für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde CellROX™ (500 nM) zugegeben und die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wurde für weitere 15 min SYTOX™ (5 nM) zugegeben und die Zellen erneut unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels AccuriC6™ Durchflusszytometer (BD Biosciences) wurden 50.000 Ereignisse pro Probe analysiert. Ein angemessenes Gating der Zellpopulationen und eine Kompensation wurde durch die Analyse von ungefärbten bzw. einzeln gefärbten Zellen sichergestellt.

### 3.2.14 Nachweis von Tubulogenese mittels *tube formation-Assay*

Die Fähigkeit von gesunden Endothelzellen *in vitro* auf einer Polymerschicht (z.B. Matrigel®) ein kapillarähnliches Netzwerk mit geschlossenen Intersektionen (sog. *tubes*) zu bilden, ahmt das zelluläre Verhalten während der Tubulogenese nach und bildet die Grundlage des *tube-formation-Assays* [131]. Die Durchführung dieses Assays ermöglicht eine Quantifizierung des antiangiogenen Potenzials von konditionierten Medien von A375- und A431-Zellen. Zur Herstellung von konditionierten Medien wurden A375- und A431-Zellen (100.000 Zellen pro Vertiefung in 48-well Platten) über 48 Stunden mit verschiedenen Substanzen behandelt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Überstände gesammelt, schwimmende Zellen oder zelluläre Partikel abzentrifugiert ( $1000 \times g$ , 5 min) und der Überstand für eine spätere Verwendung bei -80 °C aufbewahrt oder unmittelbar im *tube-formation-Assay* eingesetzt. In Vorbereitung wurden 48-well-Platten mit 30 µl Matrigel®Matrix Basement Membran pro Vertiefung beschichtet und 1 Stunde bei 37 °C auspolymerisiert. HUVECs wurden in den gesammelten Überständen der jeweiligen Versuchsreihe resuspendiert und in einer Dichte von 50.000 Zellen pro 200 µl konditioniertem Medium in der mit Matrigel®-beschichteten Vertiefung ausgesät. Nach 2-stündiger Inkubation wurde die Anzahl der *tubes* eines mikroskopischen Sichtfelds einer Vertiefung fotografiert und ausgezählt.

### **3.2.15 Statistik**

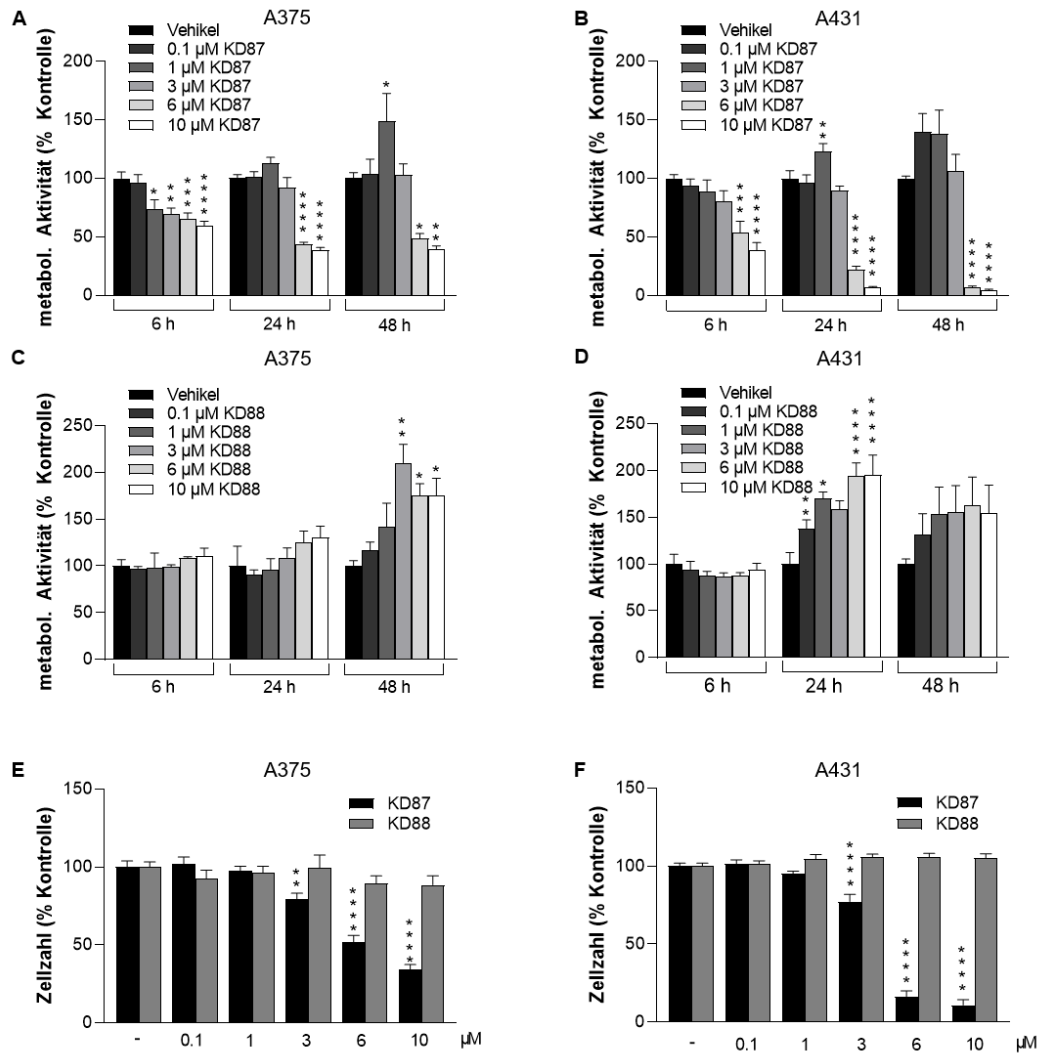
Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 7.02 oder einer neueren Version durchgeführt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test nach Student durchgeführt. Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mittels einfaktorieller (one-way) ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc- oder Dunnett Post-Hoc-Test durchgeführt.  $IC_{50}$ -Werte wurden durch nicht-lineare Regression von  $\log(\text{Inhibitor})$  vs. Reaktion unter Verwendung der kleinsten Quadrate als Anpassungsmethode in einer 4-Parameter-Berechnung mit einer variablen Steigung berechnet. Für eine vereinfachte Darstellung wurde die Bestimmung der statistischen Signifikanz auf die Gruppen, die für die jeweilige Fragestellung von Interesse waren, beschränkt. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Ab einem p-Wert  $*p < 0.05$  wurde eine Signifikanz angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss des Indirubin-N-Glykosids KD87 auf die Viabilität und Proliferation von Melanom- und Plattenepithelkarzinomzellen

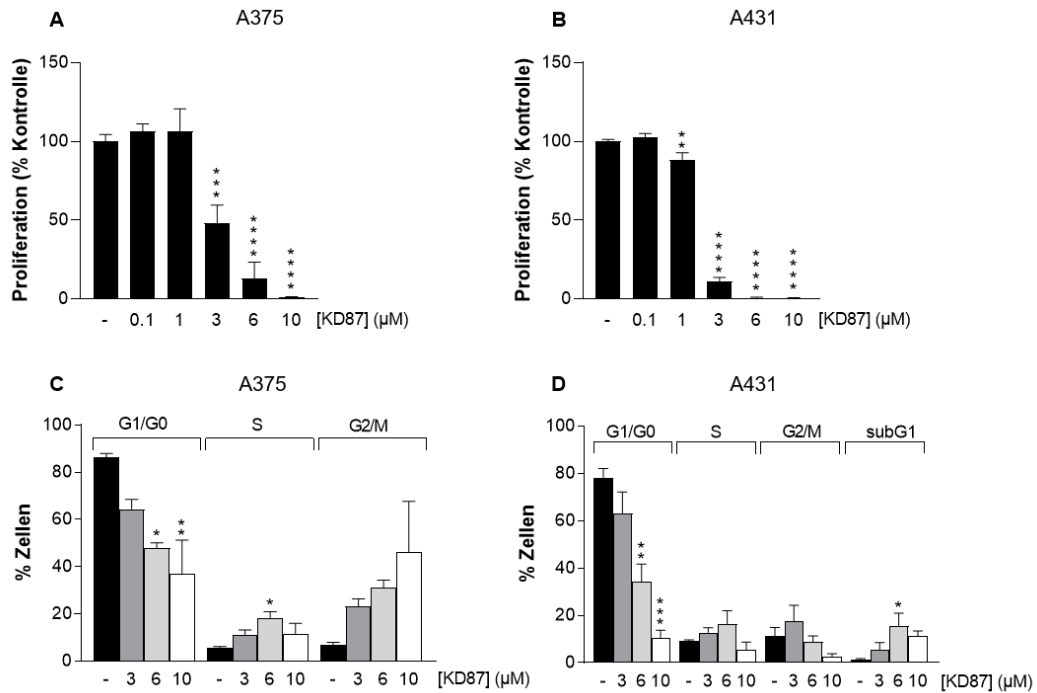
Teil der ersten Untersuchungen war es, den Einfluss der Indirubin-N-Glykoside auf die Viabilität der verwendeten Hautkrebszelllinien A375 und A431 zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen entweder über 6, 24 oder 48 Stunden mit einer ansteigenden Konzentration des jeweiligen Indirubinderivats (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) oder Vehikellösung inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay und die Viabilität mittels Kristallviolett färbung untersucht (Abbildung 8). Das glykosylierte Indirubinderivat KD87 zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität in beiden Zelllinien (Abbildung 8 A,B), nicht jedoch das nicht-glykosylierte Indirubinderivat KD88 (Abbildung 8 C,D). Bereits nach 6 Stunden Inkubationszeit konnten entsprechende zytotoxische Effekte ab 1  $\mu\text{M}$  KD87 registriert werden. Die im WST-1 nach 48 Stunden Behandlung ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte für KD87 lagen bei  $7,62 \pm 1,99 \mu\text{M}$  (A375) bzw.  $4,18 \pm 1,66 \mu\text{M}$  (A431). Die konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung von KD87 wurde durch Kristallviolett färbung in beiden Zelllinien bestätigt (Abbildung 8 E,F). Die hier ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte von KD87 auf die Lebensfähigkeit lagen bei  $4,77 \pm 1,18 \mu\text{M}$  (A375) und  $4,3 \pm 1,19 \mu\text{M}$  (A431). KD88 zeigte hingegen keine zytotoxische Wirkung in beiden Zelllinien. Weiterhin wurde das Proliferationsverhalten beider Zelllinien mittels BrdU-Elisa nach Behandlung mit KD87 (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) ermittelt. KD87 bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation (Abbildung 9 A,B). KD88 vermittelte keine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation (Supplement 1).

Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse von Propidiumiodid (PI)-gefärbten Zellen sollte der Einfluss von KD87 auf die Proliferation von Melanom- und Plattenepithelzellen näher charakterisiert werden. Beide Zelllinien wurden hierfür über 48 Stunden mit KD87 (3, 6 oder 10  $\mu\text{M}$ ) oder Vehikellösung inkubiert und anschließend entsprechend den Angaben in Kapitel 3.2.13.1 durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde eine allgemeine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch KD87 anhand einer Zunahme der S- und G2/M-Populationen nachgewiesen, wobei der genannte Effekt für 6 und 10  $\mu\text{M}$  KD87 in A375-Zellen und für 3 und 6  $\mu\text{M}$  KD87 in A431-Zellen nachgewiesen wurde (Abbildung 9 C,D). A431-Zellen zeigten zudem eine erhöhte subG1-Population für 6 und 10  $\mu\text{M}$  KD87, die charakteristisch für apoptotische Zellen ist (Abbildung 9 D) [132].



**Abbildung 8: Einfluss von Indirubin-N-Glykosiden in Zeitabhängigkeit auf die metabolische Aktivität und die Zellzahl von Melanom- und Plattenepithelkarzinomzellen.** A375- und A431-Zellen wurden für 6, 24 oder 48 Stunden mit KD87 und KD88 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die metabolische Aktivität (metabol. Aktivität) wurde mittels WST-1-Assay von (A,C) A375-Zellen und (B,D) von A431-Zellen nach Behandlung mit KD87 und KD88 zu den angegebenen Zeitpunkten und Konzentrationen ermittelt. Die in den Diagrammen (E,F) angegebenen Werte basieren auf Kristallviolett färbung lebensfähiger Zellen von A375- (E) und A431-Zellen (F) nach 48 Stunden. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (= 100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 9$  (aus 3 unabhängigen Experimenten; A,B,E,F) und  $n = 3$  (aus 1 Experiment; C,D) pro Gruppe. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.

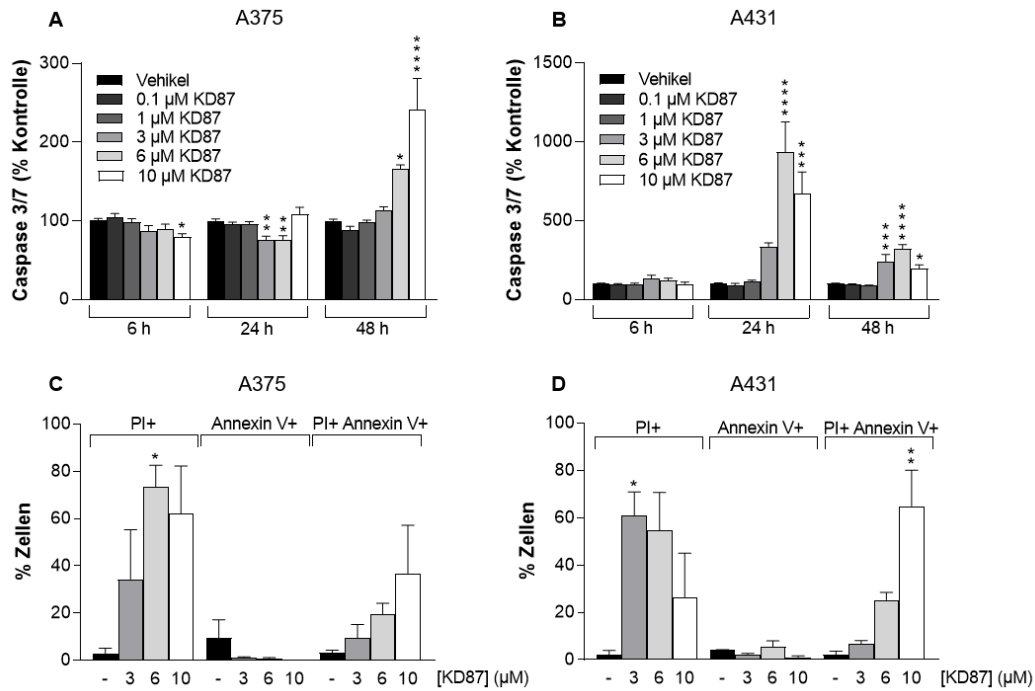




**Abbildung 9: Proliferation und Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit KD87.** A375- und A431-Zellen wurden über 48 Stunden mit Konzentrationen zwischen 0,1 – 10 µM KD87 inkubiert. Die Proliferation wurde mittels BrdU Inkorporationsassay (A,B) und der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie (C,D) für A375- (A,C) und A431- (B,D) Zellen untersucht. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 9$  (aus 3 unabhängigen Experimenten; A,B) und  $n = 3$  (aus 3 unabhängigen Experimente; C,D). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.

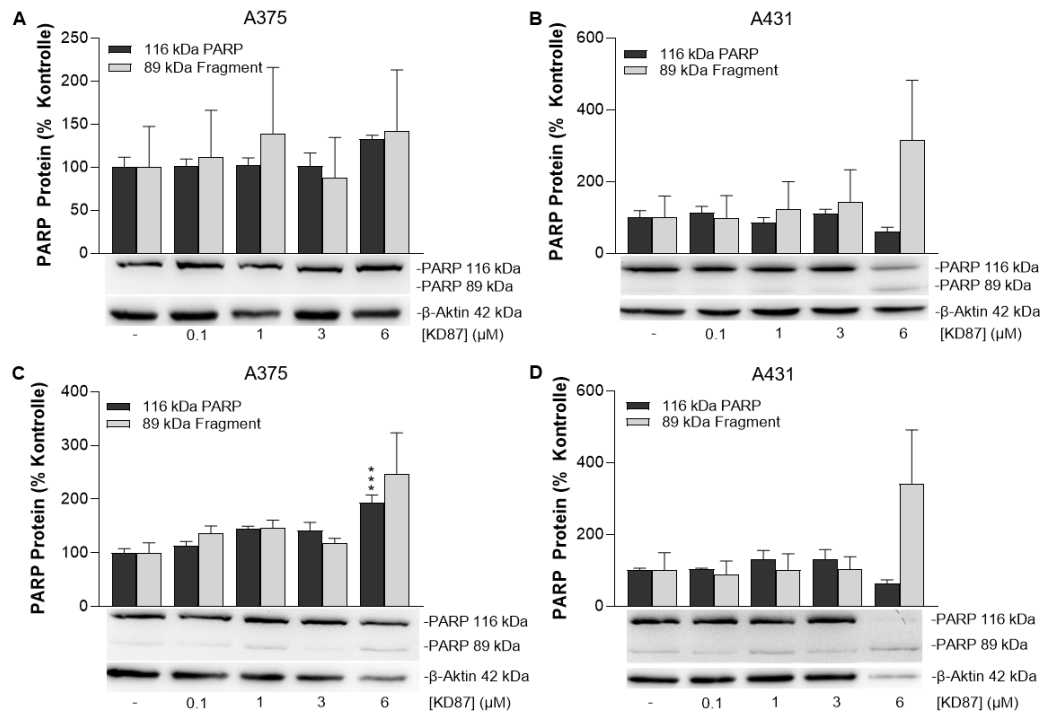
## 4.2 Einfluss von KD87 auf diverse Apoptosemerkmale

Um die Möglichkeit der Apoptoseinduktion durch einen Zellzyklusarrest näher zu untersuchen, wurde die Spaltung und damit Aktivierung der Exekutioner-Procaspasen 3 und 7 sowie des Apoptoseproteins PARP untersucht. Die Caspase-Analyse ergab eine KD87-induzierte zweifache Aktivierung der Caspase 3 und 7 in A375-Zellen (Abbildung 10 A) und eine bis zu zehnfache Caspase-Aktivierung in A431-Zellen (Abbildung 10 B). Das nicht glykosylierte KD88 induzierte ebenfalls eine Spaltung der Caspasen 3/7 (Supplement 2). Die für KD88 eingesetzten Konzentrationen lagen jedoch deutlich über den für KD87 und induzierten die Caspasen zu einem wesentlich geringeren Grad. Durchflusszytometrische Analysen beider Zelllinien nach 48 Stunden zeigten ebenfalls eine Apoptoseinduktion (Abbildung 10 C,D). Sowohl in A375- als auch in A431-Zellen induzierte KD87 konzentrationsabhängig eine Zunahme an spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen (dargestellt durch die Fraktion der PI positiven und Annexin V positiven Zellen).

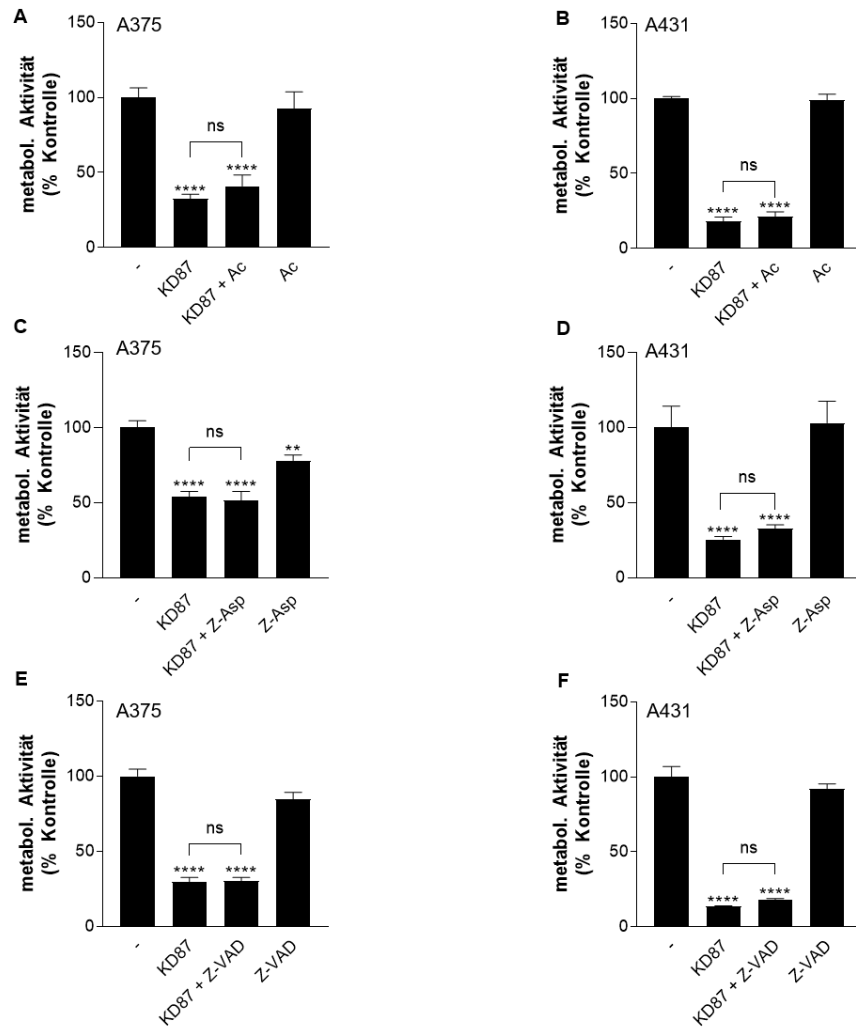


**Abbildung 10: Einfluss von KD87 auf die Caspasenaktivierung und die Auslösung von später Apoptose/Nekrose.** A375- und A431-Zellen wurden über 6 bis 72 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurde die Caspaseinduktion für A375 (A) und A431 (B) untersucht. Mittels Annexin V/PI-Kit wurde das Stadium der Apoptose für A375 (C) und A431 (D) nach 48-stündiger Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen KD87 beurteilt. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 9$  (aus 3 unabhängigen Experimenten; A,B) und  $n = 3$  (aus 3 unabhängigen Experimenten; C,D). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.

Zudem wurde ein hoher Anteil an toten Zellen (dargestellt als ausschließlich PI positive Zellen) ermittelt, der aufgrund der gezeigten Zytotoxizität von KD87 (Abbildung 10) zu erwarten war. Die durch KD87 vermittelte Apoptoseinduktion konnte auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen anhand des Nachweises des 89 kDa großen Spaltproduktes von PARP bestätigt werden (Abbildung 11). Nach sowohl 24 als auch 48 Stunden induzierte KD87 ab einer Konzentration von 6  $\mu$ M die Spaltung von PARP. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen Caspaseinduktion und Zelltod nachzuweisen, wurden Inhibitorversuche mit verschiedenen Caspasehemmern Ac-DEVD-CHO (100  $\mu$ M), Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (Z-Asp, 100  $\mu$ M) und Z-VAD-FMK (20  $\mu$ M) durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in den angegebenen Konzentrationen mit 6  $\mu$ M KD87 ko-inkubiert und nach 24 Stunden (A431) und 48 Stunden (A375) wurde die metabolische Aktivität (Abbildung 12) ermittelt. Bei keinem der eingesetzten Caspaseinhibitoren wurde eine Aufhebung der Toxizität von KD87 beobachtet.



**Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Spaltung des Apoptoseproteins PARP durch KD87.** A375- (A,C) und A431- (B,D) Zellen wurden über 24 (A,B) bzw. 48 (C,D) Stunden mit den aufsteigenden Konzentrationen KD87 oder Vehikellösung inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinexpression von PARP und seinem Spaltprodukt untersucht. Die Expressionen wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikellösung (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$ . Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.



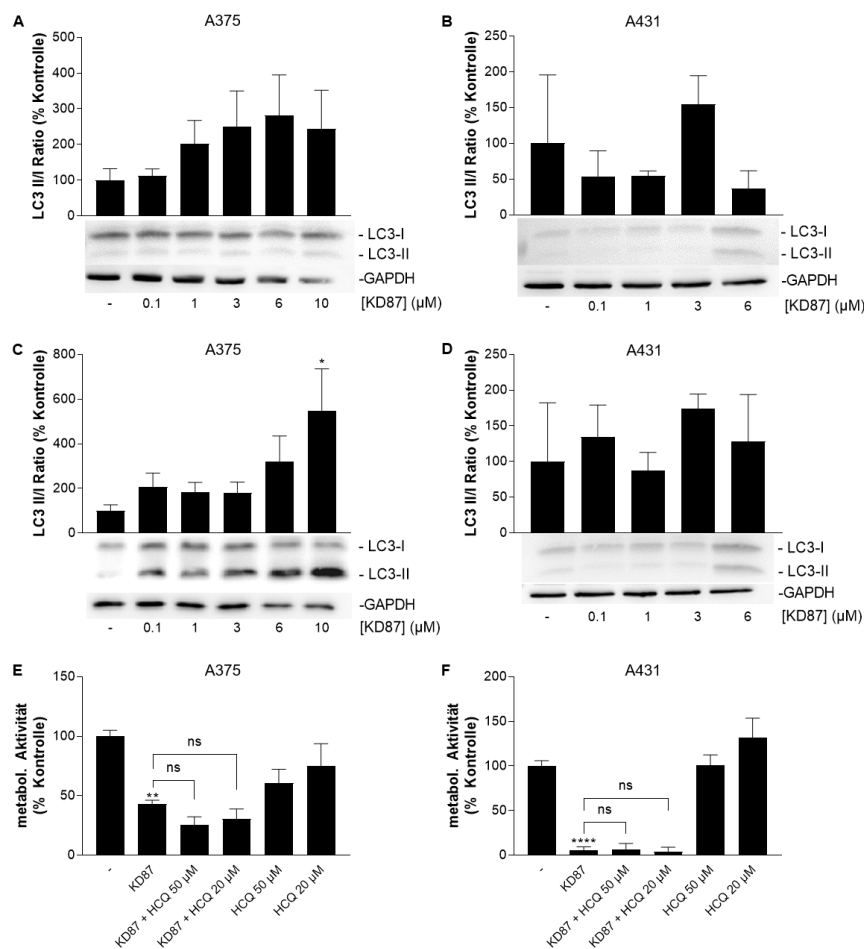
**Abbildung 12: Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf den KD87-vermittelten Zelltod.** Zellen wurden mit verschiedenen Caspaseinhibitoren (Ac [Ac-DEVD-CHO] = 100  $\mu$ M, Z-Asp [Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB] = 100  $\mu$ M, Z-VAD [Z-VAD-FMK] = 20  $\mu$ M) für 1 Stunde präinkubiert und anschließend über 24 Stunden (A431; B,D,F) oder 48 Stunden (A375; A,C,E) mit 6  $\mu$ M KD87 ko-inkubiert und die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay bestimmt. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 9 (aus 3 unabhängigen Experimenten; A-D) und n = 3 (aus 1 Experiment; E-F). ns nicht signifikant, \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001 gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test.

### 4.3 Untersuchung einer möglichen KD87-induzierten Autophagie

Da die Behandlung mit KD87 Caspasen induziert, die Inhibition selbiger jedoch keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatte, wurde neben der Apoptose ebenfalls die Möglichkeit der Autophagieinduktion durch KD87 untersucht. Mittels Western Blot wurden Zelllysate beider Zelllinien auf Expression des Autophagie-Markerprotein LC3-I/II untersucht. A375-Zellen zeigten einen von

der KD87-Konzentration abhängigen Anstieg des LC3-II/I-Verhältnisses, welcher in A431-Zellen nicht beobachtet wurde (Abbildung 13). Somit induziert KD87 in A375-Zellen Autophagie.

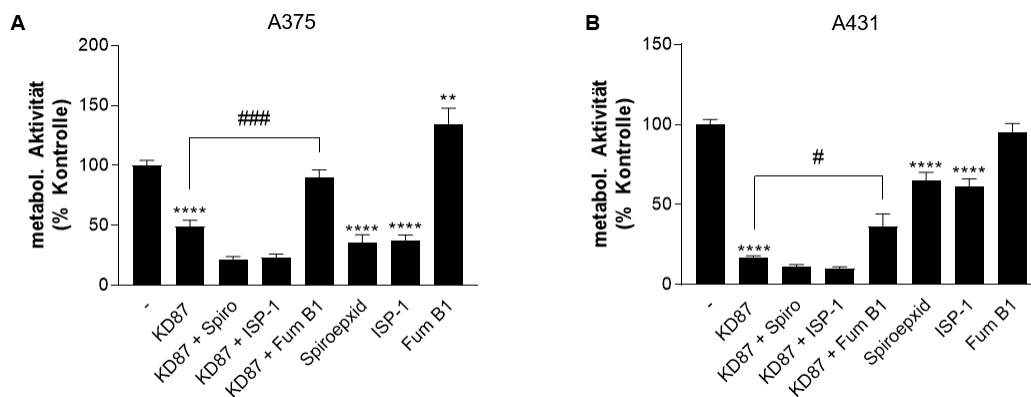
Um den Anteil der Autophagie auf den KD87-vermittelten Zelltod näher zu untersuchen, wurden diverse Autophagie-Inhibitoren (Pepstatin A (10  $\mu$ M), E64-d (10  $\mu$ M), 3-Methyladenin (5 mM), Bafilomycin A1 (100 mM, 50 nM, 2,5 nM) und Hydroxychloroquin (50  $\mu$ M, 20  $\mu$ M)) mit KD87 (6  $\mu$ M) ko-inkubiert. Die Behandlungszeit wurde für A375-Zellen auf 48 Stunden und für A431-Zellen auf 24 Stunden angepasst. Die Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die KD87-vermittelte Toxizität (exemplarisch Hydroxychloroquin [HCQ] Abbildung 13 E,F. Weitere Inhibitoren in Supplement 3).



**Abbildung 13: Untersuchung der möglichen KD87-vermittelten Autophagie-Induktion.** A375- und A431-Zellen wurden über 24 (A,B,F) bzw. 48 (C,D,E) Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen KD87 inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinexpression von LC3-II/I untersucht (A-D) und Inhibitorversuche mit Hydroxychloroquin (HCQ, 20  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M; E-F) durchgeführt. Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression wurde auf GAPDH normalisiert. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  (A375; A,C),  $n = 2$  (A431; B,D) oder  $n = 9$  (aus 3 unabhängigen Experimente; E,F). ns nicht signifikant, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett (A-D) bzw. Bonferroni (E,F) Post-Hoc-Test.

#### 4.4 Einfluss von KD87 auf den Ceramid-Signalweg

Um eine mögliche Beteiligung des Ceramid-Stoffwechsels am pharmakologisch induzierten Zelltod auf die verwendeten Hautkrebszellen zu testen, wurden diese mit verschiedenen Inhibitoren des Ceramid-Stoffwechsels und KD87 ko-inkubiert (Abbildung 14). Der N-SMase-Spiroepoxid-Inhibitor hemmt selektiv die neutrale Sphingomyelinase [133], Fumonisin B<sub>1</sub> hemmt die Sphingosin-N-Acyl-Transferase [134] und ISP-1 blockiert die Serin-Palmitoyltransferase [134–136]. Das Indirubinderivat KD87 wirkte, im Vergleich zur Kontrolle, zytotoxisch auf beide Zelllinien (Abbildung 14). Die Ko-inkubation mit N-SMase-Spiroepoxid und ISP-1 nahm darauf keinen Einfluss, während die Hemmung der Sphingosin-N-Acyl-Transferase mit Fumonisin B<sub>1</sub> zu einer signifikanten Erhöhung der metabolischen Aktivität in beiden Zelllinien nach KD87-Behandlung führte (Abbildung 14). Die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren unter Basalbedingungen führte bei Einsatz von N-SMase-Spiroepoxid und ISP-1, nicht aber bei Fumonisin B<sub>1</sub>, zu einer Verringerung der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14). Die KD87-vermittelte Zytotoxizität hängt somit partiell von der *de novo* Synthese der Ceramide ab.

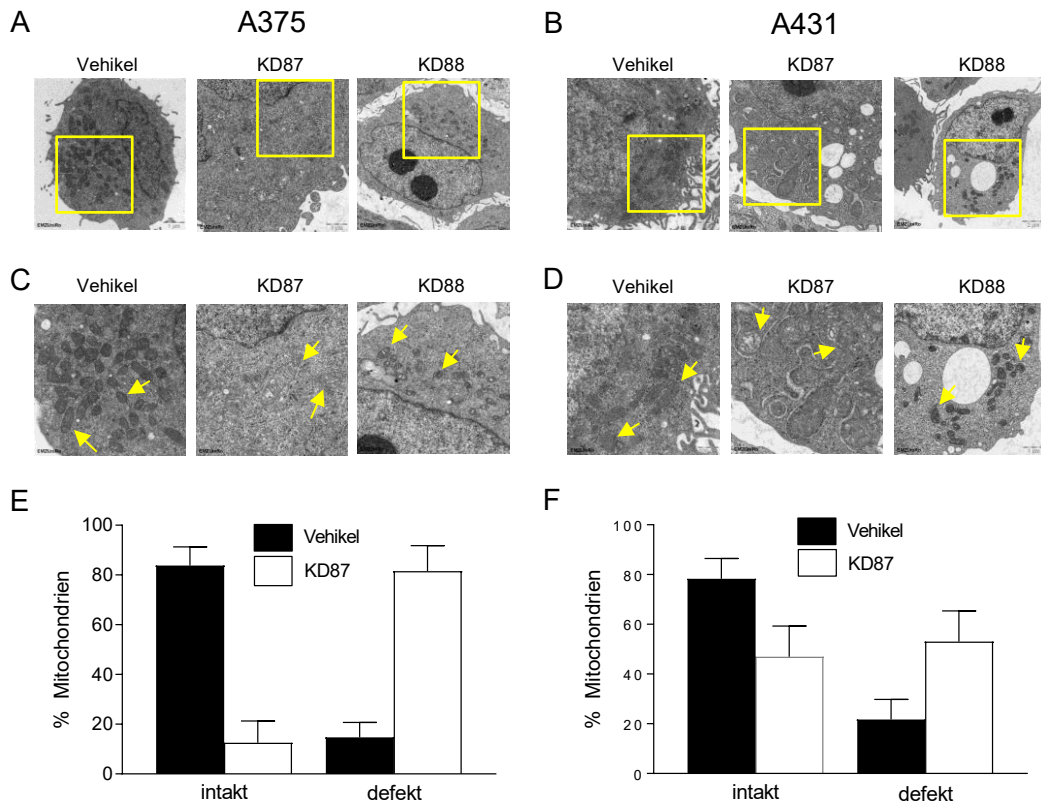


**Abbildung 14: Analyse der Beteiligung des Ceramid-Signalweges am KD87-vermittelten Zelltod.** A375- und A431-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M ISP-1, 50  $\mu$ M Fumonisin B<sub>1</sub> (Fum B1) oder 10  $\mu$ M N-SMase-Spiroepoxid-Inhibitor (Spiro) für 1 Stunde prä- und im Anschluss mit 6  $\mu$ M KD87 über 24 Stunden (A431; B) und 48 Stunden (A375; A) ko-inkubiert. Mittels WST-1-Assay wurde die metabolische Aktivität untersucht. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 9 (aus 3 unabhängigen Experimenten). \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001 gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle, # p  $\leq$  0,05, ### p  $\leq$  0,001 vs. KD87-behandelte Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test.

#### 4.5 Elektronenmikroskopische Analysen

Für eine mögliche zelluläre Lokalisation der zytotoxischen Wirkung von KD87 und um die bisherigen negativen Befunde von KD88 zu bestätigen, wurden in einem nächsten Schritt elektronenmikroskopische Untersuchungen in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Bereits nach 24 Stunden Inkubation mit

KD87 (6  $\mu\text{M}$ ) zeigten die Analysen eine mitochondriale Schädigung der Zellen (Abbildung 15). Insbesondere A375-Zellen zeigten eine Vergrößerung der Mitochondrien, die mit einem Verlust der Cristae- und Membranstruktur einherging (Abbildung 15 A,C).



**Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Untersuchung von A375- und A431-Zellen nach Behandlung mit Indirubinderivaten KD87 und KD88.** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von A375 (A,C) und A431 (B,D) Zellen. A,B wurden in 3450-facher Vergrößerung aufgenommen und C,D sind vergrößerte Ausschnitte derselben Bilder (6590-fache Vergrößerung). Die gelben Pfeile (C,D) zeigen, dass die mitochondrialen Strukturen in A375 (C) und A431 (D) nach der KD87-Behandlung (jeweils rechte Panelseite) größer sind als in den Kontrollen (jeweils linke Panelseite). Die Quantifizierung zeigt eine deutliche Zunahme der defekten Mitochondrien durch die KD87-Behandlung in beiden Zelllinien (A375 E, A431 F). Die Anzahl der defekten oder intakten Mitochondrien pro Bildausschnitt einer Zelle wurde als Anteil an den gesamten zellulären Mitochondrien dargestellt. Die Daten wurden aus jeweils n = 11-15 Bildausschnitten gewonnen. Auf eine statistische Evaluierung der ausgewerteten Daten wurde verzichtet, da lediglich eine experimentelle Serie zur quantitativen Auswertung herangezogen wurde.

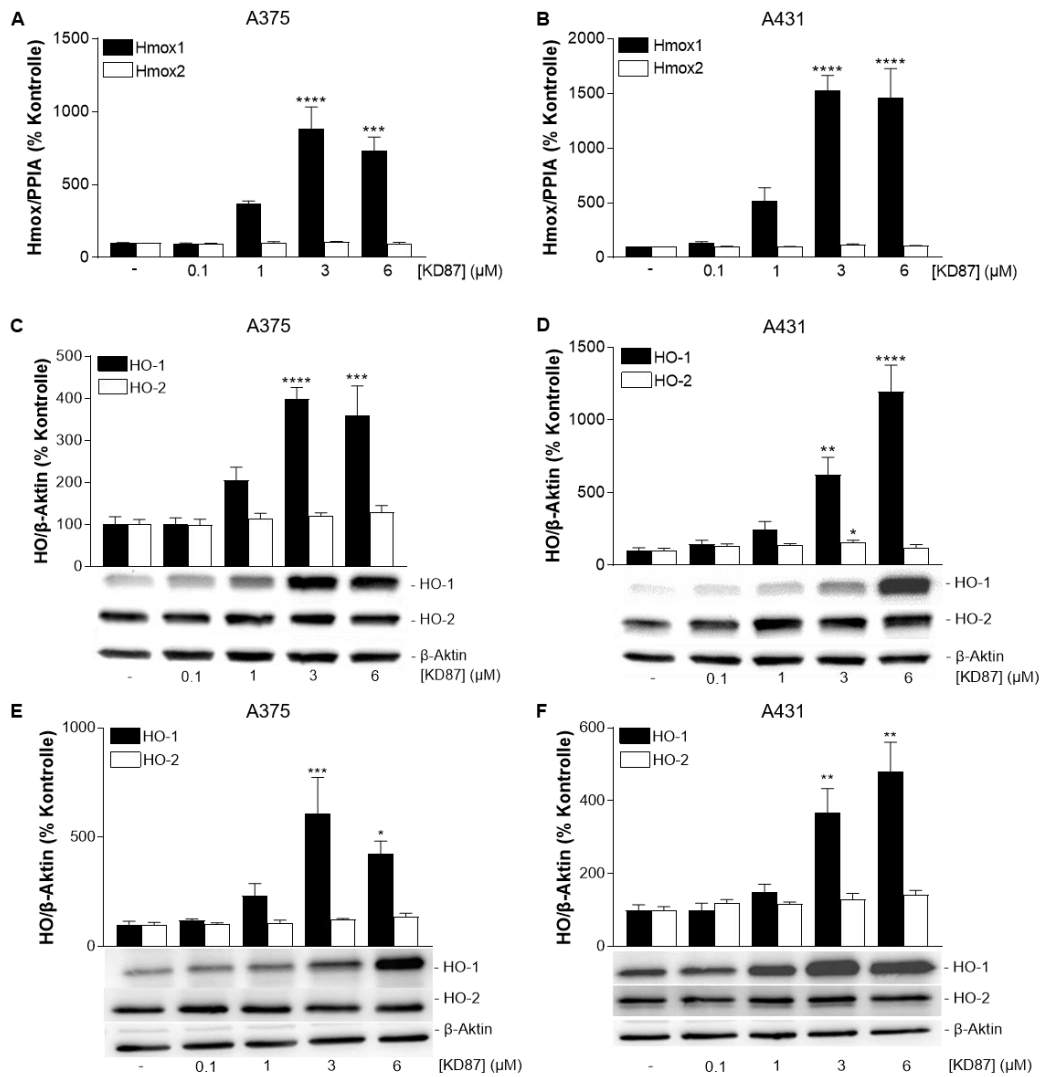
In A431-Zellen konnte ebenfalls ein Verlust der Cristae- und Membranstrukturen beobachtet werden (Abbildung 15 B,D). In beiden Zelllinien konnte im Vergleich zu Vehikel-Gruppe vermehrt ein Verlust der elektronendichten, osmiophilen Färbung sowie eine deutliche Schwellung der Zelle beobachtet werden. Zellen, die mit KD88 behandelt wurden, zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Vehikel (Abbildung 15 A-D). Die Quantifizierung der intakten und defekten

Mitochondrien nach 24 Stunden zeigte eine deutliche Zunahme defekter Mitochondrien durch die Behandlung mit KD87 in beiden Zelllinien (Abbildung 15 E,F).

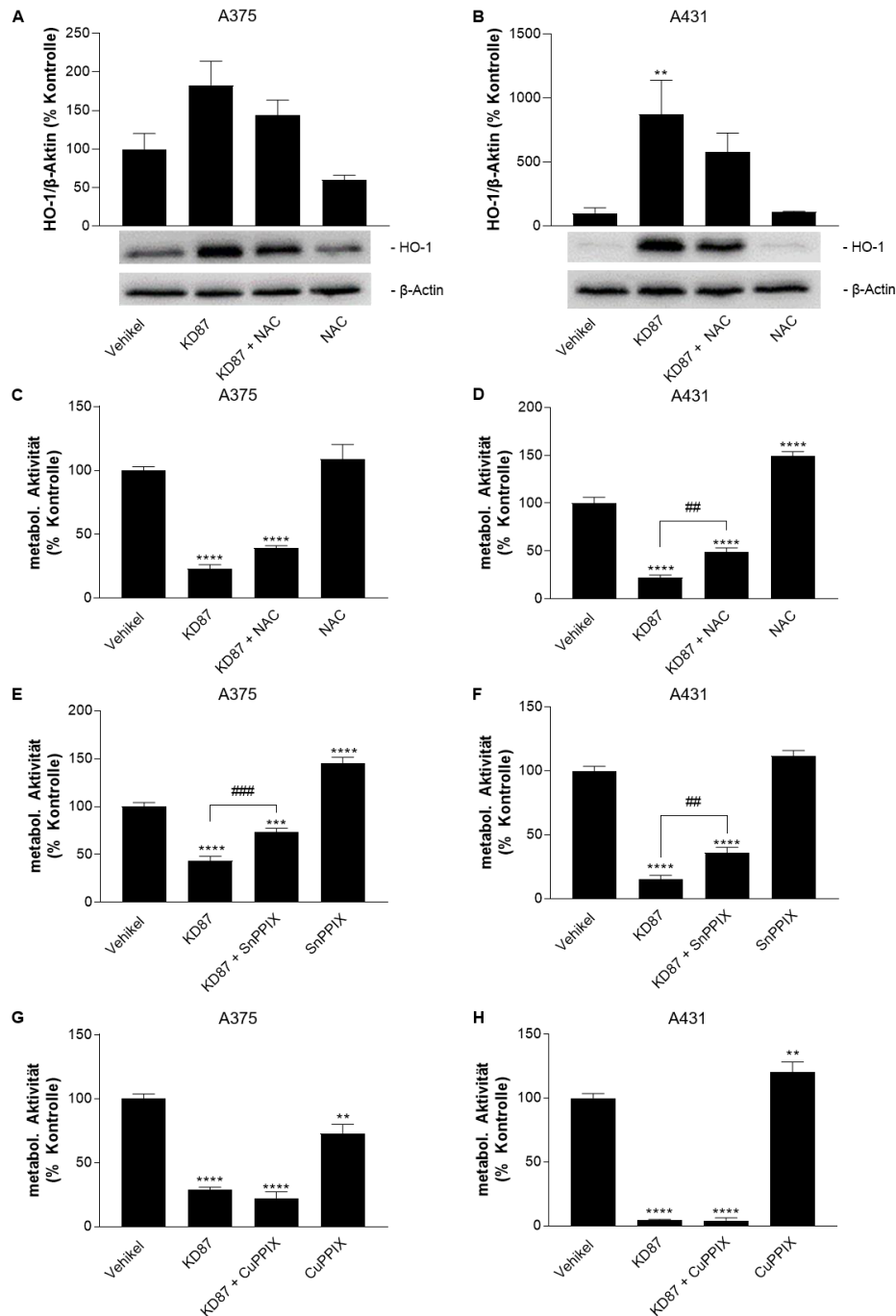
#### **4.6 Charakteristika der KD87-vermittelten Induktion von HO-1**

In neueren Studien konnte zuletzt eine pro-apoptotische Rolle von HO-1 bei der Apoptose [102–104] und der Mitophagie [105] von Krebszellen gezeigt werden. Auf dieser Grundlage wurde als nächstes eine mögliche Induktion des HO-1-Enzyms durch KD87 analysiert. In beiden Zelllinien konnte nach 24 Stunden eine konzentrationsabhängige Expression von *HMOX1* durch KD87 nachgewiesen werden (Abbildung 16 A,B). Auch die Proteinebene zeigte nach 24 sowie 48 Stunden eine HO-1-Induktion durch KD87 (Abbildung 16 C-F). Das parallel untersuchte HO-2-Isoenzym unterlag keiner entsprechenden Regulation. Um die Relevanz der HO-1-Expression für den KD87-vermittelten Zelltod zu untersuchen, wurden anschließend Inhibitor-Experimente durchgeführt. Hier wurde gezeigt, dass das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) die KD87-induzierte HO-1-Expression in beiden Zelllinien partiell hemmt (Abbildung 17 A,B). Auf entsprechende Western-Blot-Analysen zum Einfluss von SnPPIX auf die HO-1-Expression wurden an dieser Stelle verzichtet, da in Abschnitt 4.7 ausführlich auf den Einfluss von SnPPIX in mitochondrialen und zytosolischen Fraktionen eingegangen wird.





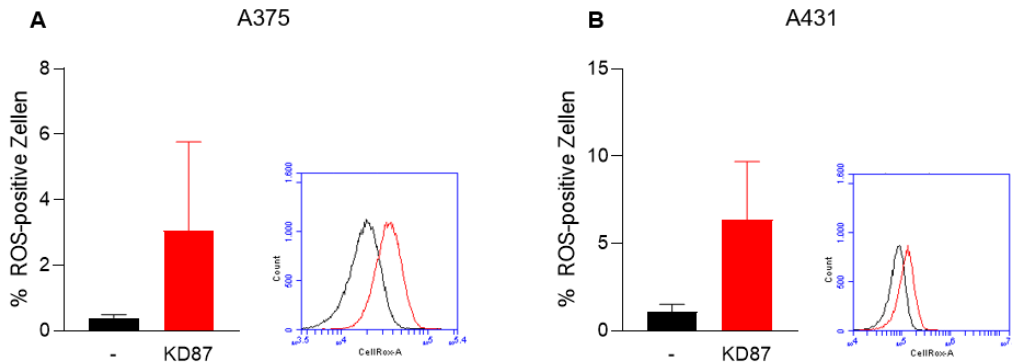
**Abbildung 16: Einfluss von KD87 auf die HO-1 Expression auf mRNA- und Proteinebene.** Die Zellen wurden über 24 Stunden (A-D) bzw. 48 Stunden (E,F) mit KD87 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die in den Histogrammen dargestellten Werte beruhen auf quantitativer RT-PCR (A375 A, A431 B) oder densitometrischen Analysen von Western Blots (A375 C,E und A431 D,F). Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  (A, B),  $n = 8$  (C (HO-1)),  $n = 6$  (C (HO-2)),  $n = 6$  (D (HO-1)) oder  $n = 5$  (D (HO-2)) pro Gruppe. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  vs. entsprechende Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.



**Abbildung 17: Inhibitorversuche zur möglichen Rolle von HO-1 im KD87-vermittelten Zelltod.** Die Zellen (A375 A,C,E,G und A431 B,D,F,G) wurden 1 Stunde mit SnPPiX (25  $\mu$ M), CuPPiX (25  $\mu$ M), NAC (1 mM) oder Vehikel vorbehandelt und anschließend 24 (A,B,D,F,H) oder 48 Stunden (C,E,G) mit 6  $\mu$ M KD87 oder Vehikel inkubiert. Die in den Histogrammen dargestellten Werte beruhen auf densitometrischen Analysen von Western Blots (A,B) oder WST-1-Experimenten (C-H). Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 (A, B), n = 9 (aus 3 unabhängigen Experimenten; C,D), n = 20 (aus 5 unabhängigen Experimenten; E), n = 18-20 (aus 5 unabhängigen Experimenten, F), n = 8-9 (aus 3 unabhängigen Experimente, G) und n = 9 (aus 3 unabhängigen Experimenten; H) pro Gruppe. ns nicht signifikant, \*\* p  $\leq$  0,01, \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001 vs. entsprechendes Vehikel, ## p  $\leq$  0,01, ### p  $\leq$  0,001 vs. jeweilige KD87-behandelte Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test.

Sowohl NAC als auch der spezifische HO-1-Aktivitätshemmer SnPPIX führten zu einer teilweisen Aufhebung der KD87-vermittelten Toxizität (Abbildung 17 C-F). Der Einsatz der nicht HO-1 hemmenden Negativkontrolle CuPPIX konnte diesen Effekt nicht reproduzieren (Abbildung 17 G,H).

Um zu prüfen, ob die für KD87 beschriebenen Effekte mit oxidativem Stress in A375- und A431-Zellen einhergehen, wurde der ROS-Gehalt beider Zelllinien durchflusszytometrisch bestimmt (s. Abbildung 18). In beiden Zelllinien wurde ein messbarer, allerdings nur marginaler Anteil an ROS-positiven Zellen (3 % in A375 [Abbildung 18 A] und 6 % in A431 [Abbildung 18 B]) gemessen.



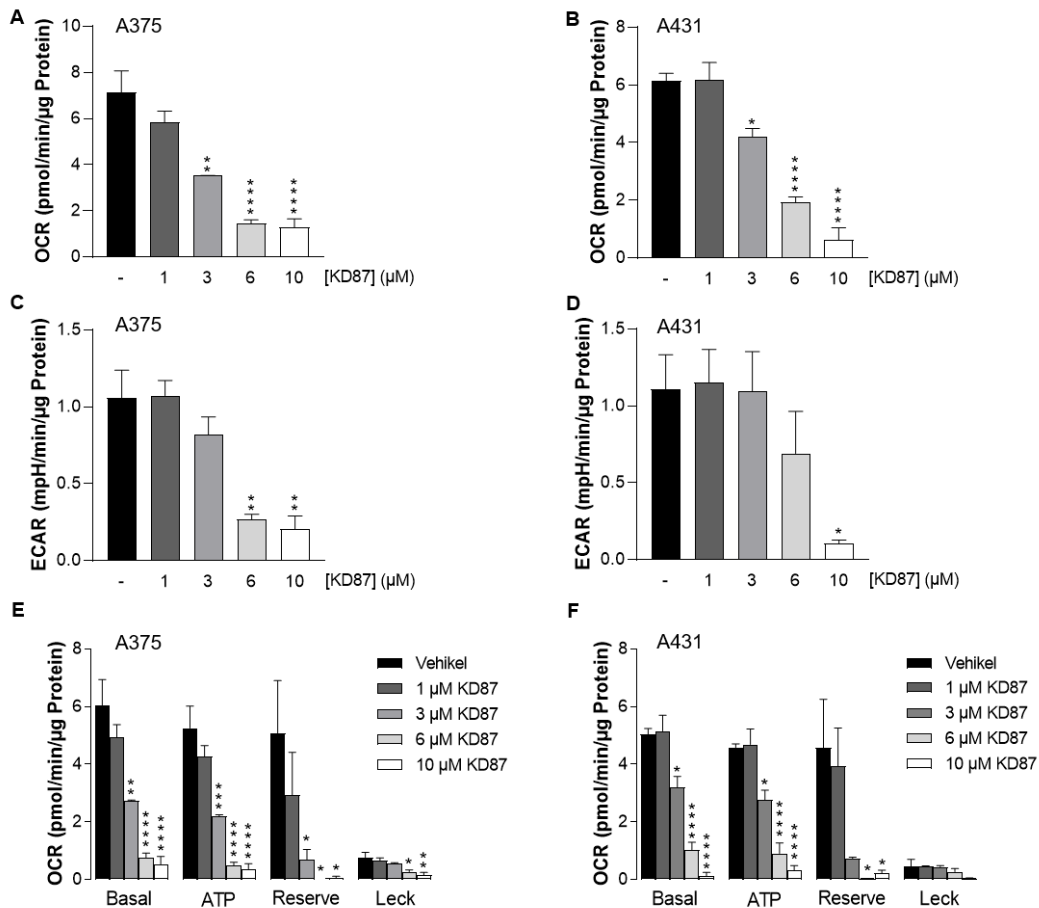
**Abbildung 18: Untersuchung einer möglichen ROS-Freisetzung nach Behandlung mit KD87.** Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit 6  $\mu$ M KD87 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die in den Histogrammen dargestellten Werte (A375 A, A431 B) beruhen auf der quantitativen Auswertung der ROS-positiven Zellpopulationen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 3 Experimenten pro Gruppe. Zweiseitiger t-Test nach Student.

#### 4.7 Effekt von KD87 auf die mitochondriale Atmung

Angesichts der gezeigten strukturellen mitochondrialen Veränderungen und der Frage, ob eine KD87-verursachte Schädigung der Mitochondrien die für die Tumorentwicklung essenzielle Energieproduktion in Form von intrazellulärem ATP stört, wurde anschließend untersucht, ob ein Einfluss durch das Indirubinderivat KD87 auf den Energiestoffwechsel besteht. Als Maß für die mitochondriale oxidative Phosphorylierung wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR) und für die Glykolyse die extrazelluläre Versauerungsrate (*extracellular acidification rate*, ECAR) bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einem Seahorse XFe24 Analyzer durchgeführt. In beiden Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der OCR (Abbildung 19 A,B) und ECAR (Abbildung 19 C,D) durch KD87 beobachtet werden. Die Krebszellen können ihr energiereiches Profil über keinen der Stoffwechselwege aufrechterhalten, es

kommt zu einer Verschiebung des Energieprofils von energiereich zu energiearm (Supplement 4 A,B).

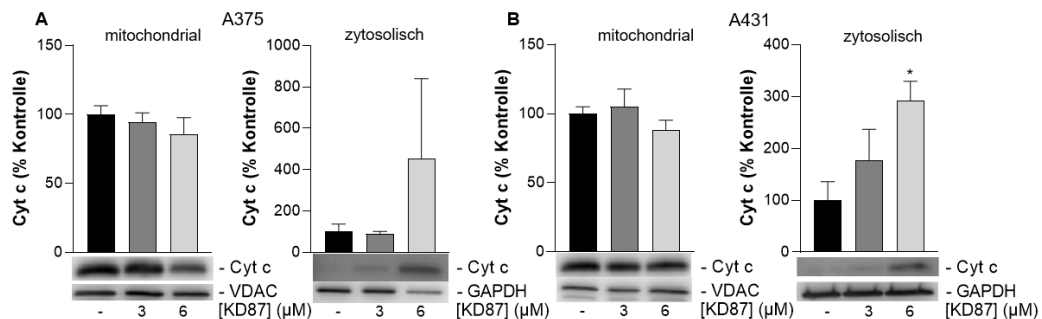
Um den Verlust der Energieproduktion näher zu charakterisieren wurde ein mitochondrialer Stresstest durchgeführt. Dieser erfasst neben der mitochondrialen Basalatemung auch die ATP-gebundene Atmung und die Reservekapazität.



**Abbildung 19: Einfluss von KD87 auf die mitochondriale Sauerstoffsverbrauchsrate (OCR) und extrazelluläre Versauerungsrate (ECAR).** A375- und A431-Zellen wurden 24 Stunden mit KD87 in den angegebenen Konzentrationen oder der Vehikelkontrolle inkubiert. Anschließend wurden OCR (A375 A, A431 B) und ECAR (A375 C, A431 D) mit dem Seahorse XFe24 Analyzer bestimmt. Zudem wurde ein mitochondrialer Stresstest durchgeführt, bei dem die mit 1,5 µM Oligomycin (Port A), 2,5 µM FCCP für A375 und 1,0 µM FCCP für A431 (Port B) und jeweils 0,5 µM Antimycin A und Rotenon (Port C) beladenen Ports der Sensorkartuschen zu den angegebenen Zeitpunkten in die Vertiefungen freigegeben wurden. Die Abbildungen E (A375) und F (A431) zeigen Berechnungen der Basalatemung (Basal), der ATP-gebundenen Atmung (ATP), der Reserveatemungskapazität (Reserve) und des Protonenlecks (Leck). Repräsentative Zeitverläufe der OCR im Stresstest sind unter Supplement 4 zu finden. Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  aus 3 unabhängigen Experimenten dar. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett bzw. Bonferroni Post-Hoc-Test.

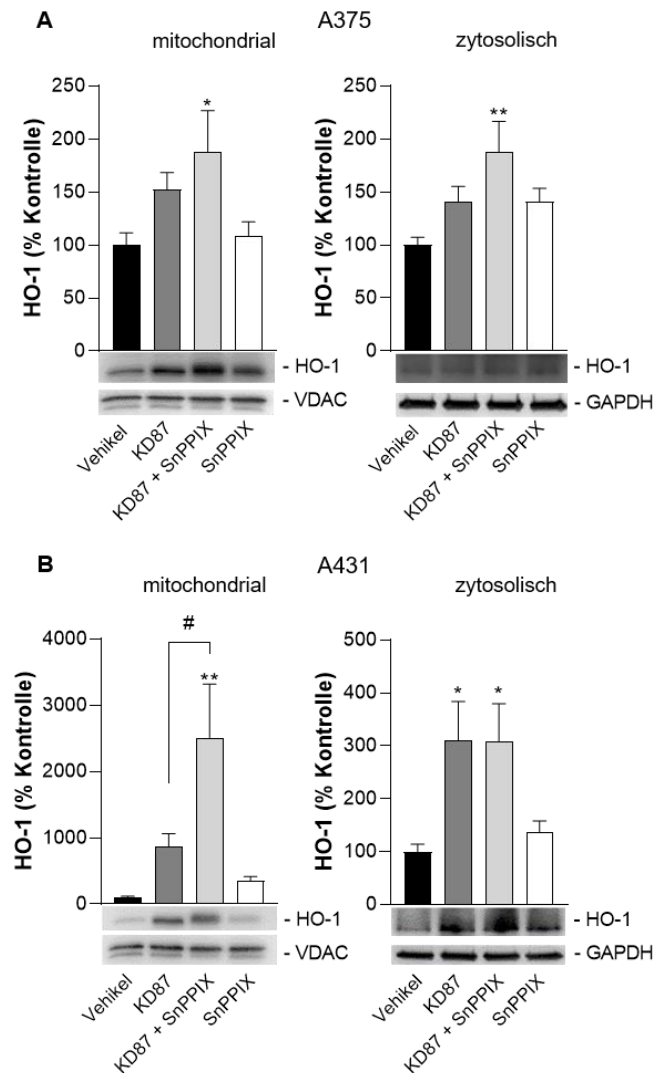
Die Verlaufskurven (Supplement 4 C,D) ergeben sich aus der zeitverzögerten Zugabe von synthetischen Modulatoren der Atmungskette. Insgesamt bestätigen die Daten die durch KD87-ausgelöste mitochondriale Schädigung. Die Inkubation von A375- und A431-Zellen mit KD87 verringerte die analysierten Parameter konzentrationsabhängig. Bereits ab 1  $\mu\text{M}$  setzte eine Hemmung der Reservekapazität ein, aber auch die ATP-gebundene Atmung wurde ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  erheblich gehemmt (Abbildung 19 G,H).

Die starke Hemmung der mitochondrialen Atmung wurde durch eine konzentrationsabhängige Freisetzung von mitochondrialem Cyt c in das Zytosol (Abbildung 20 A,B rechts) begleitet und bestätigt die elektronenmikroskopischen Befunde einer mitochondrialen Schädigung sowie der Aktivierung der Effektorcaspasen (Abbildung 10 A,B) als Indikator für Apoptose in A375- und A431-Zellen.



**Abbildung 20: Wirkung von KD87 auf die Freisetzung von mitochondrialem Cyt c in das Zytosol.** A375- (A) und A431- (B) Zellen wurden über 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von KD87 behandelt. Anschließend wurden die entsprechenden Proteine der mitochondrialen (A,B links) und zytosolischen Fraktion (A,B rechts) mittels Western Blot bestimmt. Die in den Histogrammen angegebenen Werte beruhen auf der densitometrischen Analyse der Blots. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$ . \*  $p \leq 0,05$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.

Als ein Enzym, das je nach Lokalisierung unterschiedliche Funktionen ausüben kann, und um dessen Rolle in den Mitochondrien genauer zu untersuchen, wurde die Verlagerung der HO-1 in die Mitochondrien nach Exposition mit KD87 untersucht. Ebenso wurde der Einfluss der HO-1 auf die Verlagerung von Cyt c aus den Mitochondrien in das Zytosol analysiert. Zu diesem Zweck wurden beide Zelllinien erneut mit KD87, dem HO-1-Inhibitor SnPPiX oder beiden Substanzen zusammen behandelt und anschließend die entsprechenden mitochondrialen bzw. zytosolischen Proteine nach Fraktionierung der Zellorganellen bestimmt.

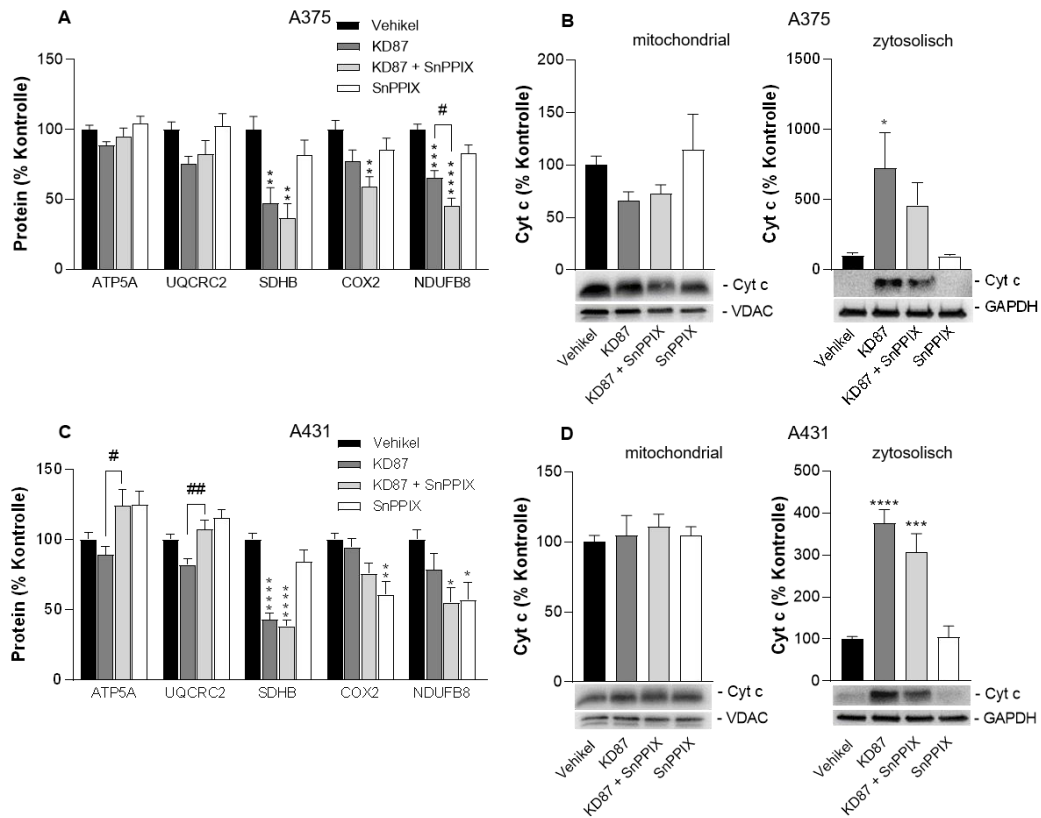


**Abbildung 21: Wirkung des HO-1-Inhibitors SnPPIX in Gegenwart von KD87 oder allein auf die mitochondriale und zytosolische Proteinkonzentration von HO-1.** Die Zellen (A375 A, A431 B) wurden 1 Stunde mit SnPPIX (25  $\mu$ M) oder Vehikel vorbehandelt, gefolgt von einer 24-stündigen Ko-Inkubation mit KD87 (6  $\mu$ M) oder Vehikel. Anschließend wurden die entsprechenden Proteine in den mitochondrialen (links) und zytosolischen Fraktionen (rechts) mittels Western Blot bestimmt. Die in den Histogrammen angegebenen Werte beruhen auf der densitometrischen Analyse der Western Blots. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 7 (A375) und n = 8 (mitochondriale Fraktion A431) und n = 7 (zytosolische Fraktion A431). Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, wurde in den mitochondrialen Fraktionen eine teils ausgeprägte Hochregulation von HO-1 durch KD87 festgestellt, die bei gleichzeitiger Inkubation mit SnPPIX verstärkt wurde. In der zytosolischen Fraktion konnte ebenfalls ein Anstieg der HO-1 Expression durch KD87 festgestellt werden, welche lediglich in A375-Zellen durch Zugabe von SnPPIX partiell verstärkt. In A431-Zellen nahm SnPPIX keinen Einfluss auf die durch KD87 hochregulierte HO-1 Expression.

Da die Freisetzung von Cyt c auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweist und Apoptose auslöst, sollte die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit KD87 und SnPPIX daher zu einer Verringerung der Cyt c Freisetzung führen, was mit der zuvor gezeigten zytoprotektiven Wirkung von SnPPIX übereinstimmt (Abbildung 17 E,F). In beiden Zelllinien konnte durch die Zugabe von SnPPIX eine partielle Hemmung der bereits gezeigten KD87-vermittelten Cyt c Freisetzung (A375 42 %, A431 25 %) in das Zytosol beobachtet werden, die jedoch kein signifikantes Niveau erreichte (Abbildung 22 B,D rechts).

Um die Verringerung der OCR genauer zu charakterisieren, wurde die Wirkung von KD87 allein und in Kombination mit SnPPIX auf die Expression der spezifischen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in mitochondrialen Proteinextrakten untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Verringerung der Succinatdehydrogenase-Komplex-Untereinheit B (SDHB, Untereinheit von Komplex II) in A375- und A431-Zellen (Abbildung 22 A,C) durch die Behandlung mit KD87. Zudem konnte eine signifikante Abnahme der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase-Untereinheit B8 (NDUFB8, Untereinheit von Komplex I) in A375-Zellen beobachtet werden (Abbildung 22 A). Weiterhin verursachte KD87 in beiden Zelllinien nicht signifikante Verringerungen des Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase-Kernproteins-2 (UQCRC2, Untereinheit von Komplex III) und der Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 2 (COX2, Untereinheit von Komplex IV), sowie von NDUFB8 in A431-Zellen. Die Zugabe von SnPPIX stellte die durch KD87 signifikant reduzierten Proteinexpressionsniveaus der Untereinheiten nicht wieder her.



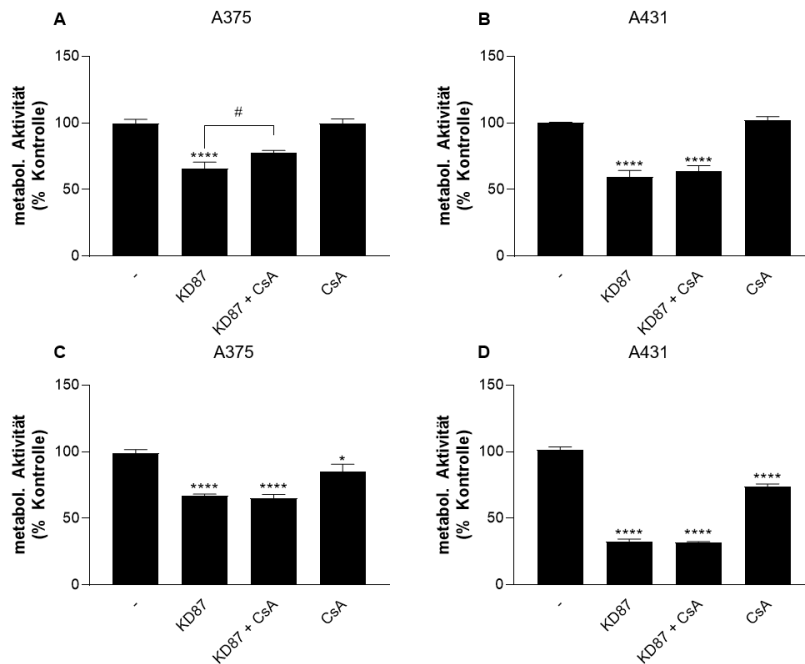
**Abbildung 22: Effekte von KD87 allein oder in Gegenwart von SnPPIX auf die Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe und der Freisetzung von mitochondrialem Cyt c.** Die Zellen (A375 A,B und A431 C,D) wurden 1 Stunde mit SnPPIX (25  $\mu$ M) oder Vehikel vorbehandelt, gefolgt von einer 24-stündigen Ko-Inkubation mit KD87 (6  $\mu$ M) oder Vehikel. Anschließend wurden die entsprechenden Proteine in den mitochondrialen (A,C sowie B,D links) und zytosolischen Fraktionen (B,D rechts) mittels Western Blot bestimmt. Repräsentative Blots für A und B sind unter Supplement 5 hinterlegt. Die in den Histogrammen angegebenen Werte beruhen auf der densitometrischen Analyse der Blots. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle (100 %). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 7 (mitochondriale Fraktion A375) oder n = 8 (zytosolische Fraktion A375 und C,D). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle, #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$  gegenüber der entsprechenden KD87-behandelten Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test.

#### 4.8 Einfluss von KD87 auf weitere Zelltodmöglichkeiten

Aufgrund der starken nachgewiesenen mitochondrialen Schädigung beider Zelllinien nach Behandlung mit KD87 (Abbildung 19) und dem hohen Anteil an spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen in durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abbildung 9) wurden mittels Inhibitorversuchen eine Auswahl an Hemmern der Ferroptose (Supplement 6), Onkose und Nekroptose (Supplement 7) sowie des MPT-gesteuerten Zelltods (Abbildung 23) untersucht. CsA, ein Inhibitor von CYPD, der zentralen Komponente des PTPC, zeigte in A431-Zellen keinen Effekt auf die metabolische Aktivität (Abbildung 23 B). In A375-Zellen konnte eine partielle, signifikante Aufhebung der KD87-induzierten



Vitalitätsabnahme im WST-1-Test nach 6-stündiger Inkubation registriert werden, die allerdings nach 24-stündiger Inkubation nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 23 A).

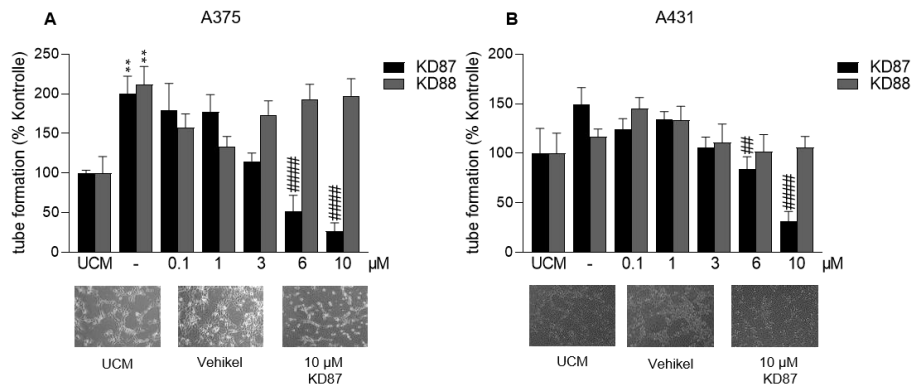


**Abbildung 23: Einfluss von CsA auf die KD87-vermittelte Reduktion der metabolischen Aktivität von A375- und A431-Zellen.** Die Zellen (A375 A,C und A431 B,D) wurden 1 Stunde mit CsA (5  $\mu$ M) präinkubiert und anschließend in Gegenwart von KD87 (6  $\mu$ M) oder Vehikel für weitere 6 (A,B) oder 24 (C,D) Stunden koinkubiert. Anschließend wurden die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay bestimmt. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 8-11$  (aus 3 unabhängigen Experimenten) pro Gruppe. ns nicht signifikant, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle, #  $p \leq 0,05$  gegenüber der entsprechenden KD87-behandelten Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test.

#### 4.9 Analyse der Tubulogenese humaner Endothelzellen nach Behandlung mit KD87 konditionierten Medien

Um eine mögliche Interaktion zwischen Hautkrebszellen und Endothelzellen zur Neubildung von Gefäßstrukturen als weiteren antikanzerogenen Wirkmechanismus zu dokumentieren, wurden konditionierte Überstände von Vehikel- oder KD87-behandelten Zellen im Hinblick auf mögliche antiangiogene Eigenschaften von Indirubinderivaten untersucht. Zur Herstellung der konditionierten Medien wurden A375- und A431-Zellen mit Vehikel bzw. KD87- oder KD88-Konzentrationen (0.1 – 10  $\mu$ M) über 48 Stunden behandelt. Die konditionierten Medien wurden im Anschluss genutzt, um das Tubulogenese-Verhalten von HUVECs zu beurteilen. Im Vergleich zu dem nicht mit Tumorzellen behandeltem Medium (UCM) induzierte konditioniertes Medium Vehikel-behandelter A375- bzw. A431-Zellen einen Anstieg der Tubulogenese in HUVECS, wobei dieser Effekt in A375-Zellen signifikant war (Abbildung 24 A). Konditionierte Medien von KD87-behandelten Tumorzellen

zeigten eine signifikante Reduktion der Tubulogenese in beiden Zelllinien, die insbesondere für 10  $\mu\text{M}$  KD87 geringer ausfiel als im UCM (Abbildung 24). Mit KD88 behandeltes Tumorzellmedium konnte keinen solchen Effekt in HUVECs auslösen.



**Abbildung 24: Einfluss von konditionierten Medien auf die Tubulogenese von HUVECs.** Herstellung der konditionierten Medien erfolgte durch Behandlung von A375 (A)- und A431 (B)-Zellen mit KD87 und KD88 in den angegebenen Konzentrationen über 48 Stunden. HUVECs wurden in mit KD87 oder KD88 konditionierten Medien, Vehikel oder unkonditioniertem Medium (UCM) resuspendiert und inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die Anzahl an neugebildeten tubes anhand von Phasenkontrastbildern ausgezählt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 12$  (aus 4 unabhängigen Experimenten) pro Gruppe. \*\*  $p \leq 0,01$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle, ##  $p \leq 0,01$ , ####  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden KD87- oder KD88-behandelten Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test.

## 5. Diskussion

Zahlreiche neuere präklinische Untersuchungen an Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten ergaben antitumorogene Effekte von Indirubin-Derivaten [106,137–141]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das thia-analoge Indirubin-N-Glykosid KD87, im Gegensatz zum nicht-glykosylierten strukturanalogen KD88, starke viabilitätsvermindernde Effekte auf humane Hautkrebszellen ausübt. Die auftretenden Differenzen in der Wirksamkeit zwischen KD87 und KD88 sind somit auf den genannten strukturellen Unterschied zurückzuführen. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Planarität der Struktur von Indirubinen und die starre Kristallstruktur für die schlechte Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen ursächlich sind [142,143]. Eine verbesserte Wasserlöslichkeit erweist sich somit als vorteilhaft bei der Entwicklung neuer Indirubine [144]. In diesem Sinne wurde im Falle von KD87 durch die Anknüpfung eines Glukoserestes die stark eingeschränkte Löslichkeit von KD88 verbessert. Die in der vorliegenden Arbeit weitestgehend ausgebliebene Zytotoxizität des nicht glykolysierten thia-analogen KD88 befindet sich im Einklang mit einer früheren Arbeit, in der unter Verwendung des Sulforhodamin-B-Zytotoxizitätstests [121] die  $IC_{50}$ -Werte für unsubstituiertes Indirubin bei weit über  $30\ \mu\text{M}$  in einem breiten Spektrum an getesteten Krebszelllinien lagen. Obschon die genaue Funktion der Glykosylierung noch einer abschließenden Klärung bedarf, ist es offensichtlich, dass sie die Wasserlöslichkeit erhöht und möglicherweise auch die Rezeptorbindung vermittelt.

Weitere mit beiden Indirubinderivaten durchgeführte Experimente zeigten, dass KD87, nicht aber KD88, einen antiproliferativen Effekt auf die untersuchten Hautkrebszelllinien ausübt, welcher in durchflusszytometrischen Untersuchungen durch Nachweis eines konzentrationsabhängigen Zellzyklusarrests bestätigt werden konnte. Als möglicher Mechanismus der zellzyklusarretierenden Wirkung von KD87 ist eine Involvierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) denkbar, wie dies bereits für andere Indirubin-Derivate beschrieben wurde [106,138,143].

Neben dem Arrest in den verschiedenen Zellzyklusphasen gibt die durchflusszytometrische Untersuchung von PI-gefärbten Zellen Aufschluss über apoptotische Zellfraktionen, die sogenannte subG1-Phase. Die apoptoseauslösenden Eigenschaften von Indirubinen wurden bereits ausführlich untersucht [123,137,140,145]. Dabei zeigten Studien mit Halogen-substituierten Indirubinen, aber auch Indirubin selbst, dass für den Zelltod eine CDK-Hemmung nicht zwingend notwendig ist [139,146]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich die in durchflusszytometrischen Untersuchungen von A431-Zellen, nicht aber A375-Zellen, auftretende subG1-Zellpopulation nach Behandlung mit KD87 weiterhin mit einer vergleichsweise stärkeren Caspaseinduktion, einem höheren Anteil an spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen und einer stärkeren Spaltung des Apoptosemarkerproteins PARP in A431-Zellen belegen. Sowohl die KD87-vermittelte Caspaseinduktion als auch die PARP-Spaltung

erscheinen abhängig von der Inkubationszeit, wobei A431-Zellen bereits nach 24 Stunden und A375-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit KD87 einen Anstieg dieses Apoptosemarkers zeigten. Eine Spaltung von PARP als Resultat einer ausgelösten Apoptose konnte von anderen Autoren auch für das Indirubinderivat IDR-E804 in Brustkrebs- und Prostatakrebszellen gezeigt werden [147].

Interessanterweise wurde die Lebensfähigkeit KD87-behandelter Zelllinien bei gleichzeitiger Inkubation mit Caspaseinhibitoren nicht verbessert. Inwiefern dies einen caspaseunabhängigen KD87-vermittelten Zelltod impliziert, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Dabei gibt es in der Literatur Belege, dass nach Blockierung der post-mitochondrialen Caspase-Aktivierung durch spezifische pharmakologische Inhibitoren wie z.B. Z-VAD-FMK die intrinsische Apoptose verzögert, aber nicht verhindert wird [49,148]. Ferner zeigen einige Arbeiten ein Umschwenken des Zelltods in Richtung Nekrose nach Behandlung von Zellen mit Caspase-Hemmern [149–151].

In einer neueren Studie konnte eine Involvierung der Autophagie im Indirubin-vermittelten Tod von Gliomazellen gezeigt werden [152]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Autophagieinduktion jedoch nur in einer der untersuchten Zelllinien nachgewiesen. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Inhibierung der Autophagie, welche unter Stressbedingungen oftmals eine zytoprotektive Funktion erfüllt, den Zelltod gegebenenfalls auch beschleunigen kann anstatt ihn zu verzögern [49]. Nach Inhibierung der Autophagie wurde die Lebensfähigkeit der Zellen in den mit verschiedenen Autophagie-Hemmern durchgeführten Experimenten jedoch weder verringert noch wiederhergestellt. Somit scheint dieser Prozess beim KD87-vermittelten Tod von Melanom- und Plattenepithelkarzinomzellen keine entscheidende Rolle zu spielen.

Interessanterweise konnte durch den Einsatz von Fumonisin B<sub>1</sub>, einem Inhibitor der *de novo* Ceramidsynthese [153], der KD87-induzierte Verlust der metabolischen Aktivität partiell aufgehoben werden. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von Neurogliomazellen mit Cannabinoiden, eine weitere Klasse von *small molecules*, zu einem Anstieg der intrazellulären Ceramidspiegel führte. Dieser Cannabinoid-vermittelte Anstieg der Ceramidspiegel konnte erfolgreich durch Fumonisin B<sub>1</sub> aufgehoben werden [154]. Dass die signifikante Erhöhung der Lebensfähigkeit beider Zelllinien nach KD87 Behandlung unter dem Einfluss von Fumonisin B<sub>1</sub> nur partiell war, legt den Schluss nahe, dass neben Ceramiden auch andere Mediatoren beim Viabilitätsverlust durch KD87 eine Rolle spielen.

Als ein möglicher Mediator der KD87-vermittelten Abnahme der metabolischen Aktivität konnte schließlich das Stressprotein HO-1 identifiziert werden. Dieses wurde sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene konzentrationsabhängig in beiden Zelllinien durch KD87 induziert. Wenngleich der HO-1 ursprünglich eine ausschließlich zytoprotektive Rolle zugeschrieben wurde [85,88], belegen mittlerweile eine Reihe von Studien eine ebenso zytotoxische Funktion, die vor allem unter den Bedingungen einer starken und anhaltenden HO-1-Expression ersichtlich wird [85,88,155–157]. Als

zytotoxische Komponente werden in diesem Zusammenhang die Freisetzung von molekularem Eisen und hoher Konzentrationen von CO, einem Hemmstoff der Atmungskette, aufgeführt [158–161].

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der KD87-induzierten HO-1-Expression und der KD87-vermittelten Abnahme der metabolischen zellulären Aktivität konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des HO-1-Inhibitors SnPPIX nachgewiesen werden. Durch Ko-Inkubation mit SnPPIX wurde der KD87-induzierte Verlust der metabolischen Aktivität entsprechend partiell wieder aufgehoben. Die Kombination von KD87 mit CuPPIX, einem nicht die HO-1 inhibierenden Strukturanalogon von SnPPIX [162], hatte keinen Einfluss auf die KD87-induzierte Toxizität in A375- und A431-Zellen, was eine spezifische Wirkung der Testsubstanz SnPPIX auf HO-1 nahelegt. Da ROS in vielen Zellsystemen eine Rolle bei der induzierten Expression der HO-1 spielen [163–166], wurde zudem der Einfluss des ROS-Scavengers NAC untersucht. Dabei erhöhte die Kombination von NAC mit KD87 die metabolische Aktivität im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit KD87 und führte zu einer ebenso partiellen, allerdings nicht-signifikanten Hemmung der KD87-induzierten HO-1-Expression, was auf eine bestenfalls untergeordnete Rolle von ROS schließen lässt. Diese Schlussfolgerung wird auch durch durchflusszytometrische Befunde gestützt, die nach Behandlung mit KD87 lediglich eine geringfügige Freisetzung von ROS ermitteln konnten. Folgeuntersuchungen sollten sich hier auf den direkten Nachweis von mitochondrial gebildeten ROS konzentrieren.

Mittels Elektronenmikroskopie wurde weiterhin untersucht, welche intrazellulären Strukturen, und hier insbesondere die mit HO-1-Aktivität assoziierten Zellorganellen wie Zellkern und Mitochondrien, durch die Behandlung mit Indirubinderivaten beeinträchtigt werden. Auf den elektronenmikroskopischen Bildern konnte unter Behandlung mit KD87, nicht aber KD88, eine morphologische Veränderung der Mitochondrien (u.a. Verlust der Cristae-Struktur), nicht aber der Zellkerne, beobachtet werden. Entgegen den Erkenntnissen aus Studien, in denen Indirubine hauptsächlich auf Faktoren im Zellkern wirkten [140,169], scheint KD87 im vorliegenden System seine Wirkweise mitochondrial zu vermitteln. Eine mitochondrial assoziierte Wirkung von Indirubinen wurde auch in Untersuchungen anderer Autoren bestätigt. So konnte für Indirubin-3'-monoxim in Prostatakrebs- und *human embryonic kidney* (HEK)-Zellen sowie für sein Derivat 5-Diphenylacetamido-indirubin-3'-oxim (LDD398) in einer myeloischen Leukämie-Zelllinie eine mitochondrial vermittelte Wirkung mit Inhibierung bzw. Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials nachgewiesen werden [123,146].

Der starke zelluläre ATP-Verlust, die Abnahme von Reservekapazität und die Hemmung von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (SDHB in A375 und A431 und NDUF8 in A375) sowie die Freisetzung von Cyt c ins Zytosol bestärken die Befunde der elektronenmikroskopischen Analysen, dass KD87 seine toxische Wirkung auf Hautkrebszellen vor allem über seine Wirkung auf Mitochondrien vermittelt. Eine Ursache könnte eine Destabilisierung des mitochondrialen

Membranpotenzials sein [123], in Folge dessen es zu einer Cyt c Freisetzung und zum ATP-Verlust kommt [62,123,170]. Diese Kausalkette konnte bereits für das Indirubinderivat LDD398 gezeigt werden [123]. Freigesetzte pro-apoptotische Moleküle wie Cyt c können wiederum Pro-Caspasen aktivieren, die unter anderem zu einem mitochondrial assoziierten apoptotischen Zelltod führen [171]. Da die Inhibierung der KD87-induzierten Caspasen in den vorliegenden Untersuchungen nicht zu einer Verbesserung der Lebensfähigkeit der Zellen führte, sind zusätzliche Mechanismen des Zelltods nicht auszuschließen. So verläuft der MPT-vermittelte Zelltod caspaseunabhängig und wird mitochondrial durch starken ATP-Verlust ausgelöst [40,59,123]. In verschiedenen Studien, u.a. an Hepatozyten oder isolierten Mitochondrien der Maus, konnte eine MPT-inhibierende Wirkung von CsA nachgewiesen werden [173–175]. Literaturbefunden zufolge lässt sich durch Einsatz des MPT-Hemmers CsA die Kinetik des MPT-vermittelten Zelltods verzögern [38], der unregulierte MPT-vermittelte Zelltod hingegen kann durch den Einsatz von CsA nicht aufgehalten werden [172]. In der vorliegenden Arbeit zeigte CsA Arbeit keine protektive Wirkung nach 24-stündiger Ko-Inkubation mit KD87 und führte lediglich in einer der beiden Zelllinien (A375) zu einer partiellen Wiederaufhebung der KD87-vermittelten Abnahme der metabolischen Aktivität bei 6-stündiger Ko-Inkubation der Substanzen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass CsA zu einer Reihe von Off-Target-Interaktionen führen kann, wobei als Zielproteine auch in apoptotische Signalwege involvierte Proteine wie Calpain 2, Caspase-3 und p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 beschrieben wurden [176], was weiterführende Untersuchungen zum MPT-vermittelten Zelltod notwendig macht. Unabhängig davon wurde in mehreren Arbeiten der Öffnung CsA-sensitiver MPTs auch eine Rolle bei der Freisetzung von Cyt c und beim apoptotischen Zelltod zugeschrieben [198–201], beides Effekte, die in den hier untersuchten Zelllinien KD87-vermittelt auftraten.

Ausgehend von der Beobachtung, dass KD87 in Gesamtzelllysaten die Expression von HO-1 in beiden Zelllinien induziert, wurde HO-1 in unterschiedlichen Zellfraktionen analysiert. In den untersuchten Mitochondrien beider Zelllinien ergab sich mit der KD87-abhängigen Zunahme des HO-1-Proteins ein Hinweis auf mitochondriale Dysfunktion [87]. In der Tat wird die Translokation von HO-1 in die Mitochondrien in der Literatur als Reaktion auf sehr schwere zelluläre Stressbedingungen wie oxidativen Stress [87], Hypoxie [87], Lipopolysaccharid [177] und Zigarettenrauch [178] beschrieben. In einer dieser Studien wurde mitochondriales HO-1 mit oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion unter normoxischen Bedingungen assoziiert, im Gegensatz zur schützenden Wirkung von HO-1, das mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung steht [87]. In Übereinstimmung damit ging die erhöhte mitochondriale HO-1-Expression mit einer höheren ROS-Produktion und einer erhöhten mitochondrialen Rekrutierung der Autophagie-Marker LC-3 und Drp-1 einher, was auf eine erhöhte Mitophagie oder Autophagie hindeutet [87]. Interessanterweise scheinen auch Antikrebsmittel die mitochondriale Funktion von Tumorzellen über die Induktion der

Translokation von HO-1 in Mitochondrien zu stören, wie für das Isoflavon-Derivat ME-344 [179] und den NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY114085 bei Brustkrebszellen [180] gezeigt werden konnte.

Die Präinkubation von KD87-behandelten Zellen mit dem HO-1-Aktivitätshemmer SnPPIX führte zu einer Zunahme von mitochondrialem HO-1 in beiden Zelllinien. Während in der zytosolischen Fraktion KD87-behandelter Zellen die HO-1-Expression im Vergleich zum Vehikel in A375-Zellen nahezu unverändert blieb, stieg sie in A431-Zellen unter KD87-Behandlung an. Interessanterweise konnte durch den Einsatz von SnPPIX in A375-Zellen eine weitere Zunahme der HO-1 beobachtet werden, während das Expressionsniveau in A431-Zellen nahezu unverändert blieb. Frank et al. zeigten in Melanomzellen, dass die Anhäufung von Protoporphyrin (PPIX) durch die Verringerung der HO-1-Aktivität mittels SnPPIX gesteigert wird [76]. Hierbei gilt die transkriptionelle Aktivierung des HO-1-Gens als adaptive Reaktion auf oxidativen und zellulären Stress [76,87]. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten HO-1-Expression und könnte in der vorliegenden Arbeit die Zunahme, trotz vorangegangener Aktivitätshemmung, an HO-1-Protein in der mitochondrialen Fraktion beider Zelllinien erklären. Der Anstieg von HO-1 trotz SnPPIX-Hemmung in der zytosolischen Fraktion könnte somit ein Hinweis auf eine KD87-induzierte Neusynthese sein; eine Erhöhung der mitochondrialen Fraktion hingegen auf eine bereits erfolgte Synthese mit anschließender Translokation aufgrund eines toxischen Stimulus, wie in diesem Fall KD87. Andererseits wird die in der Literatur gut beschriebene Induktion der HO-1-Transkription durch SnPPIX durch die Tatsache relativiert, dass der HO-1-Inhibitor unter diesen Umständen immer noch eine ausreichende Blockierung der Aktivität des präformierten und de novo synthetisierten HO-1-Enzyms vermittelt [183,184].

Die KD87-induzierte Freisetzung von Cyt c wurde in beiden Zelllinien durch SnPPIX partiell, aber nicht signifikant gehemmt. Diese Befunde werden durch die Viabilitätsdaten aus dem metabolischen Assay bestätigt, demnach SnPPIX die durch KD87 reduzierte metabolische Aktivität im WST-1-Test partiell aufhebt. In der Literatur wurden in letzter Zeit eine Reihe von Arbeiten publiziert, die ebenso für eine zytotoxische Wirkung der HO-1 auf Tumorzellen sprechen [103,104,185–188]. Dabei konnte unter anderem eine Abnahme der Apoptose-typischen PARP-Spaltung und eine Zunahme der Lebensfähigkeit von oralen Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit HO-1-spezifischer siRNA behandelt wurden [104]. Zudem wurden wichtige Erkenntnisse über die proapoptische Rolle von HO-1 in kolorektalen Karzinomzellen unter Verwendung des HO-1-Induktors Cobalt-Protoporphyrin (CoPP) gewonnen. Dabei wurde festgestellt, dass endoplasmatische retikuläre Stressproteine und Caspasen, nicht aber ROS, am HO-1-vermittelten Zelltod beteiligt sind [20,185] sowie das Spaltprodukt CO, nicht aber Eisen und Biliverdin, eine Rolle als Aktivator der HO-1-vermittelten Apoptose spielen [185]. Andererseits kommt HO-1 auch eine Rolle bei der Krebsprogression zu [181,189]. Die Wirkung des Enzyms variiert somit zwischen verschiedenen Krebsarten. Dabei könnte die jeweilige subzelluläre Lokalisierung der HO-1 die

unterschiedlichen Wirkungen in verschiedenen Tumorentitäten erklären, wobei die, hier nicht näher untersuchte, nukleäre HO-1 an zellulären Prozessen beteiligt zu sein scheint, die zur Progression von Krebs führen [190].

Im Gegensatz zur mitochondrialen Cyt c Freisetzung zeigte der HO-1-Inhibitor SnPPiX in der vorliegenden Arbeit keine Wirkung auf die durch KD87 verringerten Spiegel der verschiedenen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe. Bislang wurden in der Literatur sowohl stimulierende [192–194] als auch inhibitorische Effekte [87,177,195] von HO-1 auf die mitochondriale Biogenese beschrieben. In den letztgenannten Studien war die Induktion von mitochondrialem HO-1 mit einer Abnahme der Aktivität der Cyt c Oxidase [87] sowie der Expression des hämhaltigen Komplexes III [87] und der hämhaltigen Cyt c Untereinheiten I [177,195] und II [195] verbunden, wahrscheinlich aufgrund der durch die HO-1 vermittelten Häm-Clearance. Andererseits wird HO-1 bzw. seinem Produkt CO eine aktivierende Rolle bei der mitochondrialen Biogenese zugeschrieben [193]. Dieser Vorgang verläuft über die Erhöhung der mitochondrialen ROS-Produktion sowie die Aktivierung des Peroxisomenrezeptor- $\gamma$ -Koaktivators 1 $\alpha$ , des nuklearen Respirationsfaktors 1 und des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A [192,194].

In der vorliegenden Arbeit resultierte der Einsatz von Hemmstoffen verschiedener Zelltodsignalwege wie Ferroptose, Onkose, Nekroptose und MPT-gesteuertem Zelltod, mit Ausnahme des letztgenannten, zu Negativbefunden im WST-1-Test. Dementsprechend wurde die KD87-vermittelte Abnahme der metabolischen Aktivität durch Einsatz entsprechender Inhibitoren nicht aufgehoben. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die bereits vorangeschrittene Schädigung der Mehrzahl der Mitochondrien sein, welche unaufhaltbar zum Zelltod führt, wie in der Literatur beschrieben wurde [171,196]. KD87 könnte somit eine direkte auf Mitochondrien abzielende Wirkung auslösen. Dies könnte im Vergleich zu klassischen Chemotherapeutika vorteilhaft sein, da diese oft in Mitochondrien-vorgelagerte Signalwege eingreifen, die wiederum anfällig für die Ausbildung von Resistenzmechanismen sind [197]. Herkömmliche Pharmaka sind in der Lage, z.B. über die Aktivierung des Onkogens p53 eine mitochondriale Schädigung wie MOMP hervorzurufen - ein Effekt, der im Falle einer Resistenzbildung verloren ginge. Insofern könnten Pharmaka wie das in der Arbeit untersuchte Indirubinderivat das Potenzial besitzen, durch eine direkte mitochondrial-vermittelte Wirkung diese Resistenzmechanismen zu umgehen und dementsprechend bei resistenten Krebsformen wirksam zu sein [197].

Weiterführende Untersuchungen könnten zudem Aufschluss über mögliche Faktoren geben, die einen weiteren möglichen antikanzerogenen Mechanismus von Indirubinderivaten, die Hemmung der Angiogenese, vermitteln. Pharmaka, die die Bildung kapillarähnlicher Strukturen hemmen, sind bei verschiedenen Krankheiten, darunter Krebs, nützlich. Studien mit Indirubinen, wie Indirubin, Indirubin-3'-monoxim und IDR-E804, konnten bereits eine direkte antiangiogene Wirkung auf HUVECs zeigen [202–204]. Hierbei wurden die HUVECs mit verschiedenen Konzentrationen der



Testsubstanzen behandelt und mikroskopisch die Fähigkeit zur Bildung kapillarähnlicher Strukturen (*tubes*) beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifizierter *tube formation*-Assay eingesetzt, wobei die Fähigkeit zur Bildung von *tubes* nach Behandlung mit konditionierten Medien erfolgte. Hierbei kann eine mögliche Veränderung der Sekretion tumorigener Faktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), die das Wachstum von Blutgefäßen anregen, durch die Behandlung der Tumorzellen mit der Testsubstanz und dessen Einfluss auf die Fähigkeit zur *tube*-Bildung abgebildet werden. Grundlegende und klinische Studien weisen darauf hin, dass die Hemmung der Angiogenese das Fortschreiten des Tumors und die Metastasierung inhibiert [205]. In dieser Arbeit bewirkten konditionierte Medien von mit KD87 behandelten A375- und A431-Zellen eine Reduktion der *tubes* im *tube formation*-Assay in HUVECs. Somit vermittelt KD87 seine antitumorigene Wirkung neben einer mitochondrialen Schädigung der Zellen auch über antiangiogene Effekte.

## 6. Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Indirubinderivat KD87 eine zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zelllinien vermittelt. Weiterhin werden sowohl Apoptose in beiden Zelllinien als auch partiell Autophagie in A375-Zellen induziert. Durch Behandlung mit KD87 kommt es in beiden Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. KD87 beeinträchtigt neben seinem Einfluss auf SDHB, einem Protein der Elektronentransportkette, die oxidative Phosphorylierung, was ultimativ zu einem Zusammenbruch des Energiestoffwechsels und Zelltod führt. Die Beeinträchtigung des Energiemetabolismus geht mit einer gestörten Atmung und geschädigten Mitochondrien einher. Die mitochondriale Schädigung wurde anhand verschiedener Parameter genauer untersucht und trat bereits in einem Konzentrationsbereich auf, der nur in moderatem Umfang auf die Viabilität der Zellen Einfluss nahm. Nach der Behandlung mit KD87 konnte eine abnormale Morphologie der Mitochondrien beobachtet werden, die durch Schwellung, Verlust der Cristae-Struktur und mitochondrialen Membranintegrität mit Freisetzung von Cyt c gekennzeichnet war. Die durch KD87 ausgelöste Induktion der HO-1 war partiell in den durch KD87 vermittelten Verlust der metabolischen Aktivität und die Erhöhung der mitochondrialen Cyt c Freisetzung involviert, wie entsprechende Inhibitorversuche belegen. Wenngleich der molekulare Mechanismus der KD87-vermittelten Wirkung noch viele Fragen aufwirft, steht fest, dass das Indirubinderivat den Zelltod in aggressiven Hautkrebszellen auslöst, was weitere Untersuchungen zur Entwicklung und Verbesserung von Zytostatika rechtfertigt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Mushtaq, S. The Immunogenetics of Non-melanoma Skin Cancer. *The Immunogenetics of Dermatologic Diseases*; Springer, Cham, 2022; pp 397–409.
2. Nehal, K.S.; Bichakjian, C.K. Update on Keratinocyte Carcinomas. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 363–374, doi:10.1056/NEJMra1708701.
3. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
4. Krebs - Krebs in Deutschland. Available online: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html) (accessed on 22 April 2022).
5. Dika, E.; Scarfi, F.; Ferracin, M.; Broseghini, E.; Marcelli, E.; Bortolani, B.; Campione, E.; Riefolo, M.; Ricci, C.; Lambertini, M. Basal Cell Carcinoma: A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21155572.
6. Brantsch, K.D.; Meisner, C.; Schönfisch, B.; Trilling, B.; Wehner-Caroli, J.; Röcken, M.; Breuninger, H. *Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study*, 2008.
7. Hautkrebs – Plattenepithelkarzinom (Spinaliom) | DKG. Available online: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/plattenepithelkarzinom.html> (accessed on 12 April 2022).
8. Kozovska, Z.; Gabrisova, V.; Kucerova, L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma* **2016**, *63*, 510–517, doi:10.4149/neo\_2016\_403.
9. Linares, M.A.; Zakaria, A.; Nizran, P. Skin Cancer. *Prim. Care* **2015**, *42*, 645–659, doi:10.1016/j.pop.2015.07.006.
10. Ramer, R.; Wendt, F.; Wittig, F.; Schäfer, M.; Boeckmann, L.; Emmert, S.; Hinz, B. Impact of Cannabinoid Compounds on Skin Cancer. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 1769, doi:10.3390/cancers14071769.
11. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71*, 7–33, doi:10.3322/caac.21654.

12. Rozeman, E.A.; Dekker, T.J.A.; Haanen, J.B.A.G.; Blank, C.U. Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2018**, *19*, 303–317, doi:10.1007/s40257-017-0325-6.
13. Ting, W.; Schultz, K.; Cac, N.N.; Peterson, M.; Walling, H.W. Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. *International Journal of Dermatology* **2007**, *46*, 1253–1257, doi:10.1111/j.1365-4632.2007.03408.x.
14. Samarasinghe, V.; Madan, V. Nonmelanoma skin cancer. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* **2012**, *5*, 3–10, doi:10.4103/0974-2077.94323.
15. Chin, D.; Boyle, G.M.; Porceddu, S.; Theile, D.R.; Parsons, P.G.; Coman, W.B. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert review of anticancer therapy* **2006**, *6*, 1111–1118, doi:10.1586/14737140.6.7.1111.
16. Berking, C.; Steeb, T.; Leiter, U.; Heppt, M.; Garbe, C. S3-Leitlinie „Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut“. *Forum* **2020**, *35*, 93–99, doi:10.1007/s12312-020-00746-7.
17. Rosenberg, S.A.; Yang, J.C.; Schwartzenuber, D.J.; Hwu, P.; Marincola, F.M.; Topalian, S.L.; Seipp, C.A.; Einhorn, J.H.; White, D.E.; Steinberg, S.M. Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 968–975, doi:10.1200/JCO.1999.17.3.968.
18. Chapman, P.B.; Einhorn, L.H.; Meyers, M.L.; Saxman, S.; Destro, A.N.; Panageas, K.S.; Begg, C.B.; Agarwala, S.S.; Schuchter, L.M.; Ernstoff, M.S.; et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2745–2751, doi:10.1200/JCO.1999.17.9.2745.
19. Swe, T.; Kim, K.B. Update on systemic therapy for advanced cutaneous melanoma and recent development of novel drugs. *Clin. Exp. Metastasis* **2018**, *35*, 503–520, doi:10.1007/s10585-018-9913-y.
20. Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Matz, M.; Nikšić, M.; Bonaventure, A.; Valkov, M.; Johnson, C.J.; Estève, J.; et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* **2018**, *391*, 1023–1075, doi:10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
21. Patel, M.; Eckburg, A.; Gantiwala, S.; Hart, Z.; Dein, J.; Lam, K.; Puri, N. Resistance to Molecularly Targeted Therapies in Melanoma. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13051115.

22. Hutchinson, M.-K.N.D.; Mierzwa, M.; D'Silva, N.J. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene* **2020**, *39*, 3638–3649, doi:10.1038/s41388-020-1250-3.
23. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 389–395, doi:10.1038/74651.
24. Adair, T.H.; Montani, J.-P. *Angiogenesis*; San Rafael (CA), 2010.
25. Karkkainen, M.J.; Petrova, T.V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* **2000**, *19*, 5598–5605, doi:10.1038/sj.onc.1203855.
26. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27–31, doi:10.1038/nm0195-27.
27. Folkman, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* **1972**, *175*, 409–416, doi:10.1097/00000658-197203000-00014.
28. Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 458–467, doi:10.1038/nrm2708.
29. Yin, Z.; Pascual, C.; Klionsky, D.J. Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell* **2016**, *3*, 588–596, doi:10.15698/mic2016.12.546.
30. Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* **2010**, *221*, 3–12, doi:10.1002/path.2697.
31. Denton, D.; Xu, T.; Kumar, S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol. Cell Biol.* **2015**, *93*, 35–42, doi:10.1038/icb.2014.85.
32. Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E.H.; Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 81–94, doi:10.1038/nrm3735.
33. Liu, Y.; Levine, B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 367–376, doi:10.1038/cdd.2014.143.
34. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 77–88, doi:10.1007/978-1-59745-157-4\_4.
35. Galluzzi, L.; Bravo-San Pedro, J.M.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Andrews, D.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; et al. Essential versus

- accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* **2015**, 22, 58–73, doi:10.1038/cdd.2014.137.
36. Green, D.R.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* **2014**, 345, 1250256, doi:10.1126/science.1250256.
37. Galluzzi, L.; Bravo-San Pedro, J.M.; Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death. *Nat. Cell Biol.* **2014**, 16, 728–736, doi:10.1038/ncb3005.
38. Galluzzi, L.; Kepp, O.; Kroemer, G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microb. Cell* **2016**, 3, 101–108, doi:10.15698/mic2016.03.483.
39. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, 26, 239–257, doi:10.1038/bjc.1972.33.
40. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35, 495–516, doi:10.1080/01926230701320337.
41. Norbury, C.J.; Hickson, I.D. Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 367–401, doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367.
42. Savill, J.; Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **2000**, 407, 784–788, doi:10.1038/35037722.
43. Yan, G.; Elbadawi, M.; Efferth, T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad Sci J* **2020**, doi:10.3892/wasj.2020.40.
44. Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **2000**, 301, 5–17, doi:10.1007/s004410000193.
45. Igney, F.H.; Krammer, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 277–288, doi:10.1038/nrc776.
46. Brenner, D.; Mak, T.W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, 21, 871–877, doi:10.1016/j.ceb.2009.09.004.
47. Wei, M.C.; Zong, W.-X.; Cheng, E.H.-Y.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A.J.; Roth, K.A.; MacGregor, G.R.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* **2001**, 292, 727–730, doi:10.1126/science.1059108.
48. Cain, K.; Bratton, S.B.; Cohen, G.M. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* **2002**, 84, 203–214, doi:10.1016/s0300-9084(02)01376-7.

49. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
50. Acehan, D.; Jiang, X.; Morgan, D.G.; Heuser, J.E.; Wang, X.; Akey, C.W. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome. *Molecular Cell* **2002**, *9*, 423–432, doi:10.1016/s1097-2765(02)00442-2.
51. Chaitanya, G.V.; Steven, A.J.; Babu, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.* **2010**, *8*, 31, doi:10.1186/1478-811X-8-31.
52. Song, I.-S.; Kim, H.-K.; Jeong, S.-H.; Lee, S.-R.; Kim, N.; Rhee, B.D.; Ko, K.S.; Han, J. Mitochondrial peroxiredoxin III is a potential target for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 7163–7185, doi:10.3390/ijms12107163.
53. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 582–592, doi:10.1002/cbin.11137.
54. Vandenabeele, P.; Galluzzi, L.; Vanden Berghe, T.; Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 700–714, doi:10.1038/nrm2970.
55. Galluzzi, L.; Kepp, O.; Krautwald, S.; Kroemer, G.; Linkermann, A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *35*, 24–32, doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.006.
56. Tait, S.W.G.; Oberst, A.; Quarato, G.; Milasta, S.; Haller, M.; Wang, R.; Karvela, M.; Ichim, G.; Yatim, N.; Albert, M.L.; et al. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 878–885, doi:10.1016/j.celrep.2013.10.034.
57. Leist, M.; Single, B.; Castoldi, A.F.; Kühnle, S.; Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1481–1486, doi:10.1084/jem.185.8.1481.
58. Denecker, G.; Vercammen, D.; Declercq, W.; Vandenabeele, P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 356–370, doi:10.1007/PL00000863.
59. Kim, J.-S.; He, L.; Lemasters, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 463–470, doi:10.1016/s0006-291x(03)00618-1.

60. Bonora, M.; Wieckowski, M.R.; Chinopoulos, C.; Kepp, O.; Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Pinton, P. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* **2015**, *34*, 1475–1486, doi:10.1038/onc.2014.96.
61. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 99–163, doi:10.1152/physrev.00013.2006.
62. Nakagawa, T.; Shimizu, S.; Watanabe, T.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Yamagata, H.; Inohara, H.; Kubo, T.; Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **2005**, *434*, 652–658, doi:10.1038/nature03317.
63. Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 33–50, doi:10.1038/nrc.2017.96.
64. Blázquez, C.; Sánchez, C.; Daza, A.; Galve-Roperh, I.; Guzmán, M. The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 1759–1768, doi:10.1046/j.1471-4159.1999.721759.x.
65. Blázquez, C.; González-Feria, L.; Alvarez, L.; Haro, A.; Casanova, M.L.; Guzmán, M. Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5617–5623, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3927.
66. Jeffries, K.A.; Krupenko, N.I. Ceramide Signaling and p53 Pathways. *Adv. Cancer Res.* **2018**, *140*, 191–215, doi:10.1016/bs.acr.2018.04.011.
67. Ballou, L.R.; Chao, C.P.; Holness, M.A.; Barker, S.C.; Raghow, R. Interleukin-1-mediated PGE2 production and sphingomyelin metabolism. Evidence for the regulation of cyclooxygenase gene expression by sphingosine and ceramide. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20044–20050.
68. Sentelle, R.D.; Senkal, C.E.; Jiang, W.; Ponnusamy, S.; Gencer, S.; Selvam, S.P.; Ramshesh, V.K.; Peterson, Y.K.; Lemasters, J.J.; Szulc, Z.M.; et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 831–838, doi:10.1038/nchembio.1059.
69. Ding, W.-X.; Yin, X.-M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* **2012**, *393*, 547–564, doi:10.1515/hsz-2012-0119.
70. Tenhunen, R.; Marver, H.S.; Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *61*, 748–755, doi:10.1073/pnas.61.2.748.



71. Zelenka, J.; Koncošová, M.; Ruml, T. Targeting of stress response pathways in the prevention and treatment of cancer. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 583–602, doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.007.
72. Maines, M.D.; Trakshel, G.M.; Kutty, R.K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 411–419.
73. Trakshel, G.M.; Kutty, R.K.; Maines, M.D. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11131–11137.
74. Hayashi, S.; Omata, Y.; Sakamoto, H.; Higashimoto, Y.; Hara, T.; Sagara, Y.; Noguchi, M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* **2004**, *336*, 241–250, doi:10.1016/j.gene.2004.04.002.
75. Jozkowicz, A.; Huk, I.; Nigisch, A.; Weigel, G.; Weidinger, F.; Dulak, J. Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* **2002**, *4*, 577–585, doi:10.1089/15230860260220076.
76. Frank, J.; Lornejad-Schäfer, M.; Schöffl, H.; Flaccus, A.; Lambert, C.; Biesalski, H. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of melanoma cells to ALA-based photodynamic therapy. *Int J Oncol* **2007**, *31*, 1539–1545, doi:10.3892/ijo.31.6.1539.
77. Miyata, Y.; Kanda, S.; Mitsunari, K.; Asai, A.; Sakai, H. Heme oxygenase-1 expression is associated with tumor aggressiveness and outcomes in patients with bladder cancer: a correlation with smoking intensity. *Transl. Res.* **2014**, *164*, 468–476, doi:10.1016/j.trsl.2014.06.010.
78. Degese, M.S.; Mendizabal, J.E.; Gandini, N.A.; Gutkind, J.S.; Molinolo, A.; Hewitt, S.M.; Curino, A.C.; Coso, O.A.; Facchinetti, M.M. Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data. *Lung Cancer* **2012**, *77*, 168–175, doi:10.1016/j.lungcan.2012.02.016.
79. Torisu-Itakura, H.; Furue, M.; Kuwano, M.; Ono, M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **2000**, *91*, 906–910, doi:10.1111/j.1349-7006.2000.tb01033.x.
80. Deininger, M.H.; Meyermann, R.; Trautmann, K.; Duffner, F.; Grote, E.H.; Wickboldt, J.; Schluesener, H.J. Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells

- accumulate during oligodendrogloma progression. *Brain Res.* **2000**, *882*, 1–8, doi:10.1016/s0006-8993(00)02594-4.
81. Keyse, S.M.; Tyrrell, R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 99–103, doi:10.1073/pnas.86.1.99.
82. Shibahara, S.; Müller, R.; Taguchi, H.; Yoshida, T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 7865–7869, doi:10.1073/pnas.82.23.7865.
83. Kim, H.P.; Wang, X.; Galbiati, F.; Ryter, S.W.; Choi, A.M.K. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1080–1089, doi:10.1096/fj.03-1391com.
84. Bindu, S.; Pal, C.; Dey, S.; Goyal, M.; Alam, A.; Iqbal, M.S.; Dutta, S.; Sarkar, S.; Kumar, R.; Maity, P.; et al. Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39387–39402, doi:10.1074/jbc.M111.279893.
85. Lin, Q.; Weis, S.; Yang, G.; Weng, Y.-H.; Helston, R.; Rish, K.; Smith, A.; Bordner, J.; Polte, T.; Gaunitz, F.; et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20621–20633, doi:10.1074/jbc.M607954200.
86. Chiang, S.-K.; Chen, S.-E.; Chang, L.-C. The Role of HO-1 and Its Crosstalk with Oxidative Stress in Cancer Cell Survival. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10092401.
87. Bansal, S.; Biswas, G.; Avadhani, N.G. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 273–283, doi:10.1016/j.redox.2013.07.004.
88. Luu Hoang, K.N.; Anstee, J.E.; Arnold, J.N. The Diverse Roles of Heme Oxygenase-1 in Tumor Progression. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 658315, doi:10.3389/fimmu.2021.658315.
89. Alam, J.; Cook, J.L. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *36*, 166–174, doi:10.1165/rcmb.2006-0340TR.
90. Loboda, A.; Jazwa, A.; Grochot-Przeczek, A.; Rutkowski, A.J.; Cisowski, J.; Agarwal, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular

- mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1767–1812, doi:10.1089/ars.2008.2043.
91. Loboda, A.; Damulewicz, M.; Pyza, E.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 3221–3247, doi:10.1007/s00018-016-2223-0.
92. Vafa, O.; Wade, M.; Kern, S.; Beeche, M.; Pandita, T.K.; Hampton, G.M.; Wahl, G.M. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Molecular Cell* **2002**, *9*, 1031–1044, doi:10.1016/s1097-2765(02)00520-8.
93. Maines, M.D.; Abrahamsson, P.A. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* **1996**, *47*, 727–733, doi:10.1016/s0090-4295(96)00010-6.
94. Jozkowicz, A.; Was, H.; Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2099–2117, doi:10.1089/ars.2007.1659.
95. Was, H.; Cichon, T.; Smolarczyk, R.; Rudnicka, D.; Stopa, M.; Chevalier, C.; Leger, J.J.; Lackowska, B.; Grochot, A.; Bojkowska, K.; et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am. J. Pathol.* **2006**, *169*, 2181–2198, doi:10.2353/ajpath.2006.051365.
96. Duckers, H.J.; Boehm, M.; True, A.L.; Yet, S.F.; San, H.; Park, J.L.; Clinton Webb, R.; Lee, M.E.; Nabel, G.J.; Nabel, E.G. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 693–698, doi:10.1038/89068.
97. Johnson, T.M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Lowenstein, R.A.; Finkel, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11848–11852, doi:10.1073/pnas.93.21.11848.
98. Busserolles, J.; Megías, J.; Terencio, M.C.; Alcaraz, M.J. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1510–1517, doi:10.1016/j.biocel.2006.03.013.
99. Cisowski, J.; Loboda, A.; Józkwicz, A.; Chen, S.; Agarwal, A.; Dulak, J. Role of heme oxygenase-1 in hydrogen peroxide-induced VEGF synthesis: effect of HO-1 knockout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 670–676, doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.083.
100. Józkwicz, A.; Huk, I.; Nigisch, A.; Weigel, G.; Dietrich, W.; Motterlini, R.; Dulak, J. Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and

- inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5*, 155–162, doi:10.1089/152308603764816514.
101. Jazwa, A.; Loboda, A.; Golda, S.; Cisowski, J.; Szelag, M.; Zagorska, A.; Sroczynska, P.; Drukala, J.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1250–1263, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.016.
102. Liu, L.; Wu, Y.; Bian, C.; Nisar, M.F.; Wang, M.; Hu, X.; Diao, Q.; Nian, W.; Wang, E.; Xu, W.; et al. Heme oxygenase 1 facilitates cell proliferation via the B-Raf-ERK signaling pathway in melanoma. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 3, doi:10.1186/s12964-018-0313-3.
103. Chien, M.-H.; Yang, W.-E.; Yang, Y.-C.; Ku, C.-C.; Lee, W.-J.; Tsai, M.-Y.; Lin, C.-W.; Yang, S.-F. Dual Targeting of the p38 MAPK-HO-1 Axis and cIAP1/XIAP by Demethoxycurcumin Triggers Caspase-Mediated Apoptotic Cell Death in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12030703.
104. Hsieh, M.-J.; Lin, C.-C.; Lo, Y.-S.; Chuang, Y.-C.; Ho, H.-Y.; Chen, M.-K. Chrysofenol D Triggers Apoptosis through Heme Oxygenase-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13174327.
105. Meyer, N.; Zielke, S.; Michaelis, J.B.; Linder, B.; Warnsmann, V.; Rakel, S.; Osiewacz, H.D.; Fulda, S.; Mittelbronn, M.; Münch, C.; et al. AT 101 induces early mitochondrial dysfunction and HMOX1 (heme oxygenase 1) to trigger mitophagic cell death in glioma cells. *Autophagy* **2018**, *14*, 1693–1709, doi:10.1080/15548627.2018.1476812.
106. Hoessel, R.; Leclerc, S.; Endicott, J.A.; Nobel, M.E.; Lawrie, A.; Tunnah, P.; Leost, M.; Damiens, E.; Marie, D.; Marko, D.; et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 60–67, doi:10.1038/9035.
107. Han, J. Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. *Journal of Ethnopharmacology* **1988**, *24*, 1–17, doi:10.1016/0378-8741(88)90135-3.
108. Schäfer, M.; Semmler, M.L.; Bernhardt, T.; Fischer, T.; Kakkassery, V.; Ramer, R.; Hein, M.; Bekeschus, S.; Langer, P.; Hinz, B.; et al. Small Molecules in the Treatment of Squamous Cell Carcinomas: Focus on Indirubins. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13081770.
109. Govardhanagiri, S.; Bethi, S.; Nagaraju, G.P. *Small Molecules and Pancreatic Cancer Trials and Troubles.*

110. Li, Q.; Kang, C. Mechanisms of Action for Small Molecules Revealed by Structural Biology in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21155262.
111. Xiao, Z.; Hao, Y.; Liu, B.; Qian, L. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1763–1768, doi:10.1080/1042819021000006295.
112. Eisenbrand, G.; Hippe, F.; Jakobs, S.; Muehlbeyer, S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2004**, *130*, 627–635, doi:10.1007/s00432-004-0579-2.
113. Marko, D.; Schätzle, S.; Friedel, A.; Genzlinger, A.; Zankl, H.; Meijer, L.; Eisenbrand, G. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 283–289, doi:10.1054/bjoc.2000.1546.
114. Meijer, L.; Skaltsounis, A.-L.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Knockaert, M.; Leost, M.; Ryan, X.P.; Vonica, C.A.; Brivanlou, A.; Dajani, R.; et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1255–1266, doi:10.1016/j.chembiol.2003.11.010.
115. Nam, S.; Buettner, R.; Turkson, J.; Kim, D.; Cheng, J.Q.; Muehlbeyer, S.; Hippe, F.; Vatter, S.; Merz, K.-H.; Eisenbrand, G.; et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 5998–6003, doi:10.1073/pnas.0409467102.
116. Zhang, Y.; Du, Z.; Zhuang, Z.; Wang, Y.; Wang, F.; Liu, S.; Wang, H.; Feng, H.; Li, H.; Wang, L.; et al. E804 induces growth arrest, differentiation and apoptosis of glioblastoma cells by blocking Stat3 signaling. *J. Neurooncol.* **2015**, *125*, 265–275, doi:10.1007/s11060-015-1917-8.
117. Maskey, R.P.; Grün-Wollny, I.; Fiebig, H.H.; Laatsch, H. Akashins A, B, and C: Novel Chlorinated Indigoglycosides from *Streptomyces* sp. GW 48/1497. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 597–599, doi:10.1002/1521-3773(20020215)41:4<597:AID-ANIE597>3.0.CO;2-Z.
118. Libnow, S.; Methling, K.; Hein, M.; Michalik, D.; Harms, M.; Wende, K.; Flemming, A.; Köckerling, M.; Reinke, H.; Bednarski, P.J.; et al. Synthesis of indirubin-N'-glycosides and their anti-proliferative activity against human cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16*, 5570–5583, doi:10.1016/j.bmc.2008.04.003.
119. Berger, A.; Quast, S.-A.; Plötz, M.; Hein, M.; Kunz, M.; Langer, P.; Eberle, J. Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative--Enhancement

- of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 71–81, doi:10.1016/j.bcp.2010.09.010.
120. Kunz, M.; Driller, K.M.; Hein, M.; Libnow, S.; Hohensee, I.; Ramer, R.; Hinz, B.; Berger, A.; Eberle, J.; Langer, P. Synthesis of thia-analogous indirubin N-Glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 534–539, doi:10.1002/cmdc.200900506.
121. Moon, M.J.; Lee, S.K.; Lee, J.-W.; Song, W.K.; Kim, S.W.; Kim, J.I.; Cho, C.; Choi, S.J.; Kim, Y.-C. Synthesis and structure-activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14*, 237–246, doi:10.1016/j.bmc.2005.08.008.
122. Zhivkova, V.; Kiecker, F.; Langer, P.; Eberle, J. Crucial role of reactive oxygen species (ROS) for the proapoptotic effects of indirubin derivative DKP-073 in melanoma cells. *Molecular carcinogenesis* **2019**, *58*, 258–269, doi:10.1002/mc.22924.
123. Song, J.H.; Lee, J.-E.; Cho, K.-M.; Park, S.-H.; Kim, H.-J.; Kim, Y.-C.; Kim, T.S. 5-diphenylacetamido-indirubin-3'-oxime as a novel mitochondria-targeting agent with anti-leukemic activities. *Molecular carcinogenesis* **2016**, *55*, 611–621, doi:10.1002/mc.22307.
124. Beisker, W.; Hittelman, W.N. Measurement of the kinetics of DNA repair synthesis after uv irradiation using immunochemical staining of incorporated 5-bromo-2'-deoxyuridine and flow cytometry. *Exp. Cell Res.* **1988**, *174*, 156–167, doi:10.1016/0014-4827(88)90151-6.
125. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685, doi:10.1038/227680a0.
126. Reynolds, J.A.; Tanford, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1970**, *66*, 1002–1007, doi:10.1073/pnas.66.3.1002.
127. Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, *51 Pt 1*, 263–273, doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032.
128. Mullis, K.B.; Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **1987**, *155*, 335–350, doi:10.1016/0076-6879(87)55023-6.
129. Shaffer, A.L.; Wojnar, W.; Nelson, W. Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **1990**, *190*, 292–296, doi:10.1016/0003-2697(90)90196-g.

130. Cell mito stress test, Seahorse Cell Mito Stress Test Kit | Agilent. Available online: <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-assay-kits-reagents-cell-assay-media/seahorse-xf-cell-mito-stress-test-kit-740885> (accessed on 29 June 2022).
131. Grant, D.S.; Tashiro, K.; Segui-Real, B.; Yamada, Y.; Martin, G.R.; Kleinman, H.K. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* **1989**, *58*, 933–943, doi:10.1016/0092-8674(89)90945-8.
132. Plesca, D.; Mazumder, S.; Almasan, A. Chapter 6 DNA Damage Response and Apoptosis. *Programmed Cell Death, The Biology and Therapeutic Implications of Cell Death, Part B*; Elsevier, 2008; pp 107–122, ISBN 9780123744647.
133. Arenz, C.; Giannis, A. Synthesis of the First Selective Irreversible Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1440–1442, doi:10.1002/(SICI)1521-3773(20000417)39:8<1440:AID-ANIE1440>3.0.CO;2-R.
134. Merrill, A.H.; Sullards, M.C.; Wang, E.; Voss, K.A.; Riley, R.T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109 Suppl 2*, 283–289, doi:10.1289/ehp.01109s2283.
135. Miyake, Y.; Kozutsumi, Y.; Nakamura, S.; Fujita, T.; Kawasaki, T. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *211*, 396–403, doi:10.1006/bbrc.1995.1827.
136. Xu, Y.; Liu, Y.; Yang, C.; Kang, L.; Wang, M.; Hu, J.; He, H.; Song, W.; Tang, H. Macrophages transfer antigens to dendritic cells by releasing exosomes containing dead-cell-associated antigens partially through a ceramide-dependent pathway to enhance CD4(+) T-cell responses. *Immunology* **2016**, *149*, 157–171, doi:10.1111/imm.12630.
137. Blažević, T.; Heiss, E.H.; Atanasov, A.G.; Breuss, J.M.; Dirsch, V.M.; Uhrin, P. Indirubin and Indirubin Derivatives for Counteracting Proliferative Diseases. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 654098, doi:10.1155/2015/654098.
138. Perabo, F.G.E.; Frössler, C.; Landwehrs, G.; Schmidt, D.H.; Rucker, A. von; Wirger, A.; Müller, S.C. Indirubin-3'-monoxime, a CDK inhibitor induces growth inhibition and apoptosis-independent up-regulation of survivin in transitional cell cancer. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 2129–2135.
139. Ferandin, Y.; Bettayeb, K.; Kritsanida, M.; Lozach, O.; Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.-L.; Meijer, L. 3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4638–4649, doi:10.1021/jm060314i.

140. Ribas, J.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Knockaert, M.; Garrofé-Ochoa, X.; Totzke, F.; Schächtele, C.; Mester, J.; Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; et al. 7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death. *Oncogene* **2006**, *25*, 6304–6318, doi:10.1038/sj.onc.1209648.
141. Fischle, A.; Schwarz, R.; Wendt, F.; Kordt, M.; Ramer, R.; Boeckmann, L.; Hein, M.; Langer, P.; Emmert, S.; Vollmar, B.; et al. A Sensitive LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Two Thia-Analogous Indirubin N-Glycosides and Indirubin-3'-Monoxime in Plasma and Cell Culture Medium. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27093031.
142. Gaboriaud-Kolar, N.; Vougiannopoulou, K.; Skaltsounis, A.-L. Indirubin derivatives: a patent review (2010 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25*, 583–593, doi:10.1517/13543776.2015.1019865.
143. Li, C.; Go, Y.; Mao, Z.; Koyano, K.; Kai, Y.; Kanehisa, N.; Zhu, Q.; Zhou, Z.; Wu, S. The Synthesis, Antileukemic Activity, and Crystal Structures of Indirubin Derivatives. *BCSJ* **1996**, *69*, 1621–1627, doi:10.1246/bcsj.69.1621.
144. Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.-L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Tarricone, A.; Musacchio, A.; Roe, S.M.; Pearl, L.; Leost, M.; et al. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 935–946, doi:10.1021/jm031016d.
145. Lee, J.-W.; Moon, M.J.; Min, H.-Y.; Chung, H.-J.; Park, E.-J.; Park, H.J.; Hong, J.-Y.; Kim, Y.-C.; Lee, S.K. Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3'-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3948–3952, doi:10.1016/j.bmcl.2005.05.105.
146. MacDonald, M.L.; Lamerdin, J.; Owens, S.; Keon, B.H.; Bilter, G.K.; Shang, Z.; Huang, Z.; Yu, H.; Dias, J.; Minami, T.; et al. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 329–337, doi:10.1038/nchembio790.
147. Nam, S.; Buettner, R.; Turkson, J.; Kim, D.; Cheng, J.Q.; Muehlbeyer, S.; Hippe, F.; Vatter, S.; Merz, K.-H.; Eisenbrand, G.; et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 5998–6003, doi:10.1073/pnas.0409467102.
148. McCarthy, N.J.; Whyte, M.K.; Gilbert, C.S.; Evan, G.I. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 215–227, doi:10.1083/jcb.136.1.215.



149. Prabhakaran, K.; Li, L.; Borowitz, J.L.; Isom, G.E. Caspase inhibition switches the mode of cell death induced by cyanide by enhancing reactive oxygen species generation and PARP-1 activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *195*, 194–202, doi:10.1016/j.taap.2003.11.012.
150. Dunai, Z.A.; Imre, G.; Barna, G.; Korcsmaros, T.; Petak, I.; Bauer, P.I.; Mihalik, R. Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e41945, doi:10.1371/journal.pone.0041945.
151. Steinhart, L.; Belz, K.; Fulda, S. Smac mimetic and demethylating agents synergistically trigger cell death in acute myeloid leukemia cells and overcome apoptosis resistance by inducing necroptosis. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e802-, doi:10.1038/cddis.2013.320.
152. Li, Z.; Wang, H.; Wei, J.; Han, L.; Guo, Z. Indirubin exerts anticancer effects on human glioma cells by inducing apoptosis and autophagy. *AMB Express* **2020**, *10*, 171, doi:10.1186/s13568-020-01107-2.
153. Wattenberg, E.V.; Badria, F.A.; Shier, W.T. Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *227*, 622–627, doi:10.1006/bbrc.1996.1555.
154. Ramer, R.; Weinzierl, U.; Schwind, B.; Brune, K.; Hinz, B. Ceramide is involved in r(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1189–1198, doi:10.1124/mol.64.5.1189.
155. Hill, M.; Pereira, V.; Chauveau, C.; Zagani, R.; Remy, S.; Tesson, L.; Mazal, D.; Ubillos, L.; Brion, R.; Asghar, K.; et al. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1957–1968, doi:10.1096/fj.05-3875com.
156. Andrés, N.C.; Fermento, M.E.; Gandini, N.A.; Romero, A.L.; Ferro, A.; Donna, L.G.; Curino, A.C.; Facchinetti, M.M. Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: involvement of p53. *Exp. Mol. Pathol.* **2014**, *97*, 321–331, doi:10.1016/j.yexmp.2014.09.012.
157. Gandini, N.A.; Alonso, E.N.; Fermento, M.E.; Mascaró, M.; Abba, M.C.; Coló, G.P.; Arévalo, J.; Ferronato, M.J.; Guevara, J.A.; Núñez, M.; et al. Heme Oxygenase-1 Has an Antitumor Role in Breast Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *30*, 2030–2049, doi:10.1089/ars.2018.7554.
158. Suttner, D.M.; Dennery, P.A. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* **1999**, *13*, 1800–1809, doi:10.1096/fasebj.13.13.1800.

159. Maruhashi, K.; Kasahara, Y.; Ohta, K.; Wada, T.; Ohta, K.; Nakamura, N.; Toma, T.; Koizumi, S.; Yachie, A. Paradoxical enhancement of oxidative cell injury by overexpression of heme oxygenase-1 in an anchorage-dependent cell ECV304. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *93*, 552–562, doi:10.1002/jcb.20170.
160. Zuckerbraun, B.S.; Chin, B.Y.; Bilban, M.; d'Avila, J.d.C.; Rao, J.; Billiar, T.R.; Otterbein, L.E. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1099–1106, doi:10.1096/fj.06-6644com.
161. D'Amico, G.; Lam, F.; Hagen, T.; Moncada, S. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2291–2298, doi:10.1242/jcs.02914.
162. Chernick, R.J.; Martasek, P.; Levere, R.D.; Margreiter, R.; Abraham, N.G. Sensitivity of human tissue heme oxygenase to a new synthetic metalloporphyrin. *Hepatology* **1989**, *10*, 365–369, doi:10.1002/hep.1840100320.
163. Liang, M.; Croatt, A.J.; Nath, K.A. Mechanisms underlying induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2000**, *279*, F728–35, doi:10.1152/ajprenal.2000.279.4.F728.
164. Böckmann, S.; Hinz, B. Cannabidiol Promotes Endothelial Cell Survival by Heme Oxygenase-1-Mediated Autophagy. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9071703.
165. Schwartz, M.; Böckmann, S.; Hinz, B. Up-regulation of heme oxygenase-1 expression and inhibition of disease-associated features by cannabidiol in vascular smooth muscle cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 34595–34616, doi:10.18632/oncotarget.26191.
166. Chang, S.-H.; Garcia, J.; Melendez, J.A.; Kilberg, M.S.; Agarwal, A. Haem oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 877–885, doi:10.1042/BJ20021731.
167. Halasi, M.; Wang, M.; Chavan, T.S.; Gaponenko, V.; Hay, N.; Gartel, A.L. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *Biochem. J.* **2013**, *454*, 201–208, doi:10.1042/BJ20130282.
168. Mokhtari, V.; Afsharian, P.; Shahhoseini, M.; Kalantar, S.M.; Moini, A. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell J.* **2017**, *19*, 11–17, doi:10.22074/cellj.2016.4872.
169. Kurita, M.; Hanada, S.; Ichimaru, Y.; Saito, H.; Tabata, K.; Asami, S.; Miyairi, S.; Suzuki, T. Indirubin 3'-Epoxide Induces Caspase-Independent Cell Death in Human Neuroblastoma. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39*, 993–999, doi:10.1248/bpb.b15-00999.

170. Galluzzi, L.; Kroemer, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **2008**, *135*, 1161–1163, doi:10.1016/j.cell.2008.12.004.
171. Tait, S.W.G.; Green, D.R. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a008706.
172. He, L.; Lemasters, J.J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett.* **2002**, *512*, 1–7, doi:10.1016/s0014-5793(01)03314-2.
173. Lemasters, J.J.; Nieminen, A.-L.; Qian, T.; Trost, L.C.; Elmore, S.P.; Nishimura, Y.; Crowe, R.A.; Cascio, W.E.; Bradham, C.A.; Brenner, D.A.; et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1998**, *1366*, 177–196, doi:10.1016/S0005-2728(98)00112-1.
174. Friberg, H.; Ferrand-Drake, M.; Bengtsson, F.; Halestrap, A.P.; Wieloch, T. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 5151–5159.
175. Masgras, I.; Rasola, A.; Bernardi, P. Induction of the permeability transition pore in cells depleted of mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1817*, 1860–1866, doi:10.1016/j.bbabo.2012.02.022.
176. Hu, G.; Wang, K.; Groenendyk, J.; Barakat, K.; Mizianty, M.J.; Ruan, J.; Michalak, M.; Kurgan, L. Human structural proteome-wide characterization of Cyclosporine A targets. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3561–3566, doi:10.1093/bioinformatics/btu581.
177. Converso, D.P.; Taillé, C.; Carreras, M.C.; Jaitovich, A.; Poderoso, J.J.; Boczkowski, J. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1236–1238, doi:10.1096/fj.05-4204fje.
178. Slebos, D.-J.; Ryter, S.W.; van der Toorn, M.; Liu, F.; Guo, F.; Baty, C.J.; Karlsson, J.M.; Watkins, S.C.; Kim, H.P.; Wang, X.; et al. Mitochondrial Localization and Function of Heme Oxygenase-1 in Cigarette Smoke-Induced Cell Death. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2006**, *36*, 409–417, doi:10.1165/rcmb.2006-0214OC.
179. Zhang, L.; Zhang, J.; Ye, Z.; Manevich, Y.; Ball, L.E.; Bethard, J.R.; Jiang, Y.-L.; Broome, A.-M.; Dalton, A.C.; Wang, G.Y.; et al. Isoflavone ME-344 Disrupts Redox Homeostasis and Mitochondrial Function by Targeting Heme Oxygenase 1. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4072–4085, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3503.

180. Chang, L.-C.; Chiang, S.-K.; Chen, S.-E.; Yu, Y.-L.; Chou, R.-H.; Chang, W.-C. Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis. *Cancer Lett.* **2018**, *416*, 124–137, doi:10.1016/j.canlet.2017.12.025.
181. Chiang, S.-K.; Chen, S.-E.; Chang, L.-C. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, doi:10.3390/ijms20010039.
182. Shahrokhi, S.Z.; Karami Tehrani, F.S.; Salami, S. Induction of cell apoptosis by biliverdin reductase inhibitor in MCF-7 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines: Experimental and in silico studies. *EXCLI J.* **2021**, *20*, 1502–1516, doi:10.17179/excli2021-4069.
183. Chang, T.; Wu, L.; Wang, R. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by chronic heme treatment. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H999-H1007, doi:10.1152/ajpheart.01289.2007.
184. Sardana, M.K.; Kappas, A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 2464–2468, doi:10.1073/pnas.84.8.2464.
185. Wu, M.-S.; Chien, C.-C.; Chang, J.; Chen, Y.-C. Pro-apoptotic effect of haem oxygenase-1 in human colorectal carcinoma cells via endoplasmic reticular stress. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 5692–5704, doi:10.1111/jcmm.14482.
186. Chuang, C.-Y.; Lin, C.-W.; Su, C.-W.; Chen, Y.-T.; Yang, W.-E.; Yang, S.-F.; Su, S.-C. Deoxyshikonin Mediates Heme Oxygenase-1 Induction and Apoptotic Response via p38 Signaling in Tongue Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23137115.
187. Su, C.-W.; Chuang, C.-Y.; Chen, Y.-T.; Yang, W.-E.; Pan, Y.-P.; Lin, C.-W.; Yang, S.-F. FLLL32 Triggers Caspase-Mediated Apoptotic Cell Death in Human Oral Cancer Cells by Regulating the p38 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222111860.
188. Chen, Y.-T.; Lin, C.-W.; Su, C.-W.; Yang, W.-E.; Chuang, C.-Y.; Su, S.-C.; Hsieh, M.-J.; Yang, S.-F. Magnolol Triggers Caspase-Mediated Apoptotic Cell Death in Human Oral Cancer Cells through JNK1/2 and p38 Pathways. *Biomedicines* **2021**, *9*, doi:10.3390/biomedicines9101295.
189. Nitti, M.; Piras, S.; Marinari, U.M.; Moretta, L.; Pronzato, M.A.; Furfaro, A.L. HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxidants (Basel)* **2017**, *6*, doi:10.3390/antiox6020029.

190. Mascaró, M.; Alonso, E.N.; Alonso, E.G.; Lacunza, E.; Curino, A.C.; Facchinetti, M.M. Nuclear Localization of Heme Oxygenase-1 in Pathophysiological Conditions: Does It Explain the Dual Role in Cancer? *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10*, doi:10.3390/antiox10010087.
191. Yu, Z.; Wei, X.; Liu, L.; Sun, H.; Fang, T.; Wang, L.; Li, Y.; Sui, W.; Wang, K.; He, Y.; et al. Indirubin-3'-monoxime acts as proteasome inhibitor: Therapeutic application in multiple myeloma. *EBioMedicine* **2022**, *78*, 103950, doi:10.1016/j.ebiom.2022.103950.
192. Hull, T.D.; Boddu, R.; Guo, L.; Tisher, C.C.; Traylor, A.M.; Patel, B.; Joseph, R.; Prabhu, S.D.; Suliman, H.B.; Piantadosi, C.A.; et al. Heme oxygenase-1 regulates mitochondrial quality control in the heart. *JCI Insight*, *1*, doi:10.1172/jci.insight.85817.
193. Suliman, H.B.; Piantadosi, C.A. Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 20–48, doi:10.1124/pr.115.011502.
194. Rayamajhi, N.; Kim, S.-K.; Go, H.; Joe, Y.; Callaway, Z.; Kang, J.-G.; Ryter, S.W.; Chung, H.T. Quercetin Induces Mitochondrial Biogenesis through Activation of HO-1 in HepG2 Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/154279.
195. Bolisetty, S.; Traylor, A.; Zarjou, A.; Johnson, M.S.; Benavides, G.A.; Ricart, K.; Boddu, R.; Moore, R.D.; Landar, A.; Barnes, S.; et al. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 decreases oxidative stress in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2013**, *305*, F255-64, doi:10.1152/ajprenal.00160.2013.
196. Ma, K.; Chen, G.; Li, W.; Kepp, O.; Zhu, Y.; Chen, Q. Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 467, doi:10.3389/fcell.2020.00467.
197. Fulda, S.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 447–464, doi:10.1038/nrd3137.
198. Kanno, T.; Fujita, H.; Muranaka, S.; Yano, H.; Utsumi, T.; Yoshioka, T.; Inoue, M.; Utsumi, K. Mitochondrial swelling and cytochrome c release: sensitivity to cyclosporin A and calcium. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **2002**, *34*, 91–102.
199. Skinner, S.K.; Solania, A.; Wolan, D.W.; Cohen, M.S.; Ryan, T.E.; Hepple, R.T. Mitochondrial Permeability Transition Causes Mitochondrial Reactive Oxygen Species- and Caspase 3-Dependent Atrophy of Single Adult Mouse Skeletal Muscle Fibers. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10102586.
200. Qi, Y.-H.; Mao, F.-F.; Zhou, Z.-Q.; Liu, D.-C.; Min-Yu; Deng, X.-Y.; Li, J.-W.; Mei, F.-Z. The release of cytochrome c and the regulation of the programmed cell death progress in the endosperm of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under waterlogging. *Protoplasma* **2018**, *255*, 1651–1665, doi:10.1007/s00709-018-1256-7.

201. Naserzadeh, P.; Ansari Esfeh, F.; Kaviani, M.; Ashtari, K.; Kheirbakhsh, R.; Salimi, A.; Pourahmad, J. Single-walled carbon nanotube, multi-walled carbon nanotube and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in melanoma cells. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **2018**, *37*, 157–166, doi:10.1080/15569527.2017.1363227.
202. Shin, E.-K.; Kim, J.-K. Indirubin derivative E804 inhibits angiogenesis. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 164, doi:10.1186/1471-2407-12-164.
203. Li, Z.; Zhu, C.; An, B.; Chen, Y.; He, X.; Qian, L.; Lan, L.; Li, S. Indirubin inhibits cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis in tumor-derived endothelial cells. *Onco. Targets. Ther.* **2018**, *11*, 2937–2944, doi:10.2147/OTT.S157949.
204. Kim, J.-K.; Shin, E.K.; Kang, Y.-H.; Park, J.H.Y. Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a chinese antileukemia medicine, inhibits angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 1384–1391, doi:10.1002/jcb.23055.
205. Avraamides, C.J.; Garmy-Susini, B.; Varnier, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617, doi:10.1038/nrc2353.

**Danksagung**

Ich möchte mich bei Prof. Burkhard Hinz bedanken: Für die Betreuung und für die Möglichkeit im Rahmen des Verbundprojektes ONKOTHER-H an einem spannenden Promotionsthema arbeiten zu dürfen.

Herzlichen Dank an Prof. Inna Sokolova für die Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock.

Weiterhin danke ich PD Robert Ramer, welcher mich am IPT im Projekt begleitet hat.

Vielen Dank an PD Dr. Marcus Frank vom Elektronenmikroskopischen Institut der Universitätsmedizin Rostock für die Zusammenarbeit und Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, und hier insbesondere Anne Rupprecht, Rico Schwarz, Elisa Teichmann, Elane Blessing und Felix Wittig, welche mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt haben. Ihr alle wart eine wichtige Stütze ohne die dies nicht möglich gewesen wäre.

Hervorheben möchte ich meinen Dank an Philipp Borchert welcher mir unvergleichliche Jahre geschenkt hat und auf den zu jeder Zeit blind Verlass war.

Danke dir, Miri! Ich kann nicht aufzählen was du alles für mich getan hast!

Niklas, ich danke dir! Du hast stets alles stoisch ertragen und mir dann einen Anschubs gegeben.

Uli, für dich habe ich so viele Worte und noch mehr Dankbarkeit. Beides würde hier nicht ausreichend Platz finden.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung und Rückhalt in der gesamten Zeit.

## Materialverzeichnis

**Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien**

Accutase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ac-DEVD-CHO	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Alpha-Tocopherol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxydisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Braun Melsungen AG, Melsungen
Bafilomycin A <sub>1</sub>	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kristallviolett	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CuPPIX	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Cyclosporin A	EMD Millipore Corp, Billerica MA, USA
Deferoxamin	Biomol, Hamburg, Deutschland
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
DMF	Sigma-Aldrich, Deutschland
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
E-64d	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium Kit	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Enzym für qPCR	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland



Fötales Kälberserum (FCS) superior stabil	Bio&Sell, Nürnberg, Deutschland
Ferrostatin-1	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Fumonisin B <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glycerine (water-free)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycine	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerol anhydrous	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Heme oxygenase 1 siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
HEPES	Ferak®, Berlin, Deutschland
Hydroxychloroquine	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Isopropanol	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
ISP-1	Sigma-Aldrich, Deutschland
KD87, KD88, KD85	Institut für Chemie, Universität Rostock, Rostock
Leupeptin	Biomol, Hamburg, Deutschland
Lipofectamine® RNAiMAX reagent	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Matrigel® Basement Membrane Matrix	Corning, Glendale, USA
Methanandamide	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Methanol	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
Milchpulver	Bio-Rad, München, Deutschland
NAC	Sigma-Aldrich, Deutschland
NaOH	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Necrostatin-1	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
N-SMase Spiroepoxide Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Opti-MEM I reduced serum medium	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Deutschland

p-Coumaric acid	Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
PD150606	Sigma-Aldrich, Deutschland
PenStrep	Sigma-Aldrich, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München, Deutschland
Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range	Bio-Rad, München, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Ribonuclease A from bovine pancreas	Sigma-Aldrich, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SDS, ultra pure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
siRNA negative control	Eurogentec, Köln, Deutschland
siRNA Suspensionspuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
SnPPIX	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SupplementPack Endothelial Cell GM	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRIS/HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung (0.4 %)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Trypsin-EDTA (10X)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Z-Asp-CH <sub>2</sub> -DCB	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Z-VAD-FMK	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

β-Mercaptoethanol

Ferak®, Berlin, Deutschland

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien**

10/20 µl TipOne® Filterspitze (steril)

STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland

Amersham™ Protran™ 0.2 µM Nitrocellulose Blotting Membran

Sigma-Aldrich, Deutschland

Autoklavierbare Abfallbeutel

nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen, Deutschland

Combitips advanced® 0.5 ml, 5 ml, 10 ml

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Corning® TC-behandelte Mikrotiterplatten (96-, 24-, 6-well)

Corning, Glendale, USA

Extra thick blot paper

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Falcon® Zellkultur inserts (Porengröße: 8 µM)

Corning, Glendale, USA

Kryokonservierungsröhrchen (2 ml, 5 ml)

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Luna Cell Counting Slides

Logos Biosystems, Anyang, Südkorea

MicroAmp™ fast optical 96-well Messplatte, 0.1 mL

Thermo Fisher Scientific, Deutschland

MicroAmp™ Klebefolie

Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Parafilm

Amcor, Melbourne, Australien

Petrischale 100

SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

Pipettenspitzen (1000 µl, 100 µl, 10 µl)

SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

Prestained SDS-PAGE standard

Bio-Rad, München, Deutschland

Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)

SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

Reaktionsgefäße, braun (0.5 ml, 2 ml)

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sero-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)

SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

Tube (15 ml, 50 ml)

SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

Zellkulturflaschen T75 (75 cm<sup>2</sup>)

SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

**Tabelle 5: Kits**

BrdU Cell Proliferation ELISA

Abcam, Cambridge, Großbritannien

Caspase-Glo®3/7 Assay

Promega Corporation, Madison, USA

CellROX™ green flow cytometry assay kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
H <sub>2</sub> DCFDA ROS detection	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium (MTT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
PGE <sub>2</sub> -Elisa	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Qproteome Mitochondria Isolation kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent, Santa Clara, USA
TaqMan® RNA-to-CTTM 1-Step kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
VEGF-Elisa	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
WST-1	Sigma-Aldrich, DeutschlandPro

Tabelle 6: Zelllinien

Kurzname	Zellart	Hersteller
A375	Humane Melanomzelllinie	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim (Lot-No: 300110)
A431	Humane Plattenepithel- karzinomzelllinie der Haut	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim (Lot-No: 300112)
HUVEC	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene	PromoCell GmbH, Heidelberg (Lot-No: 449Z004)

Tabelle 7: Primäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Cytochrom C	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
LC3A/B	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
HO-1	Rabbit	1:1000	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
HO-2	Rabbit	1:1000	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
OxPhos Human WB Antibody	Mouse	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

β-Aktin	Mouse	1:1000	Sigma-Aldrich, Deutschland
GAPDH	Rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich, Deutschland
PARP	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
VDAC1/Porin + VDAC3	Mouse	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien

**Tabelle 8: Sekundäre Antikörper für Western Blot**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-rabbit IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

**Tabelle 9: Genexpressionsassays**

HO-1 (Hs01110251_m1; FAM™ dye/MGB probe)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
HO-2 (Hs00157969_m1; FAM™ dye/MGB probe)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
PPIA	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

**Tabelle 10: Geräte**

Anthos HT II plate reader	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Österreich
AxioCam ERc 5s digital microscope camera	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BD Accuri™ C6	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bio-Rad Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, München, Deutschland
BP 211 D Analytische Laborwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
CB 201 CO <sub>2</sub> Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad München, Deutschland
Eppendorf Research Pipette 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Infinite F200 Pro Tecan Mikroplatten-Lesegerät	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
LaminAir HB2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
LUNA-II™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea

Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau, Germany
Mini Star Centrifuge	VWR, Radnor, USA
Model 1000/500 Power Supply	Bio-Rad München, Deutschland
Mr. Frosty™ freezing container	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Multi-Axle-Rotating-Mixer, RM10W-80V	VWR, Radnor, USA
Multipette E3	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus™	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
PowerPac (300 / universal)	Bio-Rad, München, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Primovert Inverted Microscope	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Seahorse XF24	Agilent, Santa Clara, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Touchmixer VortexGenie1	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Trans-Blot SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen (5417R / 5810R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 11: Software**

7500 Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
BD Accuri™ C6	BD Biosciences, San Jose, USA
i-control	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
ImageJ1	public domain, Wayne Rasband
Microsoft® Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Prism7 und neuer	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Quantity One 4.6.5	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Wave Seahorse	Agilent, Santa Clara, USA
Zen 2 pro	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Tabelle 12: Zusammensetzung Lauf- und Trenngel für SDS-Page

<b>Sammelgel, 4 % Acrylamid</b>	<b>Volumen</b>
Aqua ad injectabilia	8,9 ml
0.5 M TRIS (ultrapure)	3,75 ml
SDS (10 % (w/v))	150 µl
Rotiphorese® Gel 30	12 ml
TEMED	15 µl
APS (10 %)	150 µl

<b>Trenngel, 12 % Acrylamid</b>	<b>Volumen</b>
Aqua ad injectabilia	7,9 ml
1.5 M TRIS (ultrapure)	3,75 ml
SDS (10 % (w/v))	150 µl
Rotiphorese® Gel 30	9,6 ml
TEMED	24 µl
APS (10 %)	240 µl

<b>Trenngel, 15 % Acrylamid</b>	<b>Volumen</b>
Aqua ad injectabilia	5,5 ml
1.5 M TRIS (ultrapure)	6 ml
SDS (10 % (w/v))	240 µl
Rotiphorese® Gel 30	12 ml
TEMED	24 µl
APS (10 %)	240 µl

Anmerkung: Diese Werte dienen zur Herstellung von vier Gelen mit einer Dicke von je 1 mm. Zunächst werden die Komponenten für das Trenngel gemischt und die Flüssigkeit in die vorbereitete Gelkammer gefüllt. Das flüssige Gel wird vorsichtig mit ca. 3 ml Isopropanol überzogen. Die Polymerisation des Trenngels erfolgt für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Herstellung des Sammelgels wird das Isopropanol mit Filterpapier entfernt. Das Trenngel wird dann mit dem Stapelgel überschichtet. Nach Einsetzen des Taschenkamms erfolgt die

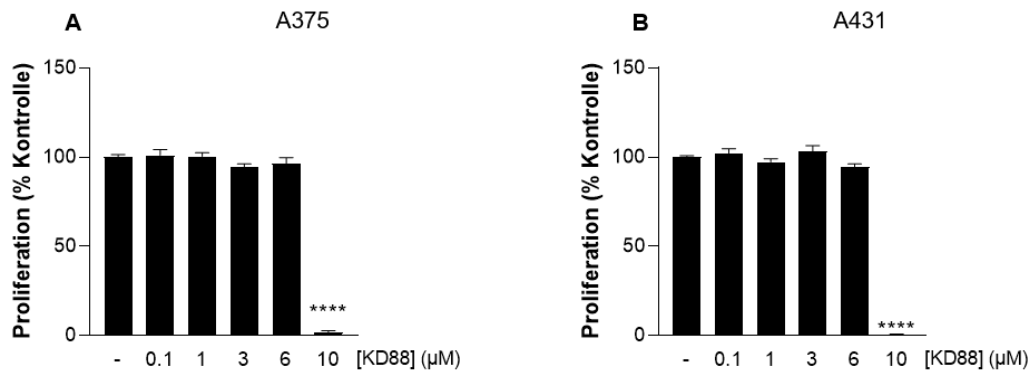
Polymerisation für 30 min bei Raumtemperatur. Die vorbereiteten Gele werden einzeln in feuchte Papiertücher gewickelt und bis zur Verwendung, aber maximal 7 Tage, bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 13: Puffer und Lösungen**

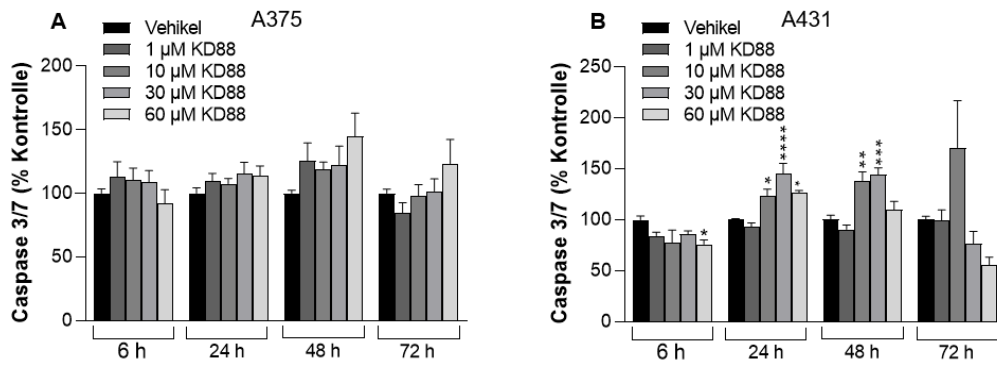
<b>10X TRIS-buffered saline (TBS)</b>	1 mM Tris (ultrapure) 2,5 mM NaCl pH 7.5
<b>1X TRIS-buffered saline/TWEEN®20 (TBS-T)</b>	100 ml 10X TBS 900 ml deionisiertes Wasser 1 ml TWEEN®20
<b>10X Elektrophoresepuffer</b>	250 mM TRIS (ultrapure) 1,92 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS
<b>1X Elektrophoresepuffer</b>	100 ml 10X Elektrophoresepuffer 900 ml deionisiertes Wasser
<b>5X Glycin-Strip-Puffer</b>	1 mM Glycin 2.5 M NaCl pH 2.5 (eingestellt mit HCl)
<b>1X Glycin-Strip-Puffer (pH 2.5)</b>	50 ml 5X Strippingpuffer 200 ml deionisiertes Wasser
<b>10 % SDS (v/v)</b>	10 g SDS 100 ml deionisiertes Wasser
<b>Enhanced chemiluminescence solution I (ECL I)</b>	2.5 mM Luminol 400 µM p-Cumarinsäure 100 mM TRIS/HCl (pH 8.5)
<b>Enhanced chemiluminescence solution II (ECL II)</b>	0,09 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 mM TRIS/HCl (pH 8.5)
<b>Entwicklungsreagenz ECL</b>	1 Volumenanteil ECL I 1 Volumenanteil ECL II



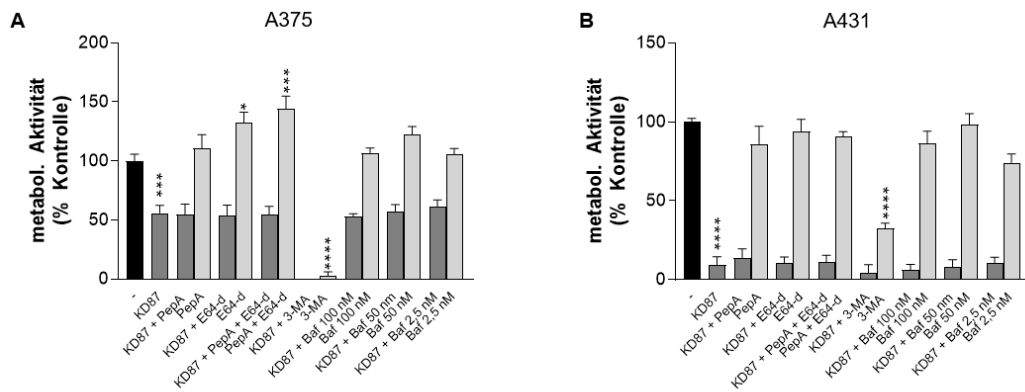
<b>1X Trypsin/EDTA (TE)</b>	5 ml 10X Trypsin/EDTA 45 ml DPBS
<b>Blockpuffer</b>	5 g Blotting grade blocker 100 ml deionisiertes Wasser
<b>Semi-dry Transferpuffer</b>	190 mM Glycin 25 mM TRIS (ultrapure) 20 % (v/v) Methanol
<b>Lysepuffer pH 7,4</b>	50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton® X-100 10 % Glycerin (v/v)
<b>Proteaseinhibitoren im Lysepuffer (frisch zugesetzt)</b>	10 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin 1 mM Orthovanadat 1 mM PMSF

**Supplement**

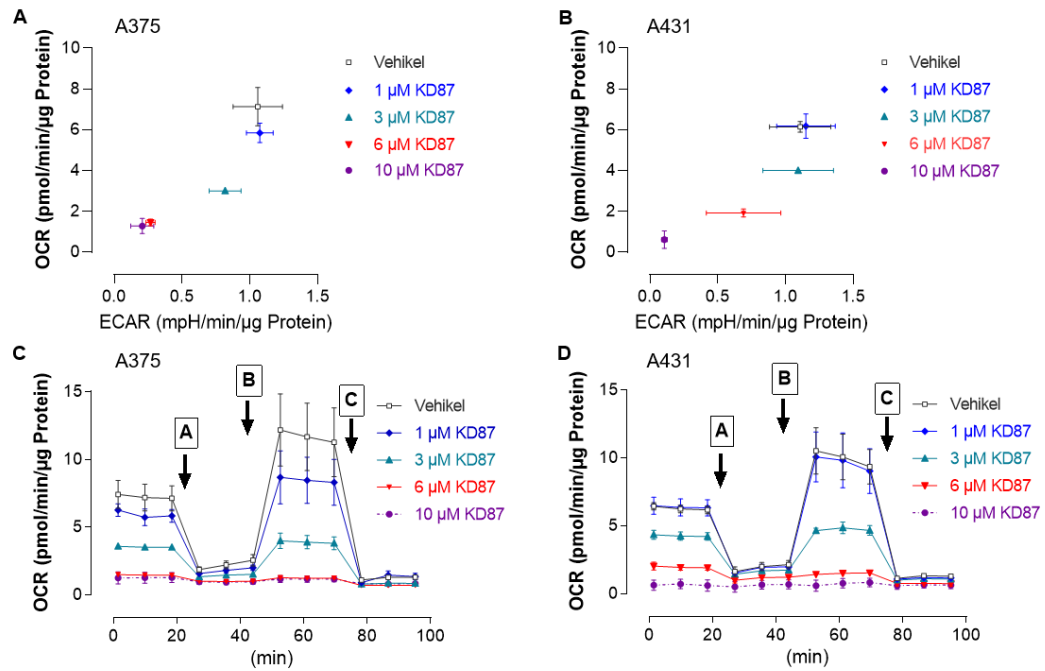
**Supplement 1: Untersuchung der Proliferation nach Behandlung mit KD88.** A375- und A431-Zellen wurden über 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen KD88 inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation mittels BrdU Inkorporationsassay analysiert. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  (aus 2 unabhängigen Experimenten). \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test.



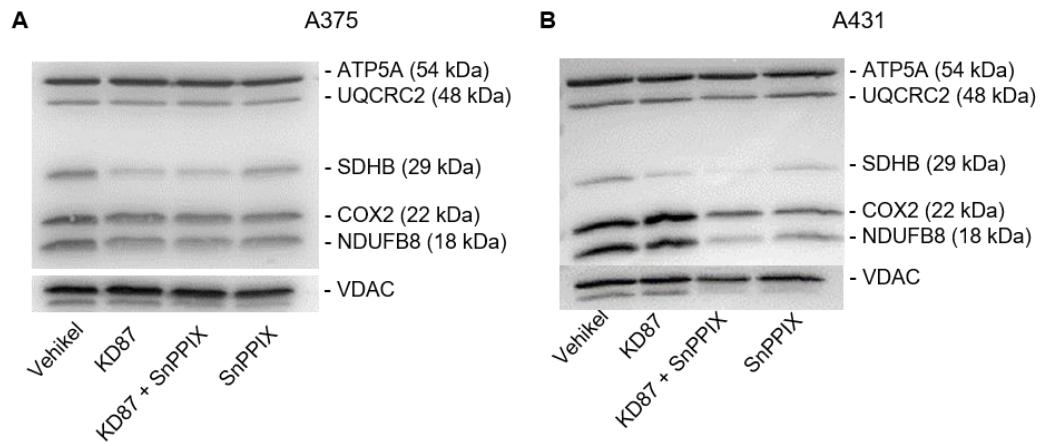
**Supplement 2: Untersuchung der Caspasenaktivierung nach Behandlung mit KD88.** A375- und A431-Zellen wurden über 6-72 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen KD88 inkubiert. Im Anschluss wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten die Caspaseinduktion untersucht. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 9$  (aus 3 unabhängigen Experimenten; A) und  $n = 6$  (aus 2 unabhängigen Experimenten; B). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test.



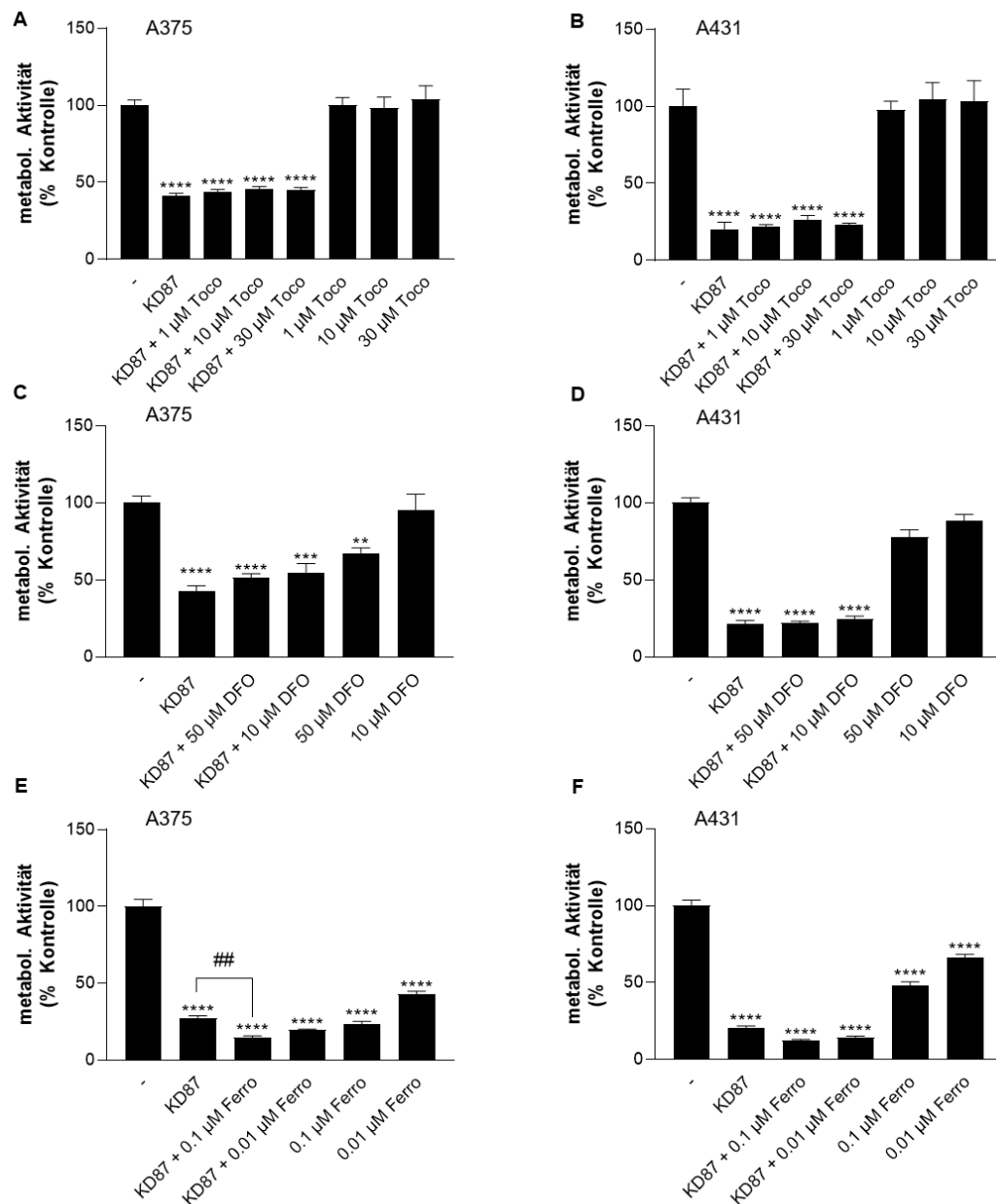
**Supplement 3: Einfluss von Autophagieinhibitoren auf KD87-ausgelösten Zelltod.** A375- und A431-Zellen wurden für 1 Stunde mit den entsprechenden Inhibitoren (Pepstatin A (PepA; 10  $\mu$ M), E64-d (10  $\mu$ M), 3-Methyladenin (3-MA; 5 mM), Bafilomycin (Baf; 100, 50, 2,5 nM) oder einer Kombination hieraus vorbehandelt und anschließend über 24 (B) bzw. 48 (A) Stunden mit KD87 (6  $\mu$ M) ko-incubiert. Im Anschluss wurde mittels WST-1-Assay die metabolische Aktivität, dargestellt als % Viabilität, ermittelt. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 9$  (aus 3 unabhängigen Experimenten). \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test.



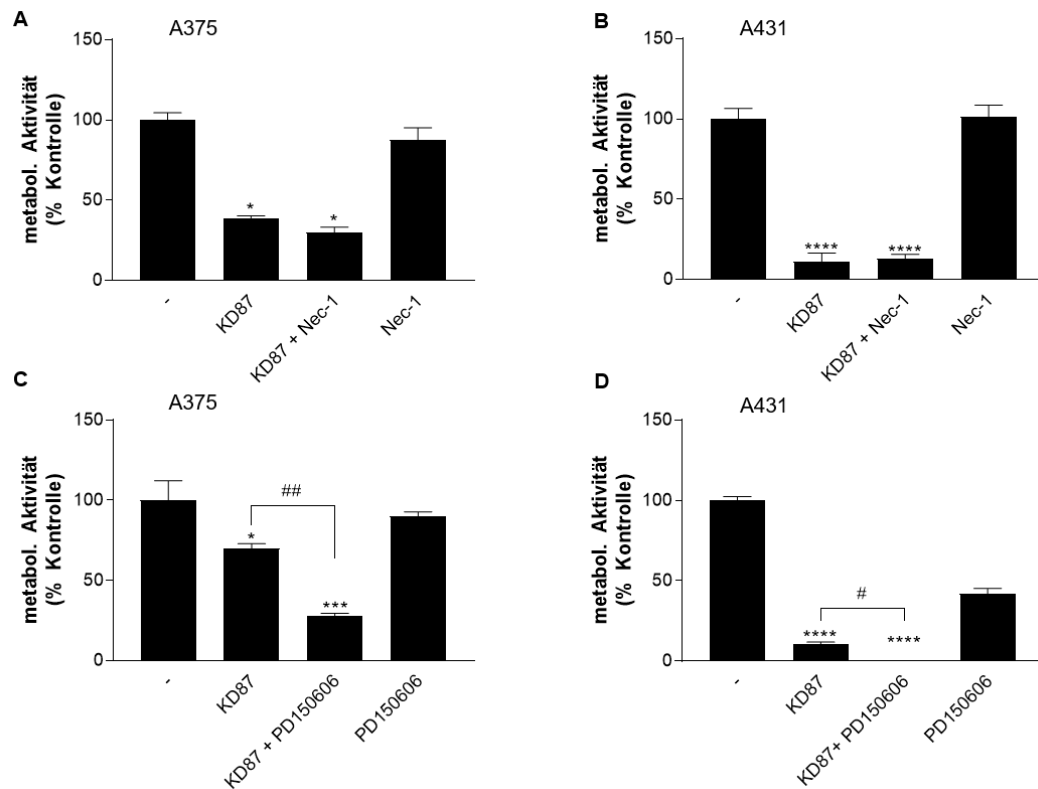
**Supplement 4: Energieprofil und Zeitverläufe der OCR und ECAR nach Behandlung mit KD87.** A375- und A431-Zellen wurden 24 Stunden lang mit KD87 in den angegebenen Konzentrationen oder der Vehikelkontrolle inkubiert. Anschließend wurden OCR und ECAR mit dem Seahorse XFe24 Analyser bestimmt. Die Auswirkungen der Behandlung auf OCR und ECAR sind in den Energieprofilen A,B zusammengefasst. Zur Erfassung des mitochondrialen Stressverhaltens wurde ein Stresstest durchgeführt, bei dem die mit 1,5 μM Oligomycin (Port A), 2,5 μM FCCP für A375 und 1,0 μM FCCP für A431 (Port B) und jeweils 0,5 μM Antimycin A und Rotenon (Port C) beladenen Ports der Sensorkartuschen zu den angegebene Zeitpunkten in die Vertiefungen freigegeben wurden. C und D zeigen die Zeitverläufe der OCR in beiden mit KD87 behandelten Zelllinien. Die Daten stellen Mittelwerte ± SEM von n = 3 (A-D) pro Gruppe dar.



**Supplement 5: Repräsentative Western Blots der Expression der Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in mitochondrialer Fraktion.** Die Zellen (A375 A, A431 B) wurden 1 Stunde lang mit SnPPIX (25  $\mu$ M) oder Vehikel vorbehandelt, gefolgt von einer 24-stündigen Ko-Inkubation mit KD87 (6  $\mu$ M) oder Vehikel. Anschließend wurden die Proteine der Atmungskettenkomplexe in der mitochondrialen Fraktion mittels Western Blot bestimmt. Die gezeigten Blots sind repräsentativ.



**Supplement 6: Einfluss von KD87 auf eine mögliche Ferroptose.** A375- (A,C,E) oder A431 (B,D,F)-Zellen wurden 1 Stunde lang mit  $\alpha$ -Tocopherol (Toco; 1, 10, 30  $\mu$ M), Deferoxamin (DFO; 10, 50  $\mu$ M) oder Ferrostatin (Ferro; 0,01, 0,1  $\mu$ M) präinkubiert und anschließend in Gegenwart von KD87 (6  $\mu$ M) oder Vehikel für weitere 24 (A431) oder 48 (A375) Stunden ko-inkubiert. Anschließend wurden die metabolische Aktivität, dargestellt als %-Viabilität, mittels WST-1-Assay bestimmt. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8-11 (aus 3 unabhängigen Experimenten) pro Gruppe. \*\* p  $\leq$  0,01, \*\*\* p  $\leq$  0,001, \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001 gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle und ## p  $\leq$  0,01 gegenüber der entsprechenden KD87-behandelten Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test.



**Supplement 7: Einfluss von KD87 auf eine mögliche Onkose oder Nekrose.** A375- (A,C) oder A431 (B,D)-Zellen wurden 1 Stunde lang mit Necrostatin-1 (Nec-1; 10  $\mu$ M) oder PD150606 (25  $\mu$ M) präinkubiert und anschließend in Gegenwart von KD87 (6  $\mu$ M) oder Vehikel für weitere 24 (A431) oder 48 (A375) Stunden koinkubiert. Anschließend wurden die metabolische Aktivität, dargestellt als %-Viabilität, mittels WST-1-Assay bestimmt. Alle angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Vehikelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8-11 (aus 3 unabhängigen Experimenten) pro Gruppe. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrolle und #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$  gegenüber der entsprechenden KD87-behandelten Gruppe. Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Test.