

Wirkung von redox-aktiven Ceroxid-Nanopartikeln bei Hautkrebs

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maren Sack

aus Wesel

Düsseldorf, Mai 2012

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	11
1.2 Hautkrebserkrankungen	14
1.2.1 Das Plattenepithelkarzinom.....	14
1.2.2 Das maligne Melanom	15
1.3 Prozesse der Karzinogenese	19
1.4 Oxidativer Stress.....	22
1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress.....	22
1.4.2 Antioxidantien	25
1.4.3 Bedeutung von ROS in der Karzinogenese und Tumorprogression.....	26
1.5 Tumor-Stroma-Interaktion	28
1.6 Nanomedizin als alternativer Ansatz in der Krebstherapie	30
1.7 Ceroxid-Nanopartikel	32
1.8 Fragestellung.....	36
2 Material und Methoden.....	38
2.1 Nanopartikel.....	38
2.2 Chemikalien	39
2.3 Lösungen und Puffer	41
2.4 Antikörper	43
2.4.1 Primäre Antikörper	43
2.4.2 Sekundäre Antikörper	43
2.5 Kits	44
2.6 Materialien.....	44
2.6.1 Zelllinien	44
2.7 Verbrauchsmaterial.....	45
2.8 Geräte.....	45
2.9 Software	46
2.10 Zellbiologische Methoden	46
2.10.1 Kultivierung der Zellen	46
2.10.2 Isolierung von humanen dermalen Fibroblasten aus Biopsien	47
2.10.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen.....	48
2.10.4 Mycoplasmentest.....	48
2.10.5 Herstellung von Zelllysaten für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen	49

2.10.6	Vitalitätstest	49
2.10.7	Untersuchungen zur Aufnahme der Partikel.....	50
2.10.8	Herstellung von konditioniertem Medium.....	51
2.10.9	Invasionsassay.....	52
2.11	Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	53
2.11.1	Proteinbestimmung.....	53
2.11.2	Fraktionierung von Zelllysaten.....	54
2.11.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.11.4	Western-Blot (semi-dry)	56
2.11.5	Ponceau S Färbung	56
2.11.6	Immunologischer Nachweis (Antikörperfärbung).....	56
2.11.7	Immunologischer Nachweis von HIF-1 α	57
2.11.8	Stripping von PVDF-Membranen	58
2.11.9	Immunologischer Nachweis von oxidierten Proteinen (Oxyblot-Analysen).....	58
2.11.10	Nachweis von intrazellulären ROS (DCF-Messung)	59
2.11.11	Nachweis von extrazellulären ROS (Amplex Red Assay)	59
2.11.12	Caspase-3-Aktivitäts-Assay.....	60
2.12	Allgemeine Versuchsbedingungen	60
2.13	Statistik.....	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Cytotoxizität von Ceroxid-Nanopartikeln.....	62
3.2	Aufnahme und zelluläre Verteilung von Ceroxid-Nanopartikeln.....	64
3.3	Ceroxid-Nanopartikel verringern die invasive Kapazität von Tumorzellen..	67
3.4	ROS-abhängige Prozesse vermitteln cytotoxische Wirkung von CNP in Tumorzellen.....	69
3.5	Anti-invasive Effekte von CNP werden über die ROS-abhängige Regulation von Cav-1 vermittelt.....	77
3.6	CNP-abhängige ROS-Erhöhung induziert Apoptose in Tumorzellen.....	79
3.7	CNP inhibieren das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	83
3.8	Toxizität von Ceroxid-Nanopartikeln in Tumorzellen beruht auf dem „Warburg-Effekt“	86
4	Diskussion	88
4.1	CNP vermitteln cytotoxische und anti-invasive Effekte in Tumorzellen.....	88
4.2	Aufnahme	89
4.3	Cytotoxische und anti-invasive Effekte von CNP sind ROS-abhängig.....	90
4.4	Toxizität von CNP in Tumorzellen wird über Apoptose vermittelt.....	94
4.5	CNP inhibieren das Tumorwachstum <i>in vivo</i> und verändern den Redoxstatus des Tumorgewebes	95
4.6	Die pH-abhängige selektive Wirkung von CNP – eine Hypothese.....	97
4.7	Schlussfolgerung.....	100

5	Perspektiven.....	102
6	Zusammenfassung	103
7	Summary	104
	Literaturverzeichnis.....	105
	Danksagung.....	119
	Erklärung.....	121

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
AP-1	Activator protein
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cav-1	Caveolin-1
CM	Konditioniertes Medium
CNP	Ceroxid-Nanopartikel
CNP-FITC	FITC-gekoppelte Ceroxid-Nanopartikel
DAPI	Bisbenzimid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Eagle's Medium, nach Dubblecco's Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DTT I	Dithiothreito
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescinoisothiocyanat
GPx	Glutationperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
H ₂ -DCF-DA	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
HBSS	Hanks buffered saline solution
HDF	Human dermal fibroblasts
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HIF-1 α	α Untereinheit des Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HRP	Horseradish peroxidase
IL-6	Interleukin 6

MeOH	Methanol
MF	Myofibroblast
min	Minute
mm	Millimeter
mM	mMol/L
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	Tetrazoliumsalz3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAC	N-Acetylcystein
nm	Nanometer
nM	nmol/L
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
RFU	relative fluorescence units
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rTGFβ1	rekombinantes Transforming growth factor-beta 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOD	Superoxid-Dismutase
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ1	Transforming growth factor-beta 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
αSMA	α smooth muscle actin
μm	Mikrometer
μM	μmol/L

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut (Kutis) ist das Grenzorgan des Organismus gegenüber der Umwelt. Sie dient dem Schutz vor Umwelteinflüssen wie UV-Licht, Kälte, Hitze und Austrocknung, sowie vor mechanischen Traumen oder dem Eindringen von fremden Agenzien. Ferner ist sie der Sitz von Sinnesorganen und Teil der Immunabwehr. Die Haut ist mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m², einem Gewicht von 3,5-10 kg und einer Dicke von 1,5-4 mm das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie ist in drei Schichten unterteilt: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Corium oder Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Die Epidermis, die äußerste Schicht, besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel mit einer durchschnittlichen Dicke von 30-300 µm und besitzt viele Nerven, jedoch keine eigenen Blutgefäße (Terhorst, 2009; Moll, 2005; Fritsch, 2009). Die Zellen der Epidermis sind vor allem Keratinozyten, mit einem Anteil von über 90%, sowie Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen. Die Epidermis lässt sich weiter in fünf Schichten unterteilen. Basalschicht (*Stratum basale*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), Glanzschicht (*stratum lucidum*), und Hornschicht (*Stratum corneum*)(von innen nach außen). *Stratum spinosum* und *stratum basale* werden auch als *Stratum germinativum* (Regenerationsschicht) zusammengefasst (Terhorst, 2009). Die Keratinozyten des einschichtigen *Stratum basale* (basal Zellen) bilden durch mitotische Teilung die Stachelzellen des mehrschichtigen *Stratum spinosums* und somit dient das *Stratum basale* als Proliferationsgewebe für eine ständige Erneuerung der Epidermis (alle 27 Tage) (Fritsch, 2009). Die Stachelzellen wandern durch die verschiedenen Schichten der Epidermis zur Oberfläche und unterliegen dabei einer zunehmenden Differenzierung. Stachelzellen differenzieren zu Körnerzellen des *Stratum granulosum* und weiter zu Korneozyten (Hornzellen), den kernlosen Zellen des *Stratum lucidum* und des *Stratum corneum*, wo es letztendlich zu einer Abschuppung kommt (Fritsch, 2009). Melanozyten kommen in der Basalschicht der Epidermis und in Haarfollikeln vor. Melanozyten sind Dendritenzellen und verfügen über spezifische Organellen, die Melanosomen, in welchen das Pigment Melanin produziert und angereichert wird. Dieses Pigment dient vor allem dem Schutz vor UV-Strahlung und ist verantwortlich für die Farbe von Haut und Haaren. Die Melanosomen werden von den Melanozyten an benachbarte Keratinozyten abgegeben, in denen sie wie eine Schutzkappe über dem oberen Kernpol angeordnet sind und die DNA der Keratinozyten vor UV-Licht durch Absorption von Photonen

und Umwandlung in Wärme schützen (Moll, 2005; Uong & Zon, 2010). Als weitere Zellen der Epidermis sind Merkel-Zellen, welche die Tastempfindung vermitteln, und Langerhans-Zellen, die dendritischen Zellen der Haut, welche von zentraler Rolle bei der Einleitung der primären Immunreaktion sind, zu nennen (Terhorst 2009; Scherer & Kumar, 2010). Die Epidermis wird durch die Basalmembran von der Dermis abgegrenzt. Die Basalmembran kontrolliert den Austausch von Molekülen und Zellen und übt eine stützende Funktion aus. Sie besteht aus zwei Laminae, Fibrillen, Kollagenfasern und Matrix und wird in zwei Schichten unterteilt. Die obere Schicht, *Lamina lucida* ist durch Verankerungsfilamente mit den Basalzellen der Epidermis verbunden. *Lamina densa*, die untere Schicht der Basalmembran, ist über Verankerungsfibrillen- und Mikrofibrillenbündel mit der Dermis verbunden. Die Dermis (Lederhaut) besteht aus Bindegewebe und wird in zwei Schichten unterteilt, die Papillarschicht (*Stratum papillare*) und die Geflechschicht (*Stratum reticulare*). Das *Stratum papillare* ist zell- und gefäßreich und besitzt ein lockeres Fasergeflecht. Das *Stratum reticulare* bildet den unteren Teil der Dermis und geht kontinuierlich in die tiefergelegene Subcutis (Unterhaut) über. In dieser Schicht ist das Fasergeflecht dichter und es sind weniger Zellen zu finden. Die Zellen der Dermis sind neben Fibroblasten, die den Großteil bilden, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten und vereinzelte Melanozyten. Als eigenständige Strukturen der Haut sind Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen in das Bindegewebe der Dermis eingebettet (Terhorst 2009, Moll 2005, Fritsch 2009). Das Bindegewebe ist in komplexer Weise aus Strukturproteinen und Bindegewebszellen (Fibroblasten) aufgebaut. Fibroblasten bilden verschiedene multifunktionelle Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin, Fibrillin und unterschiedliche Kollagene (Ross et al. 1995; Brenneisen et al., 1996; Kielty et al., 1997). Den Raum zwischen zellulären und fasrigen Elementen (Interstitium) füllt eine protein- und polysaccharidreiche Flüssigkeit aus, die sogenannte Interzellulärsubstanz. Faserige Elemente und Interzellulärsubstanz bilden zusammen die extrazelluläre Matrix (EZM), in der sich die Zellen bewegen und miteinander interagieren können. Kollagene spielen in der Haut eine besondere Rolle, da sie von struktureller und funktioneller Bedeutung sind. Kollagen Typ VII, verbindet die Epidermis mit der Dermis und ist mit anderen Strukturproteinen der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und Kalinin vernetzt. Kollagen Typ I ist das Strukturprotein, das in der Dermis am häufigsten vorkommt und insbesondere für deren Reißfestigkeit und Stabilität verantwortlich ist (Van der Rest et al., 1991; Fleischmajer et al., 1990). Der Abbau einzelner Bindegewebsproteine wird in kontrollierter Weise durch Enzyme, die zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen gehören, reguliert. Die Aktivität dieser Matrix-Metalloproteinasen wiederum wird durch Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases) kontrolliert, die von Fibroblasten synthetisiert werden

(Docherty et al., 1992; Matrisian, 1992; Kahari et al., 1997). Letztendlich garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis der Synthese von Strukturproteinen auf der einen Seite und der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren auf der anderen Seite die Funktion des Bindegewebes der Haut. In Abb. 1.1 ist der Aufbau der Haut schematisch dargestellt.

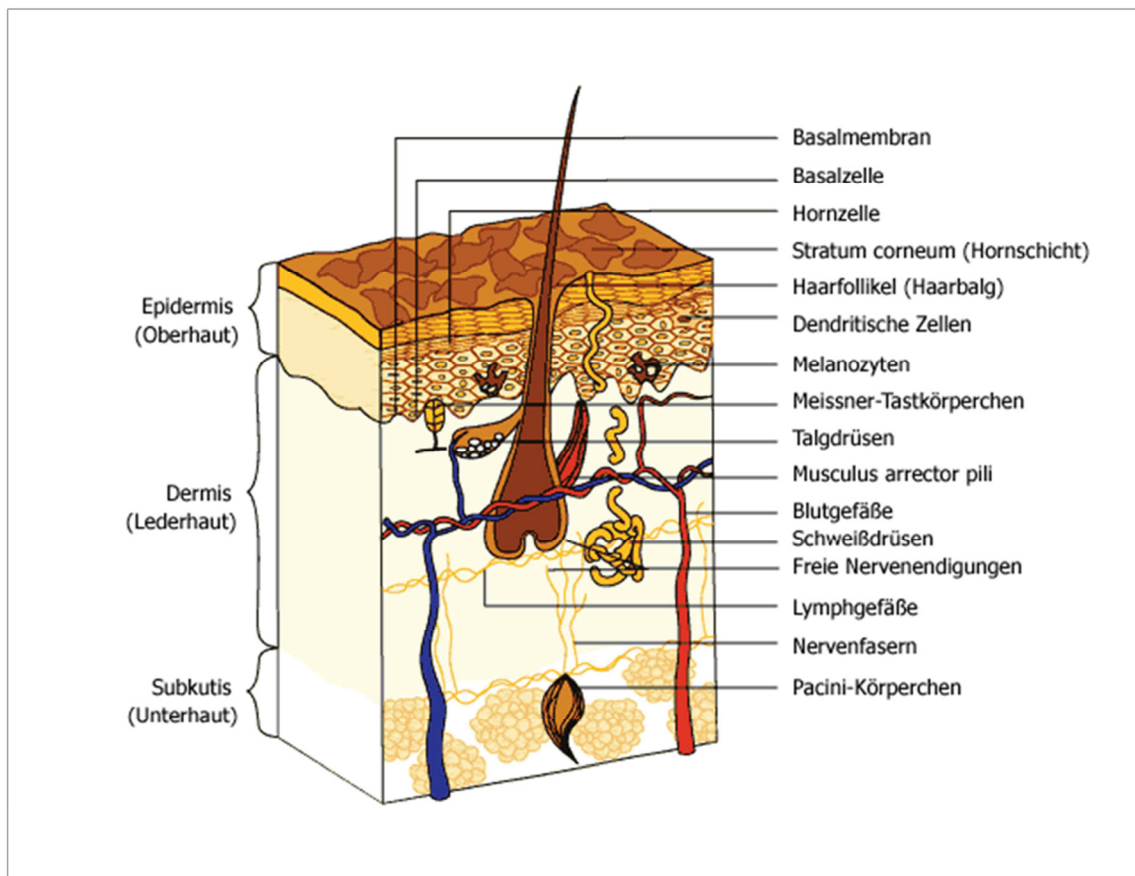


Abb. 1.1 Aufbau der Haut Schematische Darstellung der Schichten und Zellen der Haut (Quelle: http://skincare.dermis.net/content/e01aufbau/e660/e661/e700/013_haut_aufbau_ger.gif)

1.2 Hautkrebserkrankungen

Das Organ des menschlichen Körpers mit der höchsten Inzidenz und Vielfalt an Neoplasien ist die Haut, was vor allem aus der exponierten Lage gegenüber karzinogenen Umwelttoxinen resultiert (Fritsch, 2009). Neben dem Plattenepithelkarzinom und dem Melanom, welche im Folgenden kurz beschrieben werden, unterscheidet man weitere maligne Neoplasien der Haut, zu denen das Basaliom und das Merkel-Zellkarzinom gehören.

1.2.1 Das Plattenepithelkarzinom

Plattenepithelkarzinome, synonym Spinaliome, spinozelluläre Karzinome oder Stachelzellkarzinome, sind maligne Neoplasien, die aus Keratinozyten hervorgehen. Der Tumor entspricht in seiner intraepidermalen Form einem Carcinoma in situ, kann jedoch in die invasive Form übergehen, metastasieren und so zu einer tödlich verlaufenden Erkrankung werden. Das Plattenepithelkarzinom ist nach dem Basaliom der zweithäufigste maligne Hauttumor. In Mitteleuropa kommt es im Jahr zu 50-100 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner mit steigender Tendenz (Terhorst, 2009). In den letzten 20 Jahren stieg die Inzidenz um 6% pro Jahr. Männer sind 2-5 mal häufiger betroffen als Frauen (Scherer & Kumar, 2010). Das Spinaliom wird überwiegend durch UV-Licht verursacht und entsteht daher häufig an stark sonnenexponierten Regionen wie dem Gesicht. Meistens gehen Plattenepithelkarzinome aus aktinischen Prokanzerosen auf lichtgeschädigter Haut hervor. Nach UV-Strahlung gelten humane Papilloma-Viren, Immunsuppression, Teer und Arsen als Risikofaktoren (Terhorst, 2009; Moll, 2005; Fritsch, 2009). Abb. 1.2 zeigt ein fortgeschrittenes Spinaliom auf der Stirn einer Patientin, dem eine aktinische Keratose vorausgegangen ist. Plattenepithelkarzinome treten vor allem im höheren Alter auf (meist zwischen dem 70-80zigsten Lebensjahr), als Folge der Schädigung durch die oben genannten, kanzerogenen Noxen über viele Jahre. Maligne Zellen werden nur in 10-20% der Fälle zu Tumoren. 80-90% der malignen Zellen können über Apoptose aus der Epidermis eliminiert werden (Fritsch, 2009). Das Plattenepithelkarzinom ist ein solider Tumor mit Verhornungstendenz aus großen, plasmareichen Zellen, die den Keratinozyten des Stratum spinosum ähneln. Bei Verdacht auf ein Spinaliom muss die Diagnose immer histopathologisch verifiziert werden (Terhorst, 2009; Moll, 2005). An erster Stelle der therapeutischen Maßnahmen steht die chirurgische Exzision des Tumorgewebes unter Schnitttrandkontrolle mit Sicherheitsabstand. Bei inoperablen oder metastasierenden Karzinomen wird eine Chemotherapie mit Methotrexat angewandt. Bei fortgeschrittenen Stadien kann auch eine Chemo-Radiotherapie durchgeführt

werden, bei der Cisplatin und 5-Fluorouracil als Cytostatika eingesetzt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt je nach Tumorgröße und Lokalisation bei 68-80% (Terhorst, 2009; Moll, 2005; Fritsch, 2009).



Abb. 1.2 Plattenepithelkarzinom Ein aus einer aktinischen Keratose hervorgegangenes Plattenepithelkarzinom auf der Stirn einer Patientin. Häufig sind stark lichtexponierte Hautareale betroffen. (Quelle: <http://www.dermis.net/bilder/CD078/550px/img0068.jpg>)

1.2.2 Das maligne Melanom

Das Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor mit einer hohen und frühzeitigen Tendenz zu Metastasieren und stellt die aggressivste und tödlichste Form der Hautkrebskrankungen dar. Die Inzidenz des Melanoms in der weißen Bevölkerung hat in den letzten Jahren stark zugenommen und verdoppelt sich alle 10 bis 15 Jahre. Die Inzidenzrate korreliert stark mit der UV-Belastung des Wohnortes. Australien hat mit mehr als 40/10.000/Jahr die höchste Inzidenzrate (P. Fritsch, 2009). Besonders helle Hauttypen sind betroffen, wohingegen bei Asiaten und Afrikanern Melanome eher selten auftreten. Melanome entstehen meist zwischen dem 30. und 70. Lebensjahr. Frauen sind etwa 1,5-mal häufiger betroffen als Männer (Joosse et al., 2010). Als wichtigster Risikofaktor gilt UV-Strahlung. Der Anstieg der Inzidenz ist auf veränderte Lebensgewohnheiten (erhöhte Exposition gegenüber UV-Licht) zurückzuführen (Terhorst, 2009; Moll, 2005). Dispositionelle Risikofaktoren für die Entstehung sind neben ethnischer Zugehörigkeit (Hauttyp I, II) und Geschlecht (weiblich) der Albinismus, gestörte DNA-Reparation (wie z.B. bei Xeroderma pigmentosum) und positive Familienanamnese (Terhorst, 2009). Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom ist das Melanom nicht auf die Akkumulation von UV-Schäden an häufig exponierten Hautarealen über die Jahre zurückzuführen, sondern korreliert

mit der Zahl einzelner schwerer Sonnenbrände (besonders in der Kindheit) (Fritsch, 2009; Uong & Zon, 2010).

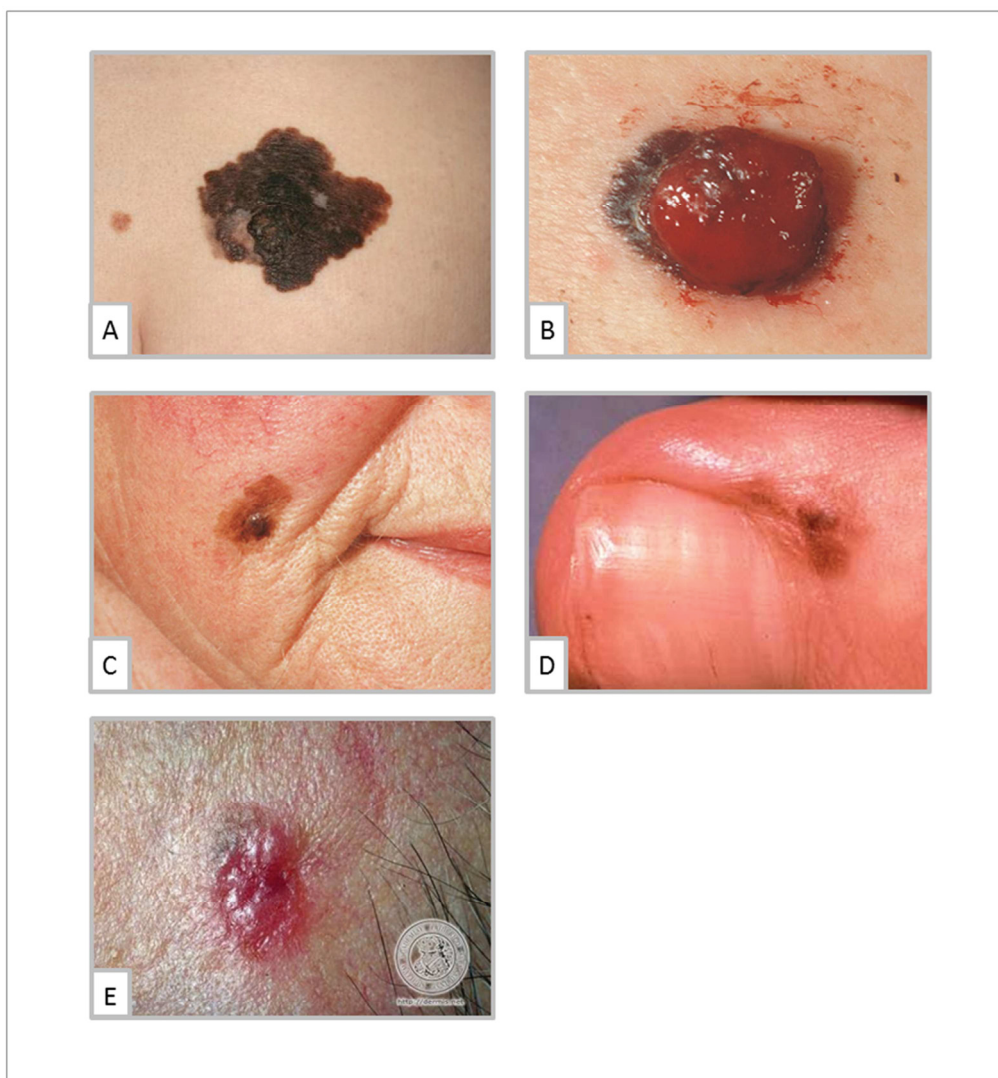


Abb. 1.3 Das maligne Melanom Man unterscheidet verschiedene Subtypen des malignen Melanoms. A: Superfiziell spreitende maligne Melanom (SSM); B: Primär noduläres maligne Melanom (NMM); C: Lentigo-maligna-Melanom (LMM); D: Akrolentiginöses malignes Melanom (ALM); E: Amelanotisches maligne Melanom (AMM). (Quellen, verändert nach: Internet, A: <http://dcdn.de/pictures.doccheck.com>, B: <http://www.onkodin.de>, C: <http://www.onkodin.de>, D: <http://melanom-info.de>, E: <http://www.dermis.net>)

Ein malignes Melanom kann sich aus einem bestehenden Nävuszellnävus oder auf unauffälliger Haut entwickeln. Das Melanom ist eine maligne Neoplasie der Melanozyten, was die frühzeitig einsetzende Metastasierung erklärt, da Melanozyten –sowohl benigne als auch maligne- nicht im Zellverband wachsen, sondern nach der Zellteilung in der Epidermis segregieren. Es lassen sich mehrere Melanomsubtypen

unterscheiden. Dazu gehören das superfiziell spreitende maligne Melanom (SSM), das primär noduläre maligne Melanom (NMM), das Lentigo-maligna-Melanom (LMM), das akrolentiginöses malignes Melanom (ALM) und das amelanotische maligne Melanom (AMM) (siehe Abb. 1.3). Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über die Subtypen des Melanoms und deren relative Häufigkeit, mittleres Erkrankungsalter u.s.w. (Terhorst, 2009; Moll, 2005; Fritsch, 2009).

Das NMM und das AMM zählen zu den aggressivsten Subtypen des Melanoms, da sie durch ein nahezu sofortiges vertikales Wachstum und somit frühzeitige Metastasierung gekennzeichnet sind, während andere Subtypen z. T. über mehrere Jahre horizontal wachsen ohne dabei die Basalmembran der Haut zu durchbrechen. Die Diagnose erfolgt zunächst über die bekannte ABCD-Regel, nach der Unregelmäßigkeiten beurteilt werden können (**A**symmetrie, **B**egrenzung, **C**olor und **D**urchmesser). Bei Verdacht auf ein Melanom wird wegen der Gefahr der frühen Metastasenbildung keine Probebiopsie entnommen, sondern die Läsion wird vollständig mit entsprechendem Sicherheitsabstand entfernt (Terhorst 2009). Die endgültige Diagnose muss histopathologisch erfolgen. Die Diagnose des amelanotischen malignen Melanoms stellt sich als besonders schwierig dar, da die Tumorzellen dieses Typs das charakteristische Pigment Melanin nicht mehr bilden und daher dieser Melanomtyp sehr spät entdeckt wird, oft erst nach dem die Metastasierung schon stattgefunden hat. In einigen Fällen kann der Primärtumor nicht lokalisiert werden. Je nach Eindringtiefe des Tumors nach Clark bzw. der absolute Tumordicke nach Breslow und etwaiger Metastasierung werden verschiedene Stadien unterschieden, die in Tab. 1.2 erläutert sind. Das erste Ziel in der Therapie des malignen Melanoms ist die vollständige Entfernung des Primärtumors mit entsprechendem Sicherheitsabstand. Bei Befall von Lymphknoten wird eine radikale Lymphadenektomie der betroffenen Region empfohlen. Bei Fernmetastasen werden systemische Chemotherapien, z.B. mit Dacarbazin, vorgenommen, bei Knochen- oder Hirnmetastasen werden auch Radiotherapien durchgeführt. Melanome zeigen eine hohe Resistenz gegen herkömmliche Chemotherapeutika und so ist die Ansprechrate von Dacarbazin (DITIC) mit 10- 20% eher gering. Nur in 5% der Fälle wurde eine komplette Remission beobachtet (Soengas & Lowe, 2003). Andere Chemotherapeutika wie Taxane oder Platinverbindungen zeigten noch geringere Ansprechraten. Die hohe Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika ist im Wesentlichen durch die Dysregulation der Apoptose begründet, jedoch spielen auch andere Prozesse wie eine verstärkte DNA-Reparatur oder die gesteigerte Detoxifikation von Wirkstoffen durch einen erhöhten GSH-Gehalt in Melanomzellen eine Rolle (Grossmann & Altieri, 2001). Neue klinische Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse mit spezifischen BRAF-

Inhibitoren. BRAF, ein Oncogen, codiert eine Kinase im RAS/RAF- bzw. im MAP-Kinase-Signalweg und ist in 60% aller Melanome mutiert (BRAF-V600-Mutation) (Perez-Lorenzo & Zheng, 2010; Hersey et al., 2011). In den USA ist seit August 2011, in Europa seit Februar 2012 der BRAF-Inhibitor Vemurafenib (Zelboraf®) zugelassen. Vemurafenib konnte das Überleben bei Patienten mit metastasierendem Melanom in klinischen Studien verglichen mit einer Therapie mit Dacarbazin signifikant verlängern (Hersey et al., 2011).

Subtyp	Relative Häufigkeit	Mittleres Erkrankungsalter	Betroffene Hautareale	Wachstum
Superfiziell spreitende maligne Melanom (SSM)	65 %	50 Jahre	Sonnen-exponierte Regionen	lange (5-7 J.) horizontale Wachstumsphase
Primär noduläre maligne Melanom (NMM)	15 %	55 Jahre	Sonnen-exponierte Regionen	sofort einsetzendes vertikales Wachstum
Lentigo-maligna-Melanom (LMM)	10%	68 Jahre	Gesicht und Handrücken	lange (mehrere Jahre bis Jahrzehnte) horizontale Wachstumsphase
Akrolentiginöses malignes Melanom (ALM)	5 %	63 Jahre	Akren und Nagelbett	Vertikales Wachstum nach ca. 3 Jahren
Amelanotisches malignes Melanom (AMM)	2-5 %	k.A.	Sonnen-exponierte Regionen	sofort einsetzendes vertikales Wachstum

Tab. 1.1 Subtypen des malignen Melanoms Aufgeführt sind die relative Häufigkeit, durchschnittliches Erkrankungsalter, am häufigsten betroffene Hautareale und charakteristisches Wachstum. (Quelle: verändert nach Terhorst, 2009)

Stadien	Charakterisierung	10-Jahres-Überlebensrate
Stadium I	Tumor <1 mm Dicke mit Ulzeration, Tumor<2mm ohne Ulzerartion	>90 %
Stadium II	Tumor jeder Dicke ohne Lymphknotenbefall	>43 %
Stadium III	Tumor jeder Dicke mit Lymphknotenbefall	>19 %
Stadium IV	Fernmetastasen	3 %

Tab. 1.2 Einteilung der Stadien des malignen Melanoms Je nach Eindringtiefe des Tumors nach Clark bzw. der absolute Tumordicke nach Breslow und etwaiger Metastasierung werden verschiedene Stadien unterschieden. (Quelle: verändert nach Terhorst, 2009)

1.3 Prozesse der Karzinogenese

Karzinogenese, die Entstehung von Krebs, auch Kanzerogenese genannt, erfolgt schrittweise über mehrere Prozesse, welche Initiation, Promotion und Progression einschließen, und denen genetische und epigenetische Veränderungen zugrunde liegen (Mehrstufenmodell) (Yuspa, 1998; Matsumura & Ananthaswamy, 2002). Der Ausgangspunkt für den ersten Schritt der Karzinogenese, die Initiation, ist eine Mutation in Genen, die mit Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose assoziiert sind und als Tumorsuppressor- bzw. Onkogene bezeichnet werden (Fritsch, 2009). Mehrere Hundert dieser Gene sind inzwischen bekannt. Onkogene und Tumorsuppressorgene sind im nicht-mutierten Zustand an der Zellwachstumskontrolle beteiligt. Durch Mutationen werden Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert. Beides kann zum Verlust oder zu einer Beeinflussung der Wachstumskontrolle führen und somit die Tumorentstehung fördern. Zu den Tumorsuppressorgenen gehören auch Gene, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (Löffler, 2007; Weber, 2007). Ein Beispiel für ein Onkogen ist RAF, eine Kinase, die im RAS/RAF- und im MAP-Kinase-Signalweg involviert ist. Aktivierung dieser Signalwege fördert die Proliferation und das Überleben der Zelle. B-RRAF, eine Isoform von RAF, ist in 60% aller Melanome mutiert (Perez-Lorenzo & Zheng, 2010). Ein bekanntes Tumorsuppressorgen ist P53, ein Protein, das an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist und bei einer irreversiblen DNA-Schädigung die Apoptose (Weber, 2007) P53-Mutationen treten oft nach erhöhter UV-Exposition und sind typisch für Basaliome und Plattenepithelkarzinome (Brash et al., 1991; Bolshakov et al., 2003). Mutationen können entweder vererbt oder im Laufe des Lebens durch kanzerogene Noxen, wie z.B. Strahlung, Viren, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder verschiedene chemische Verbindungen, wie polycyclische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine oder

Nitrosamine, erworben sein. Als das bedeutendste Kanzerogen für die meisten Hautkrebskrankungen gilt UV-Licht. UV-Licht wird von der DNA absorbiert, wodurch spezifische Dipyrimidin-Photoprodukte entstehen, eine Vorstufe der klassischen Mutation durch UV. Dabei handelt es sich um C → T oder CC → TT – Transitionen. Außerdem verursacht UV-Strahlung die Entstehung von ROS, was Fehler bei der Replikation der DNA und Basensubstitutionen zur Folge hat (Weber, 2007). Die Akkumulation dieser genetischen Veränderungen durch weitere mutagene oder mitogene Reize hat einen Wachstumsvorteil der Zelle zur Folge, so dass ein Klon präneoplastischer Zellen (benigner Tumor) entsteht, der stark expandiert (Promotion) (Fritsch, 2009). Die mutierten Gene werden auf die nächste Zellgeneration weitergegeben, was ein erhöhtes Risiko für weitere Mutationen und epigenetische Veränderungen nach sich zieht (Löffler, 2007). Im weiteren Verlauf kommt es durch unlimitiertes Wachstum zu einer Selektion der zunehmend aggressiveren Zellklone, die weiter zu malignen Neoplasien transformieren und einen wachsenden, invasiven Tumor bilden (Progression) (Fritsch, 2009).

Durch die genetischen und epigenetischen Veränderungen unterscheiden sich Tumorzellen von normalen Zellen in mehreren Aspekten. Tumorzellen unterlaufen neben den Veränderungen des Proliferationsverhaltens, Veränderungen der Zell-Zell-Kommunikation, des Metabolismus, des Redox-Status und der Zelladhäsion (Gogvadze et al., 2008). Eine metabolische Modifikation, die in verschiedenen Tumorzelltypen gleichermaßen auftritt, ist das Phänomen der „aeroben Glykolyse“, das von Otto Warburg bereits in den 20er Jahren entdeckt wurde und daher auch als „Warburg Effekt“ bezeichnet wird (Warburg, 1956; Lu et al., 2002). Damals beobachtete Warburg, dass Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen einen erhöhten Glukoseverbrauch und eine erhöhte Laktatproduktion haben. Im Inneren von Tumoren kommt es ab einer gewissen Größe (0,5 mm Durchmesser) aufgrund fehlender Anbindung an das Blutssystem zu hypoxischen Zuständen. Die Energieversorgung der Tumorzellen über oxidative Phosphorylierung ist aufgrund des Sauerstoffmangels nicht mehr möglich. In Tumorzellen wird daher ATP hauptsächlich über Glykolyse gewonnen, welche auch unter hypoxischen Bedingungen ablaufen kann. Daher sind die Glykolyse-Rate, die Expression von glykolytischen Enzymen und Glukosetransportern sowie die Produktion von Pyruvat und Laktat in Tumorzellen stark erhöht (Semenza, 2008). Diese Veränderungen werden über den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbaren Faktor1 (HIF1) vermittelt, der bei hypoxischen Bedingungen aktiv wird. HIF1 besteht aus den zwei Untereinheiten α und β , die konstitutiv exprimiert werden. Unter normoxischen Bedingungen wird die Untereinheit HIF1 α von spezifischen Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert, wodurch sie von dem Von-Hippel-Lindau-E3-Ligase-Komplex

erkannt wird und in Folge dessen ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird. Unter hypoxischen Bedingungen sind die Prolylhydroxylasen inaktiviert und HIF-1 α daher stabil (Vaupel, 2004; Brahimi-Horn et al, 2006). Dadurch dass HIF nicht degradiert wird, akkumuliert der Transkriptionsfaktor im Zellkern und bindet als Dimer an eine Basensequenz, dem sogenannten „*hypoxia response element*“ (HRE), die sich in der Promotorregion nahezu aller Glykolyse-Enzymen, dem Glukosetransporters GluT-1 sowie in der des Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* VEGF befinden (Scholz, 2004; Vaupel, 2004). Damit fördert HIF1 auch die Neoangiogenese, indem die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF vorangetrieben wird. In Folge dessen kommt es zur Neovaskularisierung des Tumorgewebes, wodurch die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Tumorzellen wieder gewährleistet ist und weiteres Tumorwachstum und auch Metastasierung ermöglicht werden. HIF1 kann auch durch ROS stabilisiert werden, da erhöhte intrazelluläre ROS-Mengen hypoxischen Zuständen gleich kommen (Bonello et al., 2007; Bertout et al., 2008,). Warburg entdeckte, dass Tumorzellen auch unter normoxischen Bedingungen diesen veränderten Metabolismus beibehalten, obwohl oxidative Phosphorylierung möglich wäre und nannte dieses Phänomen daher „aerobe Glykolyse“ (Warburg, 1956; Gatenby & Gillies, 2004). Heute ist bekannt, dass selbst Tumorzellen in Zellkulturen diese metabolische Adaption der aeroben Glykolyse aufrechterhalten (Brown & Bicknell, 2001). Dennoch wurde dem Warburg-Effekt in der Krebsforschung lange Zeit nicht viel Beachtung geschenkt. Heutzutage jedoch gewinnt der Warburg-Effekt zunehmend an Bedeutung und es werden Therapien entwickelt, die auf dem Warburg-Effekt basieren (Kaelin & Thompson, 2010; Pouyssegur et al., 2006; Dang et. al., 2011). Eines der wichtigsten bildgebenden Diagnoseverfahren, das bei Krebserkrankungen sehr erfolgreich eingesetzt wird, das PET-CT (Positronen-Emission-Tomographie), basiert auf dem Warburg Effekt (Gatenby & Gillies, 2004).

Solange ein Tumor auf seinen Ausgangspunkt beschränkt ist (Primärtumor), kann die Erkrankung durch einen operativen Eingriff geheilt werden. Viele Tumoren weisen jedoch die Tendenz auf, lokal invasiv zu wachsen und nach Einbruch in das Gefäßsystem sekundäre Tumore (Metastasen) zu bilden (Löffler, 2007). Damit invasives Tumorwachstum möglich ist, müssen die Tumorzellen Zell-Zell-Kontakte auflösen und die Basalmembran durchbrechen. Tumorzellen exprimieren daher weniger oder veränderte cell adhesion molecules (CAM) auf der Oberfläche, über die normale Zellen miteinander und mit der Basalmembran verbunden sind. Zusätzlich werden vermehrt Metalloproteinasen ausgeschüttet, was zur Degradation der Laminae aus Kollagen und Laminin führt. Auf diese Weise überwinden Tumorzellen die Basalmembran und können über weiteres invasives Wachstum oder

Neoangiogenese Anschluss an das Blut- und Lymphsystem bekommen (R. Scholz, 2004). Über Blut- und Lymphwege können einzelne Tumorzellen, die sich vom Tumor abgelöst haben, in jede Körperregion gelangen und sich dort ansiedeln und Metastasen bilden, indem sie sich über Integrine an Selektine des Endothel anheften und es durchdringen (Scholz, 2004, Weber, 2007). Ein Protein, das eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen spielt ist, Caveolin-1 (Cav-1). Es ist ein membranständiges Struktur- und Signalprotein, welches in den Caveolae, kleinen Einbuchtungen der Zellmembran, lokalisiert ist (J. G. Goetz et al., 2011). Hohe Cav-1-Expression in Tumorzellen geht mit einer erhöhten invasiven Kapazität und verstärkten Metastasierung einher (Tse et al., 2012). Die Cav-1-Expression in Tumorzellen wird stark durch ROS beeinflusst. Superoxide und H_2O_2 führen zu einer Abnahme des Cav-1-Gehalts und in Folge dessen zu einer verminderten invasiven Kapazität der Tumorzellen. Hydroxylradikale hingegen erhöhen die Cav-1-Expression und fördern damit die Invasion und Metastasierung (Luanpitpong et al., 2010).

1.4 Oxidativer Stress

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht in der Zelle durch ein übermäßiges Vorkommen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und verursacht verschiedenartige zelluläre Schäden (Sies and Cadenas, 1985; Sies, 1993, 1997). Oxidativer Stress wird mit einer Reihe von Erkrankungen und auch mit dem Alterungsprozess assoziiert (Halliwell, 1989; Harman, 1956). ROS sind Metabolite von molekularem Sauerstoff. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören radikalische Formen des Sauerstoffs, wie beispielsweise das Hydroxylradikal ($HO\cdot$) und das Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$). Radikale sind hochreaktive Atome oder Moleküle, die mindestens ein ungepaartes Elektron in ihrem äußeren Orbital besitzen. Sie sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität sehr kurzlebig. Aber auch stabile, nicht radikalische Sauerstoffverbindungen, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) werden zu den reaktiven Sauerstoffspezies gezählt (Sies 1993, 1997). In allen aeroben Organismen entstehen ROS als Nebenprodukte des Metabolismus. Die Zelle verfügt jedoch über Mechanismen, durch die ROS eliminiert werden können (Gutteridge, 1993). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Entstehung und der Elimination von ROS. Wird dieses Gleichgewicht zugunsten der Bildung von ROS verschoben, akkumulieren sie in der Zelle, und es entsteht oxidativer Stress (Halliwell & Gutteridge, 1986). In

physiologischen Konzentrationen sind ROS nicht schädigend, sondern übernehmen u. a. die Funktion von Mediatoren in Signaltransduktionswegen und beeinflussen so die Genexpression (Guyton et al, 1996; Allen & Tresini, 2000). Es gibt endogene und exogene Quellen für ROS. Endogen entstehen ROS beispielsweise in Peroxisomen, im Cytosol, in Lysosomen, in Plasmamembranen und in Mitochondrien. In den Mitochondrien erfolgt die Energiegewinnung in Form von ATP, indem durch die oxidative Phosphorylierung innerhalb der Atmungskette sukzessive vier Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, wobei ein Protonengradient aufgebaut wird und Wasser entsteht. Dabei können O_2^- , H_2O_2 und $HO\cdot$ als Zwischenprodukte freigesetzt werden und aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit anderen zellulären Molekülen reagieren (Beckman & Ames, 1998). Auch die anderen endogenen ROS-Quellen bewirken über enzymatisch katalysierte Oxidation die Entstehung von ROS. So entsteht H_2O_2 als Nebenprodukt bei der Oxidation von Glykolat zu Glyoxylat in den Peroxisomen. Auch die Superoxiddismutase, die meist als antioxidatives Enzym betrachtet wird, stellt gewissermaßen eine ROS-Quelle dar, denn sie katalysiert die Reaktion von Superoxidanionen zu H_2O_2 , welches auch zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehört. Nur in Verbindung mit dem Enzym Catalase kann H_2O_2 weiter zu molekularem Sauerstoff und Wasser detoxifiziert werden. Bei den bisher beschriebenen endogenen Quellen entstehen ROS als unerwünschte Nebenprodukte oder Zwischenprodukte. Im Gegensatz dazu werden im Rahmen der angeborenen Immunantwort durch das Enzym NAD(P)H-Oxidase in phagozytischen Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, ROS zur Bekämpfung von Bakterien produziert („*respiratory burst*“) (Forman et al., 2002). Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Superoxid aus molekularem Sauerstoff unter NAD(P)H-Verbrauch (Seifert & Schultz, 1991) Auch in nicht phagozytischen Zellen, wie Fibroblasten, wird über die NAD(P)H-Oxidase als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie *tumor necrosis factor α* (TNF α), *transforming growth factor β 1* (TGF β 1) oder Interleukin-1, Superoxid gebildet. (Sies, 1993, Cat & Brenneisen, 2009). Exogene ROS-Quellen sind UV- oder ionisierende Strahlung, Xenobiotika sowie virale und bakterielle Infektionen (Halliwell, 1989; Riley et al., 1994; Pagano et al., 2002). ROS schädigen die Zelle auf unterschiedliche Weise. So können ROS zu Schädigungen von Makromolekülen wie Lipiden, Nucleinsäuren und Proteinen führen. Lipide sind sehr sensitiv gegenüber ROS. Die Lipidperoxidation durch ROS kann zu einer veränderten Permeabilität oder Deformation der Membran führen (Girotti et al., 1998). Außerdem kann es über eine Kettenreaktion zur Bildung von reaktiven Produkten, wie Malondialdehyd (MDA), 4-Hydroxy-2-Nonenol (4-HNE) und F2-Isoprostan kommen, die ihrerseits zu weiteren Schäden führen (Kregel & Zhang, 2006). Die Auswirkungen der Lipidperoxidation sind Grundlage der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Durch die Oxidation von DNA können Einzelstrang- bzw.

Doppelstrangbrüche und DNA-Addukte wie 8-Hydroxy-2-Deoxyguanin entstehen. Diese Ereignisse können dann zu Mutationen und Deletionen führen, die wiederum zur Tumorinitiation führen können (Ames et al., 1993; Burkhardt et al., 2001). Besonders anfällig für die Oxidation durch ROS ist die mitochondriale DNA, da diese aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu der Atmungskette stärker gegenüber ROS exponiert ist und weniger gut durch Reparaturmechanismen geschützt ist als nukleäre DNA (Balaban et al., 2005). Da einige Komponenten der Atmungskette durch das mitochondriale Genom kodiert werden, können Schäden an der mitochondrialen DNA zu einer Störung der Stöchiometrie der Atmungskettenmoleküle führen. Dies resultiert in einer verringerten Effizienz bei der Energiegewinnung und erhöhten Freisetzung von ROS als Reaktionsintermediate (Ott et al., 2007). In Proteinen kann nahezu jede Aminosäure durch ROS oxidiert werden. Dies kann zu einer funktionellen Veränderung oder zum Funktionsverlust des Proteins führen (Jacob et al., 2003). Die Oxidation durch ROS führt zu Modifikationen von Proteinseitenketten wie die Einführung von Carbonylgruppen oder die Bildung von sulfenischen, sulfinischen oder sulfonischen Säuren an Cystein-Resten. Thiolgruppen von Cysteinen werden durch H_2O_2 zu sulfenischen Säuren oxidiert (S-Glutathionylierung oder S-Thiolierung). Die Oxidation zur sulfenischen Säure ist reversibel, reagiert unter oxidativem Stress jedoch durch „Überoxidation“ weiter zu sulfinischen bzw. sulfonischen Säuren, wovon letzteres eine irreversibel Schädigung darstellt (Seo & Carroll, 2009; Eaton, 2006). Diese Modifikationen resultieren in veränderter Aktivität der Proteine und haben Einfluss auf die Signaltransduktion (Pombo et al., 1996). Beispielsweise modulieren ROS die Aktivität von Transkriptionsfaktoren direkt durch die Modifikation kritischer Aminosäuren, z.B. in der DNA-Bindedomäne, oder indirekt durch die Veränderungen von „upstream“ gelegenen Kinasen oder Phosphatasen in den Transkriptionsfaktor regulierenden Signalwegen. Beispiele für Transkriptionsfaktoren, die durch ROS beeinflusst werden sind *activator protein 1* (AP-1), *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) und *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) (Verschoor et al., 2010). Auf diesem Weg können ROS Einfluss auf die Genexpression ausüben, was besonders schwerwiegende Folgen für die Zelle hat, wenn Proteine in Signalwegen für Apoptose oder Proliferation betroffen sind (Harris & Levine, 2005). Auch Strukturproteine und Chaperone können Angriffspunkte von ROS sein. Funktionelle Veränderung dieser Proteine kann Proteinaggregation zur Folge haben. Einige neurodegenerative Erkrankungen wie die Parkinson- und die Alzheimer-Krankheit werden mit der Akkumulation geschädigter Proteine in Verbindung gebracht (Choi et al., 2005).

1.4.2 Antioxidantien

Die Zelle verfügt über verschiedene Schutzmechanismen um sich gegen die Schädigung durch ROS bzw. oxidativen Stress zu schützen. Diese Mechanismen beruhen auf der Bereitstellung von Antioxidantien. Als Antioxidantien werden Substanzen bezeichnet, die in niedrigen Konzentrationen verglichen mit dem Oxidans vorliegen und die Oxidation durch das Oxidans verhindern oder signifikant inhibieren (Halliwell & Gutteridge, 1989). Antioxidantien reagieren direkt oder indirekt mit ROS und verhindern, dass andere Zellkomponenten durch ROS oxidiert werden. Es gibt enzymatische und nicht enzymatische Antioxidantien (Sies, 1993). Nicht enzymatische Antioxidantien werden unterschieden in hydrophile und hydrophobe Substanzen. Hydrophobe Antioxidantien sind z.B. α -Tocopherol (Vitamin E), Carotinoide und Ubiquinol, welche hauptsächlich in Membranen und Lipoproteinen ihre Funktion erfüllen. Zu den wichtigsten hydrophilen, nicht enzymatischen Antioxidantien gehören Glutathion und Ascorbat (Vitamin C), welche ihre antioxidative Kapazität in der Zelle vor allem im Cytosol, in den Mitochondrien und im Zellkern ausüben (Chaudiere & Ferrari-Iliou, 1999). Das Tripeptid Glutathion (GSH) gehört auch zu den quantitativ am häufigsten auftretenden Antioxidantien, das ubiquitär in Organismen vorhanden ist. Glutathion spielt eine bedeutende Rolle bei der Detoxifikation von elektrophilen und radikalischen Substanzen (Jacob et al., 2003). Die Synthese von Glutathion erfolgt in einem zweistufigen Prozess, der von zwei Enzymen katalysiert wird. Zunächst wird Glutaminsäure mit Cystein durch γ -Glutamylcysteinsynthetase (GCS) verknüpft und dann erfolgt die Kondensation an Glycin durch das Enzym Glutathionsynthase. Glutathion geht durch Oxidation in das Glutathiondisulfid GSSG über und stellt damit ein Puffersystem für ROS dar. Diese Reaktion wird z.B. von GSH-Peroxidasen katalysiert. Unter Verbrauch von NADPH können aus dem Disulfid über die GSH-Reduktase wieder zwei Glutathion Moleküle hergestellt werden. Auch bei der Detoxifizierung von aromatischen Fremdstoffen im Phase II Metabolismus spielt GSH eine wichtige Rolle. Durch Glutathion-S-Transferasen (GST) wird Glutathion an in Phase I funktionalisierte Metabolite konjugiert, wodurch diese weniger reaktiv und hydrophiler werden und so leichter abgebaut werden können (Jacob et al., 2003; Montero & Jassem, 2011).

Zu den enzymatischen Antioxidantien werden die Superoxiddismutasen (SOD), Catalasen, die Glutathionperoxidasen (GPX) und Glutathion-S-Transferasen (GST) gezählt. Wie bereits erwähnt, katalysieren Superoxiddismutasen die Disproportionierung des Superoxidradikalanions zu Wasserstoffperoxid. Im Säuger sind drei Isoformen der SOD bekannt, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind: die induzierbare mitochondriale Mangan-SOD (Mn-SOD) und zwei Kupfer/Zink-SOD, von denen eine cytosolisch, die andere extrazellulär vorkommt

(Choi et al., 2005). Die Mn-SOD scheint essentiell für das Überleben der Zelle zu sein, denn Untersuchungen an *knock-out* Mäusen zeigten, dass der Verlust der Mn-SOD zu einem frühzeitigen Tod der Mäuse führte (Reaume et al., 1996). Das durch die Disproportionierung des Superoxidradikalanions entstandene Wasserstoffperoxid kann durch eine weitere Disproportionierungsreaktion zu Wasser und O₂ abgebaut werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Catalase katalysiert. Durch das Zusammenspiel der beschriebenen Antioxidantien ist die Zelle gut gegen ROS geschützt. Treten dennoch ROS bedingte Schäden auf, verfügt die Zelle über Reparatur-Mechanismen, die Schäden an DNA oder Proteinen erkennen und beseitigen können (Decker & Muller, 2002).

1.4.3 Bedeutung von ROS in der Karzinogenese und Tumorprogression

Tumorzellen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von normalen Zellen. Tumorzellen zeigen Veränderungen des Proliferationsverhalten, der Zell-Zell-Kommunikation, des Metabolismus und der Zelladhäsion. Des Weiteren besitzen Tumorzellen einen veränderten Redoxstatus. Sie zeigen basal einen höheren ROS-Gehalt als nicht entartete Zellen (Szatrowski & Nathan, 1991; Brown & Bicknell, 2001; Pelicano et al., 2004; Montero & Jassem, 2011). Als Resultat akkumulieren in Tumorzellen vermehrt ROS-bedingte Oxidationsprodukte (Pelicano et al., 2004). Aufgrund einer erhöhten ROS-Bildung oder einer Beeinträchtigung des antioxidativen Schutzsystems ist das Redoxgleichgewicht von Tumorzellen zugunsten der Oxidantien verschoben. Der Redoxstatus der Zelle wird im Wesentlichen durch das Verhältnis von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG), das Glutaredoxin- System und das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System reguliert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG im Cytoplasma normaler Zellen liegt bei 100:1. In Tumorzellen ist das Verhältnis von GSH/GSSG zugunsten von GSSG verschoben, was sich in einer erhöhten S-Glutathionylierung von Proteinen äußert (Jacob et al., 2003; Montero & Jassem, 2011). In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen konstitutiv hohe Mengen an H₂O₂ generieren, die dem *respiratoy burst* in Immunzellen gleich kommt (Szatrowski & Nathan, 1991). ROS spielen eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese. Sie können direkt zu DNA-Schäden führen oder die DNA-Reparatur beeinflussen und so Mutationen hervorrufen. Sie fördern die genomische Instabilität und damit die Promotion von Tumoren. Allerdings zeigen Tumorzellen auch eine höhere Vulnerabilität als gesunde Zellen gegenüber weiteren Erhöhungen des ROS-Gehalts (Pelicano et al., 2004; Fang et al., 2009; Montero & Jassem, 2011).

Es gibt verschiedene endogene ROS-Quellen in Tumorzellen. In Krebszellen werden häufig Mutationen der mitochondrialen DNA beobachtet. Da auch Komponenten der

Atmungskette auf der mitochondrialen DNA codiert sind, ist die Atmungskette in Tumorzellen oft fehlerhaft, was zu einer vermehrten Bildung von ROS führt. Die Mitochondrien gelten als die Hauptquelle für ROS in Krebszellen (Verschoor et al., 2010). Weitere endogene ROS-Quellen von Tumorzellen sind die NAD(P)H-Oxidase und Cytochrom P450 (Pelicano et al., 2004; Wittgen & van Kempen, 2007). In Melanomzellen entsteht ROS auch als Resultat der Melaninsynthese, die durch UV-Strahlung induziert wird. Für die Melaninsynthese wird Cystein benötigt. Diese Aminosäure ist auch Bestandteil von Glutathion, was in Folge einer erhöhten Melaninsynthese nicht mehr ausreichend gebildet werden kann. Dadurch kann in Melanomzellen weniger ROS durch GSH abgefangen werden, was ebenfalls in einer Erhöhung des ROS-Gehalts resultiert (Wittgen & van Kempen). Aufgrund des erhöhten ROS-Gehalts zeigen Tumorzellen zum Teil eine gesteigerte Expression und erhöhte Aktivität von antioxidativen Enzymen, wie etwa der Superoxid-Dismutase (SOD), der Glutathionperoxidase (GPx) und der Glutathion-S-Transferasen (GST) (Pelicano et al., 2004). Immunzellen (*respiratory burst*), die durch die Tumorzellen angelockt werden, stellen *in vivo* eine exogene ROS-Quelle dar (Wittgen & van Kempen, 2007)

Der basal erhöhte ROS-Gehalt hat für die Tumorzelle verschiedene Auswirkungen. Zum einen wird durch weitere Mutationen die genomische Instabilität der Tumorzellen erhöht und damit die Tumorpromotion gefördert, zum anderen wird die Proliferation von Krebszellen weiter gesteigert, indem ROS proliferationsregulierende Signaltransduktionswege modulieren, wie zum Beispiel über die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges (Pelicano et al., 2004). Außerdem können ROS die Aktivierung, Phosphorylierung, Oxidation oder die Bindungseigenschaften von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise HIF-1, AP-1, oder NF- κ B, beeinflussen und dadurch proliferativ wirken (Verschoor et al., 2010). Darüber hinaus üben ROS Einfluss auf das invasive Verhalten von Tumorzellen aus. Caveolin-1 (Cav-1), ein membranständiges Struktur- und Signalprotein, das eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen spielt, wird durch ROS reguliert (Goetz et al., 2011). Eine hohe Cav-1-Expression in Tumorzellen geht mit einer gesteigerten invasiven Kapazität und verstärkter Metastasierung einher (Tse et al., 2012). Die Cav-1-Expression in Tumorzellen wird durch unterschiedliche ROS auf verschiedene Arten beeinflusst. Superoxid und H₂O₂ führen zu einer Abnahme des Cav-1-Gehalts und in Folge dessen zu einer verminderten invasiven Kapazität der Tumorzellen. Hydroxylradikale hingegen erhöhen die Cav-1-Expression und fördern damit Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Luanpitpong et al., 2010). Eine weitere Auswirkung der basalen Erhöhung des ROS-Gehalts ist eine veränderte Responsivität gegenüber

verschiedenen Wirkstoffen (Pelicano et al., 2004). Der veränderte Redoxstatus von Tumorzellen bietet einen Ansatzpunkt für neuartige Krebstherapien, da der im Vergleich zu normalen Zellen erhöhte ROS-Gehalt in Tumorzellen eine erhöhte Vulnerabilität und Sensitivität gegenüber einer weiteren Erhöhung des ROS-Gehalts bedingt (Montero & Jassem, 2011). Im Rahmen einer Studie mit dem Wirkstoff 2-Metoxyestradiol (2-ME), welches über die Inhibition der SOD zur Akkumulation von ROS führt, konnte gezeigt werden, dass leukämische Zellen, in denen ein hoher basaler ROS-Gehalt nachgewiesen wurde, sensitiver gegenüber 2-ME reagierten als normale Lymphozyten (Pelicano et al., 2004). Eine weitere Erhöhung des ROS-Gehalts führt zum Absterben von Tumorzellen, während normale, stromale Zellen die Erhöhung kompensieren können. Derartige Ansätze können durch die Anwendung redox-aktiver bzw. ROS-generierender Agenzien oder die Inhibition des zelleigenen antioxidativen Schutzsystems umgesetzt werden (Fang et al., 2007; Pelicano et al., 2004). Lange Zeit wurde postuliert, dass die Wirkung von Chemotherapeutika hauptsächlich auf der Inhibition der Mitose basiert. Jedoch konnte für einige der konventionellen Cytostatika, wie Cisplatin, verschiedene Taxane und Anthracycline, redox-aktive Effekte bestätigt werden (J. Fang et al., 2007; Montero & Jassem, 2011; Luanpitpong et al., 2012).

1.5 Tumor-Stroma-Interaktion

Epitheliale Tumore, vor allem Melanome, zeigen eine hohe Tendenz zur Metastasierung und können sich daher zu einer tödlich verlaufenden Erkrankung entwickeln. Während der Tumorprogression und der Metastasierung spielt das Stroma, das den Tumor umgebene Gewebe aus „normalen“ Zellen (stromale Zellen) und extrazellulärer Matrix (EZM), eine zentrale Rolle. Tumor- und Stromazellen interagieren miteinander und beeinflussen sich gegenseitig über Zell-Zell-Kontakt oder die Sekretion von löslichen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder Proteinen der extrazellulären Matrix (Mueller & Fusenig, 2002; Löffek et al., 2006; Cat et al., 2006). Tumorzellen können das umgebene Stroma so verändern, dass Invasion, Tumorangiogenese und damit Metastasierung gefördert werden. Die Tumor- oder Neoangiogenese stellt einen entscheidenden Aspekt in der Tumorprogression dar. Ein epidermaler Tumor verfügt zunächst nicht über einen Zugang an das Lymph- oder Blutssystem. Dadurch kommt es bei voranschreitendem Wachstum der Tumore ab einer gewissen Größe zu Sauerstoff- und Nährstoffmangel. Um den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff zu beliefern und die Metastasierung über den

Blutkreislauf zu erleichtern, wird die Tumorangio-genese durch Ausschüttung des vaskularisierenden endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) vorangetrieben, was zur Rekrutierung von Endothelzellen führt (Scholz, 2004; Vaupel, 2004). Zudem migrieren Tumorzellen durch das Bindegewebe um Anschluss an das bereits bestehende Blut- und Lymphgefäßsystem zu erhalten. Dabei wird die EZM durch die Tumorzellen modifiziert und proteolytisch degradiert, wodurch die Migration der Tumorzellen erleichtert wird. An dem Abbau der EZM sind vor allem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt, die sowohl von Tumorzellen als auch von stromalen Zellen sezerniert werden können (De Wever, 2008). Die stromalen Zellen der Haut sind vor allem Fibroblasten, aber auch Endothel- und Immunzellen (Löffek et al., 2006). Vermutlich wird die Invasion von Tumorzellen im Bindegewebe der Haut wesentlich durch Fibroblasten beeinflusst (De Wever & Mareel, 2003). Tumorzellen sezernieren den transformierenden Wachstumsfaktor TGF β 1, der an TGF β 1-Rezeptoren der Oberfläche von Fibroblasten binden und zur Transdifferenzierung zum Myofibroblasten führen (Cat et al., 2006, Cat & Brenneisen, 2009). Myofibroblasten sind eigentlich an Prozessen wie Wachstum, Entwicklung und der Wundheilung des Gewebes beteiligt. Sie zeigen eine hohe Expression von kontraktile Aktin- und Myosin-Filamenten, sowie eine hohe endogene Produktion von Kollagen, was ihnen die Fähigkeit der Kontraktion verleiht. Die kontraktile Mikrofilamentbündel werden auch „*stress fibers*“ genannt und sind durch einen hohen Anteil von α -smooth muscle actin (α SMA) charakterisiert, ein Protein, das als ein Marker für die Transdifferenzierung des Myofibroblasten herangezogen werden kann. Bei traumatischen Verletzungen der Haut wandern Myofibroblasten zusammen mit Immunzellen, wie Makrophagen, in das Wundgebiet ein und tragen zur Wundheilung und Narbenbildung bei (physiologische Invasion). Myofibroblasten werden jedoch auch mit pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Fibrosen und mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert (Wang et al., 1997; Powell et al., 1999). Die durch TGF β 1-vermittelte Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist ROS abhängig. Die Bindung von TGF β 1 an Rezeptoren der Fibroblasten, führt über die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase zu einem Anstieg des intrazellulären ROS-Gehalts (Cat & Brenneisen, 2009). Der ROS-Anstieg bedingt letztendlich die Transdifferenzierung zum Myofibroblasten. Myofibroblasten sezernieren proinvasive Wachstumsfaktoren und Chemokine wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatocyte growth factor* (HGF) und Interleukin-6 (IL-6) und fördern somit die Tumordinvasion (Cat et al., 2006). In therapeutischen Ansätzen sollten die Erkenntnisse über den Einfluss der Tumor-Stroma-Interaktion bedacht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass NAC und Natriumselenit die TGF β 1-induzierte, ROS-abhängige Generierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verhindern und somit indirekt die Invasion von Tumorzellen vermindern (Cat et al.; 2006). Allerdings wurden in dieser Studie nur Fibroblasten mit Antioxidantien behandelt, nicht die Tumorzellen. Der anti-invasive Effekt der Antioxidantien resultierte in diesem Fall aus der Detoxifizierung der TGF β 1-induzierten ROS, wodurch die Transformation zum Myofibroblasten verhindert wurde und damit auch die Freisetzung von pro-invasiven Signalen durch den Myofibroblasten (Cat et al., 2006; Cat & Brenneisen, 2009). Im Gegensatz dazu zeigten Tumorzellen eine erhöhte invasive Kapazität, wenn sie direkt mit den Antioxidantien behandelt wurden (Alili et al, 2011). Für einen therapeutischen Ansatz bei Tumorerkrankungen eignen sich Antioxidantien aufgrund ihrer pro-invasiven Effekte auf Tumorzellen nicht.

1.6 Nanomedizin als alternativer Ansatz in der Krebstherapie

Der Begriff Nanomedizin beschreibt die medizinische Anwendung von Nanotechnologie. Nanotechnologie kann in praktisch jedem Bereich der Medizin Anwendung finden, daher kann Nanomedizin in Fachgebiete unterteilt werden, zu denen z. B. Nanoonkologie, Nanoneurologie oder Nanoorthopädie gehören (Jain, 2010). In der Nanotechnologie wird mit Strukturen gearbeitet, die kleiner als 100 Nanometer (nm) sind. Der Begriff Nanopartikel (nano = Zwerg, griechisch) beschreibt definitionsgemäß den Verbund von wenigen bis tausenden Atomen oder Molekülen mit einem Durchmesser von 1 bis 100 nm. Nanopartikel können natürlicherweise bei Vulkanausbrüchen oder bei industriellen Prozessen als Feinstaub entstehen, wobei letzteres mit der Entstehung von verschiedenen Atemwegs- und Krebserkrankungen assoziiert wird (Terzano et al, 2010). Aufgrund der geringen Größe liegt ein Großteil der Atome des Partikels an der Oberfläche. Je kleiner die Partikel sind desto größer wird ihr Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Die relativ große Oberfläche hat großen Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Partikel und diese können sich stark von denen des Feststoffs unterscheiden. Partikel aus identischer Zusammensetzung können je nach Größe unterschiedliche Wirkungen aufweisen (Perez et al., 2007; Celardo et al., 2011). Nanotechnologien werden als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts betrachtet und es wurden bereits verschiedene vielversprechende Ansätze im Bereich der Nanomedizin entwickelt, wovon einige sich bereits in der klinischen Anwendung befinden (Schroeder et al., 2012; Grobe et al., 2008). Zu den wichtigsten Ansätzen der Nanoonkologie zählen

Drug Delivery, *Nanodiagnostics*, *Nanopharmaceuticals* und das Hyperthermieverfahren, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

Bei dem sogenannten *Drug Delivery*, werden Nanopartikel für den Transport von Wirkstoffen im menschlichen Körper eingesetzt. Dabei wird ein Wirkstoff von Nanomaterial umschlossen oder ist kovalent an Nanopartikel gebunden, wodurch er in spezifische Zielgebiete transportiert werden kann oder seine Stabilität (Halbwertszeit), Aufnahme und Löslichkeit erhöht werden kann. Aufgrund der geringen Größe der Partikel ist es möglich Barrieren wie Zellmembranen, Magen-Darm-Wand und die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, was bisher vor allem für die Blut-Hirn-Schranke als schwierig gilt und die pharmakologische Therapie von Erkrankungen wie z.B. Alzheimer und Hirntumoren erschwert (Grobe et al., 2008; Florence, 2012). Der Einsatz von Nanopartikeln als Transportsystem, bietet den Vorteil ganz gezielt nur bestimmte Regionen, Organe bzw. Zellen des Körpers zu behandeln (*Targeted Delivery*) und so Nebenwirkungen zu reduzieren, die bei systemischen Anwendungen, wie in der Chemotherapie, sehr problematisch sein können (Mahapatro & Singh, 2011; Galvin et al., 2011, Abeylath et al., 2011). Um den zielgerichteten Transport von Substanzen über „*Nanocarrier*“ zu ermöglichen, werden die Eigenschaften des Nanomaterials und die Oberfläche der Partikel ganz spezifisch auf das Zielgewebe bzw. die Zielzellen abgestimmt, so dass sie mit einer besonders hohen Affinität für das betreffende Zielgebiet ausgestattet sind. Derartige Eigenschaften werden oft durch Beschichtung der Partikel (Coating), wie z.B. Polymer-Beschichtungen, oder durch die Kopplung von spezifischen Antikörpern oder Peptiden erreicht. So können beispielsweise Antikörper, die spezifisch an Epitope binden, die vermehrt an der Oberfläche von Tumorzellen zu finden sind, an Nanopartikel gekoppelt werden (Cho et al., 2008; Jain, 2008, 2010). Solche Epitope sind beispielsweise Rezeptoren, die in Tumorzellen überexprimiert werden, wie der *human epidermal growth factor*- Rezeptor-2 (HER-2) oder Folat-Rezeptoren, die bereits als Biomarker bzw. *target* von Brustkrebszellen für Nanocarrier untersucht wurden (Gulloti & Yeo, 2009).

Nanodiagnostics beschreibt die Anwendung von Nanotechnologie in der medizinischen Diagnostik. Der Einsatz von Nanostrukturen kann bereits etablierte Verfahren verbessern. In bildgebenden Diagnostikverfahren wie der Magnet-Resonanz- Tomographie (MRT) werden Nanostrukturen als Kontrastmittel eingesetzt (*Nano Imaging*) (Boyer et al., 2010) Vielversprechend sind *quantum dots*, halbleitende, lichtemittierende Nanokristallstrukturen, deren Anwendung in vielen verschiedenen Verfahren des Tumor Imaging erprobt wird. Diskutiert wird allerdings auch eine toxische Wirkung von *quantum dots* (Pericleous et al., 2012). Ein weiterer

sehr interessanter und bedeutsamer Ansatz der Nanodiagnostik, der in Mäusen bereits getestet wurde, ist es im Blut zirkulierende Tumorzellen mit Hilfe von Nanopartikeln aufzuspüren und gleichzeitig z.B. über magnetische Eigenschaften der Partikel abzufangen (Galanzha et al., 2009). Derartige Innovationen würden hervorragende Möglichkeiten für Diagnose und Therapie bieten.

Auch die Anwendung von Nanopartikeln selbst als Wirkstoff bzw. von Nanoformulaturen von bereits erprobten Wirkstoffen wird fokussiert (Nanopharmaceuticals). Paclitaxel, ein Chemotherapeutikum, wurde in Mäusen als Nanoformulatur getestet. Für das Medikament in „Nanoform“ konnte im Vergleich zu der konventionellen Darreichungsform eine erhöhte Biokompatibilität festgestellt werden (Jain, 2010). In letzter Zeit wird auch die Anwendung von redox-aktiven Partikeln angestrebt, die zum Beispiel über antioxidative Eigenschaften eine protektive Wirkung gegenüber oxidativem Stress erzielen (Celardo et al., 2010, Perez et al., 2008). Einen weiteren Ansatz stellt das Hyperthermieverfahren dar, bei dem metallische Nanostrukturen aus Eisen, Kupfer, Gold oder Magnetit eingesetzt werden. Diese Methode wird bereits in der Krebstherapie eingesetzt. Dabei werden magnetische Nanopartikel, über *Targeted Delivery* in Tumore eingebracht, wo sie durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes in Schwingungen gebracht werden. Durch die Schwingungen wird Wärme erzeugt, was zu thermalem Stress und zum Absterben der Tumorzellen führt, während andere Zellen nicht betroffen sind (A. S. Silva et al., 2011; Shinkai et al., 2002).

Die Nanomedizin, bietet viele Möglichkeiten für neue therapeutische Strategien gegen verschiedene Krankheiten, insbesondere im Bereich der Onkologie, von denen hier nur einige kurz vorgestellt wurden. Allerdings bedarf es gründlicher Aufklärung über Toxizität, Biokompatibilität und eventuelle Langzeit-Effekte von Nanopartikeln, damit ein sicherer Einsatz von Nanopartikeln gewährleistet werden kann.

1.7 Ceroxid-Nanopartikel

Das chemische Element Cer, auch Cerium genannt, ist ein Metall der Gruppe der Lanthanoide und gehört zu den „Seltene Erden“. Das Metall wurde um 1814 von J. J. Berzelius, W. von Hisinger und M. H. Klaproth entdeckt und nach dem Kleinplaneten Ceres benannt. Cer ist das einzige Element der Seltene Erden, welches neben der Oxidationsstufe III auch in der Oxidationsstufe IV vorkommt (Ce^{3+} und Ce^{4+}). In der Natur kommt Cer in Verbindung mit anderen Lanthanoiden als Ceriterde vor

(Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1986). Cer wird in vielen industriellen Anwendungen eingesetzt (Lin et al., 2006; Park et al., 2007). Seit kurzer Zeit wird Cer auch in der Nanotechnologie verwendet. Dabei werden Nanopartikel aus Ceroxid synthetisiert, die aufgrund der Fähigkeit von Cer zwischen den Oxidationsstufen III und IV wechseln zu können, redox-aktive Eigenschaften besitzen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Ceroxid-Nanopartikel (CNP) wurden an der University of Central Florida, Orlando (Advanced Materials Processing and Analysis Center, Nanoscience and Technology Center (NSTC), Mechanical, Materials Aerospace Engineering (MMAE), University of Central Florida, Orlando, Florida 32816, USA) von Prof. Sudipta Seal und seiner Arbeitsgruppe, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, synthetisiert. Dabei handelt es sich um im Durchmesser 3-5 nm große Partikel aus Ceroxid, die mit einem Polymer beschichtet sind (*polymer coating*). Die Beschichtung besteht aus Dextran-Polymeren und stabilisiert das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} -Ionen innerhalb eines Partikels und sorgt dafür, dass die Partikel in der Lösung nicht agglomerieren (Alili et al., 2011). Die Partikel besitzen ein ausgewogenes, stabiles Verhältnis von Ce^{3+} - und Ce^{4+} -Ionen. Das Absorptionsmaximum von Ce^{3+} liegt zwischen 250 und 350 nm, während das Absorptionsmaximum von Ce^{4+} erst bei höheren Wellenlängen nach 350 nm auftritt (Alili et al., 2011). Das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} jeder Charge wurde bestimmt und es wurden ausschließlich Chargen mit einem ausgewogenen Ce^{3+}/Ce^{4+} -Verhältnis für die durchgeführten Experimente verwendet (siehe Kapitel 2.1). Aufgrund der Fähigkeit zwischen den Oxidationsstufen III und IV zu wechseln, zeigen CNP redox-aktive Eigenschaften und besitzen an ihrer Oberfläche Sauerstoffdefekte bzw. -Sauerstoffvakanz, welche durch den spontanen Verlust eines Sauerstoffatoms oder seiner Elektronen zustande kommen (Korsvik et al., 2007). Das große Oberflächen/Volumen-Verhältnis der Partikel und die damit steigende Anzahl der Sauerstoffvakanz begünstigen eine hohe Redox-Aktivität und ermöglichen eine katalytische Wirkung für Redox- Reaktionen (Korsvik et al., 2007). Abb. 1.4 zeigt repräsentative *high resolution transmission microscopy*-Aufnahmen von CNP in unterschiedlicher Vergrößerung.

Die Wirkung von Ceroxid-Nanopartikeln wird derzeit kontrovers diskutiert. Einige *in vitro*-Studien deuten auf eine antioxidative und protektive Wirkung der Partikel hin, wohingegen andere eine prooxidative und cytotoxische Wirkung postulieren. So konnte gezeigt werden, dass CNP in Lungenkarzinomzellen den intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies erhöhen (Lin et al.; 2006). Auch in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B), wurden prooxidative und cytotoxische Effekte beobachtet (Park et al.; 2007; Eom & Choi, 2009). Antioxidative Effekte von Ceroxid-Nanopartikeln konnten zum Beispiel in humanen Fibroblasten und retinalen

Neuronen nachgewiesen werden (Perez et al., 2008; Chen et al., 2006). In weiteren Studien wurde eine radioprotektive Wirkung in Lungenfibroblasten festgestellt, während in Tumorzellen keine Protektivität beobachtet wurde (Tarnuzzer et al., 2005; Colon et al., 2009).

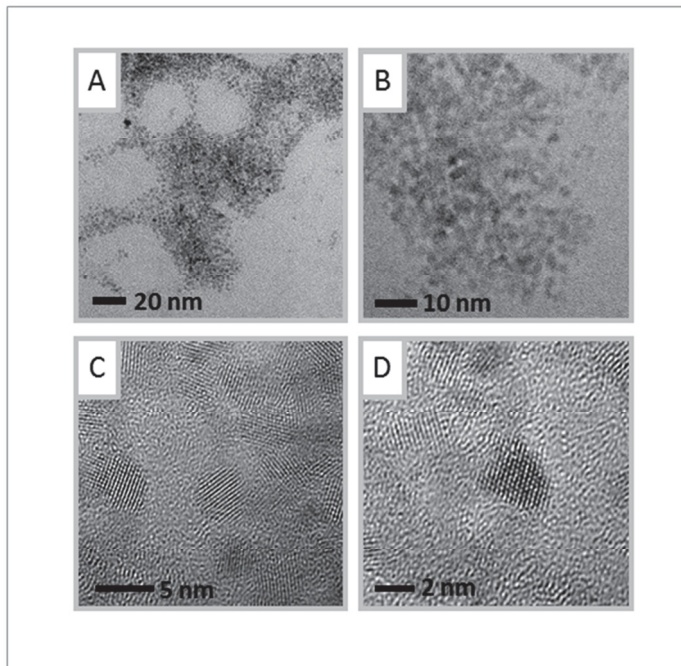


Abb. 1.4 Ceroxid-Nanopartikel (CNP) High resolution transmission microscopy (HRTEM)-Aufnahmen von CNP in unterschiedlicher Vergrößerung.

In zellfreien Systemen konnte eine Superoxid-Dismutase (SOD) mimetische Aktivität und auch eine Catalase mimetische Aktivität festgestellt werden (Korsvik et al., 2007; Pirmohamed et al., 2010; Vincent et al., 2009). Das Enzym SOD katalysiert die von O_2^- zu O_2 und H_2O_2 (Abb. 1.5). Für die Reaktion von CNP mit O_2^- wird eine zweistufige Reaktion angenommen, die in Abb. 1.5 dargestellt ist. In der ersten Teilreaktion wird Ce^{4+} durch O_2^- zu Ce^{3+} oxidiert. In der zweiten Teilreaktion reagiert Ce^{4+} mit einem weiteren Superoxid-Anion zu H_2O_2 und wird dabei wieder zu Ce^{3+} reduziert (Korsvik et al., 2007). Das Enzym Catalase katalysiert die Reaktion von H_2O_2 zu H_2O und molekularem Sauerstoff O_2 . Wie genau diese Reaktion durch CNP katalysiert wird und abläuft bleibt bisher unklar. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass der H_2O_2 -Gehalt von Lösungen mit CNP geringer war als der ohne Zusatz von CNP (T. Pirmohamed et al., 2010).

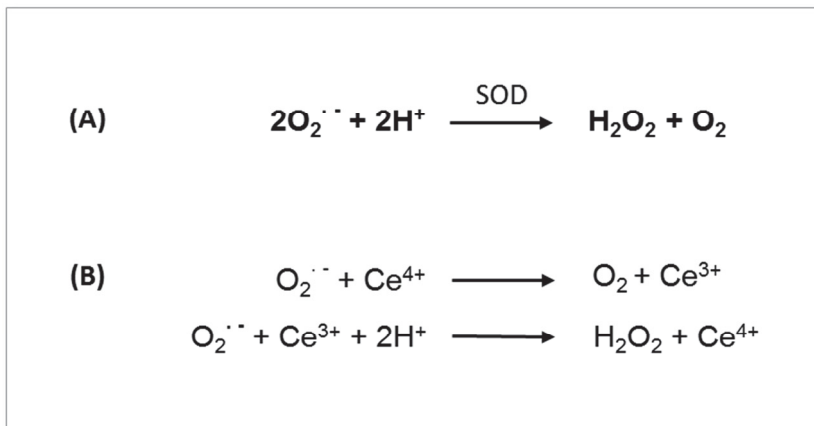


Abb. 1.5 Dismutation von Superoxid (A) Katalytische Reaktion der Superoxid-Dismutase (SOD), (B) Im zellfreien System wurde eine SOD mimetische Aktivität von CNP nachgewiesen, dargestellt ist der putative Reaktionsmechanismus von CNP in zwei Teilschritten nach C. Korsvik et al, 2007.

Weitere Untersuchungen am Advanced Materials Processing and Analysis Center, Nanoscience and Technology Center (NSTC) von Prof. Sudipta Seal und seiner Arbeitsgruppe ergaben, dass sowohl SOD-Aktivität als auch Catalase-Aktivität pH abhängig sind. Die SOD-Aktivität und eine mögliche pH-Abhängigkeit von CNP wurde über die Reduktion von Ferricytochrom C durch Superoxid in CNP-haltigen Reaktionslösungen, die auf einen pH-Wert von 3 bzw. 7 eingestellt wurden, im zellfreien System spektrometrisch bestimmt. Bei beiden pH-Werten konnte eine Superoxid-Dismutase-Aktivität von CNP beobachtet werden, jedoch war diese bei pH 3 höher als bei pH 7, was eine pH-Abhängigkeit der SOD-Aktivität der Partikel nahe legt (Alili et al., 2011). Die pH-Abhängigkeit der Catalase-Aktivität wurde mit Hilfe eines Amplex Red Assays untersucht, mit welchem physiologische Mengen von H_2O_2 gemessen werden können. Im zellfreien System wurde bei einem pH-Wert von 7 eine höhere Catalase-Aktivität festgestellt als bei einem pH-Wert von 3, was auf eine pH-Abhängigkeit der Catalase-Aktivität schließen lässt (Alili et al., 2011). In anderen Studien konnte ebenfalls eine pH-Abhängigkeit von Ceroxid-Nanopartikeln gezeigt werden (Perez et al.; 2008). Aufgrund ihrer redox-aktiven Eigenschaften besitzen CNP ein hohes Potential für einen therapeutischen Einsatz gegen Krankheiten, die mit ROS und oxidativem Stress assoziiert werden. Deswegen ist es wichtig die Auswirkungen von CNP in Zellen bzw. im Organismus zu untersuchen, um neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können und eventuelle Risiken ausschließen zu können.

1.8 Fragestellung

Die Inzidenz von Hautkrebserkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen. Die Behandlungsmöglichkeiten sind jedoch begrenzt. Vor allem die Behandlung der metastasierenden Form des malignen Melanoms, dem aggressivsten aller Hauttumore, ist aufgrund der hohen Resistenz von Melanomzellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika schwierig (Soengas & Lowe, 2003). Die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit malignen Melanom und Fernmetastasen liegt bei nur 3%. Daher ist die Entwicklung neuer Therapien von großer Bedeutung. Ein neuer Ansatz in der Krebsforschung ist es, den in Tumorzellen veränderten Redoxstatus für therapeutische Zwecke zu nutzen (Montero & Jassem, 2011). Tumorzellen zeigen eine basal erhöhte ROS-Bildung im Vergleich zu normalen Zellen (Cerutti et al., 1994; Brown & Bicknell, 2001; H. Pelicano et al., 2004). Diese Eigenschaft kann die Tumorprogression durch eine Erhöhung der genomischen Instabilität und der Resistenz gegenüber Medikamenten fördern, verleiht den Tumorzellen andererseits aber auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber weiteren Erhöhungen des ROS-Gehalts (Montero & Jassem, 2011). Antioxidantien bieten die Möglichkeit den zellulären Redoxstatus zu verändern. Vorherige Untersuchungen innerhalb der Forschungsgruppe von Prof. Brenneisen zeigten vielversprechende Effekte von N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit auf die Tumor-Stroma-Interaktion. Es wurde gezeigt, dass NAC und Natriumselenit die TGF β 1-induzierte, ROS-abhängige mesenchymale-mesenchymale Transition von Fibroblasten zu Myofibroblasten verhindern und somit indirekt die Invasion von Tumorzellen vermindern (Cat et al.; 2006). Allerdings wurden in dieser Studie nur Fibroblasten mit Antioxidantien behandelt, nicht die Tumorzellen. Der anti-invasive Effekt der Antioxidantien resultierte in diesem Fall aus der Detoxifizierung der TGF β 1-induzierten ROS, wodurch die Transformation zum Myofibroblasten verhindert wurde und damit auch die Freisetzung von pro-invasiven Signalen durch den Myofibroblasten. Der direkte Einfluss von Antioxidantien auf die invasive Kapazität von Tumorzellen wurde bis dahin nicht untersucht. Da bei möglichen therapeutischen Ansätzen mit antioxidativen Substanzen *in vivo* auch die Tumorzellen von der Behandlung betroffen wären, war es von hoher Wichtigkeit auch den direkten Effekt von Antioxidantien auf die Invasion von Tumorzellen zu untersuchen. Daher wurden im Rahmen einer weiteren Studie der direkte Einfluss von NAC und Natriumselenit auf die Tumorzellen untersucht. Die Behandlung mit Antioxidantien führte zu einer gesteigerten invasiven Kapazität von Tumorzellen. Aufgrund dieser pro-invasiven Wirkungen in Tumorzellen eignen sich Antioxidantien nicht für einen therapeutischen Einsatz bei Tumorerkrankungen (Alili et al., 2011).

Nanomedizin, die medizinische Anwendung von Nanotechnologie, bietet neue und vielversprechende Möglichkeiten für die Therapie von Krebs und anderen Erkrankungen. Ceroxid-Nanopartikel zeigten in verschiedenen Studien redox-aktive Eigenschaften (Korsvik et al, 2007; Pirmohamed et al., 2010; Vincent et al., 2009). Nachdem gezeigt wurde, dass Antioxidantien die Tumordinvasion fördern und sich daher nicht für therapeutische Zwecke eignen, sollte in dieser Studie der Einfluss von redox-aktiven Ceroxid-Nanopartikeln (CNP) einer bestimmten Größe auf Tumorzellen untersucht werden. Die Wirkung von Ceroxid-Nanopartikeln sollte *in vitro*, in Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) und Melanomzellen (A375), als auch *in vivo*, in einem murinen Xenograft-Modell mit A375 Zellen untersucht werden. Die Untersuchungen sollten aufklären, inwieweit sich Ceroxid-Nanopartikel für einen therapeutischen Einsatz bei Tumorerkrankungen eignen.

2 Material und Methoden

2.1 Nanopartikel

Die Ceroxid-Nanopartikel wurden an der University of Central Florida, Orlando (Advanced Materials Processing and Analysis Center, Nanoscience and Technology Center (NSTC), Mechanical, Materials Aerospace Engineering (MMAE), University of Central Florida, Orlando, Florida 32816, USA) von Prof. Sudipta Seal und seiner Arbeitsgruppe nach der bereits beschriebenen Methode (Karakoti et al., 2007) hergestellt und uns in Kooperation zur Verfügung gestellt.

Die Ceroxid-Nanopartikel wurden in Dextran (1000 Da) synthetisiert. Dazu wurde zunächst Dextran in deionisiertem Wasser gelöst und anschließend Cernitrathexahydrat unter zweistündigem Rühren zugefügt. Es folgte die Zugabe von Ammoniumhydroxid (30% w/w). Dabei wurde der pH-Wert der Lösung unter 9,5 gehalten, um die Präzipitation von Cerhydroxid zu vermeiden. Im Anschluss an die Synthese wurden die mit Dextran umhüllten Ceroxid-Nanopartikel mittels Ultraviolett-Visible Spektroskopie(UV/VIS) untersucht, um den Oxidationsstatus der Partikel zu überprüfen. Die Größe der Partikel (3-5 nm) wurde über Transmission-Elektronen-Mikroskopie bestimmt. Die Konzentration der für diese Studie verwendeten Ceroxid-Lösung betrug 5 mM.

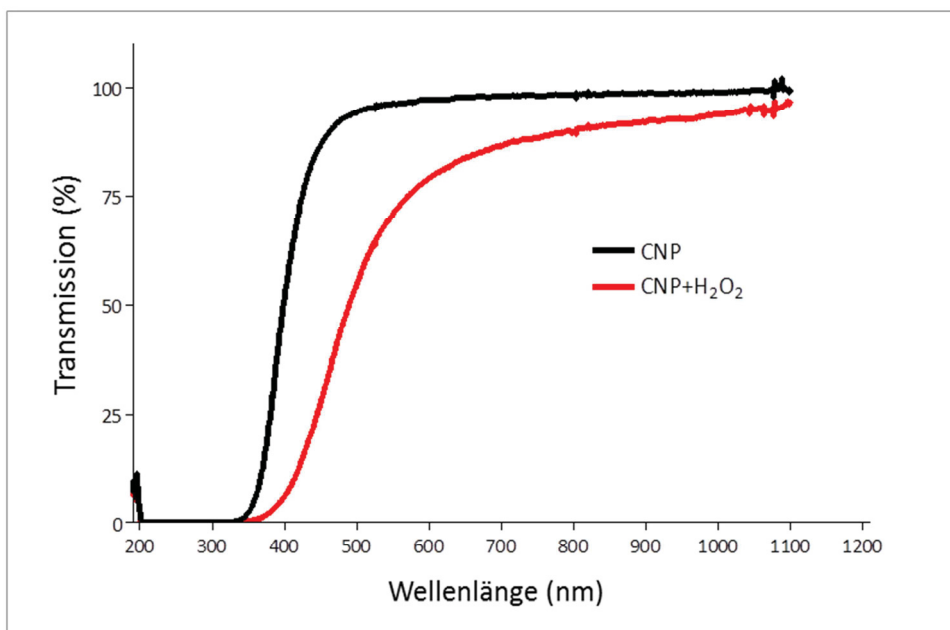


Abb. 2.1 Charakteristisches Transmissionsspektrum von Ceroxid-Nanopartikeln in Lösung. Transmission einer 1 mM CNP-Lösung mit einem ausgeglichenen Verhältnis von $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ (schwarz) und typischer Shift nach Oxidation durch H_2O_2 (75 mM) in Richtung Ce^{4+} (rot).

Nach Erhalt der Partikel-Lösung wurde jede Charge auf ihre Toxizität mittels MTT-Test in Tumorzellen (SCL-1 und A375) und stromalen Zellen (HDF) untersucht. Des Weiteren wurde von jeder Charge ein Transmissionsspektrum aufgenommen um das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} , die Konzentration der Lösung und den charakteristischen Shift von Ce^{3+} zu Ce^{4+} nach Oxidation durch H_2O_2 zu überprüfen und so die gleichbleibende Qualität der Chargen zu gewährleisten. Für die Untersuchung der Transmission wurde die 5 mM Nanopartikel-Lösung 1:5 in PBS (1 mM) verdünnt und das Transmissionsspektrum dieser Verdünnung in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 1100 nm aufgezeichnet (Abb. 2.1). Die Partikel absorbieren Licht im Bereich von 210 nm bis ca 350 nm, wenn ein ausgewogenes Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} vorliegt. In der Verdünnung wurde dann eine Konzentration von 75 mM H_2O_2 eingestellt. Direkt im Anschluss wurde die Transmission erneut gemessen. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid wird Ce^{3+} zu Ce^{4+} oxidiert, was sich im Transmissionsspektrum als *shift* nach rechts zeigt (Abb. 2.1), da Ce^{4+} rotes Licht absorbiert, während Ce^{3+} gelbes Licht absorbiert. Der shift nach rechts zeigt, dass das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} durch Oxidation zugunsten von Ce^{4+} verschoben wird. In diesem Verhältnis fällt die Absorption erst bei einer Wellenlänge von 450 nm ab, so dass bei einer Wellenlänge von 550 nm eine 25 prozentige Transmission beobachtet wurde, die dann langsam weiter auf fast 100% bei 1100 nm anstieg. Die Eigenschaft der Partikel autokatalytisch von Ce^{4+} zu Ce^{3+} wechseln zu können (Heckert et al., 2008), ließ sich ebenfalls über Transmissionsspektroskopie nachweisen. Die Aufnahmen der Transmission zeigten nach mehreren Stunden einen *shift* zurück in Richtung Ce^{3+} . Nach mehreren Stunden war das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} wieder im Gleichgewicht.

2.2 Chemikalien

2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	Millipore, Schwalbach
Ac-DEVD-AMC	Calbiochem, Darmstadt
Aceton p.A.	Merck, Darmstadt
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt
APS analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA) 98%	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
Caspase Inhibitor III	Calbiochem, Darmstadt

CHAPS analytical grade	Sigma, Taufkirchen
Cisplatin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
DAPI pro long	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Entwicklerkonzentrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100%) (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS superior	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fixiererkonzentrat	Merck, Darmstadt
Fluoromount C	Southern Biotech, Eching
Gentamycin solution	Sigma, Taufkirchen
Glutamax	Gibco,
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin p.A.	Roth, Karlsruhe
Glycin \geq 99,9 % p. A.	Roth, Karlsruhe
H ₂ -DCF-DA	Sigma, Taufkirchen
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen
Kobaltchlorid	Merck, Darmstadt
Luminol/Verstärker-Lösung	Pierce, Rockfort USA
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MTT 98% (TLC)	Sigma, Taufkirchen
Na ₂ HPO ₄ p. A	Merck, Darmstadt
Na-EDTA p.A.	Sigma, Taufkirchen
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Paraquat	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching

Penstrep	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Taufkirchen
PonceauS	Sigma, Taufkirchen
Protein Assayagenzien A, B, S	BioRad, München
Proteinstandard Page Ruler	Fermantas, Deutschland
Rotiphorese Gel 40(37,5;1)	Roth, Karlsruhe
SDS Ultra Pure $\geq 99\%$	Roth, Karlsruhe
Spurr's medium	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
TGF β 1, recombinant from human	R&D Systems, Wiesbaden
Tris Pufferan [®] $\geq 99,9\%$	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30Gew.%), stabilisiert	Riedel-de Häen
Western Blot Stripping Buffer	Thermoscientific
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen

2.3 Lösungen und Puffer

10x SDS-Laufpuffer	10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g Glycin ad 1 l dH ₂ O
10x TBST	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% Tween
4x SDS Probenpuffer (Leammli-Puffer)	40% Glycerin 20% β Mercaptoethanol 12% SDS 0,4% Bromphenolblau
Anodenpuffer I	0,3 M Tris 10% (v/v) Methanol pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris 10% (v/v) Methanol pH 10, 4

Blockierlösung	5% Milchpulver in 1x TBST
Blockierlösung für Oxyblot-Analysen	1% BSA in PBST
Carnoy's Fixativ	Methanol/Eisessig, (3:1)
Caspase Assay-Buffer	20 mM HEPES 0,1% CHAPS 2 mM EDTA 5 mM DTT ad 100 ml dH ₂ O
Caspase Assay-Lysepuffer	50 mM HEPES pH 7,4 5 mM CHAPS 5 mM DTT ad 100 ml dH ₂ O
Coomassie Blue-Färbelösung	0,05% Coomassie Brilliant Blue 20% Methanol 7,5% Essigsäure
Fraktionierungslysepuffer	74,6 mg KCl 102 mg NaCl 476 mg HEPES 121 mg Tris 8,55 g Saccharose 400 µl EDTA (500 mM) 25 mg Digitonin (frisch zusetzen) ad 100 ml dH ₂ O
Kathodenpuffer	25mM Tris 10% (v/v) Methanol 40mM Glycin pH 9,4
Luminol/Verstärker-Lösung	Pierce, Rockfort USA
Mcllvaine-Puffer	50mM Zitronensäure 100mM Na ₂ HPO ₄
MTT-Inkubationslösung	MTT-Stocklösung 1/10 in serumfreiem DMEM verdünnt.
MTT-Stocklösung	5 mg/ml MTT in PBS
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO
PBST	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 0,05% Tween
Ponceau S Lösung	0,1% Ponceau S (w/v) 5% (v/v) Essigsäure
SDS-Lyse-Puffer	1% SDS Phosphatase Inhibitor Cocktail I

	(Verd. 1/1000)
	Phosphatase Inhibitor Cocktail II
	(Verd. 1/1000)
	Protease Inhibitor Cocktail
	(Verd. 1/1000)
Trypsin-EDTA	0,5 g/l Trypsin
	0,2 g/l Na-EDTA

2.4 Antikörper

Alle Primärantikörper wurden 1:1000 , alle Sekundärantikörper 1:15000 in 5% Milchpulver in TBST (Tween 0,1%) verdünnt, mit Ausnahme der Antikörper für die Oxyblot-Analysen. Diese wurden nach Angaben des Herstellers 1:150 (Primärantikörper) bzw. 1:300 (Sekundärantikörper) in 1% BSA in PBST (0,05% Tween) verdünnt.

2.4.1 Primäre Antikörper

Mouse-anti-human Cytochrome C	Cell Signalling, Frankfurt a.M
Mouse-anti-human HIF-1 α	Cell Signaling, Frankfurt a.M.
Mouse-anti-human α -Tubulin	Sigma, Taufkirchen
Polyconal rabbit α -haptan-anti-sulfenic acid	entwickelt und hergestellt von K.S. Carroll (Y. H. Seo & K. S. Carrol et al. 2009)
Rabbit-anti-human Caveolin-1	Cell Signaling, Frankfurt a.M
Rabbit-anti-human PARP	Cell Signaling, Frankfurt a.M

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Rabbit-anti-mouse-HRP	Dako, Schweden
Goat-anti-rabbit-HRP	Dianova, Hamburg

2.5 Kits

Alle Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet, Abweichungen sind vermerkt.

Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Millipore, Schwalbach
Proteinbestimmung	BioRad, München
Laktat-Bestimmung	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

2.6 Materialien

2.6.1 Zelllinien

SCL-1 – Squamous cell carcinoma cell line

Die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL-1 sind wenig differenzierte, humane Plattenepithelkarzinomzellen der Haut, die aus dem Karzinom einer 74-jährigen Frau stammen (Boukamp et al., 1982). Die Zellen erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. Norbert Fusenig aus dem DKFZ in Heidelberg.

A375 – humane maligne Melanomzellen

Bei der Zelllinie A375 handelt es sich um humane, amelanotische Zellen eines malignen Melanoms, das einer 54 jährigen Frau entnommen wurde. Die Zellen wurden von European Collection of Cell Cultures (ECACC) erworben.

HDF – Humane dermale Fibroblasten

HDF Zellen sind humane dermale Hautfibroblasten, die von Präputien gesunder 2 bis 10-jähriger Jungen stammen und durch Zirkumzisionen gewonnen wurden. Die zur Isolation der Zellen verwendeten Biopsien erhielten wir freundlicherweise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik Grevenbroich. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 2 bis 12 verwendet.

2.7 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe
Kryotubes	Greiner Bio-One, Frickhausen
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
PDVF-Membran	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare, Freiburg
Skalpelle	Feather, Japan
Tubes (50ml, 15ml)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Whattman-Papier	Roth, Karlsruhe
Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturplatten (24-well und 96-well Format)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturschalen, vers. Größen	Greiner Bio-One, Frickhausen

2.8 Geräte

Analysenwaage AB 204-S	Mettler Toledo, Schweiz
CCD Digital Kamera (Orca II)	Hamamatsu, Japan
Clean Air Sterilbank	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Criterion Elektrophoresekammer	BioRad, München
Elektro-Blot-Apparatur	Roth, Karlsruhe
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 100 TV	Carl Zeiss, Oberkochen
Gelkammer Novex Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Heizblock	Peqlab
Inkubator Heraeus	Kendro, Langenselbold
Magnetrührer	Janke&Kunkel IKAMAG®RCT, Staufen
Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotiter Plate Reader Fluostar Optima	BMG Labtech
Mikrotiter Plate Reader KC4	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikrotiter Plate Reader Victor 1420	Wallac, Freiburg

Milli-Q-Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
pH-Meter HI221	Hanna Instruments, Kehl
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Powersupplier Power Pac Basic	BioRad, München
Rollschüttler RM-5-Assistant	Braun, Melsungen
Schüttelinkubator SM 25	Edmund Bühler, Tübingen
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	Janke&Kunkel IKAMAG®RCT, Staufen
Schüttler Rotomax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Ultraschall-Disintegrator Branson Sonifier W-250	Bandelin electronic, Berlin
UV/VIS Spectrophotometer Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer	Janke&Kunkel IKAMAG®RCT, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Düsseldorf
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

2.9 Software

Image J

Microsoft Office 2010 (Excel, Word, Powerpoint)

Prism Graph Pad

Aqua Cosmos

PDF Creator

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung der Zellen

Alle hier verwendeten Zelllinien wurden in Dulbeccos's modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde (Komplettmedium), in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C

temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Die Zellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen weiterkultiviert oder für Experimente in Zellkulturschalen und Zellkulturplatten verschiedener Formate ausgebracht. Zur Weiterkultivierung oder für die experimentelle Verwendung der Zellen, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90% passagiert. Da für diese Arbeit ausschließlich adhärente Zelllinien verwendet wurden, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann durch Trypsinierung mit einer Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Reaktion des Trypsins wurde nach 5-10 min durch Zugabe von 10% FCS haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden in dem Gemisch aus Trypsin/EDTA-Lösung und Medium resuspendiert und die Zellzahl der Suspension mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die benötigte Anzahl von Zellen wurde daraufhin in frischem Komplettmedium in das entsprechende Zellkulturgeschirr überführt. Die Zellproliferation wurde über die Bestimmung der kumulativen Populationsdichte kontrolliert, welche sich folgendermaßen berechnet:

$$PD = \frac{\ln(\text{Zellzahl der geernteten Zellen}) - \ln(\text{ausgesäte Zellzahl})}{\ln 2}$$

Fibroblasten wurden bis zu einer CPD von 17 verwendet. Die Tumorzellen wurden unabhängig von der CPD genutzt. Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycolaschen untersucht (siehe Kapitel 2.10.4). Für experimentelle Untersuchungen und Testreihen wurden ausschließlich subkonfluente Zellen (60-90% Konfluenz) herangezogen.

2.10.2 Isolierung von humanen dermalen Fibroblasten aus Biopsien

Nach der Operation wurden die Biopsien bis zur Isolierung der Fibroblasten bei 4°C in Keratinozyten-Medium gelagert. Die Biopsien wurden dann zunächst zweimal für eine Minute in kaltem PBS gewaschen, dabei wurde im zweiten Waschschrift das PBS mit 20µg/ml Gentamycin versetzt. Danach wurde das Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt und die Biopsie in kleine Stücke zerteilt, die eine maximale Größe von 5 mm² aufwiesen. Diese Hautstücke wurden mit der Dermisseite nach unten in Petrischalen platziert und 10 min angetrocknet. Anschließend wurde 20% FCS-haltiges DMEM in die Petrischalen gegeben, so dass die Hautstücke vollständig mit Medium bedeckt waren. Nach einigen Tagen unter den üblichen Zellkulturbedingungen wuchsen zunächst epitheliale Zellen aus der Biopsie. Unter diesen wuchsen dann einige Tage später die Fibroblasten heraus. Nachdem die Fibroblasten einen gewissen Konfluenzgrad erreicht hatten, konnten sie trypsinisiert und im Folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert werden. Nur Fibroblasten überleben das stark serumhaltige Medium (Fleischmeyer et al., 1990; Bayreuther et al., 1992).

2.10.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Für eine Kryokonservierung wurden stets subkonfluente Zellen verwendet, die in 175 cm²-Kulturflaschen kultiviert wurden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA Lösung abgelöst. Die Reaktion des Trypsin wurde nach 10 min mit FCS-haltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension für 3 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (DMEM, supplementiert mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und die Zellen mit einer Dichte von 10⁶ Zellen/ml in Kryotubes bei -80°C eingefroren.

Zur Revitalisierung kryokonservierter Zellen wurden die Zellsuspensionen bei RT aufgetaut und in temperiertem Komplettmedium in 175cm²-Kulturflaschen überführt. Nach 12 h erfolgte ein Mediumwechsel um den DMSO-Gehalt zu reduzieren und dadurch Membranschäden vorzubeugen. Die Zellen wurden mindestens zweimal passagiert, bevor sie für Experimente genutzt wurden.

2.10.4 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind zellwandlose, parasitäre Bakterien, die über Membranfusionen in Wirtszellen eindringen und sich intrazellulär vermehren können. Mycoplasmen können Einfluss auf die Proliferation, Signaltransduktion und Reaktion der Zelle auf bestimmte Stimuli haben. Daher wurden in regelmäßigen Abständen alle Zelllinien auf Kontaminationen durch Mycoplasmen untersucht. Die Zellkultur wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid (DAPI) kontrolliert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 1000 Zellen/cm² auf einem Deckgläschen in einer 3,5 cm Zellkulturschale kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die subkonfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2 ml PBS gewaschen und 10 min in 1 ml Carnoy's Fixativ fixiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit McIlvaine-Puffer und eine 15-minütige Inkubation in 1 ml DAPI- Lösung. Nach zweimaligem Waschen mit dH₂O wurde das Deckgläschen mit den Zellen mit 20 µl Einbettmedium (Fluoromount C) auf einem Objektträger fixiert. Innerhalb der nächsten 20 Minuten wurden die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid (DAPI) wird selektiv DNA angefärbt. Nicht kontaminierte Kulturen zeigten eine hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die Mykoplasmen erschienen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel oder sie

bildeten Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellen wurden autoklaviert und entsorgt.

2.10.5 Herstellung von Zelllysaten für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen

Um Zelllysate zu erhalten wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung mit PBS gewaschen und mit einem entsprechenden Lysepuffer in den Zellkulturschalen lysiert. Die Zellen wurden mit Zellschabern vom Boden der Schalen gekratzt und die Lysate in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C oder -80°C eingefroren. Vor der Verwendung für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen wurden die Lysate für 10 sec sonifiziert. Für die Herstellung von Zelllysaten aus den Tumoren der Xenograft-Modelle wurde das gefrorene Tumorgewebe in RIPA-Puffer homogenisiert und anschließend für 10 sec sonifiziert.

2.10.6 Vitalitätstest

Mittels eines MTT-Tests kann die Vitalität von Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen bestimmt werden und so auf die Cytotoxizität der Substanzen geschlossen werden. In diesem Test wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu einem blauen, unlöslichen Formazan, die nur in Zellen mit aktiven Mitochondrien abläuft (Abb. 2.2). Die Absorption des Formazansalzes bei 570 nm ist ein Maß für die Vitalität der Zellen und wurde photometrisch bestimmt (Victor). Für MTT-Tests wurden die Zellen in 24well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Behandlung mit den zu testenden Substanzen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium mit 10% MTT-Gehalt bis zu einer deutlichen Blaufärbung im Brutschrank inkubiert. Je nach metabolischer Aktivität der verschiedenen Zelllinien konnte eine Blaufärbung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten beobachtet werden: Tumorzellen sind metabolisch sehr aktiv und konnten daher das MTT relativ schnell umsetzen. Bei den SCL-1 Zellen kam es nach 20-30 min zu einer deutlichen Blaufärbung, bei den A375 Zellen bereits nach 15-20 min. Die Fibroblasten benötigten bis zur Blaufärbung eine Inkubationszeit von etwa 2 Stunden. Wenn die Zellen sich blau verfärbt hatten, wurde das MTT-haltige Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in DMSO solubilisiert und die Absorption bei 570 nm bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und deren Absorption wurde gleich einer

Zellvitalität von 100% gesetzt. Die Absorptionen der behandelten Zellen wurden auf die der unbehandelten Kontrolle bezogen und so die prozentuale Vitalität berechnet.

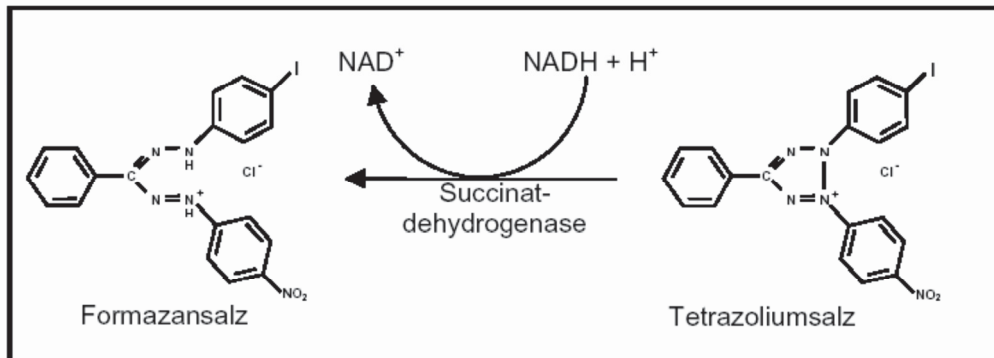


Abb. 2.2 Reaktion des Tetrazoliumsalses MTT zum blauen Formazansalz durch eine mitochondriale Succinatdehydrogenase Das Ausmaß der Bildung des Formazansalz in Zellen gibt Auskunft über die Vitalität von Zellen.

2.10.7 Untersuchungen zur Aufnahme der Partikel

Die Aufnahme von CNP in die hier verwendeten Tumorzellen (SCL-1 und A375) wurde mittels Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von FITC-gekoppelten Ceroxid-Nanopartikeln untersucht. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Anatomie II von Herrn Dr. K. Zanger durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit 150 μ M CNP inkubiert und im Anschluss für die Untersuchung präpariert. Dazu wurden die Zellen nach der Behandlung in PBS gewaschen und durch Zentrifugieren pelletiert. Dann wurden die Zellpellets für 2 Stunden in 4% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4) bei Raumtemperatur fixiert und im Anschluss viermal in PBS gewaschen. Es folgte ein weiterer Fixierungsschritt mit 1% Osmiumtetroxid für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Proben wurden durch aufsteigende Acetonreihen dehydriert und in Spurr's Medium eingebettet (70°C, 24 Stunden). Von den eingebetteten Proben wurden dann mit einem Reichert Ultracut (Vienna, Austria) mit Diamantmesser Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichteten Kupferrastern mit Uranylacetat angefärbt. (Reynolds et al., 1963). Die Kupferraster wurden mit einem Hitachi H 600 Elektronenmikroskop analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit der Software Digital Micrograph (Gatan, Munich, Germany). Für eine lichtmikroskopische Kontrolle wurden die Schnitte mit 1% Toluidin blue und 1% Borax angefärbt.

Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelte Ceroxid-Nanopartikel (CNP-FITC) verwendet, die an der University of Central Florida, Orlando (Advanced Materials Processing and Analysis Center, Nanoscience and Technology Center (NSTC), Mechanical, Materials Aerospace Engineering (MMAE), University of Central Florida, Orlando, Florida 32816, USA) von Prof. Sudipta Seal und seiner Arbeitsgruppe hergestellt wurden. Die Zellen wurden mit 150 μM CNP-FITC auf Glasplättchen in Zellkulturschalen inkubiert und anschließend wurden bei einer Exzitationswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm eine Vitalmikroskopie (Axiovert TV 100, Zeiss) durchgeführt, für welche die Glasplättchen mit den Zellen in Zellkammern eingespannt wurden. Die Dokumentation erfolgte mit der Software Aqua Cosmos. Von den A375 Melanomzellen wurden zusätzlich Präparate hergestellt, die mit DAPI pro long gold gegengefärbt wurden. Dazu wurden die Zellen auf den Glasplättchen mit PBS gewaschen, 10 Minuten bei -20°C in Methanol fixiert und danach und erneut mit PBS gewaschen. Mit ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) wurden die Zellen gleichzeitig präpariert und mit DAPI angefärbt. Die Kernfärbung mit DAPI wurde bei Exzitationswellenlänge von 358 nm und einer Emissionswellenlänge von 461 nm mikroskopiert und dokumentiert.

2.10.8 Herstellung von konditioniertem Medium

In Invasionsassays diente konditioniertes Medium (CM) als Chemoattraktant für die invadierenden Tumorzellen. Es wurden zwei verschiedene konditionierte Medien verwendet: CM^{HDF} und CM^{MF} . Für die Herstellung dieser Medien wurden Fibroblasten in 10 cm^2 Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Subkonfluenz in Kompletmedium kultiviert. Das serumhaltige Medium wurde durch Waschen mit PBS entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt. Um CM^{MF} zu erhalten wurden die Fibroblasten dann mit 5 ng/ml rekombinantem TGF β 1 behandelt. Nach 48h wurde das TGF β 1-haltige Medium abgenommen und nach einem Waschschrift mit PBS durch frisches serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 48h wurde das Medium abgenommen und bis zur Verwendung im Invasionsassay als Chemoattraktant bei -20°C gelagert. CM^{MF} enthält proinvasive Signale wie Wachstumsfaktoren und Cytokine, da die Fibroblasten nach Behandlung mit rTGF β 1 zu Myofibroblasten transdifferenzieren und diese Botenstoffe ins Medium abgeben (siehe Kapitel 1.5). Daher dient CM^{MF} im Invasionsassay als interne Positivkontrolle. Für CM^{HDF} wurden die Zellen nicht behandelt. Es wurde lediglich nach 48h ein Mediumwechsel vorgenommen und nach weiteren 48h wurde das Medium gesammelt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.10.9 Invasionsassay

Mithilfe des Invasionsassays kann die invasive Kapazität von Tumorzellen untersucht werden. In diesem Assay lässt man Tumorzellen durch eine mit Poren versehene Membran in Richtung eines Chemoattraktants invadieren. Die Membran wird mit Matrigel überschichtet und simuliert in diesem Assay die Basalmembran der Haut. Die Anzahl der invadierten Tumorzellen wird bestimmt und dient als Maß für die invasive Kapazität und kann damit Hinweise auf die Aggressivität und das Potential zur Metastasierung von Krebszellen liefern.

Für den Invasionsassay wurden 24-well Platten mit Zellkultureinsätzen, sogenannten Transwells, von Becton Dickinson verwendet. Die Transwells besitzen an ihrer Unterseite eine Membran mit einem Durchmesser von 6,5 mm, welche mit Poren einer Größe von 8 μm versehen ist. Die Innenseite der Transwells wurde mit Matrigel beschichtet. Das Matrigel beinhaltet dieselben Bestandteile wie die Basallamina der Haut. Durch die Beschichtung kann die Invasion von Tumorzellen durch die Basalmembran simuliert werden (Abb. 2.3).

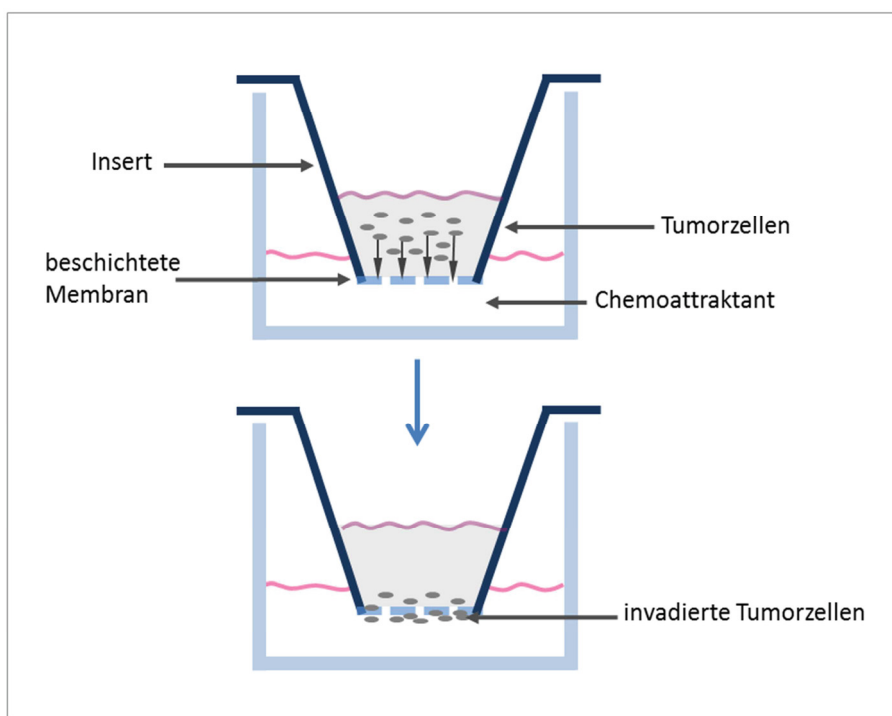


Abb. 2.3 Schematische Darstellung eines Invasionsassays Bei diesem Assay invadieren Tumorzellen in Richtung Chemoattraktant durch eine mit Matrigel beschichtete Membran. Die Anzahl der invadierten Tumorzellen liefert Hinweise über die invasive Kapazität von Tumorzellen.

Das Matrigel wurde für die Beschichtung 1:30 in kaltem PBS verdünnt. Anschließend wurden je 50 µl dieser Lösung in die Transwells pipettiert und vorsichtig geschwenkt, um eine lückenlose Beschichtung der Membran zu gewährleisten. Die Membran wurde dann mit 200 µl sterilem Wasser überschichtet und über Nacht steril getrocknet. Am nächsten Tag wurde die beschichtete Membran mit 100 µl sterilem Wasser rehydriert. Es wurden je 5×10^5 Tumorzellen in 400 µl serumfreiem Medium in die Transwells eingesät. 300 µl des Chemoattraktants wurden in die Wells der Platte gegeben und das Transwell luftblasenfrei darin platziert (Abb. 2.3). Als Chemoattraktant fungierte konditioniertes Medium (CM^{HDF} oder CM^{MF}) (s. Kapitel 2.10.8). Der Assay wurde bei der Untersuchung von SCL-1 Zellen nach 48 h gestoppt. Bei einer Verwendung von Melanomzellen wurde der Assay bereits nach 30 h beendet. Für die Auswertung des Invasionsassays wurde zuerst das Medium der oberen Kammer abgesaugt und die Zellen auf dem Matrigel mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen auf der Unterseite der Transwells wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann 5 min mit kaltem Methanol auf der Membran fixiert. Zur Entfernung des Methanols wurden die Zellen zuerst mit PBS und dann 2 bis 3 Mal mit dH₂O gewaschen. Die Transwells wurden dann für einige Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden die invadierten Zellen auf der Unterseite des Transwells für 1 min mit einer Coomassie-Blue-Färbelösung angefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurde die Unterseite der Transwells ein letztes Mal mit dH₂O gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Membranen wurden dann mit einem spitzen Skalpell aus den Transwells herausgeschnitten und mit einem Tropfen Fluoromount C und einem Deckgläschen auf Objektträgern fixiert. Die gefärbten Zellen wurden dann unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.11 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.11.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis der Methode nach Lowry mit kommerziell erhältlichen Lösungen (BioRad, DC) nach Angaben des Herstellers. 100 µl des Reagent A' wurden zu 20 µl einer Probe in Plastikkuvetten gegeben. Zu diesem Gemisch wurden anschließend 750 µl des Reagent B pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die optische Dichte (OD) photometrisch bei 750 nm gemessen. Aus den Daten eines Proteinstandards aus bovinem Serumalbumin (BSA)

konnte der Proteingehalt der Proben berechnet werden. Die benötigten Proteinkonzentrationen wurden dann dem Experiment entsprechend eingestellt.

2.11.2 Fraktionierung von Zelllysaten

Für die Fraktionierung wurden die Zellen in 100 µl Fraktionierungslysepuffer bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Lysate für 10min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Danach konnte der Überstand, der die cytosolische Fraktion enthielt, abgenommen werden. Das Pellet wurde in 1%SDS, dem Protease-Inhibitor-Cocktail (1:1000) zugesetzt wurde, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand enthielt die mitochondriale Fraktion.

2.11.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese können Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden, Ladung und Struktur der Proteine haben keinen Einfluss auf die Auftrennung. Bei der von U.K. Laemmli entwickelten Methode werden durch das im Proben-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen aufgelöst. Das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) verursacht eine Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur durch Spaltung der Wasserstoffbrücken und Streckung. Zudem lagert sich SDS an Proteine (ca. 1,4 µg SDS/µg Protein) und überdeckt dadurch deren Eigenladung. Dadurch bilden sich Micellen mit konstant negativer Ladung, die proportional zur Masseneinheit ist. Bei der SDS-Page handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, basierend auf einem Tris-HCl/Tris-Glycerin Puffersystem. Das Polyacrylamidgel besitzt zwei verschiedene Bereiche: ein weitporiges Sammelgel und ein engporiges Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine zunächst aufkonzentriert um das zeitgleiche Einlaufen der Proteinsuspension in das Trenngel und somit eine präzisere elektrophoretische Auftrennung der Proteinbanden im Trenngel zu erreichen (Laemmli, 1970). Durch den Vergleich mit Markerproteinen oder Standards, die Proteine definierter Größe enthalten, können die Größen bestimmt werden. Nach Auftrennung der Proteine ist das Gel für weitere Bearbeitungen zugänglich, wie zum Beispiel Färbungen, immunologische Nachweise (Blotting) oder, bei radioaktiven Proteinproben, der Autoradiographie.

Die Polyacrylamid-Gele wurden in Gelkassetten gegossen. Dabei wurde die Acrylamid-Konzentration, und damit die Porengröße, des Trenngels an die Größe des zu detektierenden Proteins angepasst. Die Porengröße der Gelmatrix ist abhängig von der Konzentration der Acrylamidmoleküle. Bei Proteingrößen bis zu 40 kDa wurden

15% Polyacrylamid haltige Gele verwendet, bei 40-80 kDa 10%ige und bei Proteinen größer als 80 kDa 8%. Für Oxyblot-Analysen wurden 12%ige Gele gegossen. Die chemische Copolymerisierung der Acrylamidmonomere wurde durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 2.1 verzeichnet. Ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8) wurde über das Trenngel (pH 8,8) gegossen (Zusammensetzung siehe Tab. 2.2), nachdem dieses 24 h bei RT auspolymerisiert war. Bis zur Verwendung wurden die Gele verpackt bei 4°C gelagert. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde die Proteinkonzentration, wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben, bestimmt. Für die Elektrophorese wurden je nach Abundanz des zu untersuchenden Proteins zwischen 10 und 40 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Proben wurden mit 4 × SDS-Probenpuffer (1/4 des Probenvolumens) versetzt und vor dem Beladen des Gels 10 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei 20 mA und 150 V, im Trenngel bei 40 mA und 150 V pro Gel.

	8%	10%	12%	15%
dH ₂ O	5,3 ml	4,8 ml	4,3 ml	3,55 µl
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (40 %)	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,75 ml
Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl	4 µl	4 µl

Tab. 2.1 Zusammensetzung der Trenngele

dH ₂ O	3,5 ml
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (40%)	720 µl
Tris, pH 6,8	650 µl
10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tab. 2.2 Zusammensetzung eines 5% Sammelgels

2.11.4 Western-Blot (semi-dry)

Für einen immunologischen Nachweis werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine PVDF-Membran transferiert und immobilisiert (Blotting). Danach können auf der Membran Proteine spezifisch durch die Verwendung von Antikörpern nachgewiesen werden.

Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran 10 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend in dH_2O gewaschen. Auf die Anodenplatte der Semi-dry-Blottingapparatur wurden übereinander zwei mit Anodenpuffer getränkte Whatmanpapiere und darauf die aktivierte Membran gelegt. Auf die Membran wurden das Gel, von dem das Sammelgel entfernt wurde, und zuoberst zwei in Kathodenpuffer getränkte Papiere luftbasenfrei gelegt. Der Transfer erfolgte bei 80 mA und 15 V pro Gel über 1 Stunde.

2.11.5 Ponceau S Färbung

Um den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran mit einer Ponceau S Lösung angefärbt. Ponceau S enthält einen roten Azofarbstoff, welcher reversibel an Proteine bindet und so Proteinbanden auf der Membran sichtbar macht. Dazu wurde die Membran direkt nach dem Transfer kurz in Ponceau S Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dH_2O wieder entfärbt.

2.11.6 Immunologischer Nachweis (Antikörperfärbung)

Nach der Färbung mit Ponceau S wurde die Membran mit Blockierlösung in Schalen bei RT schüttelnd für eine Stunde oder in 50 ml-Tubes bei 4 °C rotierend über Nacht blockiert um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Danach konnte die Membran mit dem primären Antikörper umgesetzt werden. Die verwendeten Primärantikörper (siehe Kapitel 2.4.1) wurden 1:1000 in Blockierlösung verdünnt und die Membranen in dieser Verdünnung eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C rotierend in 50 ml Tubes inkubiert. Danach erfolgten drei 15 minütige Waschschrte mit 1x TBST. Der entsprechende Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.4.2) wurde 1:15000 in Blockierlösung verdünnt und die Membran darin 1 Stunde bei RT in Schalen schüttelnd inkubiert. Danach wurde erneut dreimal 15 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Im Anschluss wurden die Proteine mit Luminol/Verstärkerlösung detektiert, indem Röntgenfilme aufgelegt wurden. Die Expositionzeiten variierten dabei abhängig von der Intensität des Signals. Die

Röntgenfilme wurden dann in entsprechenden Lösungen entwickelt und fixiert. Die Banden wurden zum Teil mit dem Programm Image J densitometrisch ausgewertet.

2.11.7 Immunologischer Nachweis von HIF-1 α

Da Voruntersuchungen zeigten, dass das HIF-1 α nur sehr schwach über die Immunfärbung mit einem anti-HIF-1 α Antikörper detektiert werden konnte, wurde in folgenden Experimenten Cobalt(II)-chlorid eingesetzt um HIF-1 α zu stabilisieren, um so das HIF-1 α -Signal im Western Blot zu verstärken und die Detektion zu vereinfachen. Mit Inhibitoren, wie Cobalt(II)-chlorid-Ionen (CoCl_2), können Prolylhydroxlasen (PHD) inaktiviert werden und somit der proteasomale Abbau von HIF-1 α verhindert werden (Maxwell et al., 1999). Cobalt(II)-chlorid-Ionen simulieren hypoxische Bedingungen, indem sie die PHDs inhibieren, wodurch HIF-1 α stabil bleibt und nicht degradiert wird. Die Tumorzellen wurden 24 Stunden mit 50 μM bzw. 150 μM CNP behandelt und zusätzlich mit Cobaltchlorid inkubiert. Die Zellen wurden in den letzten 4 Stunden der 24-stündigen CNP-Inkubation mit 100 μM CoCl_2 inkubiert. Als Kontrollen fungierten unbehandelte Zellen bzw. Zellen, die für 4 Stunden mit 100 μM CoCl_2 behandelt wurden. In Abb. 2.4 ist ein Beispiel eines Western-Blot gezeigt, für den auch in den A375 Zellen, die nicht mit CoCl_2 behandelt wurden, ein deutliches HIF-1 α Signal detektiert werden konnte. Um die Detektion von HIF-1 α in Lysaten mit niedrigen Proteingehalten zu ermöglichen und um lange Expositionszeiten zu verhindern wurden die Zellen in nachfolgenden Untersuchungen mit CoCl_2 co-inkubiert.

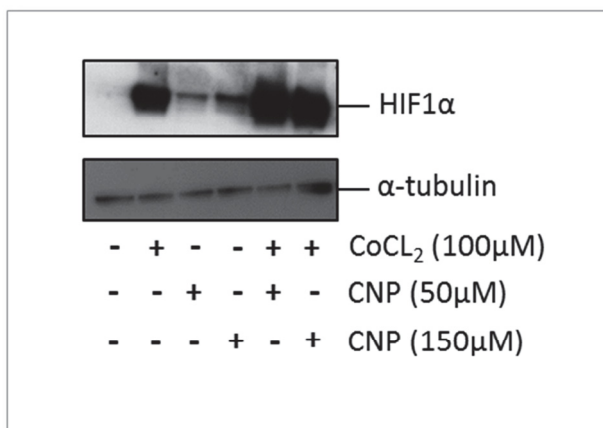


Abb. 2.4 Verstärkung des HIF-1 α Signals in Western Blot-Analysen durch CoCl_2 Durch die Behandlung mit CoCl_2 konnte das Signal verstärkt werden und vereinfachte die Detektion von HIF-1 α .

2.11.8 Stripping von PVDF-Membranen

Nach dem Umsatz mit Antikörpern und anschließender Detektion kann eine PVDF-Membran einem *stripping* unterzogen werden, dabei können die gebundenen Antikörper wieder abgelöst werden. Danach muss die Membran erneut blockiert werden und kann dann mit einem weiteren Primär- und Sekundärantikörper umgesetzt werden. So können mehrere immunologische Nachweise für verschiedene Proteine mit einer Membran erbracht werden. Vor dem *stripping* wurde die Membran 15 Minuten in TBST gewaschen. Danach wurde sie schüttelnd für 25 min in Stripping Buffer bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut 15 Minuten in TBST gewaschen und für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung blockiert. Danach stand die Membran für eine weitere Umsetzung mit Antikörpern zu Verfügung.

2.11.9 Immunologischer Nachweis von oxidierten Proteinen (Oxyblot-Analysen)

Der Nachweis von oxidierten Proteinen erfolgte mit Hilfe des OxyBlot Protein Oxidation Detection Kits. Der Gehalt an carbonylierten Proteinen gilt als Marker für eine oxidative Schädigung der Zellen. Mit dem Kit können carbonylierte Proteine über die Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu DNP-Hydrazonen nachgewiesen werden. Die DNP-Hydrzone können dann mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 5 µl des Lysats mit 5 µl 12%-iger SDS-Lösung versetzt, um eine Endkonzentration von 6% SDS zu erreichen. Zu der Probe wurden anschließend 10 µl 1x 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (DNPH) hinzugefügt und für 15 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 7,5 µl Neutralisations-Lösung hinzugegeben, um die Derivatisierungsreaktion zu stoppen. Die derivatisierten Proben wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und wie beschrieben auf PDVF-Membran geblottet. Die PDVF-Membran wurde für 1 h in Blocking/Dilution Puffer blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C schüttelnd mit einem Rabbit anti-DNP Antikörper (Verdünnung 1:150 in Blocking/Dilution Puffer) inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 15 min mit PBST und weitere zweimal für 5 min gewaschen. Der Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG HRP-gekoppelt) wurde für 1 Stunde in Blocking/Dilution Puffer (Verdünnung 1:300) inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit PBST für 15 min gewaschen. Zum Nachweis der Bindung wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung; Pierce Biotechnology, Rockford IL) im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Folie

eingeschweißt und mit einem Röntgen-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde exponiert und anschließend entwickelt und fixiert.

2.11.10 Nachweis von intrazellulären ROS (DCF-Messung)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können mit Hilfe des Farbstoffs 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) nachgewiesen werden. Das Diacetat des Farbstoffs wird in der Zelle durch Esterasen abgespalten, wodurch der Farbstoff membranimpermeabel wird und sozusagen in der Zelle gefangen bleibt. H₂DCF wird dann in der Zelle durch ROS zu DCF oxidiert, welches sich mit einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektieren läßt. Die Detektion erfolgte sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch über eine fluorometrische Messung mit einem Mikrotiterplattenlesegerät.

Für die fluorometrische Messung mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Fluostar Optima, BMG Labtech) wurden die zu untersuchenden Zellen, welche in 24-well-Platten ausgebracht wurden, mit HBSS gewaschen und dann 100 µM H₂DCF-DA in HBSS ausgesetzt. Es wurde immer eine frische 100 mM Stammlösung angesetzt. Direkt im Anschluss erfolgte eine 1,5 stündige Messung bei den oben angegebenen Wellenlängen, bei der die Fluoreszenz alle 5 Minuten detektiert wurde.

Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis wurden die Zellen auf Glasplättchen in Zellkulturschalen ausgesät und entsprechend behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und für eine Stunde mit 1 µM H₂DCF-DA im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder mit HBSS gewaschen und die Glasplättchen mit den Zellen in Attofluor-Zellkammern eingespannt und mit HBSS überschichtet mikroskopiert (Axiovert 100TV, Zeiss).

2.11.11 Nachweis von extrazellulären ROS (Amplex Red Assay)

Für einen extrazellulären Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies wurde das Amplex®Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen) verwendet, mit dem von Zellen freigesetztes Wasserstoffperoxid gemessen werden kann. Amplex®Red (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin) reagiert in Kombination mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit H₂O₂ zum fluoreszenten Oxidationsprodukt Resorufin. Resorufin besitzt ein Exzitations- und Emissionsmaximum bei 571 nm und 585 nm. Die Fluoreszenzintensität von Resorufin dient als Maß für die Menge an H₂O₂, dass von den Zellen während der Messung in den Überstand freigesetzt wird. Für diesen Assay wurden die Zellen in 96-well Platten kultiviert. Die Behandlung mit 150 µM CNP erfolgte in serumfreiem Medium. Als Kontrolle dienten unbehandelte

Zellen. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl HBSS mit einer Konzentration von 50 µM Amplex®Red und 1 U/ml HRP auf die Zellen gegeben. Direkt im Anschluss wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm alle 5 min über eine Stunde bei 37°C gemessen.

2.11.12 Caspase-3-Aktivitäts-Assay

Um die Caspase-3-Aktivität zu bestimmen wurden die Zellen (in 3 cm dishes), nachdem sie mit PBS gewaschen wurden, in 200 µl Caspase-Assay-Lysepuffer kurz auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in dem Lysepuffer vom Boden der Zellkulturschale abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle fünf Minuten gevortext. Nach der Inkubation wurden die Proben für 15 Minuten bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für den Assay und eine Proteinbestimmung verwendet. Der Proteingehalt wurde auf 10 µg Protein/100 µl Caspase-Assay-Buffer eingestellt. Für den Assay wurde pro Probe ein Volumen von 200 µl benötigt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substrates gestartet. Dazu wurde jeder Probe 2 µl einer 1mM Substrat-Verdünnung (10 mM Ac-DEVD-AMC verdünnt mit Caspase-Assay-Buffer) zugegeben. Ac-DEVD ist ein Peptid, welches die Aminosäuresequenz von PARP enthält, einem Caspase-spezifischen Substrat, und mit dem Fluorogen Amino Methyl Cumarin (AMC) gekoppelt ist, das nach Spaltung des Substrats fluoresziert. Die Substrat-Lösung musste vor Licht geschützt werden. Die Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von einer Stunde alle 10 Minuten bei einer Exzitation von 360 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

2.12 Allgemeine Versuchsbedingungen

Verwendete Lösungen wurden mit dH₂O aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Signifikanzen wurden nach dem ANOVA-Test mit anschließendem Dunnett's Test ermittelt. Alle verwendeten Substanzen wurden vor Verwendung mittels MTT-Test auf Toxizität überprüft. Bis zum Zeitpunkt des Experiments befanden sich alle Zellen in Kompletmedium. Es wurden immer subkonfluente Zellen verwendet. Alle

Behandlungen der Zellen bis zu einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurden in serumfreien DMEM durchgeführt. Betrug die Inkubationszeit länger als 48 Stunden wurde das Medium mit 5% FCS supplementiert.

2.13 Statistik

Für die statistische Analyse der Signifikanz in densitometrischen Auswertungen wurden nicht-parametrische Tests wie One-way-ANOVA mit anschließenden Dunnett's Test durchgeführt. Der Student's t-Test wurde durchgeführt, wenn zwei Datenreihen miteinander verglichen werden sollten. Vor der Studie wurden * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ als Maß für die Signifikanz festgelegt.

3 Ergebnisse

Nachdem sich zeigte, dass Antioxidantien sich nicht für einen therapeutischen Ansatz eignen, da sie die invasive Kapazität von Tumorzellen verstärken (siehe Kapitel 1.5), wurde nach alternativen, redox-aktiven Substanzen gesucht. Ceroxid-Nanopartikel verfügen aufgrund ihrer Fähigkeit zwischen den Oxidationsstufen III und IV autokatalytisch zu wechseln über verschiedene redox-aktive Eigenschaften. In zellfreien Systemen wurden eine Superoxiddismutase- sowie eine Catalase-mimetische Aktivität der Partikel festgestellt. In dieser Studie sollten die Effekte von Ceroxid-Nanopartikeln auf SCL-1 Plattenepithelkarzinom- und A375 Melanomzellen untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Cytotoxizität und die Aufnahme der Partikel in die Tumorzellen bestimmt. Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung wurden auch Effekte von CNP auf die Viabilität von gesunden, normalen Zellen untersucht. Dafür wurden repräsentativ humane dermale Fibroblasten verwendet, welche den Hauptanteil der stromalen Zellen der Haut bilden. In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von CNP auf die invasive Kapazität, den ROS-Gehalt und apoptotische Signalkaskade von Tumorzellen ermittelt.

3.1 Cytotoxizität von Ceroxid-Nanopartikeln

Der Einfluss von Ceroxid-Nanopartikeln auf die Zellviabilität von Tumorzellen (SCL-1 und A375) wurde mit Hilfe von MTT-Assays untersucht. Ebenso wurde die Wirkung von CNP auf humane dermale Fibroblasten (HDF) untersucht, die den stromalen Zelltyp repräsentieren und den größten Anteil der Zellen der Haut bilden, welche *in vivo* den Tumor umgeben. Außerdem nehmen sie großen Einfluss auf die Tumorprogression, im Besonderen in Bezug auf Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (Cat et al., 2006). Für einen möglichen Therapieansatz mit CNP bei Hautkrebserkrankungen ist es von entscheidender Bedeutung auch den Einfluss von CNP auf die Zellvitalität der gesunden, stromalen Zellen zu betrachten. In einem therapeutischen Ansatz ist es schwer möglich ausschließlich Tumorzellen zu behandeln, auch stromale Zellen würden von einer Therapie mit CNP betroffen sein. Daher wurde in dieser Studie, im Hinblick auf eventuelle Nebenwirkungen auf gesunde Zellen durch eine therapeutische Behandlung mit CNP, zusätzlich die Cytotoxizität von CNP in humanen Hautfibroblasten mittels MTT-Assay untersucht.

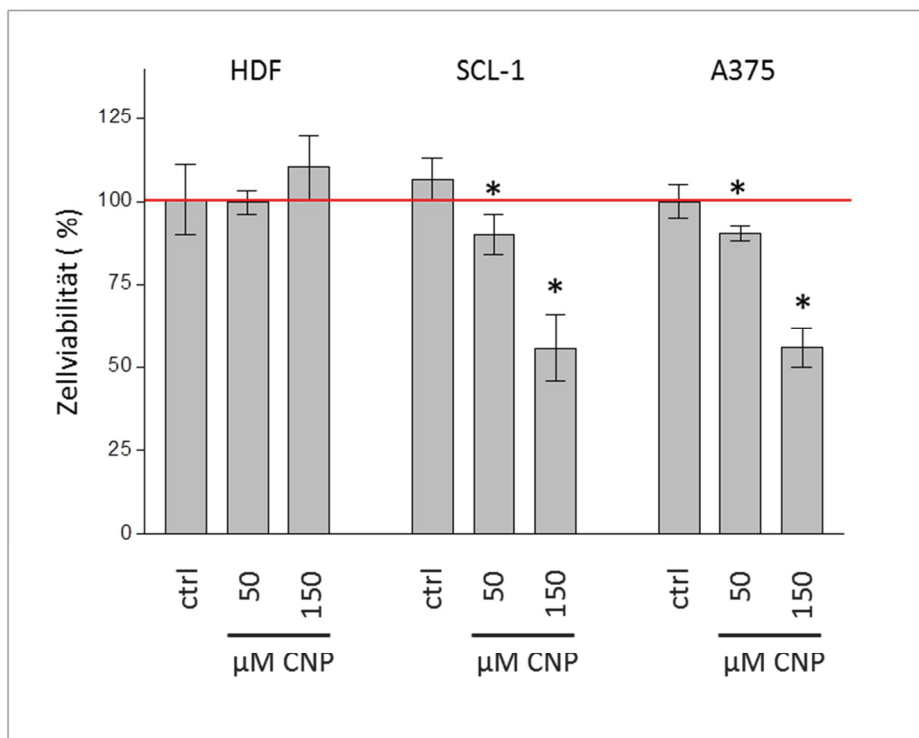


Abb. 3.1 Cytotoxizität von CNP in stromalen Zellen und Tumorzellen Humane dermale Fibroblasten, SCL-1 und A375 Tumorzellen wurden mit 50 µM bzw. 150 µM CNP behandelt. Die Zellviabilität wurde nach 96 h Inkubation mit CNP durch MTT-Tests bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Erhöhung bzw. Erniedrigung gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen, deren Viabilität auf 100% gesetzt wurde. Ctrl, Kontrolle (unbehandelt).

Subkonfluente Tumorzellen (A375 und SCL1) und stromale Zellen (HDF) wurden für 48, 72, 96 h mit verschiedenen Konzentrationen CNP behandelt. In Abb. 3.1 sind die Mittelwerte mit S.E.M. von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten für eine CNP-Konzentration von 50 µM bzw. 150 µM und eine Inkubationsdauer von 96 h dargestellt. Die Absorptionswerte der unbehandelten Negativ-Kontrollzellen wurden gleich 100% Zellviabilität gesetzt und die anderen Werte entsprechend auf diese bezogen. Es wurden keine cytotoxischen Effekte von Ceroxid-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 bzw. 150 µM in humanen dermalen Fibroblasten beobachtet. In Tumorzellen hingegen wurde bei gleichen CNP-Konzentrationen eine Abnahme der Zellviabilität festgestellt. Nach der Behandlung mit 50 µM CNP fiel die Viabilität der SCL-1 Zellen und der A375 Zellen signifikant auf 90%. Bei einer Konzentration von 150 µM CNP nahm die Zellviabilität der Tumorzellen weiter ab auf etwa 56% bei SCL-1 und ebenso bei A375 Zellen. Für die Tumorzellen wurden Konzentrationen zwischen 25 und 500 µM CNP getestet (Daten hier nicht gezeigt). Es wurde eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität von Tumorzellen ab 25 µM CNP nach 96 h Inkubation festgestellt. Es war ein zeitabhängiger Anstieg der Cytotoxizität von CNP in Tumorzellen zu

beobachten. Bei kürzeren Inkubationen mit CNP (48 und 72 Stunden) waren die cytotoxischen Effekte auf die Tumorzellen schwächer als nach 96 Stunden. Für die folgenden Experimente wurde basierend auf den Ergebnissen der MTT-Assays eine Konzentration von 150 μM für die CNP-Behandlung der Tumorzellen festgelegt, da bei dieser Konzentration die Zellviabilität von Fibroblasten nicht beeinträchtigt wird, sondern tendenziell sogar eher zunimmt. In einer weiteren Studie innerhalb der gleichen Arbeitsgruppe (Dissertation Sarah Teuber) zeigten CNP bei dieser Konzentration in HDF protektive Effekte gegenüber exogenen Noxen (unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend zeigten Ceroxid-Nanopartikel bei Tumorzellen cytotoxische Effekte, während in stromalen Zellen keine Cytotoxizität beobachtet wurde. Die hier beobachtete Selektivität in der Wirkung der Partikel auf stromale Zellen bzw. Tumorzellen bietet eine optimale Voraussetzung für einen therapeutischen Ansatz mit CNP.

3.2 Aufnahme und zelluläre Verteilung von Ceroxid-Nanopartikeln

Im Weiteren sollte zunächst aufgeklärt werden, ob die hier verwendeten Ceroxid-Partikel mit einem Durchmesser von 5-8 nm in die verwendeten Tumorzellen, humane SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen und A375 Melanomzellen, intrazellulär aufgenommen werden. Viele Studien zu Nanopartikeln beschreiben, dass Nanopartikel abhängig von ihrer Größe nicht von der Zelle aufgenommen werden, sondern von außen an die Plasmamembran binden und ihre Effekte über Rezeptoren vermitteln (Albrecht et al., 2004; Weißenberg et al., 2010). Im Hinblick auf eine Charakterisierung der Partikel und eine mögliche therapeutische Anwendung von CNP ist es von großer Bedeutung zu klären, inwieweit die Partikel in die Zellen aufgenommen werden, oder ob Effekte lediglich Rezeptor-vermittelt sind.

Die Aufnahme und zelluläre Verteilung von Ceroxid-Nanopartikeln in humanen Plattenepithelkarzinomzellen und Melanomzellen wurden anhand von Transmission-Elektronen- und Fluoreszenz-mikroskopischen Analysen untersucht. Die Tumorzellen wurden mit 150 μM CNP inkubiert und anschließend für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die in Kooperation mit dem Institut für Anatomie II durch Herrn Dr. K. Zanger durchgeführt wurden, präpariert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.2) zeigen SCL-1 Zellen, die 16 Stunden, und A375 Zellen, die 4 Stunden mit CNP behandelt wurden. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Agglomerierte Ceroxid-Nanopartikel waren

als dunkle, rundliche Strukturen (in Abb. 3.2 durch Pfeile gekennzeichnet) im Cytosol beider mit CNP behandelten Tumorzelllinien erkennbar. Aufgrund der geringen Größe sind einzelne Partikel mit dieser Methode nicht sichtbar. Daher wurden die Aufnahme und subzelluläre Verteilung von CNP im Folgenden zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

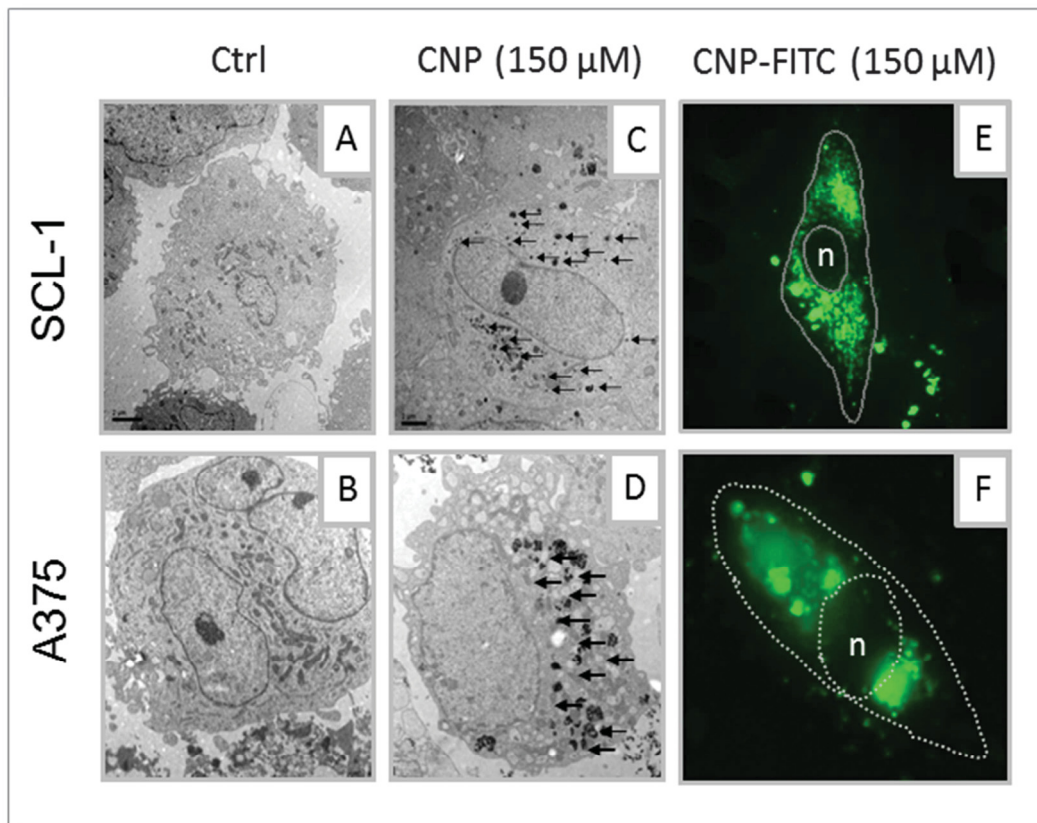


Abb. 3.2: Aufnahme und zelluläre Verteilung von Ceroxid-Nanopartikeln in SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen und A375 Melanomzellen Elektronenmikroskopische Untersuchungen (A-D): SCL-1 Zellen wurden für 16 h, A375 für 4 h mit 150µM CNP behandelt (C; D). Als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (A; B). Die Pfeile kennzeichnen agglomerierte Ceroxid-Nanopartikel im Cytosol beider Tumorzelllinien. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (E, F): SCL-1 wurden für 24 h, A375 für 48 mit 150 µM FITC-gekoppelten CNP behandelt. In den SCL-1 Zellen (E) und in den A375 Zellen wurde eine cytosolische Verteilung von CNP beobachtet. Im Zellkern (n) wurden keine Partikel detektiert. Ctrl, Kontrolle (unbehandelt).

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Tumorzellen mit FITC-gekoppelten Ceroxid-Nanopartikeln (CNP-FITC) in einer Konzentration von 150 µM inkubiert. Direkt im Anschluss wurde eine Vital-Mikroskopie durchgeführt. Auch durch diesen Ansatz konnte die intrazelluläre Aufnahme der Partikel in SCL-1 und A375 Zellen bestätigt werden. Nach Inkubation war eine deutliche Fluoreszenz, der FITC-gekoppelten Nanopartikel, im Cytosol der Zellen zu erkennen, während im

Zellkern keine Fluoreszenz sichtbar war. Dieses Ergebnis zeigt, dass CNP ins Cytosol der Zellen, jedoch nicht in den Zellkern aufgenommen werden. Bei den SCL-1-Zellen konnte eine deutliche Fluoreszenz nach 16 Stunden Inkubation mit 150 μM CNP detektiert werden. Für die Melanomzellen konnte die Aufnahme von CNP bereits nach 4 Stunden nachgewiesen werden. Abb. 3.2 (E, F) zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Plattenepithelkarzinomzellen nach 24 Stunden Inkubation mit CNP und der Melanomzellen nach 48 Stunden Inkubation. Abb. 3.3 zeigt Melanomzellen die 4 Stunden mit FITC-gekoppelten CNP inkubiert, dann zusätzlich fixiert und mit DAPI gegengefärbt wurden. Auch hier wird deutlich, dass die Partikel ausschließlich im Cytosol lokalisiert sind und nicht in den Zellkern aufgenommen werden.

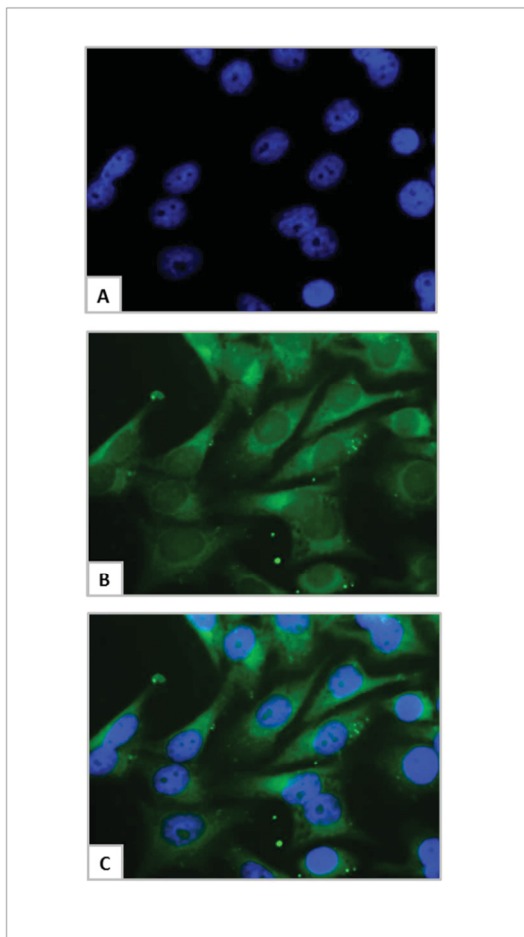


Abb. 3.3 Zelluläre Verteilung von CNP in A375 Melanomzellen A375 Zellen wurden für 4 h mit FITC-gekoppelten Ceroxid-Nanopartikeln (150 μM) behandelt, im Anschluss fixiert und mit DAPI angefärbt. Bei einer Exzitationswellenlänge von 358 nm und einer Emissionswellenlänge von 461 nm war eine deutliche DAPI-Kernfärbung zu erkennen (blaue Fluoreszenz, A). Bei einer Exzitationswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm konnten CNP im gesamten Cytosol lokalisiert werden. (grüne Fluoreszenz, B) Bild C ist eine Überlagerung der Bilder A und B (1000fache Vergrößerung).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die elektronenmikroskopischen als auch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine intrazelluläre Aufnahme Ceroxid-Nanopartikel in die Tumorzellen nahelegen, sich die zelluläre Verteilung von CNP aber auf das Cytosol beschränkt.

3.3 Ceroxid-Nanopartikel verringern die invasive Kapazität von Tumorzellen

Sofern Hautkrebserkrankungen frühzeitig entdeckt und der Primärtumor rechtzeitig entfernt wird, bestehen gute Heilungschancen. Jedoch zeigen Hauttumore, vor allem Melanome, eine hohe Tendenz zur Metastasierung. Für die metastasierende Form von Melanomen ist die Prognose eher schlecht, was u.a. durch eine hohe Resistenz gegenüber klassischen Chemotherapeutika begründet ist. Auch das Plattenepithelkarzinom kann bei Bildung von Metastasen zu einer tödlich verlaufenden Erkrankung werden. Im Allgemeinen stellt die Invasion von Krebszellen und die Bildung von Metastasen in anderen Gewebe bzw. Organen bei allen Krebserkrankungen das Hauptproblem dar. Ziel einer Therapie sollte daher die Verhinderung oder Verringerung der Invasion von Tumorzellen sein.

Nachdem festgestellt wurde, dass Ceroxid-Nanopartikel zumindest auf einen gewissen Prozentsatz von Tumorzellen eine cytotoxische Wirkung ausüben, wurden auch Effekte von CNP auf die Invasion von Tumorzellen untersucht. Die invasive Kapazität von Tumorzellen wurde mit Hilfe von *in vitro*-Invasionassays analysiert. Im Invasionsassay migrieren Tumorzellen durch eine die Basalmembran der Haut simulierende Membran in Richtung eines Chemoattraktants. Die Anzahl der invadierten Zellen dient als Maß für die invasive Kapazität der Tumorzellen. Dazu wurden die Zellen, SCL-1 bzw. A375, für 48 Stunden mit 150 μM CNP behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Chemoattraktant für die Tumorzellen wurde konditioniertes Medium von Fibroblasten benutzt (CM^{HDF} und CM^{MF}). CM^{MF} enthält proinvasive Signale, die von Fibroblasten nach der Transdifferenzierung zum Myofibroblasten in das Medium abgegeben werden und dient damit in diesem Assay als interne Positiv-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M von drei voneinander unabhängigen Experimenten (Abb. 3.4).

Im Vergleich zu konditioniertem Medium von nicht transdifferenzierten Fibroblasten, CM^{HDF} , erhöhte das konditionierte Medium von Myofibroblasten, CM^{MF} , die Invasion der unbehandelten SCL-1 Zellen (A) um das 2-fache und die Invasion der

unbehandelten A375 Melanomzellen (B) um mehr als das 4-fache. Dieses Ergebnis zeigt, dass CM^{MF} einen stärkeren chemoattraktiven Effekt auf beide Tumorzelltypen ausübt als CM^{HDF} und bestätigt, dass mit dieser Methode die invasive Kapazität von Tumorzellen, SCL-1 und A375, erfasst werden kann.

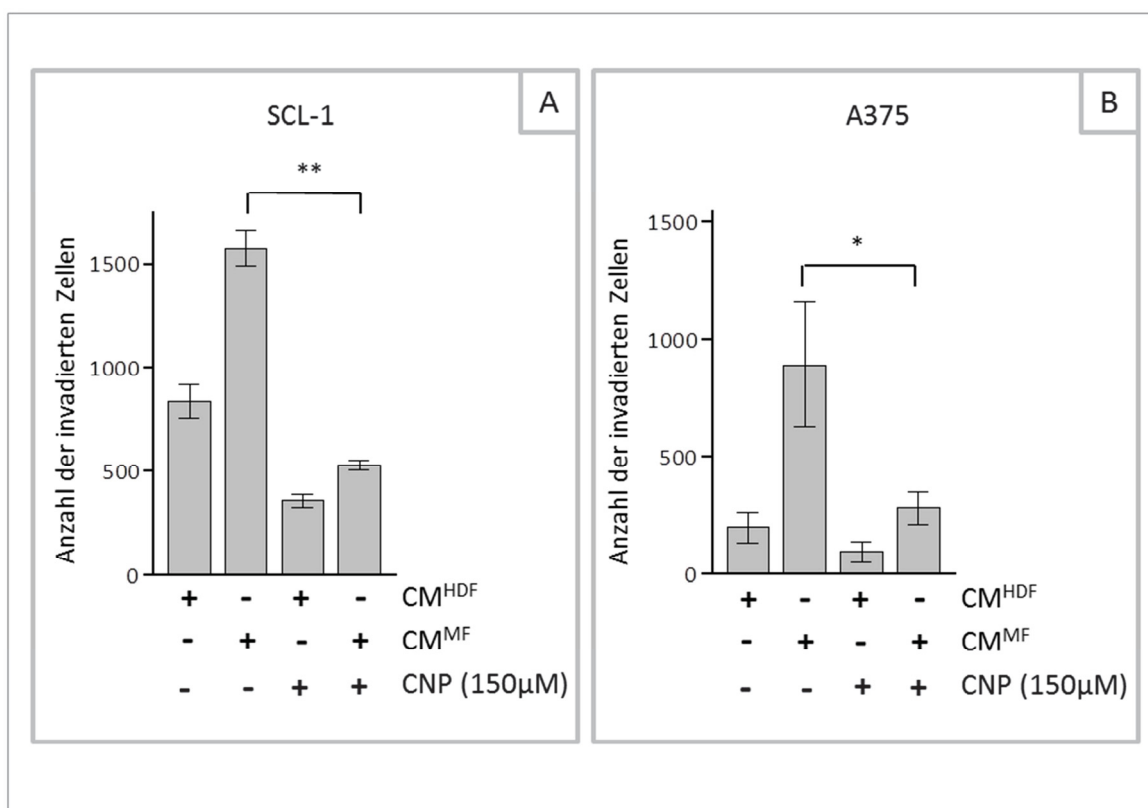


Abb. 3.4 Einfluss von Ceroxid-Nanopartikeln auf die Invasion von Tumorzellen *in vitro* SCL-1 (A) und A375 (B) wurden für 48 h mit 150 μ M CNP inkubiert. Anschließend wurde die invasive Kapazität der Tumorzellen mit Hilfe von Invasionsassays (Boyden-chamber-Prinzip) bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Chemoattraktant wurde konditioniertes Medium (CM^{HDF} , CM^{MF}) eingesetzt. Die invadierten Zellen wurden mit Coomassie Blue angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von drei voneinander unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; One-way-Anova mit Dunett's post hoc Test).

Durch die Behandlung von CNP wurde die Invasion der Tumorzellen deutlich verringert. Die Verringerung der Invasion von SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen, für die CM^{HDF} als Chemoattraktant verwendet wurde, betrug 59%, wenn sie zuvor mit CNP behandelt wurden. Wurde CM^{MF} als Chemoattraktant verwendet, sank die Anzahl von invadierten SCL-1 nach CNP-Behandlung signifikant um 66% im Vergleich mit den unbehandelten Zellen. Bei den A375 Zellen verminderte die CNP-Behandlung die invasive Kapazität signifikant um mehr als die Hälfte in CM^{HDF} , und um 70% in CM^{MF} . Ceroxid-Nanopartikel vermindern die invasive Kapazität sowohl von

Plattenepithelkarzinomzellen als auch von A375 Melanomzellen deutlich und bieten daher einen vielversprechenden Ansatz für eine therapeutische Anwendung.

3.4 ROS-abhängige Prozesse vermitteln cytotoxische Wirkung von CNP in Tumorzellen

In den vorhergegangenen Experimenten zeigten Ceroxid-Nanopartikel cytotoxische und anti-invasive Effekte in Tumorzellen. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, welche zugrundeliegenden Mechanismen die Effekte von CNP in Tumorzellen vermitteln. Aktuelle Studien mit Ceroxid-Nanopartikeln deuten auf redox-aktive Eigenschaften der Partikel hin. Sowohl antioxidative, als auch prooxidative Effekte von Ceroxid-Nanopartikel in verschiedenen Zelltypen sind beschrieben und werden kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass CNP in Lungenkarzinomzellen den intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies erhöhen (Lin et al.; 2006). Auch in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B), wurden prooxidative Effekte beobachtet (Park et al., 2007; Eom & Choi, 2009). Antioxidative Effekte von Ceroxid-Nanopartikeln konnten in humanen Fibroblasten und retinalen Neuronen gezeigt werden (Perez et al., 2008; Chen et al., 2006). In zellfreien Systemen wurde eine Superoxiddismutase- und Catalase-mimetische Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel festgestellt (Heckert et al., 2008; Pirmohamed et al., 2010). Um festzustellen, ob die hier beobachteten cytotoxischen und anti-invasiven Effekte von CNP auf redox-aktive Eigenschaften der Partikel zurückzuführen sind und durch ROS-abhängige Prozesse vermittelt werden, wurde der Einfluss von CNP auf den extrazellulären und intrazellulären ROS-Gehalt, sowie auf oxidative Schädigung der Tumorzellen untersucht.

Zunächst wurde mit dem Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay die extrazelluläre Menge an H_2O_2 qualitativ bestimmt, die von den Tumorzellen nach der Behandlung mit CNP freigesetzt wurde. Als Referenz dienten unbehandelte Tumorzellen. SCL-1 und A375 Zellen wurden für 4, 8, 24 und 48 Stunden mit CNP behandelt. In Abb. 3.5 sind die Mittelwerte mit S.E.M. der Fluoreszenzintensitäten von drei voneinander unabhängigen Messungen dargestellt. Gegenüber den unbehandelten Kontrollen wurde eine deutliche Erhöhung des H_2O_2 -Gehaltes nach CNP-Behandlung festgestellt. Bei beiden Zelllinien wurde die höchste Menge H_2O_2 nach 4 Stunden Behandlung mit CNP gemessen. Dabei handelte es sich bei SCL-1 Zellen um eine 2,8-fache und bei A375 Zellen um eine 3,9-fache Erhöhung gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Mit steigender Inkubationsdauer mit CNP war eine

Abnahme der gemessenen H_2O_2 -Menge in beiden Tumorzelllinien zu beobachten. Nach 48 Stunden CNP-Inkubation war bei SCL-1 Zellen noch eine 1,5-fache, bei A375 Zellen eine 2,3-fache Zunahme feststellbar. Die extrazelluläre ROS-Messung mit dem Amplex Red Assay ergab hochsignifikante Erhöhungen des Wasserstoffperoxid-Gehaltes in Plattenepithelkarzinom- und Melanomzellkulturen nach CNP-Behandlung und zeigten eine prooxidative Wirkung der Partikel in Tumorzellen.

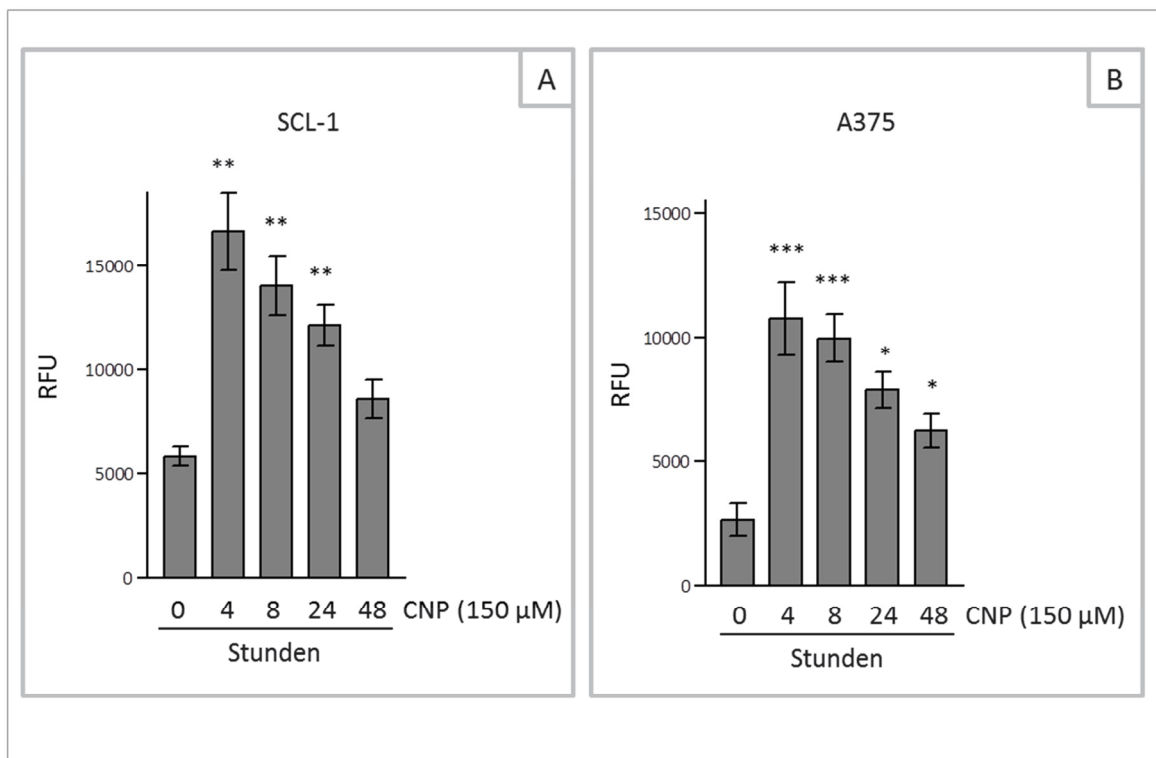


Abb. 3.5 Auswirkung von CNP auf den extrazellulären ROS-Gehalt in *in vitro* Tumorzellkulturen
Subkonfluente SCL-1 (A) und A375 (B) wurden für verschiedene Zeitintervalle mit $150 \mu\text{M}$ CNP inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Menge an Wasserstoffperoxid, das von den Zellen innerhalb einer Stunde freigesetzt wurde, mit Hilfe des Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten (RFU) \pm S.E.M. von drei voneinander unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; One-way-Anova mit Dunett's post hoc Test).

Nachdem extrazelluläre ROS-Messungen auf einen prooxidativen Effekt von CNP hinweisen, sollte in den folgenden Experimenten nun auch der Einfluss von CNP auf den intrazellulären ROS-Gehalt von Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden SCL-1 Zellen mit dem Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) angefärbt, der intrazellulär durch ROS zu dem stark fluoreszierenden Oxidationsprodukt DCF oxidiert wird. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs steigt proportional mit der Menge an ROS an und dient somit als Maß für den

intrazellulären ROS-Gehalt der Zellen. Der Nachweis wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch (Abb. 3.7) als auch über die Messung der Fluoreszenzintensitäten mit einem Fluorometer für Mikrotiterplatten (Abb. 3.6.) erbracht. Für die Messungen am Fluorometer wurden die SCL-1 Zellen 24 Stunden mit Ceroxid-Nanopartikeln inkubiert und danach mit H₂DCF-DA angefärbt. Als technische Positiv-Kontrolle wurden unbehandelte Zellen kurz vor der Messung mit 100 µM H₂O₂ inkubiert, als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen zeigten einen deutlichen Anstieg des intrazellulären ROS-Gehalt durch CNP. Nach einer 24stündigen Behandlung mit 50 µM bzw. 150 µM CNP stieg der ROS-Gehalt der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Negativ-Kontrolle auf das 1,4-fache bzw. 2,1-fache an.

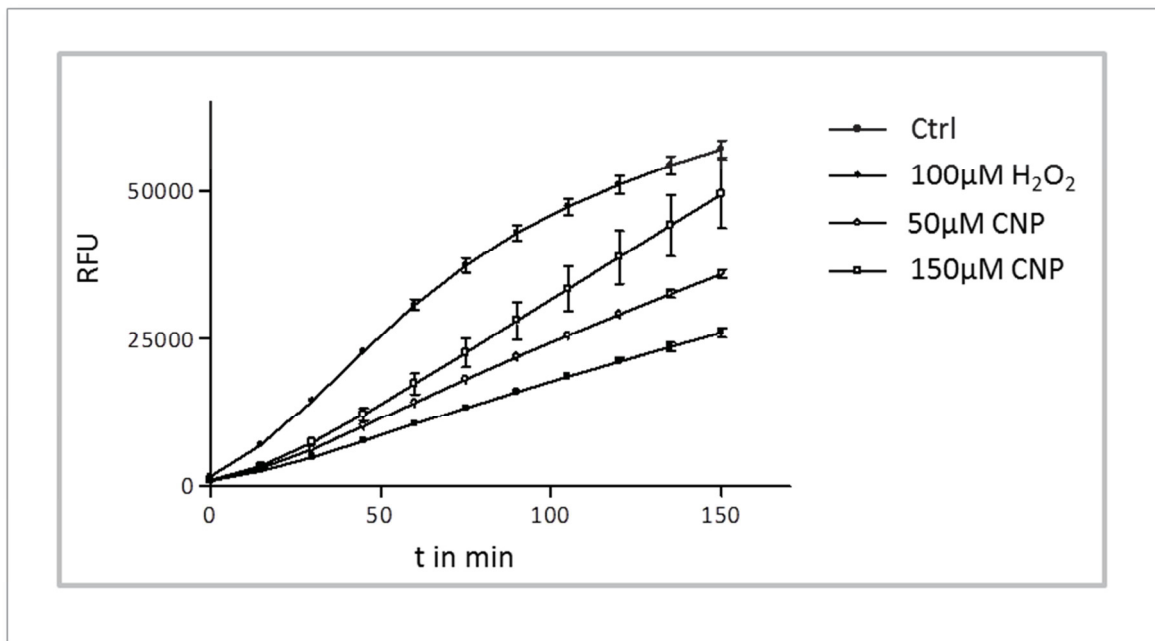


Abb. 3.6 Einfluss von CNP auf den intrazellulären ROS-Gehalt von Tumorzellen SCL-1 Zellen wurden 24 Stunden mit 50 bzw. 150 µM CNP behandelt. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen. H₂O₂ wurde für eine technische Kontrolle verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff H₂DCF-DA beladen und die Fluoreszenzintensität des gebildeten DCF über den Zeitraum von 2,5 Stunden alle 5 Minuten gemessen. CNP-Behandlung führte zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Menge. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen eines hier repräsentativ abgebildet ist.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die SCL-1 Zellen 24 Stunden mit 150 µM CNP behandelt, als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte SCL-1. Für einen Vergleich wurden Zellen mit 250 µM H₂O₂ behandelt. In Abb. 3.7 sind repräsentative Aufnahmen der drei verschiedenen Behandlungsgruppen eines von

drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Auch bei diesen Untersuchungen wurde ein eindeutiger Anstieg der intrazellulären ROS-Menge durch die Partikel beobachtet. Die Fluoreszenzintensität der CNP- behandelten Zellen und der mit H_2O_2 behandelten Zellen waren gleich hoch. Mit den intrazellulären ROS-Messungen konnte nachgewiesen werden, dass Ceroxid-Nanopartikel den ROS-Gehalt in SCL-1 Zellen deutlich erhöhen, was erneut auf einen pro-oxidativen Effekt von CNP in Tumorzellen hindeutet.

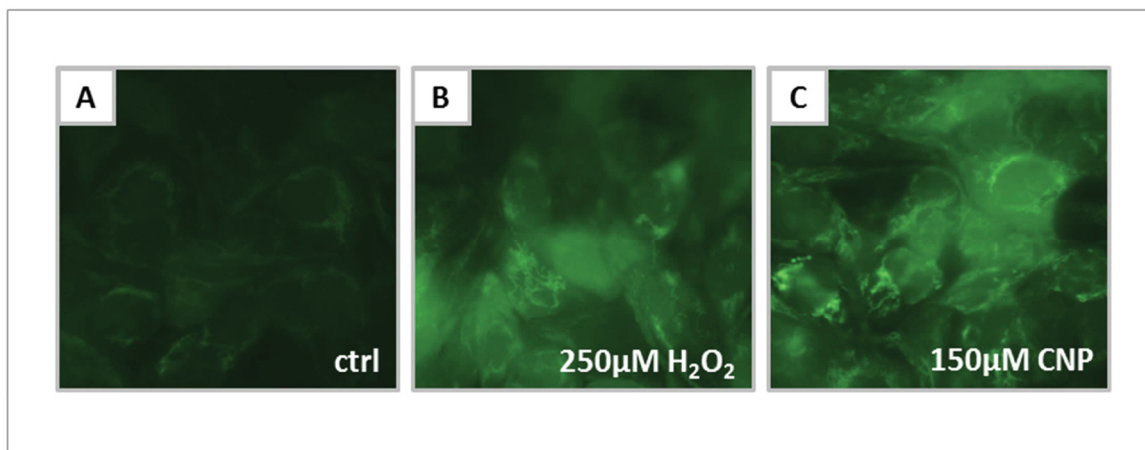


Abb. 3.7 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von intrazellulären ROS Intrazelluläre ROS wurden mit dem fluoreszenten Farbstoff ($H_2DCF-DA$) nachgewiesen. (A-C): SCL-1 wurden 24 h mit 150 μM CNP behandelt (C). Vergleichend wurden SCL-1 Zellen für 24 Stunden mit 250 μM H_2O_2 belastet (B). Unbehandelte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle (A). Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen repräsentative Aufnahmen gezeigt sind.

Als weiterer Nachweis für eine pro-oxidative Wirkung von CNP wurde der Einfluss von CNP auf die Menge der α -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert die zelluläre Antwort auf Hypoxie, spielt eine kritische Rolle während der Tumorprogression und wird außerdem durch erhöhte ROS-Mengen aktiviert, die einer Hypoxie ähneln (Denko, 2008; Kuphal et al., 2010). HIF-1 aktiviert die Transkription von Genen für Glykolyse-Enzyme und Prozesse der Angiogenese. Der Transkriptionsfaktor besteht aus den Untereinheiten α und β , die konstitutiv exprimiert werden. Unter normoxischen Bedingungen wird die HIF-1 α Untereinheit jedoch von spezifischen Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert, wodurch sie von dem Von-Hippel-Lindau-(E3)-Ligase-Komplex erkannt wird, in Folge dessen ubiquitiniert und proteasomal verdaut werden. Unter hypoxischen Bedingungen sind die Prolylhydroxylasen inaktiviert und daher stabil. Auch ROS stabilisieren die

Untereinheit HIF-1 α und aktivieren so den Transkriptionsfaktor (Denko, 2008; Kuphal et al., 2010).

Mit Inhibitoren, wie Cobalt(II)-chlorid-Ionen (CoCl₂), können Prolylhydroxylasen inaktiviert werden und somit der proteasomale Abbau von HIF-1 α verhindert werden (Maxwell et al., 1999). Da sich in Voruntersuchungen (siehe Kapitel 2.11.6) zeigte, dass das HIF-1 α nur sehr schwach über die Immunfärbung mit einem anti-HIF-1 α Antikörper detektiert werden konnte, wurde in folgenden Experimenten Cobalt(II)-chlorid eingesetzt um HIF-1 α zu stabilisieren, um so das HIF-1 α -Signal im Western Blot zu verstärken und die Detektion zu vereinfachen.

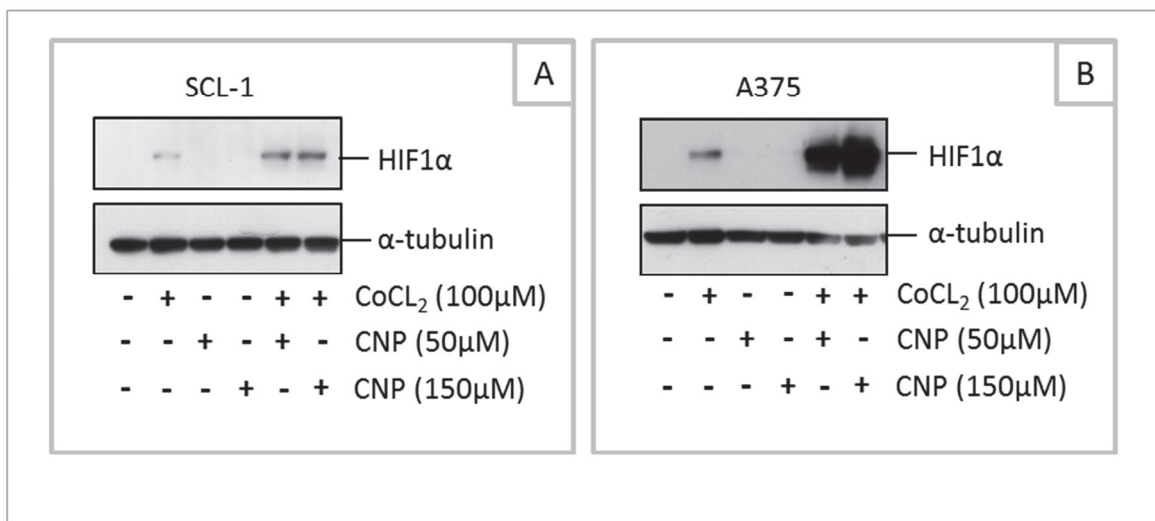


Abb. 3.8 Effekt von CNP auf die Aktivität des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 in Tumorzellen Subkonfluente SCL-1 (A) und A375 (B) wurden für 24 h mit CNP behandelt bzw. wurden zusätzlich in den letzten 4 h der CNP Inkubation mit 100 μ M Cobaltchlorid co-inkubiert. Cobaltchlorid wurde eingesetzt um das HIF-1 α -Signal in den Western Blot-Analysen zu verstärken. CNP führte zur Akkumulation von HIF-1 α . Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Für diesen Ansatz wurden die Tumorzellen 24 Stunden mit 50 μ M bzw. 150 μ M CNP behandelt und zusätzlich mit Cobaltchlorid inkubiert. Cobalt(II)-chlorid-Ionen simulieren hypoxische Bedingungen, indem sie die PHDs inhibieren, wodurch HIF-1 α stabil bleibt und nicht degradiert wird. Die Zellen wurden in den letzten 4 Stunden der 24stündigen CNP-Inkubation mit 100 μ M CoCl₂ co-inkubiert. Als Kontrollen fungierten unbehandelte Zellen bzw. Zellen, die für 4 Stunden mit 1 mM CoCl₂ behandelt wurden. In Abb. 3.8 ist ein repräsentatives Beispiel dreier voneinander unabhängiger Experimente gezeigt. Bei den unbehandelten Zellen und den Zellen, die ausschließlich mit Partikeln behandelt wurden, konnte gar kein oder nur ein

schwaches HIF-1 α Signal detektiert werden, während nach Behandlung mit CoCl₂ HIF-1 α deutlich sichtbar waren. Vergleicht man die mit CoCl₂ behandelte Kontrolle mit den Zellen, die mit CNP co-inkubiert wurden, ist eine Erhöhung des HIF-1 α -Gehalt durch die CNP-Behandlung bei SCL-1 und A375 Zellen zu erkennen, was wiederum für einen prooxidativen Effekt von CNP spricht. CNP-Behandlung führte zu einer Akkumulation der HIF-1 Untereinheit α und somit zu einer Erhöhung der HIF-1 Aktivität.

Kann das antioxidative Abwehrsystem der Zelle eine Erhöhung der ROS-Menge nicht mehr kompensieren, tritt eine oxidative Schädigung von zellulären Strukturen, wie Proteinen, DNA und Lipiden auf. In diesem Fall spricht man von oxidativem Stress (Sies et al., 1997). Die oxidative Schädigung kann die enzymatische Aktivität oder Bindungseigenschaften von Proteinen verändern und bis zum Funktionsverlust des Proteins führen. Diese Schädigung durch ROS erfolgt u.a. über oxidative Modifikationen der Seitenketten von Proteinen. Charakteristische Modifikationen durch ROS ist die Einführung von Carbonylgruppen in bestimmte Seitenketten oder die sehr spezifische Thiol-Oxidation von Cystein zu sulfenischer Säure (-SOH) (Yan & Forster, 2010). Carbonylgruppen können über eine Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender immunologischer Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen die entstandenden DNP-Hydrazone nachgewiesen werden. Thiol-Oxidation von Cysteinen lässt sich über eine charakteristische Reaktion der sulfenischen Säure mit dem cyclischen Diketon Dimedon zu einem stabilen Thioether-Produkt nachweisen. Dimedon wird an das oxidierte Cystein gebunden und fungiert dann als Epitop für eine Detektion mit neuartigen α -Hapten-Antikörpern (Seo & Carroll et al., 2009). In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss von CNP auf den Carbonyl-Gehalt und die Thiol-Oxidation von Proteinen in Tumorzellen untersucht werden.

Für den Nachweis von Carbonyl-Gruppen über DNPH-Derivatisierung wurde in folgenden Experimenten das Oxy Blot Protein Oxidation Detection Kit verwendet. Für Oxyblot Analysen wurden SCL-1 Plattenepithelkarzinom Zellen und A375 Melanomzellen für verschiedene Zeitpunkte mit CNP bzw. H₂O₂ inkubiert und dann lysiert. Als Negativ-Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Alle Proteinlysate wurden vor der gelelektrophoretischen Auftrennung nach Angaben des Herstellers mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin derivatisiert, mit Ausnahme einer technischen Kontrolle, die anstatt dessen mit einer Kontroll-Lösung ohne DNPH versetzt wurde. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen ein repräsentatives Beispiel in Abb. 3.9 dargestellt ist. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

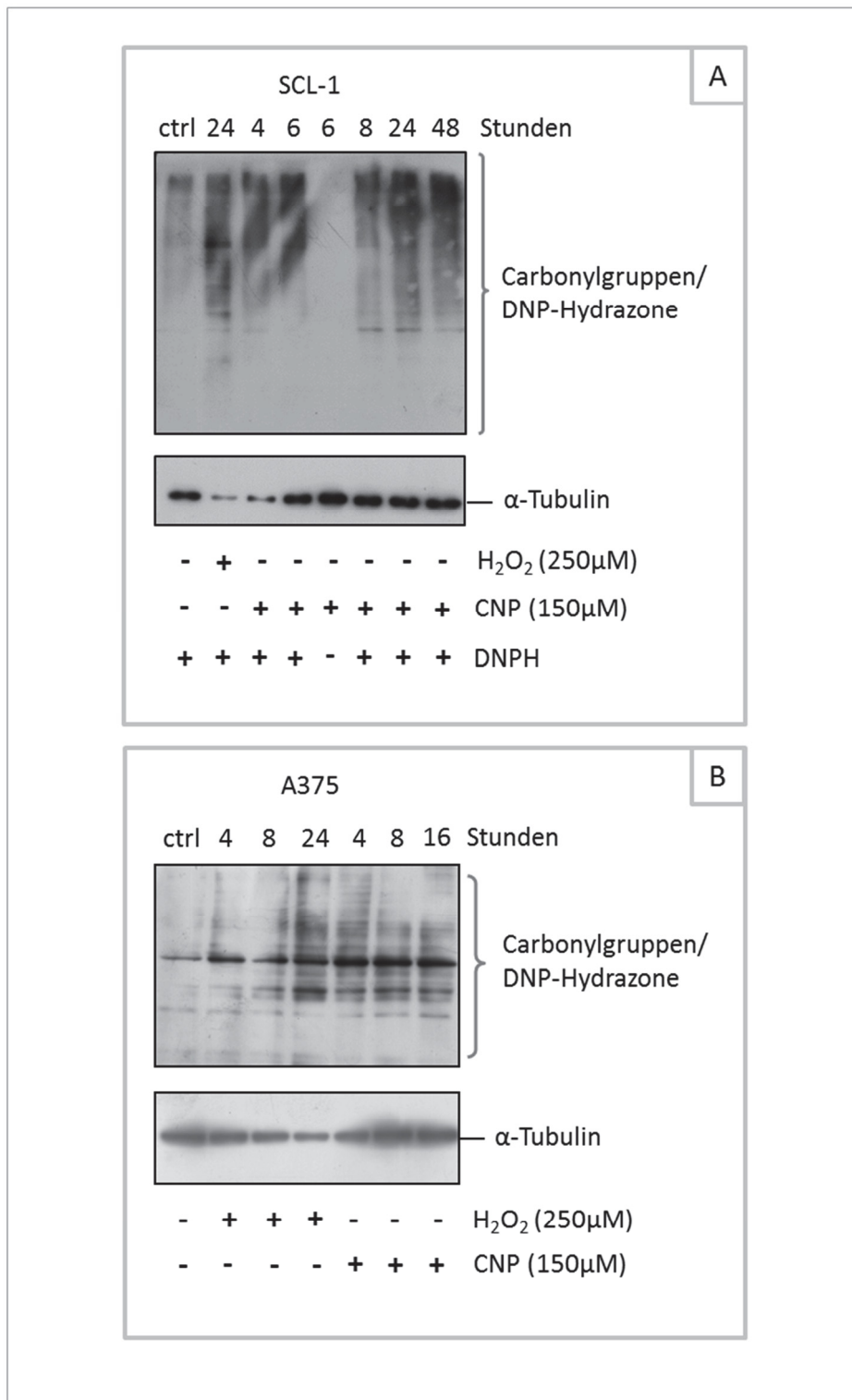


Abb. 3.9 Einfluss von CNP auf die oxidative Schädigung von Proteinen in Tumorzellen Um die oxidative Schädigung von Proteinen zu untersuchen, wurden SCL-1 Zellen (A) und A375 (B) für verschiedene Zeiten mit 150 μ M CNP bzw. H₂O₂ behandelt und anschließend Oxyblot-Analysen unterzogen, die es über eine Derivatisierung mit DNP-H ermöglichten, carbonylierte Proteine mit einem anti-DNP-H Antikörper zu detektieren. Als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Alle Proteinproben wurden vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit DNP-H derivatisiert, mit Ausnahme der Negativ-DNP-H-Kontrolle (A), die anstatt mit der DNP-H-Lösung nur mit einer Kontroll-Lösung ohne DNP-H versetzt wurde. CNP führte zu einer verstärkten Carbonylierung in Tumorzellen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen ein repräsentativer Western Blot abgebildet ist. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle analysiert.

In den unbehandelten Kontrollen konnte in SCL-1 und A375 wenige oxidierte Proteine bzw. Carbonylgruppen detektiert werden. Im Vergleich dazu wurden in den mit H_2O_2 behandelten Zellen hohe Mengen carbonylierter Proteine nachgewiesen. Auch in den mit CNP behandelten Zellen wurden stark erhöhte Mengen oxidiertes Proteine gefunden. In den SCL-1 Zellen nahm der Gehalt an carbonylierten Proteinen mit steigender CNP-Inkubationsdauer zu, erreichte nach 24 Stunden ein Maximum und nahm danach leicht ab. In A375 Zellen wurde die höchste Menge an carbonylierten Proteinen bereits nach 4 Stunden Inkubation mit CNP festgestellt. Bei längeren Inkubationszeiten mit CNP nahm der Gehalt an Carbonylgruppen in A375 Zellen wieder leicht ab. Insgesamt wurde jedoch zu jedem Zeitpunkt eine Zunahme von oxidierten Proteinen in beiden Tumorzelllinien festgestellt. Die Zunahme von carbonylierten/oxidierten Proteinen in den Oxyblot-Analysen zeigt eine irreversible, oxidative Schädigung der Tumorzellen durch CNP.

Als weiterer und spezifischerer Marker für eine oxidative Schädigung von Proteinen wurde die H_2O_2 -vermittelte Thiol-Oxidation von Cysteinen untersucht. H_2O_2 reagiert mit Thiolgruppen von Cysteinen in Proteinseitenketten und bildet ein spezifisches Oxidationsprodukt, die sulfenische Säure. Der Nachweis von sulfenischen Säuren ist daher ein Marker für die spezifisch durch H_2O_2 vermittelte Proteinoxidation. Es wurde ein α -Hapten-Antikörper verwendet, der das Thioether-Produkt der Reaktion von sulfenischen Säuren mit Dimedon, erkennt. Diese Methode und der α -Hapten-Antikörper wurden von Kate S. Carroll und ihrer Arbeitsgruppe entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden für 24 Stunden mit $150 \mu\text{M}$ CNP. In den letzten zwei Stunden der CNP-Behandlung wurde den Zellen 10 mM Dimedon zugesetzt. Vergleichend wurden die Zellen für zwei Stunden mit 1 mM H_2O_2 und 10 mM Dimedon co-inkubiert. Als Referenz wurden A375 Zellen verwendet, die zwei Stunden mit Dimedon inkubiert wurden. Abb. 3.10 zeigt einen exemplarischen Western Blot dreier voneinander unabhängiger Versuche. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle analysiert. In CNP-behandelten und H_2O_2 -behandelten Zellen wurden im Vergleich zu der Negativkontrolle wesentlich mehr oxidierte Thiole detektiert. CNP erhöhte den Anteil von oxidierten Thiolen in etwa dem gleichen Ausmaß wie H_2O_2 . Das erhöhte Vorkommen von sulfenischen Säuren nach CNP-Behandlung liefert einen weiteren Nachweis für eine oxidative Schädigung von Proteinen durch eine CNP-bedingte Erhöhung des ROS-Gehalts in Tumorzellen. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass es sich bei den gebildeten ROS um H_2O_2 handeln muss, da sulfenische Säuren spezifisch durch die Reaktion von H_2O_2 mit Thiolen entstehen.

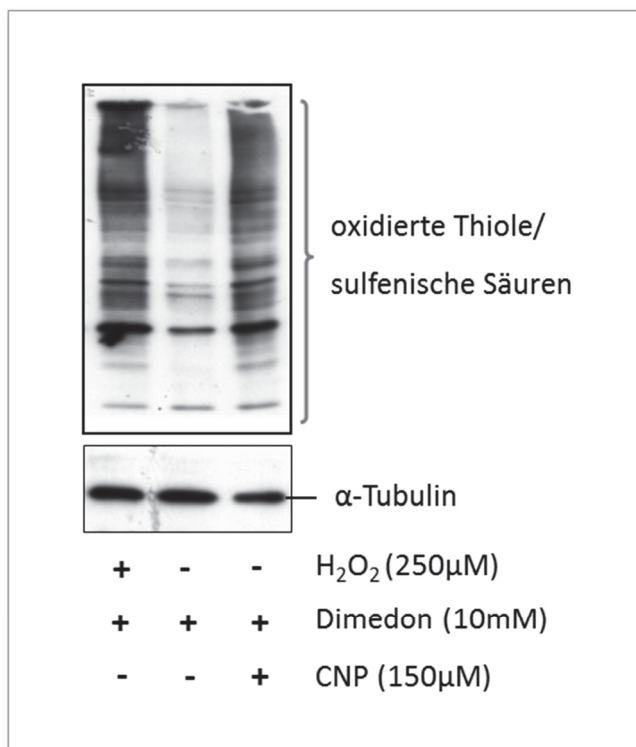


Abb. 3.10 Nachweis einer oxidativen Schädigung von Proteinen durch Detektion oxidierter Thiole A375 Zellen wurden 24 Stunden mit 10 mM Dimedon und 150 μM CNP bzw. 250 μM H₂O₂ co-inkubiert. Dimedon bindet spezifisch an sulfenische Säuren, welche das initiale Oxidationsprodukt von Thiolgruppen in Cysteinen mit H₂O₂ darstellen. Das dadurch entstandene Thioether-Produkt wurde spezifisch über einen α-Hapten-Antikörper detektiert werden. CNP führte zu einer verstärkten Thiol-Oxidation in Melanomzellen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen ein repräsentativer Western Blot abgebildet ist. α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen eine deutliche oxidative Schädigung von Tumorzellen durch CNP auf. Es wurden sowohl ein erhöhter Anteil von carbonylierten Proteinen, als auch von oxidierten Cysteinen nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erhöhung des ROS-Gehalts durch CNP von den Tumorzellen nicht durch das zelleigene antioxidative Schutzsystem kompensiert werden kann und es somit zu einer Veränderung des zellulären Redoxstatus kommt. Anzunehmen ist daher auch, dass weitere oxidative Schäden von Makromolekülen durch CNP auftreten.

3.5 Anti-invasive Effekte von CNP werden über die ROS-abhängige Regulation von Cav-1 vermittelt

In vorangegangenen Versuchen konnte ein anti-invasiver Effekt von Ceroxid-Nanopartikel auf Tumorzellen nachgewiesen werden. Migration und Invasion von Tumorzellen werden durch reaktive Sauerstoffspezies stark beeinflusst, indem diese

in die Signaltransduktion eingreifen. ROS regulieren die Expression des Signal- und Strukturproteins Caveolin-1 (Cav-1), das mit einem verstärkt aggressiven Verhalten von Tumorzellen assoziiert ist. Hydroxylradikale erhöhen die Expression von Caveolin-1 und fördern damit die Tumordinvasion, während Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen die Expression von Caveolin-1 vermindern und dadurch die Migration und Invasion von Tumorzellen inhibieren (Luanpitpong et al., 2010).

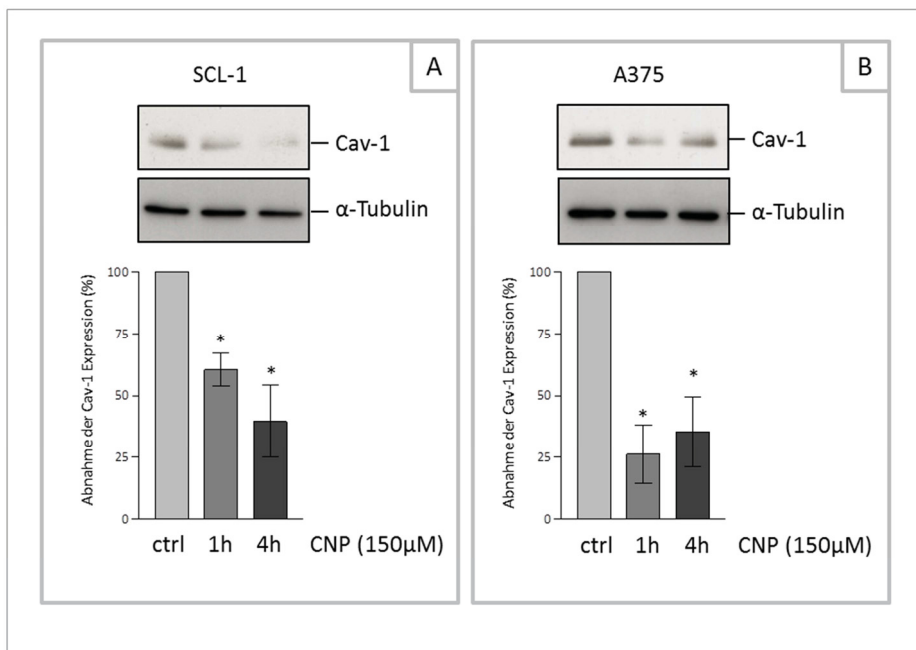


Abb. 3.11 Wirkung der CNP-generierten ROS auf den Caveolin-1 (Cav-1) Gehalt in Tumorzellen SCL-1 (A) und A375 (B) Zellen wurden 1 h bzw. 4 h mit 150 μ M CNP behandelt. Der Cav-1 Gehalt der Zellen wurde mittels Western Blot bestimmt. Nach CNP-Behandlung wurde eine Abnahme von Cav-1 beobachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. (* $p < 0,05$; One-way-Anova mit Dunett's post hoc Test)

Um festzustellen, ob die beobachteten anti-invasiven Effekte von Ceroxid in Tumorzellen über Caveolin-1 vermittelt werden, wurde im Folgenden der Einfluss von CNP auf die Caveolin-1-Expression über Western Blot-Analysen untersucht. Dafür wurden SCL-1 und A375 Zellen für eine bzw. vier Stunden mit 150 μ M CNP behandelt. In Abb. 3.11 ist jeweils ein repräsentativer Western Blot und die Densitometrie von drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Bandenintensitäten nach Normierung auf α -Tubulin. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte entsprechend auf diese bezogen. In beiden Tumorzelllinien wurde nach CNP-Behandlung weniger Caveolin-1 detektiert als in unbehandelten Zellen. In SCL-1 wurde nach einer Stunde Behandlung nur noch

60% des Caveolin-1-Gehalts im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (100%) gemessen und nach 4 Stunden Inkubation sank der Cav-1-Gehalt weiter auf ca. 40%. In A375 Zellen war der Effekt von CNP noch deutlicher. Nach einer Stunde Inkubation mit CNP betrug der Caveolin-1-Gehalt nur noch ca. 25% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 4 Stunden Inkubation wurde ein Cav-1-Gehalt von ca. 35% beobachtet. Diese statistisch signifikante Abnahme des Caveolin-1-Gehalts ist vermutlich auf die durch CNP bedingte Anhäufung von H_2O_2 in Tumorzellen zurückzuführen. Caveolin-1 wird negativ durch CNP reguliert und vermittelt so möglicherweise die anti-invasiven Effekte von CNP. Ferner weist der erniedrigte Caveolin-1-Gehalt auf die Art der reaktiven Sauerstoffspezies hin, die durch CNP in Tumorzellen generiert werden, da die Expression von Caveolin nur durch H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ herabreguliert wird (Luanpitpong et al., 2010).

3.6 CNP-abhängige ROS-Erhöpfung induziert Apoptose in Tumorzellen

In den folgenden Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob die ROS-abhängige Cytotoxizität von CNP über Apoptose vermittelt wird. Die Apoptose-spezifischen Biomarker, wie die Freisetzung von Cytochrom C, die Caspase-3-Aktivität und die Spaltung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP) wurden untersucht.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol gehört zu den frühen Ereignissen der intrinsischen Apoptose und führt u.a. zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9 des intrinsischen Weges der Apoptose. Die Freisetzung von Cytochrom C wird über verschiedene pro-apoptotische Stimuli initiiert, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies oder DNA-Schäden (Kawiak et al., 2012; Takahashi et al., 2004). Um die Freisetzung von Cytochrom C zu untersuchen, wurde der Cytochrom C-Gehalt der cytosolischen Zellfraktion über Western Blot-Analysen bestimmt. Die Zellen (A375) wurden für 12, 24, und 48 Stunden mit 150 μ M CNP behandelt. Als Vergleich wurden die Zellen eine Stunde mit 1 mM H_2O_2 inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle, α -Tubulin als Ladekontrolle. In Abb. 3.12 ist eine repräsentative Aufnahme von drei voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, sowie die Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung jedes einzelnen Experimentes, für die die Negativ-Kontrollen auf 1 gesetzt wurden und alle anderen Werte entsprechend auf diese bezogen wurden. Die Untersuchungen ergaben eine Zunahme des cytosolischen Cytochrom C-Gehaltes durch H_2O_2 und besonders durch Ceroxid-Nanopartikel. Die H_2O_2 -Behandlung führte zu einem über 2-

fach erhöhten Cytochrom C-Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch die Behandlung mit Ceroxid-Nanopartikeln stieg der cytosolische Cytochrom C-Gehalt der Melanomzellen zeitabhängig auf eine 7,5-fache Erhöhung nach 48 Stunden Inkubation an. Nach 12 bzw. 24 Stunden war bereits eine 4-fache bzw. eine über 6-fache Erhöhung zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass H_2O_2 und insbesondere Ceroxid-Nanopartikel zu einer hohen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führen und liefern damit deutliche Hinweise auf eine ROS-abhängige Induktion der Apoptose durch CNP über den intrinsischen Weg.

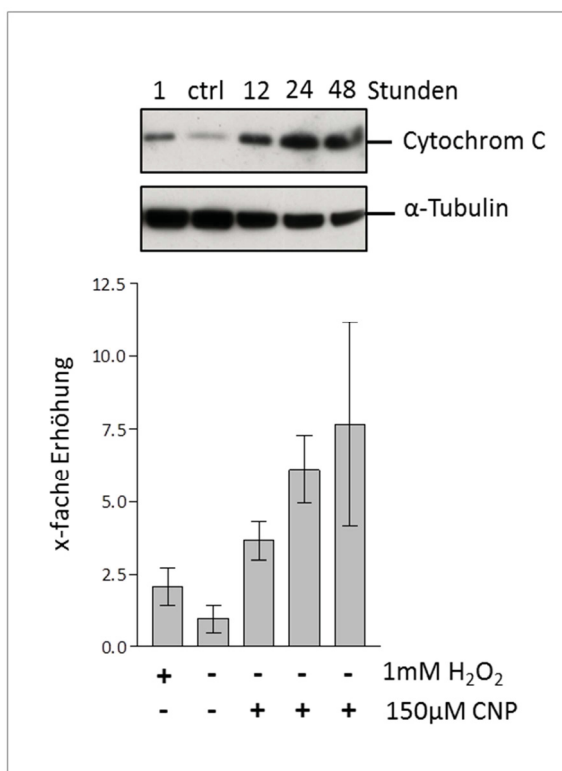


Abb. 3.12 Einfluss von CNP auf die Freisetzung von Cytochrom C in Tumorzellen A375
Melanomzellen wurden für 12, 24 und 48 Stunden mit 150 μM CNP bzw. für eine Stunde mit 1 mM H_2O_2 behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle, α -Tubulin als Ladekontrolle. CNP-Behandlung resultierte in einer Freisetzung von Cytochrom C in A375 Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot und die densitometrische Auswertung von drei voneinander unabhängigen Experimenten (Mittelwerte \pm S.E.M.).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Nanopartikel auf die Aktivität der Effektor-Caspase-3 untersucht. Die Aktivierung der Caspasen gilt als „point of no return“ in der apoptotischen Signaltransduktion. Die Aktivität der Caspase-3 wurde über eine fluorimetrische Messung des Caspase-3-spezifischen Substrates Ac-DEVD-AMC bestimmt. A375 Melanomzellen wurden dazu für 24 Stunden mit 150 μM CNP behandelt. Die Aktivität der Caspase-3 war bei CNP-behandelten Zellen um das 1,9-

fache signifikant erhöht (Abb. 3.13). Die Erhöhung der Caspase-3 durch CNP zeigt, dass Ceroxid-Nanopartikel pro-apoptotische Effekte in Tumorzellen ausüben, die vermutlich über die Erhöhung des ROS-Gehalts vermittelt werden.

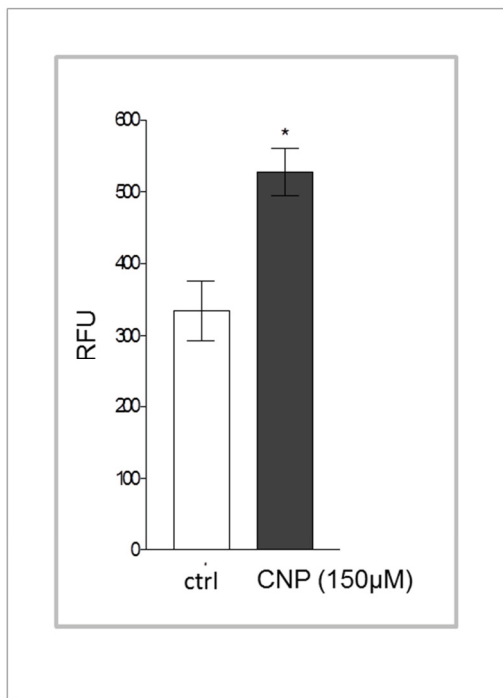


Abb. 3.13 Einfluss von CNP auf die Aktivität der Caspase-3 Als Nachweis für Apoptose wurde die Caspase-3-Aktivität über eine Fluoreszenzmessung des Caspase-3-spezifischen Substrates Ac-DEVD-AMC ermittelt. A375 wurden 24 Stunden mit 150 µM behandelt. Unbehandelte A375 fungierten als Negativ-Kontrolle. CNP-Behandlung resultierte in einer signifikant erhöhten Caspase-3-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. (* $p < 0,05$; Student's t-Test)

Ein Substrat der Caspase-3 ist die Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP), die zu den DNA-Reparatur-Enzymen gehört. Die 120 kDa große PARP wird proteolytisch durch die Caspase-3 in zwei Fragmente (98 kDa und 22 kDa) gespalten und dadurch inaktiviert. Die Proteinfragmente wurden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dazu wurden SCL-1 und A375 Zellen 24 und 48 Stunden mit 150 µM CNP behandelt. Für eine Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit 200 µM Cisplatin (*cis*-Diamindichloridoplatin(II)) behandelt, eine Substanz die in der klassischen Chemotherapie als Zytostatikum zum Einsatz kommt und Apoptose über Alkylierung der DNA und Erhöhung der ROS-Menge induziert (Montero & Jassem, 2011). Unbehandelte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. In Abb. 3.14 ist jeweils ein repräsentatives Beispiel eines Western Blots von PARP dargestellt (A SCL-1, B A375). In der unbehandelten Kontrolle konnte fast keine Fragmentierung von PARP festgestellt werden. Es konnte nur das ungespaltene Protein mit einer Größe von 120 kDa

detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in CNP-behandelten Zellen eine Spaltung von PARP beobachtet, die über das 98 kDa-Fragment nachgewiesen wurde. Nach 24 Stunden CNP-Behandlung wurde der höchste Anteil des 98 kDa Fragmentes in SCL-1 und A375 Zellen detektiert. Nach 48 Stunden nahm die Menge des Spaltproduktes von PARP wieder etwas ab. Die Behandlung mit Cisplatin führte in beiden Tumorzelllinien, im Fall der Melanomzellen zu einer sehr deutlichen Fragmentierung von PARP. CNP-Behandlung führte zur Spaltung von PARP in Tumorzellen, was erneut zeigt, dass die ROS-induzierte Cytotoxizität von CNP in Tumorzellen über Apoptose vermittelt wird.

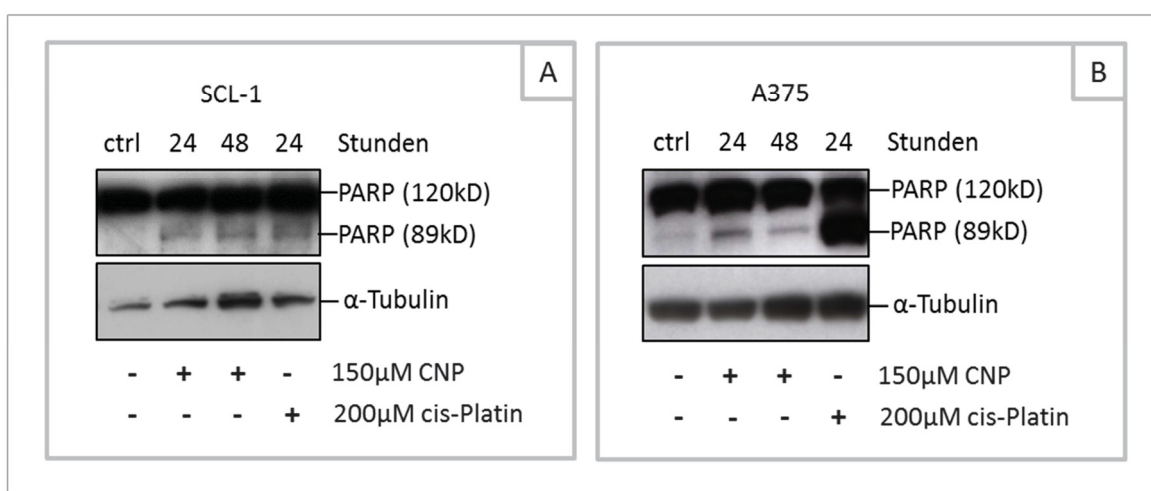


Abb. 3.14 Einfluss von CNP auf die Fragmentierung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP)
Spaltung von PARP gilt als charakteristisches Merkmal der Apoptose. SCL-1 und A375 Zellen wurden 24 bzw. 48 Stunden mit 150 µM CNP inkubiert. Für die Positiv-Kontrolle wurden die Zellen 24 Stunden mit 200 µM Cisplatin behandelt. CNP-Behandlung führte zur Fragmentierung von PARP. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen ein repräsentatives hier abgebildet ist. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

In allen Untersuchungen zur apoptotischen Signaltransduktion zeigten Ceroxid-Nanopartikel einen pro-apoptotischen Effekt in Tumorzellen. Es wurde eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C, eine erhöhte Caspase-3-Aktivität und die Spaltung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase durch CNP beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalwegs durch die Behandlung von Tumorzellen mit CNP vermittelt wird. Die durch CNP-bedingte Erhöhung von ROS, und dadurch verursachte Schädigung der Zelle, die in vorherigen Untersuchungen gezeigt wurde, wirken dabei als pro-apoptotischer Stimulus. Diese These wird durch die Ergebnisse zu den Positiv-Kontrollen mit H_2O_2 und Cisplatin gestützt, da hier ähnliche Effekte auftraten, wie sie nach CNP-Behandlung beobachtet wurden.

3.7 CNP inhibieren das Tumorwachstum *in vivo*

Dank einer guten Kooperation mit dem Department of Experimental Pathology des Mayo Clinic College of Medicine in Rochester, Minnesota war es möglich die Effekte von CNP auch im Tierversuch *in vivo* zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit verwendeten hochinvasiven humanen Melanomzellen (A375) wurden dem Department of Experimental Pathology des Mayo Clinic College of Medicine für die Anfertigung von Xenograft-Modellen mit immundefizienten Nacktmäusen zur Verfügung gestellt. Die Injektion der Zellen und das Isolieren der Tumore wurde von Dr. Shailendra Giri und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt. Die weiteren Experimente wurden am hiesigen Institut durchgeführt.

Sechs Wochen alten, immundefizienten Nacktmäusen (NCr-nu/nu, National Cancer Institute) wurden 1×10^6 A375 Zellen in 250 μ l Matrigel/PBS (5:1) subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Mäuse wurden in eine unbehandelte Kontrollgruppe und zwei CNP-behandelte Gruppen aus je sechs Individuen unterteilt. Die CNP-Behandlung wurde bei der ersten Gruppe einen Tag nach der Injektion der Tumorzellen und bei der zweiten Gruppe 10 Tage nach Injektion gestartet. Den Mäusen wurde jeden zweiten Tag 0,1 mg CNP/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Behandlungsdauer mit CNP betrug insgesamt 30 Tage. Einen Tag nach der letzten CNP-Applikation wurden die Tumore aller Gruppen entnommen und im Anschluss ihr Gewicht und Volumen ($V = \pi/6 \times L \times B \times H$) bestimmt.

In Abb. 3.15 sind die entnommenen Tumore der drei Gruppen (A) abgebildet und die Mittelwerte mit S.E.M. von Tumolvolumen (B) und Tumorgewicht (C). Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe waren die Tumore der beiden CNP-behandelten Gruppen deutlich kleiner. Durch CNP-Behandlung kam es zu einer hochsignifikanten Abnahme des Tumolvolumens und Gewichtes. In der Versuchsgruppe, bei der die CNP-Behandlung einen Tag nach Injektion der Tumorzellen gestartet wurde, nahm das Tumolvolumen um ca. 70% und das Tumorgewicht um ca. 65% ab. Im Fall der Gruppe, bei der die Behandlung 10 Tage nach Tumorzellinjektion begonnen wurde, wurde eine 82%ige Abnahme des Volumens bzw. eine 63%ige Abnahme des Tumorgewichtes beobachtet. Zwischen den unterschiedlichen Behandlungen (Tag 1, Tag 10) gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse zeigen, dass CNP das Tumorwachstum auch *in vivo* hemmen.

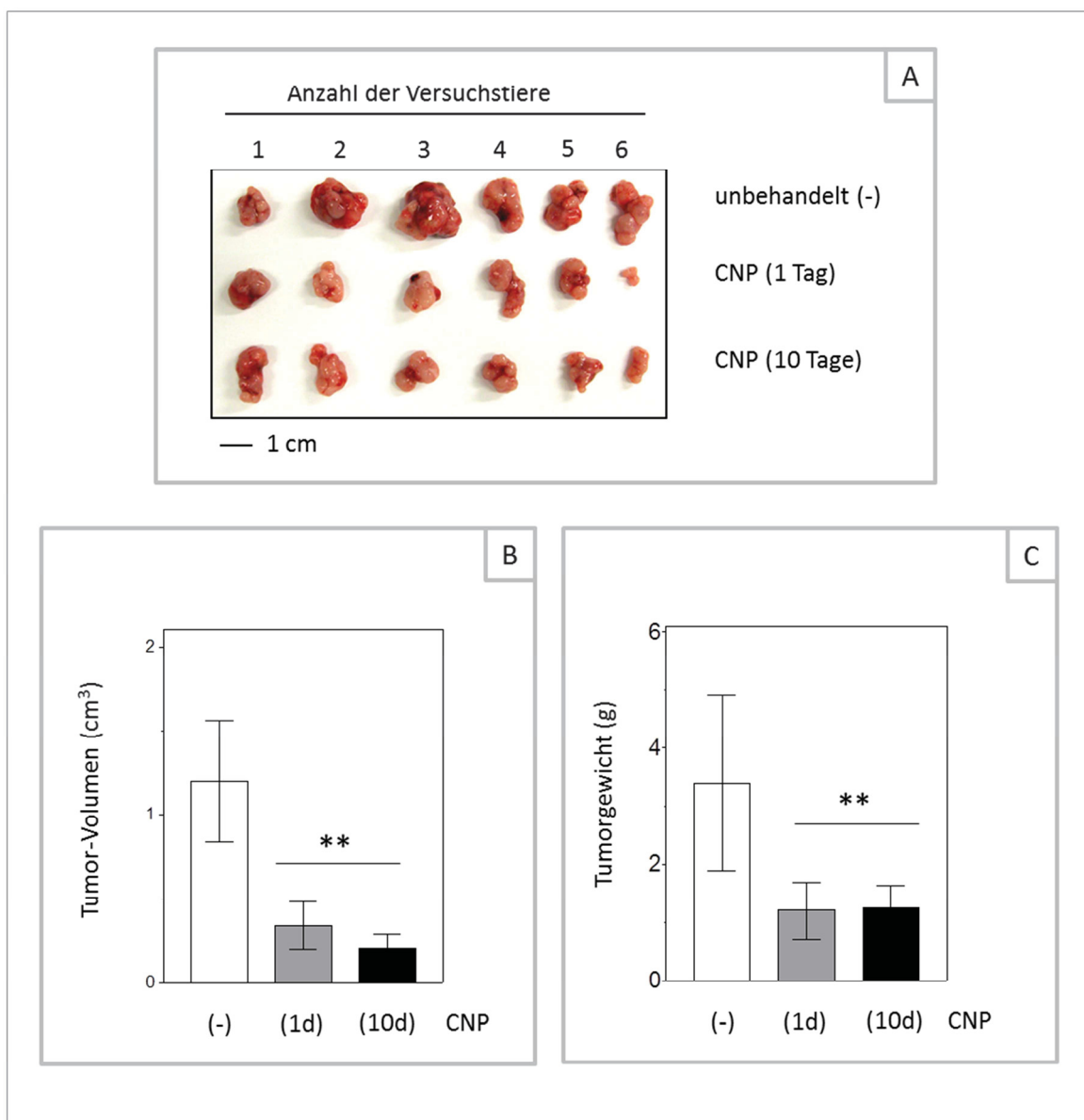


Abb. 3.15 Xenograftmodelle mit A375 Zellen NCr-nu/nu Mäuse wurden 1×10^6 A375 Zellen injiziert. Die Mäuse wurden in drei Gruppen von je 6 Tieren unterteilt. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und wurde nicht behandelt. Den Mäusen der beiden anderen Gruppen wurde jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von insgesamt 30 Tagen intraperitoneal 0,1 mg CNP/kg Körpergewicht injiziert. Das Gewicht und Volumen der entnommenen Tumore wurde ermittelt und es konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Tumoren der unbehandelten und den Ceroxid-behandelten Tiere festgestellt werden. Tumore von CNP-behandelten Tieren waren wesentlich kleiner. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way-Anova mit Dunett's post hoc Test)

Um den Einfluss von CNP auf den oxidativen Status der Zellen des Tumorgewebes *in vivo* zu untersuchen, wurden aus den entnommenen Tumoren der drei Versuchsgruppen Lysate hergestellt und deren Gehalt an carbonylierten Proteinen bestimmt. Abb. 3.16 zeigt einen repräsentativen Oxyblot von insgesamt drei unabhängigen Experimenten. Im Tumorgewebe der Mäuse, die nicht mit CNP behandelt wurden, wurde der höchste Gehalt an carbonylierten Proteinen

nachgewiesen. Im Tumorgewebe von CNP-behandelten Mäusen wurden im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe deutlich weniger carbonylierte Proteine nachgewiesen. Vergleicht man die beiden CNP-behandelten Versuchsgruppen mit einander, fällt auf, dass in den Tumoren der Gruppe, bei der die CNP-Applikation 10 Tage nach Injektion der Tumorzellen gestartet wurde, weniger carbonylierte Proteine detektiert wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die 30-tägige CNP-Behandlung *in vivo* zu einem veränderten Redox-Status der Zellen im Tumorgewebe von Mäusen führt. Es war eine klare Abnahme an carbonylierten Proteinen im Tumorgewebe von CNP-behandelten Mäusen zu beobachten.

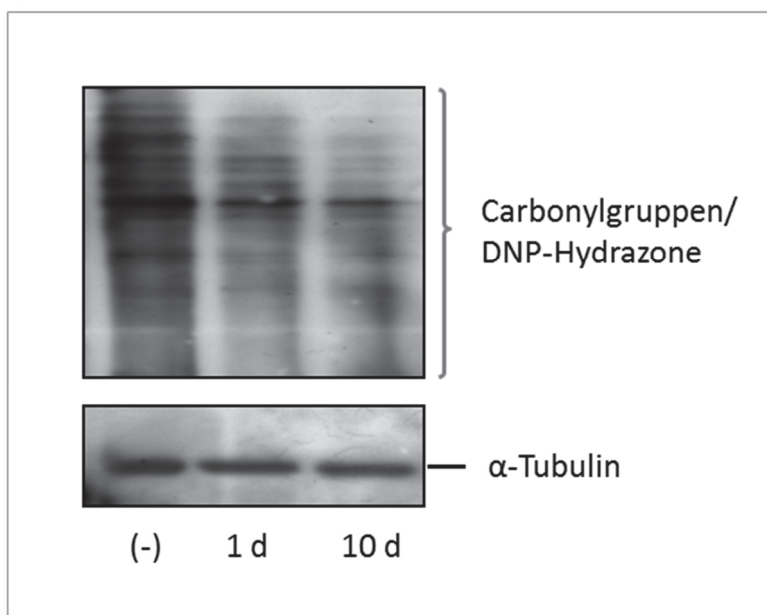


Abb. 3.16 Einfluss von CNP auf den oxidativen Status von Zellen des Tumorgewebes *in vivo*
Immundefizienten Mäusen wurden A375 Melanomzellen injiziert (Xenograft-Model). Eine Versuchsgruppe wurde nach Tag 1 der Tumorzellinjektion über einen Zeitraum von 30 Tagen jeden zweiten Tag mit CNP (0,1 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Bei einer zweiten Versuchsgruppe wurde erst 10 Tage nach der Tumorzellinjektion mit der CNP-Behandlung begonnen. Als Kontroll-Gruppe dienten Mäuse, die nicht mit CNP behandelt wurden. Aus den entnommenen Tumoren wurden Zellysate hergestellt. Der Gehalt an carbonylierten Proteinen wurde mittels Oxyblotverfahren als Marker für eine oxidative Schädigung bestimmt. CNP-Behandlung führte zu einer Abnahme der carbonylierten Proteine im Tumorgewebe. Repräsentativer Blot von drei voneinander unabhängig durgeführten Experimenten.

3.8 Toxizität von Ceroxid-Nanopartikeln in Tumorzellen beruht auf dem „Warburg-Effekt“

Krebszellen weisen im Vergleich zu normalen, gesunden Zellen einen stark veränderten Metabolismus auf. So zeigen Tumorzellen eine stark erhöhte Expression von glykolytischen Enzymen und einen hohen Glukose-Verbrauch, d.h die Glykolyse aktivität ist verglichen mit stromalen Zellen erhöht. Während der Tumorprogression kommt es im Inneren von Tumoren ab einer bestimmten Größe zu hypoxischen Zuständen, da die Sauerstoffversorgung über das Blutgefäßsystem in diesem Stadium nicht gewährleistet ist. Um die Energieversorgung weiter aufrecht halten zu können, verändern die Zellen ihren Metabolismus dahingehend, dass in hohem Maße Glykolyse betrieben wird, die auch ohne Sauerstoff ablaufen kann, und weniger die Sauerstoff-abhängige oxidative Phosphorylierung. Diese metabolische Veränderung wird vor allem durch HIF-1 reguliert, ein Transkriptionsfaktor der unter hypoxischen Bedingungen aktiv wird. HIF-1 wird außerdem durch einen erhöhten ROS-Gehalt aktiviert, was einem hypoxischen Zustand gleichkommt (Denko, 2008; Kuphal et al., 2010). Aktivierung von HIF-1 führt zu einer stark erhöhten Expression und Aktivität von Glykolyseenzymen, Glucosetransportern und der Laktat-Dehydrogenase (LDH). Außerdem fördert HIF-1 die Neoangiogenese. Auch wenn später durch Neoangiogenese die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen über Blutgefäße wieder gewährleistet wird, behalten Krebszellen diese Veränderung des Metabolismus bei. Trotz normoxischer Bedingungen zeigen Krebszellen *in vivo* und *in vitro* eine hohe Aktivität von HIF-1 und eine hohe Glykolyserate. Dieses Phänomen, das von Otto Warburg bereits 1924 beschrieben wurde, wird als „aerobe Glykolyse“ oder „Warburg Effekt“ bezeichnet. Die um ein vielfaches erhöhte Glykolyserate, führt zu einer Anhäufung von Laktat in der Zelle, was zu einem erniedrigten intrazellulären pH-Wert führt. Da die Zellen versuchen ihren normalen pH aufrechtzuerhalten, wird Laktat aus der Zelle herausgeschleust, was nachfolgend zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raums durch Laktat führt. Neue Studien zeigten eine pH-Abhängigkeit von SOD- und Catalase-Aktivität der Partikel (Perez et al., 2008; Heckert et al., 2008; Pirmohamed et al., 2010), die eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkweise von CNP in stromalen Zellen bzw. Tumorzellen liefern könnte.

Daher wurde im Folgenden der Laktat-Gehalt von Tumorzellen und stromalen Zellen bestimmt, um Unterschiede im intrazellulären bzw. extrazellulären pH-Wertes der Zellen nachzuweisen. Eine Laktat-Bestimmung des Zellkulturüberstandes von unbehandelten HDF als exemplarisches Beispiel für stromale Zellen der Haut und von unbehandelten A375 Zellen als Beispiel für Tumorzellen wurde mit dem Lactat-Assay-Kit durchgeführt. In Abb. 3.17 sind die Mittelwerte mit S.E.M. von drei

voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt. In HDF-Zellkulturüberständen wurden durchschnittlich 35 nM Laktat gemessen, während in Überständen von A375 Tumorzellen im Durchschnitt fast 50 nM gemessen wurde. Damit ist der Laktat-Gehalt des Zellkulturüberstandes von A375 Zellen um das 1,4-fache höher als der von HDF. Dieser signifikante Unterschied lässt darauf schließen, dass die Anhäufung von Laktat aufgrund der erhöhten Glykolyserate in Tumorzellen zu einer Ansäuerung des Cytosols und im nachfolgendem auch zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raumes führt und damit in der Tat Unterschiede der intra- und extrazelluläre pH-Werte für die hier verwendeten stromalen Zellen und Tumorzellen angenommen werden müssen. Demzufolge könnte die pH-Abhängigkeit der Ceroxid-Nanopartikel ursächlich an den selektiven Effekten in Tumorzellen und stromalen Zellen beteiligt sein. Dies ist Gegenstand von weiteren geplanten Untersuchungen.

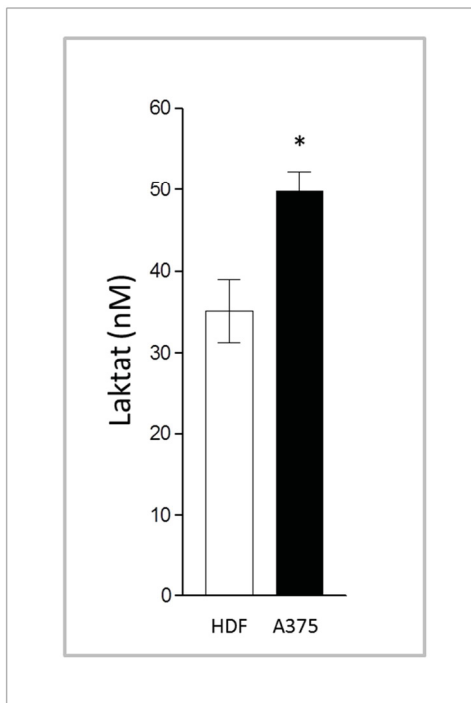


Abb. 3.17 Laktatmessung Die Laktat Konzentration in Zellkulturüberständen von HDF und A375 Zellen wurden mit dem Lactate Assay Kit (Cayman) in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. In Überständen der Tumorzellen wurde mehr Laktat (nM) gemessen als in HDF-Überständen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.. * $p \leq 0,05$; Student's t-Test.

4 Diskussion

Tumorzellen zeigen im Vergleich zu normalen Zellen einen basal erhöhten intrazellulären ROS-Gehalt. Ein neuer Ansatz in der Krebsforschung ist es, den veränderten Redoxstatus von Tumorzellen für therapeutische Zwecke auszunutzen und zu modulieren, um bessere Strategien im Kampf gegen Krebs zu entwickeln. Daher wurde in dieser Studie die Wirkung von redox-aktiven Ceroxid-Nanopartikeln in SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen und A375 Melanomzellen untersucht.

4.1 CNP vermitteln cytotoxische und anti-invasive Effekte in Tumorzellen

Die Wirkung, beziehungsweise eine mögliche Toxizität von Ceroxid-Nanopartikeln wird derzeit kontrovers diskutiert. Einige Studien deuten auf cytotoxische Effekte von CNP hin (Park et al., 2007; Eom & Choi, 2009; Lin et al., 2006), wohingegen andere protektive Effekte beschreiben (Perez et al., 2008; Chen et al., 2006). Zu Beginn dieser Studie wurde daher zunächst die Toxizität von Ceroxid-Nanopartikeln in den Tumorzelllinien SCL-1 und A375, sowie in humanen dermalen Fibroblasten (HDF), als repräsentativer Zelltyp des Stromas der Haut, untersucht. Für eine potentielle therapeutische Anwendung der Partikel bei Krebserkrankungen ist es von großer Wichtigkeit auch die Wirkung von CNP auf normale Zellen zu untersuchen, um mögliche Nebenwirkungen und Risiken abschätzen zu können. Bei herkömmlichen, systemischen Chemotherapien treten oft unerwünschte Nebenwirkungen auf, welche auf der Schädigung normaler, gesunder Zellen beruhen und daher die Behandlung, bezüglich der Dauer und der Dosis, einschränken (Perrino et al., 2012; McWhinney et al., 2009; Lechner & Weltermann, 2009). Bei der Entwicklung neuer, effektiverer Medikamente ist die Verträglichkeit ein wichtiger Aspekt der Krebsforschung.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zeigten keine toxischen Effekte von CNP in humanen dermalen Fibroblasten. Tendenziell konnte sogar eher eine Zunahme der Zellviabilität von Fibroblasten nach CNP-Behandlung festgestellt werden. Innerhalb der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Brenneisen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass CNP keine Toxizität in zwei Endothelzelllinien (HMEC-1 und EA.hy 926) aufweisen (Laura Witsch, unveröffentlichte Daten). Dahingegen zeigten CNP bei den gleichen Konzentrationen

(50 und 150 μM) cytotoxische Effekte in beiden Tumorzelllinien (SCL-1 und A375). In Tumorzellen wurde eine signifikante Abnahme der Zellviabilität nach CNP-Behandlung beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass CNP toxisch in Tumorzellen wirken, während die Viabilität von Stromalen Zellen nicht beeinträchtigt wird. CNP besitzen eine spezifische, selektive Wirkung auf Tumorzellen. Eine zellspezifische Wirkung von CNP konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass CNP in Brustepithelzellen eine radioprotektive Wirkung ausüben, während in Brustkrebszellen keine Radioprotektivität beobachtet wurde (Colon et al., 2009). Diese Selektivität bietet sehr gute Voraussetzungen für einen therapeutischen Einsatz von Ceroxid-Nanopartikeln. Nachdem eine toxische Wirkung der Partikel festgestellt worden war, welche auf Tumorzellen beschränkt war, wurde der Einfluss von CNP auf die Invasion von Tumorzellen untersucht. CNP zeigten in beiden Tumorzelllinien anti-invasive Effekte. Die Invasion der Plattenepithelkarzinomzellen und der Melanomzellen wurde signifikant verringert. Durch Untersuchungen im Rahmen der Doktorarbeit von Sarah Teuber (Arbeitsgruppe Prof. Brenneisen) konnte gezeigt werden, dass CNP die Formation des Myofibroblasten und die damit verbundene Freisetzung von pro-invasiven Faktoren verhindern und somit auch indirekt die Invasion von Tumorzellen inhibieren (Alili et al., 2011). Auf die gleiche Weise wird durch die Behandlung von Fibroblasten mit Antioxidantien die Transdifferenzierung zum Myofibroblasten verhindert und die Tumordinvasion indirekt inhibiert. Im Gegensatz zu CNP wird die Invasion von Tumorzellen jedoch gefördert, wenn Tumorzellen direkt mit den Antioxidantien behandelt werden (Alili et al., 2011).

Für eine therapeutische Anwendung in der Krebstherapie scheinen Ceroxid-Nanopartikel aufgrund ihrer selektiv cytotoxischen und anti-invasiven Wirkung prädestiniert zu sein. Allerdings werfen diese Erkenntnisse die Frage auf, wodurch diese Selektivität begründet ist und durch welche zugrundeliegenden Mechanismen die toxischen und anti-invasiven Effekte vermittelt werden.

4.2 Aufnahme

Sowohl elektronenmikroskopische Analysen als auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit FITC-gekoppelten Ceroxid-Nanopartikeln konnten die intrazelluläre Aufnahme der Partikel in die hier verwendeten Tumorzellen, SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen und A375 Melanomzellen, bestätigen. Die Partikel wurden im Cytosol beider Zelllinien lokalisiert. Im Zellkern konnten keine Ceroxid-

Nanopartikel nachgewiesen werden. Die Aufnahme der Partikel erfolgte innerhalb weniger Stunden. Für Melanomzellen wurde nach vier Stunden bereits eine Verteilung über das gesamte Cytosol beobachtet. Wahrscheinlich werden CNP sofort nach Exposition von den Zellen aufgenommen und akkumulieren dann im Cytosol. In anderen Studien mit Ceroxid-Nanopartikeln konnte eine Aufnahme nach drei Stunden bestätigt werden (S. Singh et al., 2010). Darüber hinaus wurde auch die Aufnahme von CNP in humane dermale Fibroblasten gezeigt (Alili et al. 2011). Die Ergebnisse deuten auf eine intrazelluläre Wirkung von CNP hin. Die Wirkung verschiedener anderer Nanopartikel ist im Gegensatz dazu auf Rezeptor-vermittelte Effekte zurück zu führen, da die Partikel nicht in die Zelle aufgenommen werden (Albrecht et al., 2004; Weißenberg et al., 2010). Rezeptor-vermittelte Effekte können für die hier untersuchten Ceroxid-Nanopartikeln nicht ausgeschlossen werden, darüber hinaus muss jedoch auch eine intrazelluläre Wirkung angenommen werden.

4.3 Cytotoxische und anti-invasive Effekte von CNP sind ROS-abhängig

In den hier untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen und Melanomzellen zeigten Ceroxid-Nanopartikel cytotoxische und anti-invasive Effekte. Im Weiteren sollte geklärt werden, welche zugrundeliegenden Mechanismen die Effekte von CNP in Tumorzellen vermitteln. Mehrere Studien mit Ceroxid-Nanopartikel deuten auf redox-aktive Eigenschaften der Partikel hin. Es sind sowohl antioxidative, als auch prooxidative Effekte von CNP in verschiedenen Zelltypen beschrieben. In Lungenkarzinomzellen und in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) wurden prooxidative Effekte von CNP beobachtet (Lin et al., 2006; Park et al., 2007; Eom & Choi, 2009). Antioxidative Effekte von Ceroxid-Nanopartikeln konnten in humanen Fibroblasten und retinalen Neuronen gezeigt werden (Perez et al., 2008; Chen et al., 2006). In zellfreien Systemen wurde eine Superoxiddismutase- und Catalase-mimetische Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel festgestellt (Heckert et al., 2008; Pirmohamed et al., 2010). Um festzustellen, ob die hier beobachteten cytotoxischen und anti-invasiven Effekte von CNP auf redox-aktive Eigenschaften der Partikel zurückzuführen sind und eventuell durch ROS-abhängige Prozesse vermittelt werden, wurde der Einfluss von CNP auf die extrazelluläre und intrazelluläre ROS-Bildung, sowie auf oxidative Schädigung der Tumorzellen untersucht.

Die Untersuchungen ergaben, dass CNP in den hier untersuchten Tumorzellen eine redox-aktive Wirkung ausüben. Sowohl der intrazelluläre als auch der extrazelluläre

ROS-Gehalt der Tumorzellen war nach CNP-Behandlung stark erhöht. Auch eine durch CNP-verursachte oxidative Schädigung von Proteinen wurde nachgewiesen. Ceroxid-Nanopartikel zeigten deutliche prooxidative Effekte in beiden Tumorzelllinien. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CNP sehr schnell zu einem Anstieg von ROS in Tumorzellen führen, da bereits nach 4 stündiger CNP-Behandlung eine starke Erhöhung der durch die Tumorzellen freigesetzten H_2O_2 -Menge festgestellt wurde. Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass es direkt nach Exposition mit CNP zu einem sofortigem Anstieg von ROS in SCL-1 kommt (M. Sack, unveröffentlichte Daten). Nach längeren Inkubationszeiten nahm der ROS-Gehalt ab, blieb jedoch im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle auch noch nach 48 Stunden erhöht. Die zeitabhängige Abnahme des ROS-Gehalts könnte durch das endogene antioxidative Schutzsystem der Zellen begründet sein, das nach einiger Zeit die durch CNP erhöhten ROS-Menge etwas kompensieren kann. Andernfalls ist vorstellbar, dass die Redox-aktivität der Partikel über die Zeit etwas nachlässt.

Als Folge des erhöhten ROS-Gehalts wurden in den Tumorzellen erhöhte Mengen der Untereinheit alpha (α) des Transkriptionsfaktors HIF-1 gefunden. HIF-1 α wird durch Erhöhung von ROS, was einer Form von Hypoxie gleichkommt, stabilisiert und akkumuliert dadurch in der Zelle (Denko, 2008; Kuphal et al., 2010). Zusammen mit der Untereinheit beta (β) bildet HIF-1 α einen dimeren Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen, wie zum Beispiel fast aller Glykolyse-Enzyme und dem Glukose-Transporter (GluT-1), aktiviert (Scholz, 2004; Vaupel, 2004). Die Stabilisierung von HIF-1 α und die dadurch verstärkte Wirkung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch CNP deutet darauf hin, dass der durch CNP bedingte Anstieg von ROS Auswirkungen auf die Signaltransduktion in Tumorzellen haben. So ist beschrieben, dass die Aktivierung von HIF-1 zu einem veränderten Metabolismus in Tumorzellen führt, der von Otto Warburg als „aerobe Glykolyse“ beschrieben wurde. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der glykolytischen Aktivität (Warburg, 1956; H. Lu et al., 2002). Ferner muss angenommen werden, dass auch andere redox-sensitive Signaltransduktionswege durch CNP beeinflusst werden. Der CNP-bedingte Anstieg der ROS-Menge führte in Plattenepithelkarzinomzellen und Melanomzellen zu einer oxidativen Schädigung von Proteinen. Es wurden sowohl vermehrt carbonylierte Proteine als auch oxidierte Thiolgruppen von Cysteinen nachgewiesen. Die hier beobachteten Effekte von CNP auf die Oxidation von Proteinen ähneln denen der durch H_2O_2 induzierten Proteinoxidation und stützen die Hinweise auf eine prooxidative Wirkung in Tumorzellen. Carbonylierte Proteine sind ein allgemeiner Marker für Proteinoxidation, während die Oxidation von Cysteinen die sehr spezifische Reaktion von H_2O_2 mit Thiolgruppen zu sulfenischen Säuren (-SOH) ist (Seo & Carroll, 2009; Eaton, 2006). Die durch CNP-bedingte Bildung von

sulfenischen Säuren in den hier untersuchten Zellen weist darauf hin, dass es sich bei den durch CNP-gebildeten ROS um H_2O_2 handelt. Dieses Ergebnis stimmt mit den zuvor diskutierten Ergebnissen der extrazellulären H_2O_2 -Messungen überein. In SCL-1 Zellen wurde außerdem eine leichte Abnahme der Menge an carbonylierten Proteinen detektiert, nachdem nach 24 Stunden ein Maximum der Erhöhung erreicht war. Bei den A375 Zellen war das Maximum bereits nach 4 Stunden erreicht. Die zeitabhängige Abnahme wurde auch in den Messungen des H_2O_2 -Gehalts beobachtet. Zusammen deuten die Ergebnisse auf eine CNP bedingte Akkumulation von H_2O_2 in Tumorzellen hin, die im Weiteren in einer Schädigung von Proteinen und vermutlich auch anderer Makromoleküle resultiert und schließlich zum Absterben der Tumorzellen führt. Cytotoxische Effekte, die über eine Erhöhung des H_2O_2 -Gehalts vermittelt werden, wurden auch bei Polystyren-Nanopartikeln in kolorektalen Adenokarzinomzellen (Caco-2) beobachtet (Thubagere & Reinhard, 2010).

Tumorprogression und hohe Aggressivität von Tumorzellen ist assoziiert mit einer erhöhten Caveolin-1-Expression. Die Expression von Cav-1 wird durch ROS beeinflusst. Hydroxylradikale erhöhen die Expression von Cav-1 und fördern damit die Invasion und Migration von Tumorzellen. Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen vermindern die Expression von Cav-1 und wirken damit inhibierend auf die Tumorprogression. Da innerhalb dieser Studie bereits anti-invasive Effekte von CNP sowie eine Zunahme von ROS beobachtet wurden, sollte geklärt werden, ob diese Effekte über die Cav-1 Expression reguliert werden. Die Untersuchungen zeigten eine Abnahme der Caveolin-1-Mengen in den Tumorzelllinien SCL-1 und A375 nach CNP-Behandlung. Da nur H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu einem Cav-1 *break down* führen, ist anzunehmen, dass es sich bei den über CNP gebildeten ROS um H_2O_2 und / oder $\text{O}_2^{\cdot-}$ handelt und nicht um OH^{\cdot} . Diese Ergebnisse stimmen mit den vorherigen Untersuchungen überein, da bereits eine Zunahme von H_2O_2 und eine H_2O_2 -spezifische Schädigung von Proteinen nachgewiesen wurde. Demnach resultieren die anti-invasiven Effekte von CNP wahrscheinlich auf der Zunahme von H_2O_2 .

Ein weiterer Hinweis dafür, dass CNP nicht zur Bildung von OH^{\cdot} führen, lieferten Untersuchungen der Lipidperoxidation in SCL-1 Zellen (M. Sack, unveröffentlichte Daten). Bei der Lipidperoxidation kommt es zur einer Kettenreaktion, die meist über das Hydroxylradikal gestartet wird und über Zwischenstufen zu Lipidhydroperoxiden führt, welche weitere Oxidationsreaktionen hervorrufen können. In den Untersuchungen wurde keine Erhöhung von Lipidhydroperoxiden nach CNP-Behandlung festgestellt. Auch in anderen Studien konnte trotz einer CNP-bedingten Erhöhung des ROS-Gehalts keine durch CNP-induzierte Lipidperoxidation festgestellt

werden (Horie et al., 2011). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass keine Hydroxylradikale durch CNP entstehen.

Interessanterweise konnten in stromalen Zellen, in dermalen humanen Fibroblasten (HDF) und in zwei Endothelzelllinien (HMEC-1 und EA.hy 926), keine prooxidativen Effekte von CNP festgestellt werden. Im Gegenteil wurde eine antioxidative Wirkung von CNP in diesen Zellen nachgewiesen (Dissertation, Sarah Teuber, Laura Witsch). Übereinstimmend damit wurden in diesen Zellen auch keine toxischen Effekte von CNP beobachtet bei Konzentrationen, die in Tumorzellen bereits toxisch waren. In Fibroblasten bewirkte eine Vorinkubation mit CNP eine protektive Wirkung gegenüber exogenen prooxidativen Noxen, wie H_2O_2 oder dem Redox-Cycler Paraquat, ein Bipyridin, welches O_2^- generiert (Cocheme & Murphy, 2007; Alili et al., 2011). Auch die durch $\text{TGF}\beta 1$ -bedingte und ROS-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wurde durch CNP verhindert, was sich in den Mengen an αSMA , sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene widerspiegelte (Alili et al., 2011). Eine hohe αSMA -Expression gilt als ein Biomarker für die Myofibroblastenformation, welche mit einer erhöhten Freisetzung von proinvasiven Botenstoffen, wie beispielsweise VEGF oder IL-6, verbunden ist. Durch die Verhinderung der Transdifferenzierung wird die Invasion von Tumorzellen indirekt inhibiert, da weniger pro-invasive Signale durch den Fibroblasten ausgeschüttet werden (Cat et al., 2006; Alili et al., 2011). CNP wirkten demzufolge direkt – durch Behandlung der Tumorzellen - und indirekt – über Behandlung der Fibroblasten - inhibierend auf die invasive Kapazität von Tumorzellen (Alili et al., 2011). Bei den beobachteten antioxidativen Effekten von CNP in stromalen Zellen handelt es sich um die beschriebene Superoxid-Dismutase-mimetische Aktivität von CNP, die in zellfreien System beobachtet wurde (Korsvik et al., 2007). Das Enzym Superoxid-Dismutase katalysiert in zwei Teilreaktionen die Transition von Fibroblasten zu Myofibroblasten die Bildung von H_2O_2 aus O_2^- , welches in einer weiteren Reaktion durch das Enzym Catalase zu H_2O und O_2 detoxifiziert werden kann (Pirmohamed et al., 2010). Bei der $\text{TGF}\beta 1$ - bedingten Transdifferenzierung kommt es über die NAD(P)H-Oxidase zur Bildung von O_2^- (Cat & Brenneisen, 2009), welches dann möglicherweise durch die SOD-Aktivität der Partikel abgebaut wird (Alili et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die cytotoxische Wirkung von CNP in Tumorzellen vermutlich über den durch CNP-vermittelten ROS-Anstieg und die dadurch verursachte Schädigung vermittelt wird. Bei den durch CNP erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies handelt es sich um H_2O_2 . Ferner konnte gezeigt werden, dass CNP in stromalen Zellen keine Cytotoxizität zeigen und keine prooxidativen Effekte auftreten, sondern eine antioxidative Wirkung von CNP beobachtet wurde, die

auf die bereits in zellfreien Systemen entdeckte SOD-mimetische Aktivität von CNP zurück geführt werden kann (Korsvik et al., 2007).

4.4 Toxizität von CNP in Tumorzellen wird über Apoptose vermittelt

Seit langer Zeit ist bekannt, dass Apoptose, der „programmierte Zelltod“, unter anderem durch ROS induziert werden kann (Simon et al., 2000; Luanpitpong et al., 2012). Verschiedene Studien zeigen, dass die Toxizität von prooxidativ wirkenden Nanopartikeln über Apoptose vermittelt wird (Ramkumar et al., 2012, W.Gao et al., 2011). Daher wurde untersucht, ob die hier beobachteten cytotoxischen Effekte über Apoptose vermittelt werden. Dazu wurden spezifische Biomarker für Apoptose untersucht, zu denen die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, die Caspase-3-Aktivität und die Spaltung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase gehörten.

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol gilt als ein frühes Ereignis der Apoptose, welches über ROS induziert werden kann (Takahashi et al., 2004; Kawiak et al., 2012). Die Cytochrom C-Freisetzung wird hauptsächlich über den intrinsischen Weg der Apoptose induziert, kann aber auch im sogenannten *cross talk* über den extrinsischen Weg durch das Protein *BH3-only* (Bid) induziert werden (Garrido et al., 2006). Cytochrom C bildet mit dem *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) und Caspase-9 einen Komplex, der auch Apoptosom genannt wird. Durch die Bildung dieses Komplexes wird die Caspase-9 autokatalytisch über Spaltung aktiviert und kann damit weitere Caspasen, sogenannte Effektor-Caspasen, aktivieren und die Apoptose unwiderruflich induzieren. Eine dieser Effektor-Caspasen ist Caspase-3 (Dawson & Dawson, 2004). Ein Substrat der Caspase-3 ist die Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP), die zu den DNA-Reparatur-Enzymen gehört. PARP wird proteolytisch durch die Caspase-3 in zwei Fragmente gespalten und dadurch inaktiviert (Decker & Muller, 2002).

Die Untersuchungen der apoptotischen Signaltransduktion ergaben, dass eine Behandlung mit CNP in Tumorzellen zur Freisetzung von Cytochrom C, einer erhöhten Aktivität der Caspase-3 und zur Spaltung von PARP führte. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die Toxizität von CNP in den hier untersuchten Tumorzellen über den apoptotischen Signalweg vermittelt werden. Die vorherigen Untersuchungen zeigten eine CNP-abhängige Zunahme von ROS. Daher ist anzunehmen, dass durch die von CNP generierten ROS die Apoptose induzieren. Diese Vermutung wird dadurch

unterstützt, dass A375 Zellen, die mit H₂O₂ behandelt wurden, ebenfalls einen Anstieg von Cytochrom C zeigten. Ähnliche ROS-abhängige Effekte und eine daraus resultierende Induktion der Apoptose über Cytochrom C Freisetzung wurden auch für Titandioxid-Nanopartikel beschrieben. (Ramkumar et al., 2012). In einer Studie mit Polystyren-Nanopartikeln konnte gezeigt werden, dass es durch eine Partikelbedingte Erhöhung von H₂O₂ die Apoptose in Tumorzellen induziert wurde (Thubagere & Reinhard, 2010). Bei der durch CNP-bedingten und über ROS-vermittelten Apoptose wird der intrinsische Weg der Apoptose induziert, da eine Cytochrom C-Freisetzung ins Cytosol zu beobachten war und die Analysen zur Aufnahme der Partikel eine cytosolische Verteilung von CNP zeigen, was auf eine intrazelluläre Wirkung hindeutet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Cytochrom C-Freisetzung über den oben genannten *cross talk* mit dem extrinsischen Weg der Apoptose ausgelöst wird, da in vorherigen Untersuchungen auch ein extrazellulärer Anstieg von H₂O₂ beobachtet wurde.

4.5 CNP inhibieren das Tumorwachstum *in vivo* und verändern den Redoxstatus des Tumorgewebes

Bislang wurden Ergebnisse diskutiert, die auf *in vitro*-Untersuchungen basieren. Natürlich stellte sich die Frage, ob die *in vitro* beobachteten Effekte von CNP auch im Organismus auftreten. Die Effekte von CNP waren *in vitro* je nach Zelltyp sehr unterschiedlich. So zeigten CNP in Tumorzellen prooxidative und cytotoxische Effekte, während in stromalen Fibroblasten und Endothelzellen eine antioxidative und protektive Wirkung festgestellt wurde (Alili et al., 2011). Aus diesen Gründen war es umso wichtiger, die Wirkung von Ceroxid-Nanopartikeln auch im Organismus zu untersuchen. Es wurde ein murines Xenograft-Modell für die *in vivo* Untersuchungen ausgewählt, das dank einer Kooperation von dem Department of Experimental Pathology des Mayo Clinic College of Medicine in Rochester, Minnesota angefertigt wurde. Die Injektion der Zellen und das Isolieren der Tumore übernahmen Dr. Shailendra Giri und seine Arbeitsgruppe. Die Arbeitsgruppe von Suzanne M. Hirst (Department of Biomedical Science and Pathobiologie, Virginia Tech, Blacksburry, VA 24061, USA) konnte außerdem nachweisen, dass CNP, welches Mäusen intraperitoneal injiziert wurde, in der Haut der Mäuse nachgewiesen werden konnte. Dabei handelte es sich um Mengen zwischen 12-20 ng CNP/g Hautgewebe (Alili et al., 2011). Für das Xenograft-Modell wurden immundefizienten Nacktmäusen (NCr-nu/nu) subkutan A375 Melanomellen injiziert. Die Tumore von Mäusen, denen

nach Injektion der Tumorzellen CNP (0,5 mg/kg Körpergewicht) jeden zweiten Tag verabreicht wurden, waren deutlich kleiner als die der unbehandelten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis zeigt, dass Ceroxid-Nanopartikel das Tumorstadium auch *in vivo* inhibieren und somit ein geeignetes Mittel in der Krebstherapie darstellen. Mehrere *in vivo* Studien mit Mäusen zeigten auch, dass durch CNP bei einer Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht keine adversen Effekte auftraten (Colon et al., 2009; Hirst et al., 2011).

Der Gehalt an carbonylierten Proteinen wurde als Marker für oxidativen Stress und eine Veränderung des Redoxstatus des Tumorgewebes analysiert (Yan & Forster, 2010). Tumore von Mäusen, die mit CNP behandelt wurden, enthielten weniger carbonylierte Proteine als die Tumore von Mäusen aus der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis erscheint zunächst etwas widersprüchlich, da in vorherigen *in vitro* Untersuchungen eine Zunahme der carbonylierten Proteine durch CNP in Tumorzellen festgestellt wurde. Im Tumorgewebe sind allerdings nicht nur Tumorzellen zu finden, sondern auch stromale Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen (Löffek et al., 2006). In Fibroblasten zeigten CNP in Rahmen anderer Untersuchungen (Dissertation Sarah Teuber, Alili et al., 2011) keine Zunahme von carbonylierten Proteinen, sondern eher eine protektive Wirkung gegenüber der Proteinoxidation durch exogene Noxen. Daher kann die Abnahme an carbonylierten Proteinen im Tumorgewebe unter anderem durch die Anwesenheit von stromalen Zellen erklärt werden, in denen CNP nachweislich nicht zu einer Proteinoxidation führen. Zum anderen muss bedacht werden, dass in den *in vivo* und *in vitro* Experimenten völlig andere Zeiträume untersucht wurden. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die Zellen maximal 48 Stunden mit CNP behandelt. Der höchste Gehalt von carbonylierten Proteinen, also die stärkste oxidative Proteinschädigung, wurde nach 24 Stunden in SCL-1 Zellen und nach bereits 4 Stunden in A375 Zellen gemessen, danach nahm der Gehalt wieder ab. Die Mäuse wurden insgesamt 30 Tage mit CNP behandelt. Demnach ist auch denkbar, dass über einen so langen Zeitraum der Gehalt an carbonylierten Proteinen auch in Tumorzellen weiter abnimmt, da oxidierte Proteine nach einer gewissen Zeit proteasomal abgebaut werden. Insbesondere carbonylierte Proteine werden abgebaut, da es sich bei einer Carbonylierung um eine irreversible Schädigung handelt (Dalle-Donne et al., 2006). Die genaue Ursache für den im Tumorgewebe erniedrigten Gehalt an oxidierten Proteinen kann hier ohne weitere Untersuchungen nicht genau geklärt werden, dennoch deutet dieses Ergebnis auf eine redox-aktive Wirkung der Partikel *in vivo* hin, die Einfluss auf den Redoxstatus der Zellen im Tumorgewebe haben. Weitere Untersuchungen des Tumorgewebes zeigten, dass Tumore von CNP-behandelten Mäusen weniger von Blutgefäßen durchwachsen

waren als die der unbehandelten Mäuse, was dafür spricht, dass CNP die Neoangiogenese *in vivo* und damit die Tumorprogression inhibiert (L. Alili, unveröffentlichte Daten).

4.6 Die pH-abhängige selektive Wirkung von CNP – eine Hypothese

Tumorzellen zeigen einen veränderten Metabolismus im Vergleich zu normalen Zellen. Sie sind metabolisch hoch aktiv, da sie aufgrund der gesteigerten Proliferation einen hohen Energiebedarf haben. Warburg erkannte 1924, dass Tumorzellen einen hohen Glukoseverbrauch und eine hohe Laktatproduktion aufweisen. Ferner zeigen Tumorzellen eine stark erhöhte Expression von glykolytischen Enzymen. Während der Tumorprogression kommt es im Inneren von Tumoren zu hypoxischen Zuständen, da die Sauerstoffversorgung über das Blutgefäßsystem in diesem Stadium nicht gewährleistet ist. Um die Energieversorgung weiter aufrecht halten zu können, verändern die Zellen ihren Metabolismus dahingehend, dass in hohem Maße Glykolyse betrieben wird, die auch ohne Sauerstoff ablaufen kann, und weniger die Sauerstoff-abhängige oxidative Phosphorylierung (Scholz, 2004). Diese metabolische Veränderung wird vor allem durch HIF-1 reguliert, einen Transkriptionsfaktor, der unter hypoxischen Bedingungen aktiv wird (Denko, 2008; Kuphal et al., 2010). Auch wenn durch Neoangiogenese die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen über Blutgefäße wieder gewährleistet wird, behalten Krebszellen diese Veränderung des Metabolismus bei. Trotz normoxischer Bedingungen zeigen Krebszellen *in vivo* und *in vitro* eine hohe Aktivität von HIF-1 und eine hohe Glykolyserate (Gatenby & Gillies, 2004). Dieses Phänomen, das von Otto Warburg beschrieben wurde, wird als „aerobe Glykolyse“ oder „Warburg Effekt“ bezeichnet. Die um ein vielfaches erhöhte Glykolyserate, führt zu einer Anhäufung von Laktat in der Zelle, was zu einem erniedrigten intrazellulären pH-Wert führt. Da die Zellen versuchen ihren normalen pH-Wert aufrechtzuerhalten, wird Laktat aus der Zelle herausgeschleust, was dann auch zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raums durch Laktat führt (Warburg, 1956; Lu et al., 2002; Semenza et al., 2008; Gatenby & Gillies, 2004). Dieses Phänomen wird auch in Tumorzellkulturen beobachtet. Die Tumorzellen behalten diese metabolische Modifikation bei. *In vivo* führt die Azidifizierung zu einer Schädigung, der den Tumor umgebenden Zellen, während die Tumorzellen selbst nicht beeinträchtigt werden. Durch die Schädigung der umliegenden stromalen Zellen wird die Invasion der Tumorzellen gefördert (Gatenby & Gillies, 2004).

Neue Studien zeigten eine pH-Abhängigkeit der SOD- und Catalase-Aktivität von Ceroxid-Nanopartikeln (Perez et al., 2008; Heckert et al., 2008; Pirmohamed et al., 2010). Da Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen aufgrund der erhöhten Laktatproduktion einen leicht erniedrigten pH-Wert zeigen, lassen sich die unterschiedlichen Effekte von CNP in Tumorzellen und stromalen Zellen von CNP durch eine pH-Abhängigkeit der Redox-aktivität von CNP erklären.

Durch die Kooperation mit Sudipta Seal und seiner Forschungsgruppe (Advanced Materials Processing and Analysis Center, Nanoscience and Technology Center (NSTC), Mechanical, Materials Aerospace Engineering (MMAE), University of Central Florida, Orlando, Florida 32816, USA) wurde die pH-Abhängigkeit der SOD- und der Catalase- Aktivität überprüft. Dazu wurde die Aktivität der Partikel im zellfreien System bei verschiedenen pH-Werten (pH 3 und pH 7) gemessen. Es stellte sich heraus, dass sowohl SOD-Aktivität als auch die Catalase-Aktivität von CNP pH-abhängig sind. In beiden pH-Werten konnte eine SOD-Aktivität nachgewiesen werden, jedoch war sie bei pH 3 etwa doppelt so hoch als bei einem pH-Wert von 7. Bei der Catalase- Aktivität verhielt es sich genau umgekehrt. Es wurde eine niedrigere Aktivität bei saurem pH gemessen als bei einem pH von 7. Natürlich sind keine derart niedrigen pH-Werte in Tumorzellen zu erwarten, aber die Experimente zeigen dennoch eine deutliche pH-Abhängigkeit der hier verwendeten Partikel und lassen vermuten, dass auch bei nicht so drastischen Unterschieden des pH-Werts in Zellen diese Effekte auftreten (Alili et al., 2011). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Laktat-Gehalt von A375 Zellkulturen und von HDF Zellkulturen miteinander verglichen. Der Laktat-Gehalt der Melanomzellkultur war signifikant erhöht gegenüber der HDF- Zellkultur. Die Anhäufung von Laktat aufgrund der erhöhten Glykolyserate in Tumorzellen führt zu einer Azidifizierung des Cytosols und im nachfolgendem dann zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raumes, was damit zu Unterschieden der intra-und extrazellulären pH-Werte für die hier verwendeten stromalen Zellen und Tumorzellen führt. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen der HIF-1 α -Mengen in SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen und humanen dermalen Fibroblasten. Während in SCL-1 Zellen HIF-1 α nachgewiesen werden konnte, wurde in Fibroblasten kein HIF-1 α detektiert (Alili et al., 2011). Da über HIF-1-Aktivierung der Phänotyp der „aeroben Glykolyse“ gefördert wird (Scholz, 2004; Vaupel, 2004), kann vermutet werden, dass die Laktatproduktion in SCL-1 Zellen höher ist als in HDF und damit der intra- und extrazelluläre pH von SCL1 etwas erniedrigt ist gegenüber dem von HDF Zellen. Folglich kann die pH-Abhängigkeit von CNP ursächlich an den selektiven oder spezifischen Effekten in Tumorzellen und stromalen Zellen beteiligt sein. Dann ist vorstellbar, dass CNP aufgrund des leicht erniedrigten pH in Tumorzellen eine erhöhte SOD-Aktivität besitzen, jedoch eine

verringerte Catalase-Aktivität aufweisen. In stromalen Zellen wäre die Situation im Vergleich zu den Tumorzellen umgekehrt. In stromalen Zellen ist die Catalase-Aktivität höher als in Tumorzellen. Demzufolge kommt es in Tumorzellen aufgrund der hohen SOD-Aktivität zu einer Akkumulation von H_2O_2 , während in stromalen Zellen, das über die SOD-Reaktion entstandene H_2O_2 durch die erhöhte Catalase-Aktivität zu H_2O und O_2 abgebaut werden kann. Da in Tumorzellen stark erhöhte Mengen H_2O_2 gemessen wurden, erscheint diese Hypothese plausibel. Die Akkumulation von H_2O_2 in Tumorzellen führt dann zu den hier beschriebenen oxidativen Schäden und cytotoxischen Effekten von CNP.

Die SOD-Aktivität ist bei niedrigeren pH-Werten höher (Alili et al., 2011). Die Ursache ist bisher nicht bekannt. Jedoch muss demnach die SOD-Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel in Tumorzellen höher sein als in normalen Zellen. Denkbar ist, dass die zweite Teilreaktion der SOD unter sauren Bedingungen besser abläuft, da für diesen Teilschritt Protonen (H^+) benötigt werden (siehe Abb. 1.5), die im sauren pH in größerer Anzahl vorliegen als bei höheren pH-Werten. Demnach läuft in stromalen Zellen die zweite Teilreaktion der SOD weniger stark ab und es wird nicht so viel H_2O_2 entstehen verglichen mit Tumorzellen. Dann würde es in normalen Zellen zwar durch die erste Teilreaktion zur Detoxifikation von $O_2^{\cdot-}$ kommen, weniger jedoch zur Bildung von H_2O_2 , da weniger Protonen für die zweite Teilreaktion zur Verfügung stehen als in Tumorzellen. Das H_2O_2 , was dennoch gebildet würde, wenn auch im geringeren Maß als in Tumorzellen, würde dann über die Catalase-Aktivität von CNP weiter abgebaut werden. Dies ist eine Hypothese, sie liefert jedoch eine mögliche Erklärung dafür, dass CNP in stromalen Zellen antioxidativ und in Tumorzellen prooxidativ wirken. Der Nachweis der SOD- bzw. Catalase-Aktivität in Zellen gestaltete sich bisher als schwierig.

In diesem Kontext ist auch interessant, dass die CNP Behandlung in Tumorzellen zu einer Anhäufung von HIF-1 α führte, was für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 spricht. Die Aktivierung von HIF-1 durch CNP wurde bisher nur als ein weiterer Marker für einen durch CNP erhöhten ROS-Gehalt betrachtet. Als Folge der Aktivierung von HIF-1 kann jedoch eine erhöhte Glykolyse und damit verbundene Laktatproduktion in den hier untersuchten Tumorzelllinien angenommen werden. Die durch CNP weiter erhöhte Laktatproduktion würde möglicherweise den pH von Tumorzellen weiter absenken und so die prooxidative Wirkung von CNP verstärken. Auch diese Hypothese bietet einen Ansatz für weitere Untersuchungen.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden inwiefern, sich Ceroxid-Nanopartikel für eine therapeutische Anwendung von Tumorerkrankungen eignen. Die hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zeigten cytotoxische und anti-invasive Effekte von CNP in SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen und A375 Melanomzellen. Die cytotoxischen Effekte traten bei Konzentrationen auf, die für stromale Zellen (HDF) nicht toxisch waren. Demnach war die Toxizität von CNP spezifisch für Tumorzellen. Des Weiteren wurde ein starker Anstieg von H_2O_2 in beiden Tumorzelllinien als Folge der CNP-Behandlung festgestellt, der zu einer oxidativen Schädigung von Proteinen führte und somit eine prooxidative Wirkung von CNP in Tumorzellen zeigt. Die cytotoxischen und anti-invasiven Effekte konnten auf die prooxidative Wirkung von CNP zurückgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von CNP ROS-abhängig über Apoptose vermittelt wird und die Invasion ebenfalls ROS-abhängig über den *break down* von Caveolin-1 inhibiert wurde. Auch im Tierversuch wurde das Tumorwachstum durch CNP gehemmt. Basierend auf den hier beobachteten cytotoxischen und anti-invasiven Effekten in Tumorzellen scheinen CNP für einen therapeutischen Einsatz geeignet zu sein, insbesondere auch weil keine Toxizität in stromalen Zellen *in vitro* auftrat. Andere Studien mit Maus- oder Rattenmodellen zeigten ebenfalls keine Toxizität von CNP (Colon et al., 2009; Hirst et al., 2011).

Im Gegensatz zu den hier beobachteten prooxidativen Effekten in Tumorzellen wurde innerhalb einer anderen Studie (Dissertation Sarah Teuber, Alili et al., 2011) in stromalen Zellen eine antioxidative Wirkung festgestellt. Diese Beobachtungen erklären, warum CNP nur in Tumorzellen toxisch sind und offenbaren weitere vielversprechende Aspekte für eine mögliche therapeutische Anwendung. Nur Tumorzellen würden bei einer Behandlung von der schädigenden Wirkung der Partikel betroffen sein, während stromale Zellen darüber hinaus noch geschützt würden. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wären bisher keine schädigenden Nebenwirkungen von CNP zu erwarten. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig um die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären, welche die Selektivität der Wirkung bzw. die Zelltyp-abhängigen Effekte von CNP vermitteln. Darüber hinaus gibt es bisher keine Untersuchungen über eventuelle Langzeit-Effekte von CNP. Abb. 4.1 zeigt eine Übersicht der Effekte von CNP auf die unterschiedlichen Zellen.

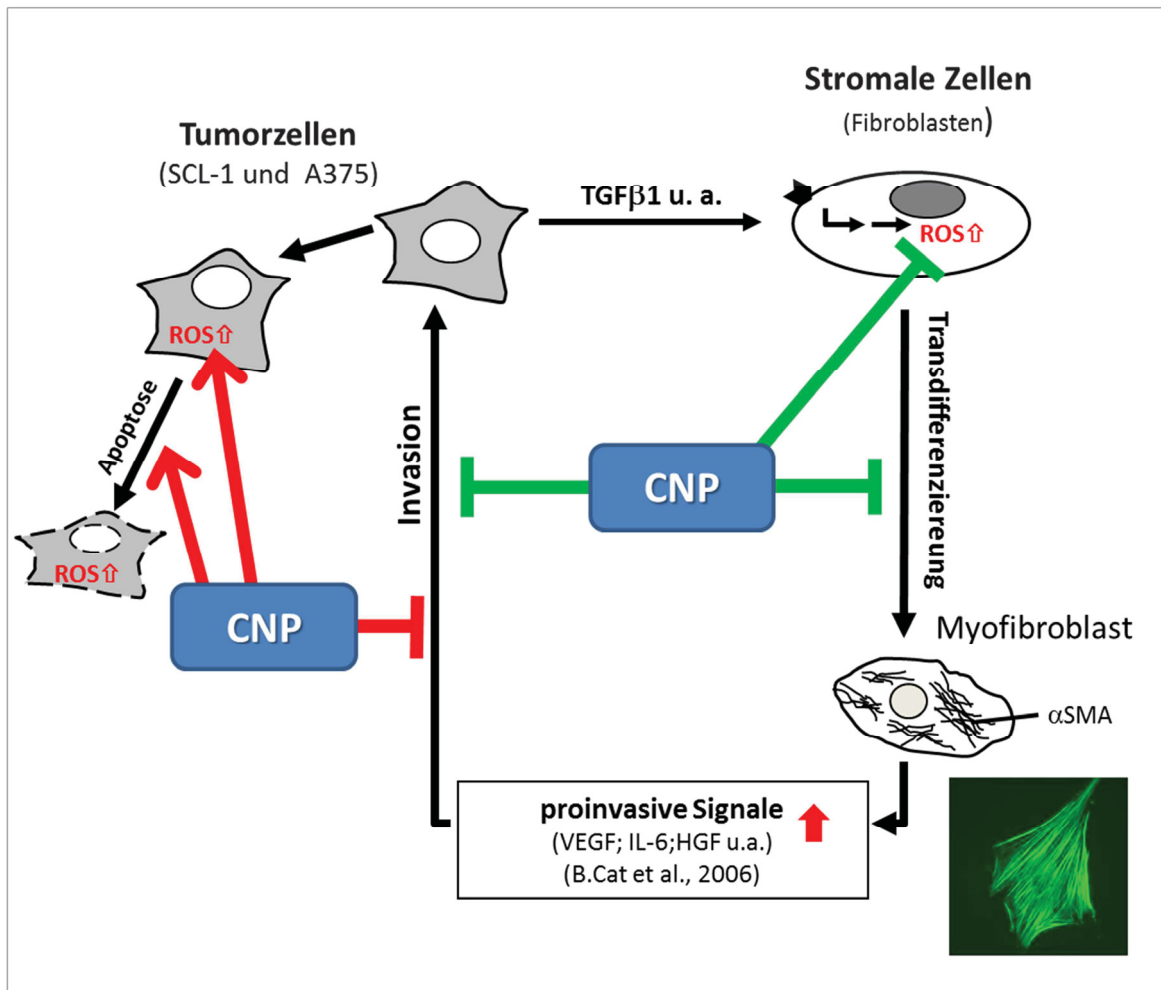


Abb. 4.1 Effekte von CNP in der Tumor-Stroma-Interaktion CNP zeigen Tumorzellen prooxidative Effekte (rot) und in stromalen Zellen antioxidative Wirkung (grün). Prooxidative Effekte führen in Tumorzellen zu einem Anstieg von ROS, wodurch die Apoptose induziert und die Invasion inhibiert wird. In stromalen Zellen wird durch die antioxidativen Effekte von CNP die TGFβ1 induzierte, ROS-abhängige Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verhindert und somit die Invasion von Tumorzellen indirekt inhibiert, da weniger invasive Signale ausgeschüttet werden. (α SMA = α smooth muscle actin; VEGF = vascular endothelial growth factor ;IL-6 = Interleukin-6; HGF = hepatocyte growth factor).

5 Perspektiven

Ceroxid-Nanopartikel zeigten im Rahmen dieser Untersuchungen sehr gute Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung bei Hautkrebs. Es wurden cytotoxische und anti-invasive Effekte in Tumorzellen *in vitro* festgestellt, die auf eine prooxidative Aktivität der Partikel zurückgeführt werden konnten. Währenddessen wurde in stromalen Zellen bei Konzentrationen, die für Tumorzellen toxisch waren, keine Cytotoxizität festgestellt. Darüber hinaus wurden im Rahmen anderer Studien antioxidative und protektive Effekte von CNP in stromalen Zellen beobachtet (Alili et al., 2011). Auch *in vivo* zeigten CNP gute Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung, da sie das Tumorwachstum und ferner die Neoangiogenese inhibieren konnten. Die zugrunde liegenden Mechanismen für die selektive Wirkung von CNP je nach Zelltyp sind bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutet wird, dass die nachgewiesene pH-Abhängigkeit der SOD- und Catalase-Aktivität eine Rolle spielt. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese zu verifizieren. Durch die Aufklärung der Mechanismen, die dieser spezifischen Wirkung von CNP auf Tumorzellen und stromale Zellen zugrunde liegen, ist eine Weiterentwicklung der Partikel hingehend einer noch höheren Effektivität oder höheren Selektivität gegen Tumorzellen denkbar. CNP zeigte einen aktivierenden Einfluss auf den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor HIF-1 in Tumorzellen. Vermutlich werden auch andere Signalwege von CNP beeinflusst. Daher bedarf es auch weiterer Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen von CNP auf die Signaltransduktion in Zellen. Bei einem möglichen Einsatz von CNP bei der Behandlung von malignen Tumoren, wäre vorstellbar, CNP als Supplementation zu konventionellen Chemotherapeutika anzuwenden. Eine derartige Supplementations-Therapie von CNP könnte die Wirkung von klassischen Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Cisplatin, unterstützen und normale Zellen vor schädigenden Nebenwirkungen schützen. Solche Ansätze könnten mit Zellkulturmodellen oder dem 3D-Hautmodell, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen weiterentwickelt wird, untersucht werden. In dieser Arbeit wurde die Wirkung auf Zellen aus Hauttumoren untersucht. Über die Wirkung von CNP auf andere Tumorzellen ist bisher wenig bekannt. Besonders interessant wäre eine mögliche Anwendung von CNP bei Hirntumoren, für die eine chemotherapeutische Behandlung aufgrund der Bluthirnschranke bisher schwierig ist. Aufgrund der geringen Größe der Partikel von 3-5 nm wäre es möglich diese Barriere zu überwinden. Ein Aspekt, der bisher noch gar nicht untersucht wurde und Möglichkeiten für weiterführende Untersuchungen bietet, sind eventuelle Langzeit-Effekte von CNP in stromalen Zellen.

6 Zusammenfassung

Die Inzidenz von Hautkrebserkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen. Die Heilungschancen bei Hautkrebs sind sehr gut, solange der Primärtumor frühzeitig entdeckt wird, jedoch sind die Behandlungsmöglichkeiten bei fortgeschrittenen Stadien mit Metastasen noch sehr begrenzt. Vor allem die Behandlung der metastasierenden Form des malignen Melanoms, dem aggressivsten aller Hauttumore, ist aufgrund der hohen Resistenz von Melanomzellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika schwierig (Soengas & Lowe, 2003). Die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit malignen Melanom und Fernmetastasen liegt bei nur 3%. Die Entwicklung neuer Therapien ist daher von großer Bedeutung. Ein neuer Ansatz in der Krebsforschung ist es, den in Tumorzellen veränderten Redoxstatus für therapeutische Zwecke zu nutzen (Montero & Jassem, 2011). Tumorzellen zeigen eine basal erhöhte ROS-Bildung im Vergleich zu normalen Zellen (Brown & Bicknell, 2001; Pelicano et al., 2004). Diese Eigenschaft kann die Tumorprogression durch eine Erhöhung der genomischen Instabilität und der Resistenz gegenüber Medikamenten fördern, verleiht den Tumorzellen andererseits auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber weiteren Erhöhungen des ROS-Gehalts (Montero & Jassem, 2011). Nanomedizin, die medizinische Anwendung von Nanotechnologie, bietet neue und vielversprechende Möglichkeiten für die Therapie von Krebs und andere Erkrankungen. In dieser Studie wurde daher die Wirkung von redox-aktiven Ceroxid-Nanopartikeln (CNP) (3-5 nm) *in vitro*, in Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) und Melanomzellen (A375), und *in vivo*, in einem murinen Xenograft-Modell mit A375 Zellen untersucht. Die *in vitro* Untersuchungen zeigten cytotoxische und anti-invasive Effekte von CNP in beiden Tumorzelllinien, bei Konzentrationen die für stromale Zellen (humane dermale Fibroblasten) nicht toxisch waren. Die Toxizität und anti-invasive Wirkung in Tumorzellen konnte auf eine prooxidative Wirkung/Aktivität von CNP zurückgeführt werden. CNP führte in Tumorzellen zu einer Anhäufung von H_2O_2 , die zu einer oxidativen Schädigung führte, und letztlich in der Apoptose der Tumorzellen resultierte. Die CNP-bedingte Bildung von H_2O_2 wurde auf eine pH-abhängige Superoxid-Dismutase mimetische Aktivität von CNP zurückgeführt. *In vivo* konnten CNP das Tumorwachstum inhibieren und den Redoxstatus des Tumorgewebes verändern. Basierend auf diesen Ergebnissen zeigen Ceroxid-Nanopartikel sehr gute Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung bei Tumorerkrankungen.

7 Summary

The incidence of skin cancers is increasing over the last decades. Surgical treatment of early skin tumors leads to high cure rates but in case of metastasis the prognosis is rather poor. Especially treatment of the metastasizing form of melanoma, the most aggressive type of skin cancer, is difficult due to its strong resistance to conventional chemotherapeutics (Soengas & Lowe, 2003) and thus the survival rate is about 3%. Compared with normal cells tumor cells show an increased intracellular ROS-level (Brown & Bicknell, 2001; Pelicano et al., 2004). High ROS-level can promote tumor progression and invasion by increasing genomic instability and resistance to chemotherapeutics, but also increase the vulnerability of tumor cell to further oxidative stress (Montero & Jassem, 2011). These facts pose a great challenge to find new approaches for the chemoprevention of tumor progression. Breaking ROS tolerance of tumor cells by either impairing their antioxidant system or further elevating their intracellular ROS-level by new therapeutics might hold a future promise as an alternative therapeutical approach. Nanomedicine, the medical application of nanotechnology, offers great potentials for development of novel therapies exploiting alterations of redox state in tumor cells. In this study the question was addressed of whether redox-active cerium oxide nanoparticles (CNP) might be a valuable therapeutical tool to counteract the invasive capacity and metastasis of tumor cells in the future. Therefore, the effect of CNP (3-5 nm) on tumor cells was investigated *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* CNP showed cytotoxic and anti-invasive effects in human squamous tumor cells (SCL-1) and melanoma cells (A375), while – at the same concentration- cell viability of human dermal fibroblasts was not affected. Cytotoxic and anti-invasive effects in tumor cells were based on a prooxidative activity of CNP in tumor cells. Elevated H₂O₂ were measured in tumor cells after treatment with CNP leading to oxidative damage of proteins and finally resulting in apoptosis of tumor cells. CNP-triggered generation of H₂O₂ is due to a pH-dependent superoxide-dismutase (SOD)-mimetic activity of CNP. Investigations with mouse model xenografted with A375 melanoma cell showed that CNP inhibit tumor growth *in vivo* as well. Furthermore, CNP modified the redox status of tumor tissue. Based on these findings, CNP might be candidate for further evaluation as chemopreventive agent against human skin cancers.

Literaturverzeichnis

Abeylath, S.C., Ganta, S., Iyer, A.K., and Amiji, M. (2011). Combinatorial-designed multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted therapeutic delivery. *Accounts of chemical research* 44, 1009-1017.

Albrecht, C., Borm, P.J., and Unfried, K. (2004). Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutation research* 553, 23-35.

Alili, L., Sack, M., Karakoti, A.S., Teuber, S., Puschmann, K., Hirst, S.M., Reilly, C.M., Zanger, K., Stahl, W., Das, S., et al. (2011). Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials* 32, 2918-2929.

Allen, R.G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free radical biology & medicine* 28, 463-499.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7915-7922.

Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.

Bawarski, W.E., Chidlow, E., Bharali, D.J., and Mousa, S.A. (2008). Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 4, 273-282.

Bayreuther, K., Francz, P.I., Gogol, J., and Kontermann, K. (1992). Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems in vivo and in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* 663, 167-179.

Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* 78, 547-581.

Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 967-975.

Bolshakov, S., Walker, C.M., Strom, S.S., Selvan, M.S., Clayman, G.L., El-Naggar, A., Lippman, S.M., Kripke, M.L., and Ananthaswamy, H.N. (2003). p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 228-234.

Bonello, S., Zahringer, C., BelAiba, R.S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., Kietzmann, T., and Gorlach, A. (2007). Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 755-761.

Boukamp, P., Tilgen, W., Dzarlieva, R.T., Breitkreutz, D., Haag, D., Riehl, R.K., Bohnert, A., and Fusenig, N.E. (1982). Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *Journal of the National Cancer Institute* 68, 415-427.

Boyer, C., Whittaker M. R., Bulmus V., Liu, J., Davis, T.P. (2010) The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications, *NPG Asia Materials* (2010) 2, 23–30; doi:10.1038/asiamat.2010.6

Brahimi-Horn, C., and Pouyssegur, J. (2006). The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bulletin du cancer* 93, E73-80.

Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., and Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10124-10128.

Brenneisen, P., Oh, J., Wlaschek, M., Wenk, J., Briviba, K., Hommel, C., Herrmann, G., Sies, H., and Scharffetter-Kochanek, K. (1996). Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochemistry and photobiology* 64, 877-885.

Brown, N.S., and Bicknell, R. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. *Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. Breast cancer research : BCR* 3, 323-327.

Burkhardt, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Hardeland, R., Cabrera, J., and Karbownik, M. (2001). DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *The international journal of biochemistry & cell biology* 33, 775-783.

Cat, B., Stuhlmann, D., Steinbrenner, H., Alili, L., Holtkotter, O., Sies, H., and Brenneisen, P. (2006). Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *Journal of cell science* 119, 2727-2738.

Cat B., Brenneisen P. (2009) Oxidative stress in tumor progression: intervention by selenium *Cell Biol Toxicol* 25: 204-208

Celardo, I., Pedersen, J.Z., Traversa, E., and Ghibelli, L. (2011). Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 3, 1411-1420.

Cerutti, P., Ghosh, R., Oya, Y., and Amstad, P. (1994). The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 10, 123-129.

Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *The Journal of biological chemistry* 275, 25130-25138.

Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 37, 949-962.

Chen, J., Patil, S., Seal, S., and McGinnis, J.F. (2006). Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nature nanotechnology* 1, 142-150.

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., and Shin, D.M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1310-1316.

Choi, J., Rees, H.D., Weintraub, S.T., Levey, A.I., Chin, L.S., and Li, L. (2005). Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *The Journal of biological chemistry* 280, 11648-11655.

Cocheme, H.M., and Murphy, M.P. (2008). Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *The Journal of biological chemistry* 283, 1786-1798.

- Colon, J., Herrera, L., Smith, J., Patil, S., Komanski, C., Kupelian, P., Seal, S., Jenkins, D.W., and Baker, C.H. (2009). Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 5, 225-231.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2006a). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of cellular and molecular medicine* 10, 389-406.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006b). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* 52, 601-623.
- Dang, C.V., Hamaker, M., Sun, P., Le, A., and Gao, P. (2011). Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med (Berl)* 89, 205-212.
- Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 36, 287-294.
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., and Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International journal of cancer Journal international du cancer* 123, 2229-2238.
- De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *The Journal of pathology* 200, 429-447.
- Decker, P., and Muller, S. (2002). Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Current pharmaceutical biotechnology* 3, 275-283.
- Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews Cancer* 8, 705-713.
- Docherty A.J., O'Connell J., Crabbe T., Angal S., Murphy G. (1992). The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol.* 10: 200-207.
- Eaton, P. (2006). Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free radical biology & medicine* 40, 1889-1899.

Eom, H.J., and Choi, J. (2009). Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicology letters* 187, 77-83.

Fang, J., Nakamura, H., and Iyer, A.K. (2007). Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of drug targeting* 15, 475-486.

Fleischmajer, R., Perlish, J.S., Burgeson, R.E., Shaikh-Bahai, F., and Timpl, R. (1990). Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 580, 161-175.

Florence, A.T. (2012). "Targeting" nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*.

Forman, H.J., and Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 166, S4-8.

Fritsch P., *Dermatologie & Venerologie für das Studium*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2009

Galanzha, E.I., Shashkov, E.V., Kelly, T., Kim, J.W., Yang, L., and Zharov, V.P. (2009). In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nature nanotechnology* 4, 855-860.

Galvin, P., Thompson, D., Ryan, K.B., McCarthy, A., Moore, A.C., Burke, C.S., Dyson, M., Maccraith, B.D., Gun'ko, Y.K., Byrne, M.T., et al. (2012). Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 389-404.

Gao, W., Xu, K., Ji, L., and Tang, B. (2011). Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicology letters* 205, 86-95.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., and Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation* 13, 1423-1433.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer* 4, 891-899.

- Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research* 39, 1529-1542.
- Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lerida, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibanez, T., Pellinen, T., Echarri, A., et al. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146, 148-163.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in cell biology* 18, 165-173.
- Grobe, A., Schneider, C., Redic, M., Schetula, V., (2008) *Nanomedizin – Chancen und Risiken; Gutachten im Auftrag der Friedrich-Ebert-Stiftung*
- Grossman, D., and Altieri, D.C. (2001). Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer metastasis reviews* 20, 3-11.
- Gullotti, E., and Yeo, Y. (2009). Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Molecular pharmaceutics* 6, 1041-1051.
- Gutteridge, J.M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological interactions* 91, 133-140.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N.J. (1996a). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *The Journal of biological chemistry* 271, 4138-4142.
- Guyton, K.Z., Xu, Q., and Holbrook, N.J. (1996b). Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *The Biochemical journal* 314 (Pt 2), 547-554.
- Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology* 70, 737-757.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics* 246, 501-514.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11, 298-300.

Harris, S.L., and Levine, A.J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899-2908.

Heckert, E.G., Karakoti, A.S., Seal, S., and Self, W.T. (2008). The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials* 29, 2705-2709.

Hersey, P., Smalley, K.S., Weeraratna, A., Bosenberg, M., Zhang, X.D., Haass, N.K., Paton, E., Mann, G., Scolyer, R.A., and Tuting, T. (2011). Meeting report from the 7th International Melanoma Congress, Sydney, November, 2010. *Pigment cell & melanoma research* 24, e1-15.

Horie, M., Nishio, K., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Yamamoto, K., Niki, E., et al. (2011). Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *Journal of biochemistry* 150, 461-471.

Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M., and Sies, H. (2003). Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 4742-4758.

Jain, K.K. (2008). Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 17, 89-101.

Jain, K.K. (2010). Advances in the field of nanooncology. *BMC medicine* 8, 83.

Joosse, A., de Vries, E., Eckel, R., Nijsten, T., Eggermont, A.M., Holzel, D., Coebergh, J.W., and Engel, J. (2011). Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *The Journal of investigative dermatology* 131, 719-726.

Kaelin, W.G., Jr., and Thompson, C.B. (2010). Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465, 562-564.

Kahari, V.M., and Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental dermatology* 6, 199-213.

Karakoti A S, Kuchibhatla S V N T, Babu K S, Seal S (2007) Direct Synthesis of Nanoceria in Aqueous Polyhydroxyl Solutions *J PhysChem C* 2007,111:17232-40

Kawiak, A., Zawacka-Pankau, J., Wasilewska, A., Stasiłojc, G., Bigda, J., and Lojkowska, E. (2012). Induction of apoptosis in HL-60 cells through the ROS-mediated

mitochondrial pathway by ramentaceone from *Drosera aliciae*. *Journal of natural products* 75, 9-14.

Kielty, C.M., and Shuttleworth, C.A. (1997). Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microscopy research and technique* 38, 413-427.

Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., and Self, W.T. (2007). Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*, 1056-1058.

Kregel, K.C., and Zhang, H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 292, R18-36.

Kuphal, S., Winklmeier, A., Warnecke, C., and Bosserhoff, A.K. (2010). Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. *Eur J Cancer* 46, 1159-1169.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lechner, D., and Weltermann, A. (2009). [Pathophysiology of chemotherapy-associated thrombosis]. *Hamostaseologie* 29, 112-120.

Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D., and Ma, Y. (2006). Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *International journal of toxicology* 25, 451-457.

Loffek, S., Zigrino, P., and Mauch, C. (2006). [Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion and metastasis]. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 4, 496-502; quiz 503.

Löffler G., *Biochemie und Pathobiochemie*. Verlag Springer, 2007

Lu, H., Forbes, R.A., and Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry* 277, 23111-23115.

Luanpitpong, S., Chanvorachote, P., Nimmannit, U., Leonard, S.S., Stehlik, C., Wang, L., and Rojanasakul, Y. (2012). Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced

keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochemical pharmacology* 83, 1643-1654.

Luanpitpong, S., Talbott, S.J., Rojanasakul, Y., Nimmannit, U., Pongrakhananon, V., Wang, L., and Chanvorachote, P. (2010). Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. *The Journal of biological chemistry* 285, 38832-38840.

Mahapatro, A., and Singh, D.K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of nanobiotechnology* 9, 55.

Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., and Boland, S. (2011). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Archives of toxicology* 85, 733-741.

Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 14, 455-463.

Matsumura, Y., and Ananthaswamy, H.N. (2002). Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, d765-783.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.

McWhinney, S.R., Goldberg, R.M., and McLeod, H.L. (2009). Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular cancer therapeutics* 8, 10-16.

Min, N.Y., Kim, J.H., Choi, J.H., Liang, W., Ko, Y.J., Rhee, S., Bang, H., Ham, S.W., Park, A.J., and Lee, K.H. (2012). Selective death of cancer cells by preferential induction of reactive oxygen species in response to (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biochemical and biophysical research communications* 421, 91-97.

Moll I., *Dermatologie*, 6. Auflage, Begründet 1989 von E.C. Jung, Thieme Verlag, 2005

Montero, A.J., and Jassem, J. (2011). Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs* 71, 1385-1396.

Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2002). Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation; research in biological diversity* 70, 486-497.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12, 913-922.

Pagano, G. (2002). Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? *Human & experimental toxicology* 21, 77-81.

Park, E.J., Choi, J., Park, Y.K., and Park, K. (2008). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 245, 90-100.

Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 7, 97-110.

Perez-Lorenzo, R., and Zheng, B. (2012). Targeted inhibition of BRAF kinase: opportunities and challenges for therapeutics in melanoma. *Bioscience reports* 32, 25-33.

Perez, J.M. (2007). Iron oxide nanoparticles: hidden talent. *Nature nanotechnology* 2, 535-536.

Perez, J.M., Asati, A., Nath, S., and Kaittanis, C. (2008). Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small* 4, 552-556.

Pericleous, P., Gazouli, M., Lyberopoulou, A., Rizos, S., Nikiteas, N., and Efstathopoulos, E.P. (2012). Quantum dots hold promise for early cancer imaging and detection. *International journal of cancer Journal international du cancer*.

Perrino, C., Schiattarella, G.G., Magliulo, F., Ilardi, F., Carotenuto, G., Gargiulo, G., Serino, F., Ferrone, M., Scudiero, F., Carbone, A., et al. (2012). Cardiac Side Effects of Chemotherapy: State of Art and Strategies for a Correct Management. *Current vascular pharmacology*.

Pirmohamed, T., Dowding, J.M., Singh, S., Wasserman, B., Heckert, E., Karakoti, A.S., King, J.E., Seal, S., and Self, W.T. (2010). Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun (Camb)* 46, 2736-2738.

Pombo, C.M., Bonventre, J.V., Molnar, A., Kyriakis, J., and Force, T. (1996). Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *The EMBO journal* 15, 4537-4546.

Poole, L.B., Karplus, P.A., and Claiborne, A. (2004). Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44, 325-347.

Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443.

Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., and West, A.B. (1999a). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *The American journal of physiology* 277, C1-9.

Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., and West, A.B. (1999b). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *The American journal of physiology* 277, C183-201.

Ramkumar, K.M., Manjula, C., Gnanakumar, G., Kanjwal, M.A., Sekar, T.V., Paulmurugan, R., and Rajaguru, P. (2012). Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*.

Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature genetics* 13, 43-47.

Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology* 17, 208-212.

Riley, P.A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology* 65, 27-33.

Ross, J.M., McIntire, L.V., Moake, J.L., and Rand, J.H. (1995). Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 85, 1826-1835.

Scherer, D., and Kumar, R. (2010). Genetics of pigmentation in skin cancer--a review. *Mutation research* 705, 141-153.

Scholz R., Medizinische Biochemie, Bd. 13,14, Verlag Zuckschwerdt, 2004

Schroeder, A., Heller, D.A., Winslow, M.M., Dahlman, J.E., Pratt, G.W., Langer, R., Jacks, T., and Anderson, D.G. (2012). Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature reviews Cancer* 12, 39-50.

Seifert, R., and Schultz, G. (1991). The superoxide-forming NADPH oxidase of phagocytes. An enzyme system regulated by multiple mechanisms. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 117, 1-338.

Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation* 118, 3835-3837.

Seo, Y.H., and Carroll, K.S. (2009). Profiling protein thiol oxidation in tumor cells using sulfenic acid-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16163-16168.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry / FEBS* 215, 213-219.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-295.

Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 311, 617-631.

Silva, A.C., Oliveira, T.R., Mamani, J.B., Malheiros, S.M., Malavolta, L., Pavon, L.F., Sibov, T.T., Amaro, E., Jr., Tannus, A., Vidoto, E.L., et al. (2011). Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *International journal of nanomedicine* 6, 591-603.

Simon, H.U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 5, 415-418.

Singh, S., Kumar, A., Karakoti, A., Seal, S., and Self, W.T. (2010). Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Molecular bioSystems* 6, 1813-1820.

Soengas, M.S., and Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138-3151.

- Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* 51, 794-798.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V.E., and Herman, B. (2004). Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain research bulletin* 62, 497-504.
- Tarnuzzer, R.W., Colon, J., Patil, S., and Seal, S. (2005). Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano letters* 5, 2573-2577.
- Terhorst D., *BASICS Dermatologie*, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2009
- Terzano, C., Di Stefano, F., Conti, V., Graziani, E., and Petroianni, A. (2010). Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *European review for medical and pharmacological sciences* 14, 809-821.
- Thubagere, A., and Reinhard, B.M. (2010). Nanoparticle-induced apoptosis propagates through hydrogen-peroxide-mediated bystander killing: insights from a human intestinal epithelium in vitro model. *ACS nano* 4, 3611-3622.
- Tse, E.Y., Ko, F.C., Tung, E.K., Chan, L.K., Lee, T.K., Ngan, E.S., Man, K., Wong, A.S., Ng, I.O., and Yam, J.W. (2012). Caveolin-1 overexpression is associated with hepatocellular carcinoma tumourigenesis and metastasis. *The Journal of pathology* 226, 645-653.
- Uong, A., and Zon, L.I. (2010). Melanocytes in development and cancer. *Journal of cellular physiology* 222, 38-41.
- van der Rest, M., and Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5, 2814-2823.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The oncologist* 9 Suppl 5, 10-17.
- Verschoor, M.L., Wilson, L.A., and Singh, G. (2010). Mechanisms associated with mitochondrial-generated reactive oxygen species in cancer. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 88, 204-219.

Vincent, A., Babu, S., Heckert, E., Dowding, J., Hirst, S.M., Inerbaev, T.M., Self, W.T., Reilly, C.M., Masunov, A.E., Rahman, T.S., et al. (2009). Protonated nanoparticle surface governing ligand tethering and cellular targeting. *ACS nano* 3, 1203-1211.

Wang, Q.P., Escudier, E., Roudot-Thoraval, F., Abd-Al Samad, I., Peynegre, R., and Coste, A. (1997). Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor-beta is involved in the pathogenesis of nasal polyps. *The Laryngoscope* 107, 926-931.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

Weber G. F., *Molecular Mechanisms of Cancer*, Springer Verlag, 2007

Weissenberg, A., Sydlik, U., Peuschel, H., Schroeder, P., Schneider, M., Schins, R.P., Abel, J., and Unfried, K. (2010). Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles. *Free radical biology & medicine* 49, 597-605.

Werth, C., Stuhlmann, D., Cat, B., Steinbrenner, H., Alili, L., Sies, H., and Brenneisen, P. (2008). Stromal resistance of fibroblasts against oxidative damage: involvement of tumor cell-secreted platelet-derived growth factor (PDGF) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation. *Carcinogenesis* 29, 404-410.

Wittgen, H.G., and van Kempen, L.C. (2007). Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma research* 17, 400-409.

Yan, L.J., and Forster, M.J. (2011). Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 879, 1308-1315.

Yuspa, S.H. (1998). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *Journal of dermatological science* 17, 1-7.

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Brenneisen für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der Dissertation danken. Darüber hinaus möchte ich mich sehr für die Unterstützung, die guten wissenschaftlichen Ratschläge und sein Verständnis bedanken. Vielen Dank!

Ebenso gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Joachim Ernst (Institut für Mikrobiologie) bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Korreferates und die sehr freundliche Betreuung.

Frau Dr. Lirija Alili danke ich herzlichst für die hervorragende Leitung der Arbeitsgruppe und die sehr hilfreiche und liebe Betreuung. Danke Lirija, dass du mich so sehr unterstützt hast und immer für alles Verständnis hattest! Eigentlich kann ich dir nicht genug danken...

Für die exzellente technische Unterstützung und die schöne Zusammenarbeit bedanke ich mich sehr bei Claudia Wyrich und Vanessa Pützer. Ihr seid die Besten!

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Sarah Teuber, Lisa Verweyen, Johanna Fromm, Laura Witsch und Martina Justen für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung sowie die lustige Zeit im Labor bedanken. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten und zu feiern!

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima danken.

Tanja, Andrea, Heide, Peter und Gilla, vielen Dank für eure Hilfe!

Sarah Wagener danke ich auch ganz besonders für ihre Hilfsbereitschaft! (Wir haben noch was zu feiern...)

Dr. Silke de Spirt und PD Dr. Holger Steinbrenner danke ich sehr für die qualifizierten wissenschaftlichen Tipps und, dass sie für Fragen immer offen waren.

Marlies Scholtes danke ich für die Unterstützung in allen organisatorischen Fragen und Thomas Becher für die Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen.

Bei allen meinen Freunden möchte ich mich ganz herzlich für alles bedanken, was ihr für mich getan habt. Ich hab jetzt auch wieder mehr Zeit. Und ich komm bald auch wieder nach Hamburg, Monilein! Tanja, danke, dass ich mich immer auf dich verlassen kann!

Liebster Tim, ich danke dir unendlich + 1, dass du immer für mich da bist! K & L!

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Manfred und Ilse Sack und meiner Schwester Carolin, die mich immer unterstützt haben und mir so viel ermöglicht haben. Vielen Dank!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Düsseldorf, Mai 2012

Datum, Ort Unterschrift

