

**Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Fritz**

**Zytotoxizität von organischen Gold(I)-Komplexen
in Krebszellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sonja Antonia Josch

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Wätjen

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Wesselborg

Meinen Eltern

I. Zusammenfassung

Da Krebs weltweit eine der führenden Todesursachen darstellt und Resistenzen und toxische Nebenwirkungen die Effektivität vorhandener Zytostatika reduzieren, ist man auf der Suche nach neuen Substanzen gegen Krebs. Goldverbindungen sind schon seit mehreren tausend Jahren bekannt und wurden zu den unterschiedlichsten Zwecken eingesetzt, bis sie schließlich in den 1980er Jahren in verschiedenen Tumorzelllinien auf ihr zytotoxisches Potenzial hin untersucht wurden, mit vielversprechendem Ausgang.

Im Rahmen dieser Arbeit sind zehn organische Gold(I)-Komplexe, davon fünf Diphosphane und fünf N-heterozyklische Carbene, auf ihre Toxizität in Krebszellen untersucht worden, welche im Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von der Arbeitsgruppe PD Peter C. Kunz synthetisiert und institutsintern mit CW bezeichnet wurden.

Von den zehn untersuchten Substanzen erwiesen sich CW143 und CW35 bis zu 72 h Inkubation mit 50 μM als nicht toxisch in Rattenhepatomzellen H4IIE und Rattengliomzellen C6. In beiden Zelllinien zeigte CW55 nur eine geringe Toxizität.

Die übrigen Substanzen wurden genauer untersucht hinsichtlich ihres apoptotischen Potenzials. Das Diphosphan **CW60** induzierte Apoptosen in H4IIE sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubation, welches sich an einer Zunahme der Chromatinkondensation und weiteren charakteristischen Kernveränderungen am Fluoreszenzmikroskop (Life-Dead-Assay), einer DNA-Fragmentierung (DNA-Leiter) und an einem Anstieg der Caspaseaktivität (ApoONE-Assay) zeigte. Bei **CW90** war nach 48 h Inkubation für 25 μM im ApoONE-Assay ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen, welcher als Nachweis apoptotischer Zellen gilt. CW165 zeigte keinen signifikanten Effekt bis zu 10 μM nach 24 h und 48 h in allen Apoptosenachweisenden Methoden. Die Carbene **CW104** und **CW109** lösten bei jeweils unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten Apoptosen aus (Life-Dead-Assay, DNA-Leiter und ApoONE-Assay). CW171a erwies sich nach 24 h Inkubation im Life-Dead-Assay bei 2,5 μM und im LDH-Assay bei 1 μM in H4IIE als primär nekrotisch. Apoptosen konnten für CW171a nicht nachgewiesen werden. Alle nachweislich apoptotisch wirkenden Substanzen erzeugten in H4IIE weder DNA-Strangbrüche (Comet-Assay) noch radikale Sauerstoffspezies (DCF-Assay). Die Zellzyklusanalyse in H4IIE ergab, dass 5 μM von CW60 und jeweils 10 μM von CW104 und CW109 einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase bewirken können. Eine eindeutige Beeinflussung eines der untersuchten Signalwege (PI3K/Akt; Nrf2; ERK; JNK) konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Laut Literatur könnte möglicherweise eine Schädigung der Mitochondrien als Auslöser apoptotischer Vorgänge in Betracht kommen.

II. Abkürzungen

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	Akt Kinase
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor 1
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bp	Basenpaar
BTB	<i>broad complex, tramtrack, and bric-a-brac</i>
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
Caspase	<i>Cysteine-aspartate specific protease</i>
CAT	Katalase
CdK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CNP	zyklischen Nukleotidphosphorylase
ddH₂O	bidestilliertes Wasser
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FAS	<i>fibroblast-associated antigen</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HWZ	Halbwertszeit
ICAD	Inhibitor von CAD

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Keap 1	<i>Kelch-like ECH associating protein 1</i>
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
pJNK	phosphorylierte JNK
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
p53	Tumorsuppressorprotein p53
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-actived protein kinase</i>
Min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
µm	Mikrometer
n	Anzahl der Versuche
NQO1	NADP(H): Chinonoxidoreduktase
Nrf2	<i>NF-E2-related nuclear factor</i>
O₂^{·-}	Superoxidanion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	<i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i>
PIP2	<i>phosphatidylinositol 4,5- disphosphate</i>
PIP3	<i>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>
PKC	Proteinkinase C
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RFU	<i>relative fluorescent units</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation buffer</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase

TBE	Tris-Borat-EDTA
tBHQ	Tertiär-Butylhydrochinon
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
VPS34	<i>homologue of the yeast vacuolar protein sorting-associated protein 34</i>

III. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Verwendung von Gold in der Medizin	1
1.1.1 Auranofin.....	2
1.1.2 Bis[1,2Bis(Diphenylphosphin)ethan]Gold(I)-Chlorid.....	4
1.2 Zelltod- Apoptose und Nekrose	6
1.3 Die Rolle von oxidativem Stress in der Apoptose und bei der Krebsentstehung	9
1.4 Intrazelluläre Signalwege	12
1.4.1 Nrf2-ARE-Signalweg	12
1.4.2 PI3K-Akt-Signalweg.....	14
1.4.3 MAPK-Signalwege.....	16
1.5 Zellzyklus	17
1.5.1 Ablauf des Zellzyklus	17
1.5.2 Regulation des Zellzyklus	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	19
1.6.1 N-methylierte-Bis(imidazolylphosphan)-Gold(I)-Komplexe	20
1.6.2 Nicht-N-methylierte-Bis(imidazolylphosphan)-Gold(I)-Komplexe	20
1.6.3 Bis(thiazolylphosphan)-Gold(I)-Komplex CW60	21
1.6.4 N-heterozyklische-Carben-Gold(I)-Komplexe	21
2. Material	22
2.1 Zelllinien	22
2.2 Medien	22
2.3 Chemikalien	22
2.4 Verwendete Antikörper	25
2.5 Sonstige Materialien	25
2.6 Geräte	26
2.7 Computersoftware	26
2.8 Lösungen und Puffer	27
3. Methoden.....	32
3.1 Zellkultur	32
3.1.1 Zelllinien	32
3.1.1.1 C6 Gliomzellen.....	32

3.1.1.2 H4IIE Hepatomzellen.....	33
3.1.2 Zellkultivierung	34
3.1.3 Kryokonservierung	35
3.2 Zytotoxizitätsnachweis MTT-Assay.....	35
3.3 Apoptose- und Nekrosenachweise	36
3.3.1 Life-Dead-Assay	36
3.3.2 DNA-Fragmentationsanalyse („DNA-Leiter“)	37
3.3.2.1 DNA-Isolierung	38
3.3.2.2 DNA-Bestimmung und DNA-Elektrophorese	38
3.3.3 ApoONE-Assay	39
3.3.4 LDH-Assay	40
3.4 Genotoxizität und oxidativer Stress	41
3.4.1 Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen	41
3.4.2 DCF-Assay im Plattenlesegerät.....	42
3.5 Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer	44
3.6 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege	44
3.6.1 Proteinisolierung	44
3.6.2 Proteinbestimmung mittels BioRad-DC Protein-Assay	45
3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	46
3.6.4 Western Blot	47
3.6.5 Proteindetektion mittels Antikörpern	48
3.6.6 Strippen von PVDF-Membranen	49
4. Ergebnisse	50
A <u>Ergebnisse zu Gold(I)-Komplexen mit Diphosphan-Liganden</u>	51
4.1 Zytotoxizitätsnachweis mittels MTT-Assays	51
4.1.1 Vorversuche zur Zytotoxizität in H4IIE	51
4.1.1.1 Zytotoxizität von Wasserstoffperoxid in H4IIE-Zellen	51
4.1.1.2 Zytotoxizität bei unterschiedlicher Konfluenz	52
4.1.2 Zytotoxizität der Gold(I)-Komplexe mit Diphosphan-Liganden in C6 und in H4IIE.....	54
4.2 Apoptosenachweise und Nekrosenachweise der Gold(I)-Komplexe mit Diphosphan-Liganden in H4IIE	58
4.2.1 Life-Dead-Assay mit Diphosphanen	58

4.2.2	DNA-Leiter mit Diphosphanen	62
4.2.3	ApoONE-Assay mit Diphosphanen	63
4.2.4	LDH-Assay mit Diphosphanen	64
4.3	Comet-Assay mit Diphosphanen	66
4.4	Detektion von ROS mittels DCF-Assay mit Diphosphanen	67
4.5	Zellzyklusanalyse mit Diphosphanen	67
4.6	Beeinflussung von Signalwegen in H4IIE durch Diphosphane	68
4.6.1	PI3K-Akt-Signalweg	68
4.6.2	Nrf2-ARE-Signalweg	70
4.6.3	ERK-Signalweg	71
4.6.4	JNK-Signalweg	71
B	<u>Ergebnisse zu Gold(I)-Komplexen mit NHC-Liganden</u>	73
4.7	Zytotoxizität der Gold(I)-Komplexe mit NHC-Liganden in C6 und H4IIE.....	73
4.8	Apoptosenachweise und Nekrosenachweise der Gold(I)-Komplexe mit NHC-Liganden in H4IIE	78
4.8.1	Life-Dead-Assay mit Carbenen	78
4.8.2	DNA-Leiter mit Carbenen	83
4.8.3	ApoONE-Assay mit Carbenen	84
4.8.4	LDH-Assay mit Carbenen	87
4.9	Comet-Assay mit Carbenen	89
4.10	Detektion von ROS mittels DCF-Assay mit Carbenen	90
4.11	Zellzyklusanalyse mit Carbenen	91
4.12	Beeinflussung von Signalwegen in H4IIE durch Carbene	93
4.12.1	PI3K-Akt-Signalweg	93
4.12.2	Nrf2-ARE-Signalweg.....	94
4.13	Tabellarische Übersicht über die Ergebnisse aller Experimente	96
5.	Diskussion	98
5.1	Zytotoxizitätstests	98
5.2	Apoptosenachweise und Nekrosenachweise.....	101
5.3	Zusammenhang von CW60 und CW171a/b beim Zelltod.....	104
5.4	Aufnahme der Gold(I)-Komplexe in die Zelle	106
5.5	Genotoxizität und oxidativer Stress	107

5.6 Zellzyklusanalyse	108
5.7 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch Gold(I)-Komplexe.....	108
5.7.1 PI3K/Akt-Signalweg	108
5.7.2 Nrf2/ARE-Signalweg.....	109
5.7.3 MAPK-Signalwege.....	109
5.8 Zytostatika und ihre Wirkung auf Mitochondrien	110
5.9 Thioredoxinreduktase als mögliches Target für Gold(I)-Komplexe	111
5.10 Fazit und Ausblick	116
6. Literaturverzeichnis	117
7. Anhang	131
7.1 Summary	131
7.2 Rohdaten	132
7.3 Veröffentlichungen	148
- Danksagung	
- Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Verwendung von Gold in der Medizin

Bei Gold (Au) handelt es sich um ein Edelmetall der Gruppe Ib, das in den Oxidationsstufen I, II, III und V vorkommt. Au(I)-Salze sind in Wasser instabil (Übersichtsartikel: Kean und Kean, 2008). Eine Stabilisierung von Au(I) kann erreicht werden über Komplexbindungen mit sogenannten „weichen“ Liganden (Pearson, 1963) wie Thiolaten oder Phosphinen (Phosphane). Elder et al. haben 1983 herausgefunden, dass nach Injektion von Gold-Thiolaten im Gewebe Au(I) vorliegt und somit vermutet werden kann, dass Au(I) den vorherrschenden Oxidationsstatus im biologischen Milieu darstellt (Elder et al., 1983; Kean und Lock, 1983). Gold wird seit über 4000 Jahren zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt in der chinesischen und arabischen Medizin (Sadler, 1976). 1890 setzte Robert Koch Gold(I)-Dicyanid gegen Tuberkulose (Tbc) ein, jedoch wenig erfolgreich (Sutton, 1986). Schließlich wurden die Gold(I)-Dicyanid-Ionen durch die weniger toxischen Gold(I)-Thiolate bei der Therapie der Tbc ersetzt (Sadler, 1976; D'Arcy Hart, 1946). Seit 1929 setzte Fourestier intramuskulär injizierbare Gold-Thiolate wie Aurothioglukose und Natrium-Aurothiomalat auch zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis ein (Forestier, 1934). Sigler stellte später anhand von Röntgenaufnahmen fest, dass Goldsalze in der Lage sind, das Fortschreiten der Gelenkdegeneration bei Rheumatoider Arthritis zu verlangsamen (Sigler et al., 1974). In den 1980er Jahren sollten oral verabreichbare und weniger toxische Gold-Phosphin-Komplexe wie z.B. Auranofin die Thiolat-Injektionen ersetzen, da viele der Patienten unter Therapie mit Thiolaten über Nebenwirkungen klagten (Übersichtsartikel: Kean und Kean, 2008). Zu den Nebenwirkungen dieser injizierbaren Gold(I)-Komplexe zählten Hautausschläge, Aphten der Mundschleimhaut, Proteinurie und Thrombozytopenie (Kean and Anastassiades, 1979). Ein Abfall der Thrombozytenkonzentration im Blut kam hierbei entweder durch Antikörper vom IgG-Typ (Kelton et al., 1984) oder durch eine Knochenmarksuppression zustande, wobei letztere seltener beobachtet wurde (Übersichtsartikel: Kean und Kean, 2008). Außerdem wurden interstitielle Lungenerkrankungen (Winterbauer, et al., 1976) und sogar Goldablagerungen in der Augenlinse (Gottlieb und Major, 1978) und der Cornea (Panayi et al., 1978) beschrieben. Bei oral verabreichten Goldverbindungen dagegen waren Stuhlveränderungen und Diarrhoe die häufigsten Nebenwirkungen (Van Riel et al., 1983). Hautausschlag und Pruritus wurde ebenso beobachtet (Ward et al., 1983). Die Proteinurie als Nebenwirkung trat seltener auf als bei injizierbarem Gold. In seltenen Fällen führten auch orale Gold(I)-Komplexe zu einer

Thrombozytopenie, allerdings auf dem Boden einer Knochenmarksuppression, nicht durch Autoantikörper, welche bei injizierbaren Goldverbindungen häufiger auftraten (Übersichtsartikel: Kean und Kean, 2008).

Die klinischen Nebenwirkungen der Goldverbindungen und die Angst vor Langzeiteffekten auf die Immunsuppression bewirkten, dass sie seit Entdeckung der antirheumatischen Wirksamkeit des zytostatischen Tetrahydrofolsäureanalogons Methotrexat (MTX) aus der Rheumatherapie mehr und mehr verdrängt wurden (Übersichtsartikel: Kean und Kean, 2008). Heute gehören Goldverbindungen nicht mehr zu der ersten Wahl in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis. In der interdisziplinären Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie zum Management der frühen rheumatoiden Arthritis aus dem Jahre 2011 wird mittlerweile MTX aufgrund seiner Wirksamkeit und Verträglichkeit als Ersttherapie vorgeschlagen (Schneider et al., 2011). Dieser Vorschlag beruht unter anderem auch auf Ergebnissen von Menninger et al., welche nicht nur eine gute Wirksamkeit von MTX, sondern auch seine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu Gold-Natriumthiomalat in einer klinischen Studie feststellten (Menninger et al, 1998).

1.1.1 Auranofin

Der in der Rheumatherapie bedeutsame Gold-Phosphin-Komplex Auranofin stellt einen linearen Gold(I)-Komplex mit einem Triethylphosphin-Liganden und einem Tetraacetylthioglucose-Liganden dar (McKeage et al., 2002) (Abb.1 aus: Alama et al., 2009).

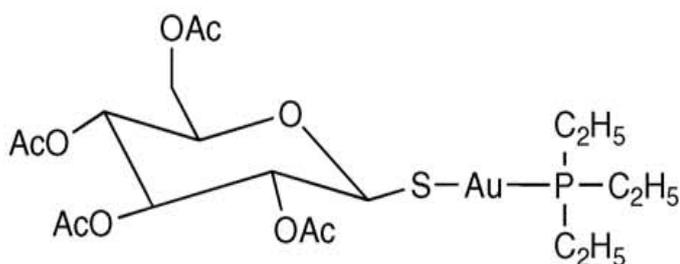


Abb.1: Strukturformel von Auranofin (aus: Alama et al., 2009).

Gegen Rheuma wurde Auranofin eingesetzt, weil es stark immunsuppressiv wirkt, indem es u.a. die Antikörper vermittelte Aktivierung des Komplementsystems und die damit assoziierte Zelllyse hemmt (Walz et al., 1983). Außerdem unterbindet es die Freisetzung lysosomaler Enzyme wie Beta-Glucuronidase und Lysozym aus stimulierten polymorphen Neutrophilen (Walz et al., 1983). Des Weiteren ist Auranofin ein Inhibitor der Superoxid-Produktion. Es

hemmt auch die lymphozytäre Immunantwort und die kutane Migration, Chemotaxis und phagozytierende Eigenschaft peripherer Blutmonozyten (Walz et al., 1983; Übersichtsartikel: Kean und Kean, 2008).

Im Jahre 1979 wurde von Simon et al. vorgeschlagen, dass Auranofin aufgrund seiner stark immunsuppressiven Wirkung auch in der Krebstherapie zum Einsatz kommen könnte (Simon et al., 1979; Crooke, 1982). Daraufhin wurde es in den frühen 1980er Jahren auf sein antikanzerogenes Potenzial auf kultivierten Tumorzellen *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich, dass es das Wachstum von Tumorzellen hemmen konnte. Analysen des Zellzyklus am Durchflusszytometer ergaben, dass es zu keiner Verschiebung zwischen den Zellzyklusphasen G1, S und G2/M kam. Es wurde aber festgestellt, dass Auranofin in der Lage war, die DNA-, RNA- und Proteinsynthese unspezifisch zu hemmen in Konzentrationen, bei denen auch morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet wurden (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002). Die Enzymhemmung erfolgte dabei wohl über Interaktion von Auranofin mit SH-Gruppen der Enzyme. Da allerdings große Konzentrationen für die Enzyminhibition benötigt wurden, war eine Hemmung der DNA-Synthese vermutlich nicht die einzige und entscheidende Erklärung für die Toxizität von Auranofin (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002).

Der antikanzerogene Wirkmechanismus anderer organischer Metallkomplexe, wie z.B. Cisplatin, das seit 1974 in die Therapie von Hodenkarzinomen integriert war (Einhorn und Donohue, 1977), ließ Raum für Spekulationen über die Wirkungsweise von organischen Goldkomplexen. Cisplatin, eine der stärksten antikanzerogenen Substanzen, bindet nach intrazellulärer Hydrolyse als Aquakomplex an DNA. Dabei kommt es einerseits zu Querverknüpfungen zwischen DNA-Strängen und andererseits zu Vernetzungen von DNA mit Proteinen, wodurch die Apoptose der Zelle eingeleitet werden kann.

Zytostatika wie Stickstoff-Lost-Verbindungen oder Nitrosoharnstoff-Derivate entfalten ihre Wirkung auch über die Alkylierung von DNA. Antibiotika wie Anthrazykline induzieren DNA-Strangbrüche. Den Wirkmechanismen dieser Zytostatika zufolge lag die Vermutung nahe, dass auch Gold-Komplexe mit DNA interagieren könnten. Untersuchungen von Auranofin bezüglich seiner Reaktivität gegenüber DNA zeigten jedoch, dass es nicht direkt mit DNA *in vitro* interagiert (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002).

Auf der Suche nach der Ursache für die Zytotoxizität von Auranofin stellte sich heraus, dass Cisplatin resistente Zellen mit veränderten Mitochondrien besonders sensibel auf Auranofin reagierten (Dong et al., 1997). Seitdem wurde untersucht, ob Auranofin über Mitochondrien

inhibierende Effekte seine Zytotoxizität entfaltet (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002). Man war auf der Suche nach Proteininteraktionen, welche die Zytotoxizität erklären könnten. Dabei wurde entdeckt, dass Auranofin die in Mitochondrien und Zytosol lokalisierte Thioredoxinreduktase hemmen kann, ein Enzym, welches Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen katalysiert (Übersichtsartikel: Barnard und Berners-Price, 2007). Kommt es zu einer Hemmung der mitochondrialen Thioredoxinreduktase, zieht dies eine Schwellung der Mitochondrien nach sich (Rigobello et al., 2002). Oxidiertes Thioredoxin akkumuliert intrazellulär und erhöht die Permeabilität der Mitochondrienmembran, wodurch schließlich apoptotische Faktoren freigesetzt werden können und die Zelle in der Apoptose zugrunde geht (Rigobello et al., 2005).

Die Aufnahme von Auranofin in die Zelle erfolgt über Ligandenaustauschreaktionen, wobei der Thioglukose-Ligand abgespalten wird und Auranofin an Thiolgruppen der Zellmembran bindet. Extrazelluläre Thiolgruppen binden ebenso an das Goldatom von Auranofin und befinden sich daher in einer Konkurrenzsituation zu den membrangebundenen Thiolgruppen. Die zelluläre Auranofinaufnahme ist somit auch abhängig von dem extrazellulären Angebot an Thiolgruppen. Neben membrangebundenen und freien extrazellulären SH-Gruppen bindet Auranofin aber auch an zytosolische und nukleäre SH-Gruppen und ist somit fähig mit intrazellulären Proteinen zu interagieren (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002). So lässt sich auch die Interaktion von Auranofin mit der Thioredoxinreduktase erklären. Im Blutserum bindet Auranofin an Albumin, indem es seinen Thioglukose-Liganden durch Albumin ersetzt (Shaw, 1999).

Wird Auranofin oral verabreicht, gelangen 25% ins Plasma (Gottlieb, 1982). Die Plasma-HWZ beträgt etwa 17-25 Tage, die totale Elimination von Auranofin ist erst nach 58-81 Tagen erfolgt (Blocka, 1983). Au(I) wird zu 75% über die Nieren ausgeschieden und zu 25% über den Gastrointestinaltrakt (Herrlinger, 1983), wodurch sich seine Nebenwirkungen auf Niere und Darm erklären lassen.

1.1.2 Bis [1,2 Bis(Diphenylphosphin)ethan] Gold(I)-Chlorid

Ein weiterer Phosphin-Komplex, der kationische tetraedrische Gold(I)-Phosphin-Komplex Bis [1,2 Bis(Diphenylphosphin)ethan] Gold(I)-Chlorid, $[\text{Au}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$ (Abb.2 aus: Alama et al., 2009), zeigte eine starke Zytotoxizität auf verschiedenen Tumorzellen *in vitro* (Berners-Price et al., 1986).

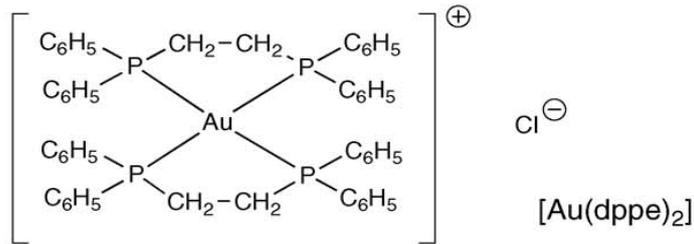


Abb. 2: Strukturformel von Bis [1,2 Bis(Diphenylphosphin)ethan] Gold(I)-Chlorid [Au(dppe)₂]Cl (aus: Alama et al., 2009)

[Au(dppe)₂]Cl war im Gegensatz zu Auranofin in der Lage, mit DNA zu interagieren und DNA-Quervernetzungen und DNA-Strangbrüche zu bewirken. Außerdem zeigte sich [Au(dppe)₂]Cl stabiler in Gegenwart von Thiol-Gruppen und Serumproteinen als Auranofin (Berners-Price et al., 1986; Berners-Price und Sadler, 1988).

[Au(dppe)₂]Cl hatte eine Mitochondrien inhibierende Wirkung in Rattenhepatozyten, welche bereits nach kurzer Exposition mit der Substanz morphologische Veränderungen ihrer Mitochondrien zeigten. Außerdem kam es zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch als Zeichen einer Entkoppelungsreaktion der Atmungskette und einer verringerten Zellviabilität, die anhand der Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase detektiert werden konnte (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002). [Au(dppe)₂]Cl wurde auch an isolierten Mitochondrien aus Rattenhepatozyten getestet. Diese zeigten nach Exposition mit [Au(dppe)₂]Cl eine Schwellung und erhöhte Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran (Smith et al., 1989).

Da der tetraedrische Gold(I)-Komplex keine Ligandenaustauschreaktionen mit Thiolen eingeht (Berners-Price et al., 1986), wird vermutet, dass die Wirkung gegen Tumorzellen auf die lipophilen und kationischen Eigenschaften des Komplexes zurückzuführen ist, die eine Akkumulation in Mitochondrien mit konsekutiver Permeabilitätserhöhung der inneren Mitochondrienmembran bewirken. Diesem Mitochondrien inhibierenden Effekt wird eine größere Bedeutung bei der zytotoxischen Wirkung von [Au(dppe)₂]Cl zugeschrieben als die Induktion von DNA-Strangbrüchen und DNA-Proteinvernetzungen (Übersichtsartikel: McKeage et al., 2002).

In Tierversuchen erwies sich [Au(dppe)₂]Cl letztendlich aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie als stark kardiotoxisch und hepatotoxisch, sodass es trotz seiner vielversprechenden antikanzerogenen Wirkung als Chemotherapeutikum nicht infrage kommen konnte (Barnard und Berners-Price, 2007).

Der Schlüssel zu der zytotoxischen Wirksamkeit wurde in der Balance zwischen Hydrophilie und Lipophilie vermutet. Daher wurden die Phenylsubstituenten an $[\text{Au}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$ ersetzt durch verschiedene Substituenten u.a. auch durch Pyridylgruppen, um die Lipophilie des Komplexes und damit ggf. seine Kardio- und Hepatotoxizität zu mindern. Das antikanzerogene Potenzial der Komplexe war jedoch abgeschwächt, nach Austausch des Phenylsubstituenten gegen andere Reste am Phosphin-Liganden (Berners-Price et al., 1990). Wurde Au(I) gegen Ag(I) oder Cu(I) ausgetauscht, blieb die Aktivität des Phosphins erhalten, nicht jedoch bei anderen Metallen wie z.B. Pt(II) oder Pd(II). In diesen Fällen waren die Dppe-Komplexe sogar noch weniger aktiv als die Phosphine allein (Übersichtsartikel: Barnard und Berners-Price, 2007).

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden immer neue Goldkomplexe mit unterschiedlichen Liganden synthetisiert, die sich in ihrer Lipophilie und Hydrophilie unterschieden. Sie wurden in Zellkultur auf ihr toxisches Verhalten getestet. Entscheidend für ihre Aktivität war das Verhältnis von Lipophilie und Hydrophilie.

Es wurden nicht nur Goldkomplexe mit Phosphin-Liganden synthetisiert, sondern auch N-heterozyklische Carbene, von denen im Rahmen dieser Arbeit auch einige auf ihr zytotoxisches Potenzial untersucht wurden.

Auf der Suche nach potenziell zytotoxischen Substanzen spielt die Art des Zelltodes eine große Rolle. Ziel ist es, Substanzen zu finden, welche einen apoptotischen Zelltod auslösen, der nicht wie bei der Nekrose mit einer Entzündungsreaktion assoziiert ist. Hauptziel muss es sein, Zytostatika zu entwickeln, die spezifisch Krebszellen abtöten und dabei möglichst eine geringe toxische Wirkung auf gesunde Körperzellen haben. Ein entscheidender Schritt dahin ist es zu verstehen, wodurch Apoptose in der Zelle ausgelöst wird und weshalb Krebszellen sich häufig durch eine gestörte Regulation der Apoptose auszeichnen. Erst dann ist es möglich, mit zytostatischen Substanzen gezielt bestimmte Krebszellen anzugreifen.

1.2 Zelltod – Apoptose und Nekrose

Es werden zwei Arten des Zelltodes unterschieden: Apoptose und Nekrose.

Bei der **Apoptose** (griechisch: apo = los, ptosis = Senkung, Niedergang) handelt es sich um einen programmierten Zelltod. Die Apoptose ist nicht nur von entscheidender Bedeutung bei der Embryogenese, der Abschilferung und Erneuerung von Darmepithel oder der Reifung immunkompetenter T-Zellen im Thymus, sondern sie ist auch im Kampf gegen entartete

Zellen bedeutsam. Es handelt sich bei der Apoptose um einen aktiven ATP-abhängigen Prozess, bei dem sich einzelne Zellen aus dem Zellverband lösen und zugrunde gehen. Diese Zellen weisen meist DNA-Schäden auf oder sind bereits entartet, sodass die Apoptose den Organismus vor Krebs schützen kann. Bei dem Vorgang der Apoptose werden bestimmte biochemische und morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet. Es kommt zu einer Chromatinkondensation, nukleären DNA-Fragmentation mit Bildung von Fragmenten definierter Länge (180Bp), Zellabrundung, Zellschrumpfung und Abschnürung von Membranvesikeln, sogenannten apoptotischen Körperchen (*Zeiose* oder *Blebbing*). Diese werden von phagozytosefähigen Zellen aufgenommen und eliminiert. Erkannt werden die apoptotischen Zellen durch die Phagozyten anhand der Umkehr von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zytoplasmamembran (Fabisiak et al., 1998; Übersichtsartikel: Matés und Sánchez-Jiménez, 2007).

Bei der **Nekrose** handelt es sich um einen passiven Prozess, der durch eine Schädigung der Zellen durch exogene Noxen ausgelöst wird, wie z.B. Hypoxie, Ischämie, Hyperthermie, Vergiftung, Strahlung oder mechanische Verletzungen. Auch eine Schädigung der Zellmembran kann eine Nekrose induzieren. Die morphologischen Veränderungen bei der Nekrose unterscheiden sich von denen der Apoptose dahingehend, dass die Zelle durch die erhöhte Permeabilität ihrer Zellmembran anschwillt. Es kommt ebenso zu einer Schwellung der Mitochondrien, Auflockerung des Chromatins und DNA-Fragmentierung. Diese geschieht aber zufällig, sodass Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Es kommt zur Zelllyse und dadurch zur Freisetzung von Enzymen und Metaboliten, die in der Umgebung der Zelle eine Entzündungsreaktion hervorrufen und Immunzellen wie Makrophagen oder Granulozyten anlocken, welche Zellreste phagozytieren.

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der Apoptose gegenüber der Nekrose ist die Intaktheit der Zellmembran in der frühen Phase der Apoptose, wodurch intrazelluläre Substanzen nicht aus der Zelle gelangen können. Bei der Nekrose dagegen bleibt die Zellmembran nicht intakt, wodurch eine Entzündungsreaktion in der Umgebung ausgelöst wird (Melino und Vaux, 2010). Diese Besonderheit kann man nutzen, um am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe membrangängiger und nichtmembrangängiger Farbstoffe die beiden verschiedenen Arten des Zelltodes in der Anfangsphase unterscheiden zu können.

Die Apoptose kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, u.a. durch DNA-Schäden (induziert z.B. durch oxidativen Stress oder ionisierende Strahlung), durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, Hormonmangel oder den Verlust von Zell-Zell-Kontakten, durch

Glukokortikoide (Matés und Sánchez-Jiménez, 2007) oder durch sog. Todesliganden wie z. B. den *fibroblast-associated antigen* (Fas)-Liganden, der über die Bindung an seinen Todesligand-Rezeptor die Apoptose der Zelle einleitet.

Es werden zwei Signaltransduktionswege unterschieden - ein **extrinsischer** und ein **intrinsischer** Weg.

Auf beiden Wegen werden intrazelluläre Cysteinproteinasen aktiviert, die sog. Caspasen, welche Proteine hinter Aspartatresten schneiden. Beim Menschen wurden 14 verschiedene Caspasen aktiviert, von denen 7 an der Apoptose beteiligt sind. Sie liegen als Proenzyme (Zymogene) vor, die dann durch Proteolyse aktiviert werden. Unterschieden werden Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen (Caspasen 2/8/9/10) aktivieren Effektorcaspasen (Caspasen 3/6/7), indem sie deren Prodomäne abspalten. Effektorcaspasen spalten schließlich zahlreiche Substrate wie zytoplasmatische Faktoren (Proteinkinasen, Zytoskelettelemente) und nukleäre Proteine (Poly-ADP-Ribosylpolymerase (PARP), Lamin, *BH3-interacting domain death agonist* (Bid), DNase-Inhibitoren, DNA-Reparaturproteine).

Der **extrinsische Weg** wird über Todesrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)-Familie ausgelöst, zu welcher der TNF α -Rezeptor und der Fas-Rezeptor zählen. Besonders in Tumorzellen ist eine Auslösung der Apoptose über *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren möglich. Da die Todesrezeptoren selbst keine enzymatische Aktivität aufweisen, werden auf der zytoplasmatischen Seite Adapterproteine rekrutiert. Im Falle des Fas-Liganden (FasL) kommt es nach seiner Bindung an den Rezeptor zur Oligomerisierung und anschließenden Bindung von *Fas-associated death domain* (FADD) an den Rezeptor, woraufhin es dann intrazellulär zur Bildung eines *Death-inducing signalling complex* (DISC) kommt mit nachfolgender Aktivierung der Caspase 8. Die Caspase 8 kann aber auch autokatalytisch aktiviert werden durch eine hohe Konzentration aktiver Enzyme. Caspase 8 aktiviert schließlich die Effektorcaspase 3. Ebenso kann Caspase 10 an FADD binden und die Apoptose auslösen (Melino und Vaux, 2010; Adams J.M., 2003).

Der **intrinsische Signalweg** kann entweder rezeptorabhängig oder rezeptorunabhängig eingeleitet werden. Beispielsweise DNA-Schäden, oxidativer Stress oder Chemotherapeutika lösen rezeptorunabhängig über den intrinsischen Signalweg die Apoptose aus.

Hierbei kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran mit einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma. Im Anschluss wird das Apoptosom gebildet aus Cytochrom c, dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1), ATP und der Procaspase 9. Es folgt die anschließende

Aktivierung der Procaspase 9 zur Initiatorcaspase 9, welche dann die Caspase 3 aktiviert (Melino und Vaux, 2010; Schmitz, 2009).

Proteine der *B-cell-lymphoma 2* (Bcl-2)-Familie regulieren die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (Simon et al., 2000). Sie wirken entweder pro- oder antiapoptotisch, indem sie die Cytochrom-c-Freisetzung fördern bzw. unterbinden. Bcl-2 selbst ist ein antiapoptotisches Molekül, das die Permeabilität blockiert (Melino und Vaux, 2010; Schmitz, 2009). *Bcl-2-associated X protein* (Bax) dagegen bewirkt direkt an den Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c über die Bildung von Ionenkanälen in der äußeren Mitochondrienmembran (Simon et al., 2000).

1.3 Die Rolle von oxidativem Stress in der Apoptose und bei der Krebsentstehung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale, Singlet-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) werden ständig im menschlichen Körper als Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels gebildet und haben u.a. die Fähigkeit direkt mit DNA, Proteinen oder Lipiden zu interagieren oder Signalwege zu modulieren.

Quellen für die Entstehung von O_2^- sind u.a. die Elektronentransportketten der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums (ER). In Mitochondrien wird die ROS-Produktion gesteigert durch Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, durch hyperbare Sauerstofftherapien oder durch das Altern der Zelle. Im ER kann die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase Elektronen auf Sauerstoff übertragen und dadurch Superoxidanionen generieren. Außerdem entstehen ROS an der Kernmembran, werden durch Autooxidation von Katecholaminen gebildet und sind nach Produktion durch Phagozyten (Neutrophile und Makrophagen) sogar an der Immunabwehr beteiligt. Enzyme, die Sauerstoff zu Superoxidanionen umsetzen können, sind z.B. die NADPH-Oxidase und die Xanthinoxidase, wobei letztere an dem Abbau von Purinen beteiligt ist. Aus Superoxidanionen kann mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) das weniger reaktive H_2O_2 gebildet werden, welches im Gegensatz zu den Anionen leicht durch Zellmembranen diffundieren kann. Intrazellulär reagiert es dann mit Fe^{2+} oder Cu^+ in der Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen unter Freisetzung von Wasser. In dem folgenden Schaubild Abb. 3 sind einige Entstehungsorte und Produktionswege von ROS sowie einige Abwehrmechanismen zusammenfassend dargestellt (Matés und Sánchez-Jiménez, 2007).

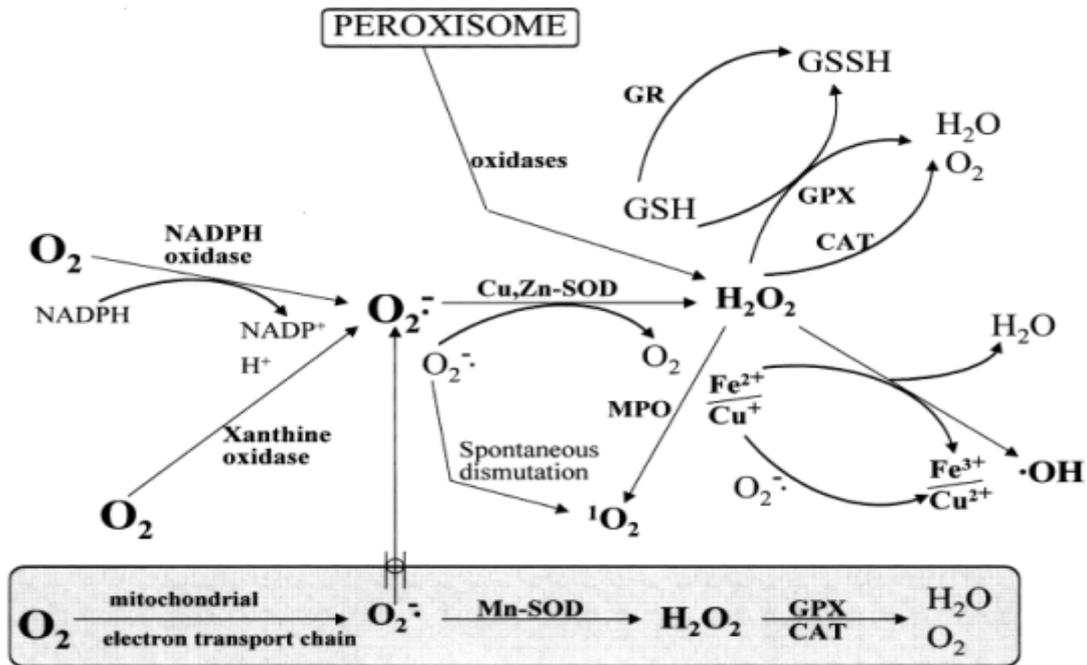


Abb. 3: Entstehung und Abwehr von radikalen Sauerstoffspezies (verändert nach: Matés und Sánchez-Jiménez, 2007)

Zelluläre antioxidative Abwehrmechanismen wirken den schädlichen Einflüssen der ROS entgegen. Dabei unterscheidet man eine enzymatische und eine nicht-enzymatische Abwehr. (Sies, 1997). Wichtige Enzyme sind z.B. Katalase (CAT), Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPX) und Thioredoxinreduktase (TrxR). Nicht-enzymatische Vertreter sind z.B. das Tripeptid Glutathion, NADPH, Urat oder die exogen zugeführten Vitamine: Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol α) oder Vitamin A (Retinal, Retinol, Retinsäure). Nimmt die Generierung von ROS Überhand gegenüber dem Abbau, ist die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt (Sies, 1997). Umwelteinflüsse wie ionisierende Strahlung, toxische Substanzen oder mikrobielle Infektionen können oxidativen Stress bewirken (Gius und Spitz, 2006; Surh et al., 2008).

Ihm wird eine Bedeutung bei der Entstehung bestimmter Krankheiten wie z.B. Krebs, neurodegenerativen Erkrankungen oder Arteriosklerose zugeschrieben (Übersichtsartikel: Itoh et al., 2004), (Abb.4 aus Matés und Sánchez-Jiménez, 2007).

ROS bewirken in der Zelle einerseits DNA-Schäden wie Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche und Basenschäden, welche zu Mutationen und Aktivierung von Onkogenen führen können, und andererseits Proteinschäden, welche die Reparatur von DNA-Schäden mindern könnten. Außerdem hemmen ROS Antiproteasen und induzieren die Lipidperoxidation.

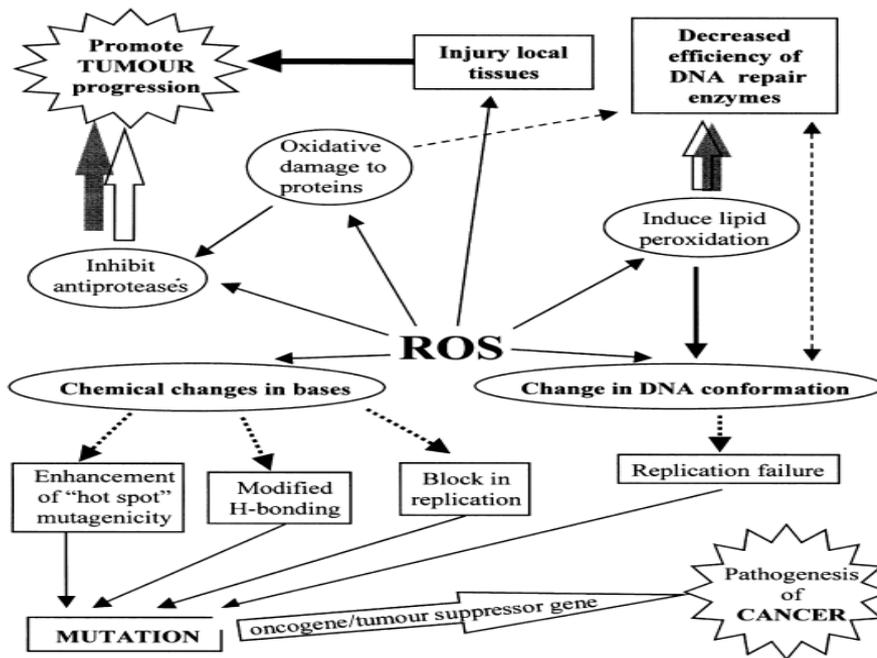


Abb. 4: Angriffspunkte von ROS in der Zelle (aus: Matés und Sánchez-Jiménez, 2007)

Herrscht in der Zelle oxidativer Stress, hat sie mehrere Möglichkeiten darauf zu reagieren.

Es kann zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase kommen. Dann kann die DNA-Reparatur durch Basenexzision oder Nukleotidexzision in Gang gesetzt werden, und Signalwege können angeschaltet werden. Die Reaktion der Zelle entscheidet dann darüber, ob diese nekrotisch oder apoptotisch zugrundegeht.

Das Protein p53 kann nach DNA-Schädigung einen Zellzyklusarrest bewirken, der Zelle somit genügend Zeit für eine Reparatur des Schadens geben oder aber die Apoptose induzieren. Liegt eine Mutation dieses Tumorsuppressorgens vor, wie das z.B. in Lungenkrebszellen oder kolorektalen Tumorzellen der Fall sein kann, so wird nach DNA-Schädigung der Zellzyklus nicht mehr angehalten und auch keine Apoptoseinduktion bewirkt. Die durch oxidativen Stress induzierten DNA-Schäden können daraufhin u.a. über eine fehlerhafte Replikation und Transkription eine Entartung der Zelle begünstigen (Übersichtsartikel: Matés und Sánchez-Jiménez, 2007). ROS beeinflusst einerseits über DNA-Schädigung die Apoptoseinduktion. Andererseits wird darüber hinaus vermutet, dass ROS die Phosphorylierung einiger Apoptose regulierender Enzyme beeinflussen kann und dadurch ebenfalls in die Apoptoseinduktion involviert ist. Auch eine Modulation der Poren der äußeren Mitochondrienmembran wurde diskutiert (Simon et al., 2000).

Eine verstärkte Genexpression antioxidativer Enzyme könnte folglich den durch oxidativen Stress induzierten pathologischen Prozessen entgegenwirken. Eine wichtige Rolle spielt dabei

der Nrf2-ARE-Signalweg, der zum Teil durch prooxidative Phytochemikalien aktiviert wird (Surh et al., 2008).

1.4 Intrazelluläre Signalwege

1.4.1 Nrf2-ARE-Signalweg

Antioxidative und Phase II detoxifizierende Enzyme werden in Zellen verstärkt exprimiert, wenn die Zellen mildem oxidativem Stress, elektrophilen Verbindungen oder phenolischen Antioxidantien ausgesetzt werden. In der Promotorregion von Genen für Phase II Enzyme wie z.B. Glutathion S-Transferase (GST), NADP(H): Chinonoxidoreduktase (NQO1) befindet sich eine DNA-Sequenz, die für die Induktion dieser Gene benötigt wird. Sie wurde *Antioxidant Response Element* (ARE) genannt (Übersichtsartikel: Zhang, 2006). ARE kann durch viele strukturell verschiedene Chemikalien aktiviert werden wie z.B. planare Polyphenole (Hydroxyzimtsäuren oder Flavonoide) (Rushmore et al., 1991), thiolhaltige Verbindungen (Talalay et al., 1995) Schwermetalle (Prester et al., 1995) oder Häm-Komplexe (Ren und Smith, 1995; Inamdar et al., 1996) (Übersichtsartikel: Nguyen, 2003). Diese Induktoren haben eine Gemeinsamkeit: Sie besitzen die Fähigkeit mit Thiol/Disulfid-Gruppen zu reagieren durch Alkylierung, Oxidation, Reduktion oder Thiol-Austausch-Reaktionen (Übersichtsartikel: Itoh et al., 2006). Sie verstärken die Expression von Fremdstoffmetabolismus-Enzymen (Rushmore, 1990), Enzymen in der Glutathion (GSH)-Biosynthese (Wild et al., 1998) oder die Expression von Redoxproteinen mit aktiven SH-Gruppen (Kim et al., 2001; Ishii et al., 2000). Da die Induktoren nicht direkt mit ARE interagieren, werden Proteine benötigt, die an das ARE binden können. Es handelt sich um *Basic region leucin zipper transcription factors* (bzip)-Proteine, die als Homodimer oder Heterodimer mit ARE in Kontakt treten (Abb.5). Der Transkriptionsfaktor *NF-E2-related nuclear factor* (Nrf2) gehört zu den bzip-Proteinen. Er kommt sowohl im Zytosol, gebunden an *Kelch-like ECH associating protein 1* (Keap1), als auch im Nukleus vor, wo er als Heterodimer im Komplex mit Maf-Proteinen an DNA binden kann. Nrf2 enthält 6 Domänen, Neh1 bis 6 (Zhang, 2006). Davon bindet die Domäne Neh2 an sein Repressorprotein Keap1 im Zytosol (Itho et al., 1999). Keap1 ist ein zytosolisches Kelch-Protein und Zink-Metalloprotein mit 3 Domänen, einer N-terminalen *broad complex, tramtrack, and bric-a-brac* (BTB)-Domäne für die Homodimerisierung von Keap1 (Zipper und Mulcahy, 2002), einer Linker-Region und einer C-terminalen Kelch-Domäne (Zhang, 2006). Dieses Protein bindet einerseits an Aktin und ist somit mit dem Zytoskelett der Zelle verankert und andererseits über Neh2 an Nrf2. Nrf2 wird dadurch im Zytosol gehalten (Zhang, 2006).

Keap1 ist ein Bestandteil einer E3-Ubiquitin-Ligase, welche Proteine an ihren Lysinresten ubiquitinyliert und für den Abbau durch das Proteasom markiert. Lysinreste in der Neh2 Region des Nrf2 dienen der Ubiquitinylierung durch die Keap1-Cul3-Ubiquitin-Ligase. Unter homöostatischen Bedingungen wird Nrf2 proteasomal abgebaut. Nrf2 hat ohne Keap eine Halbwertszeit (HWZ) von 2,7 h und mit Keap nur noch eine HWZ von 0,6 h (Zhang, 2006).

Die Ubiquitin-Ligase kann durch oxidativen Stress und elektrophile Verbindungen gehemmt werden. Unter oxidativem Stress befindet sich in der Zelle eine erhöhte Menge Nrf2 im Nukleus, welches dort Heterodimere mit Maf-Proteinen formt und die ARE abhängige Genexpression einleitet als antioxidative Antwort (Zhang, 2006).

Das Homodimer Keap 1 enthält viele Cysteinreste, die wohl als Sensoren für oxidativen Stress oder auch für die oben genannten Induktoren des Nrf2/ARE-Signalweges fungieren (Dinkova-Kostova et al., 2002). Es wird diskutiert, ob die Interaktion der Induktoren mit dem Komplex aus Nrf2 und Keap1 eine Konformationsänderung an Keap1 bewirken kann und damit eine Inhibition der Ligase auslöst, sodass Nrf2 in den Nukleus wandern kann. Weiter steht zur Diskussion, ob durch die direkte Interaktion der Induktoren mit den Cysteinresten im Keap1 eine Dissoziation des Nrf2-Proteins von Keap1 ausgelöst wird (Zhang, 2006). In beiden Fällen erhöht sich die zytosolische Nrf2-Konzentration, entweder durch verminderten Abbau oder durch Freisetzung aus dem Komplex mit Keap1. Diese erhöhte Konzentration ist experimentell nachweisbar und kann als Zeichen einer Signalwegaktivierung gedeutet werden.

Darüber hinaus wird diskutiert, ob Nrf2 durch Proteinkinasen, wie PKC, PI3K, MAPK phosphoryliert und aktiviert werden kann (Zhang, 2006; Kobayashi und Yamamoto, 2005).

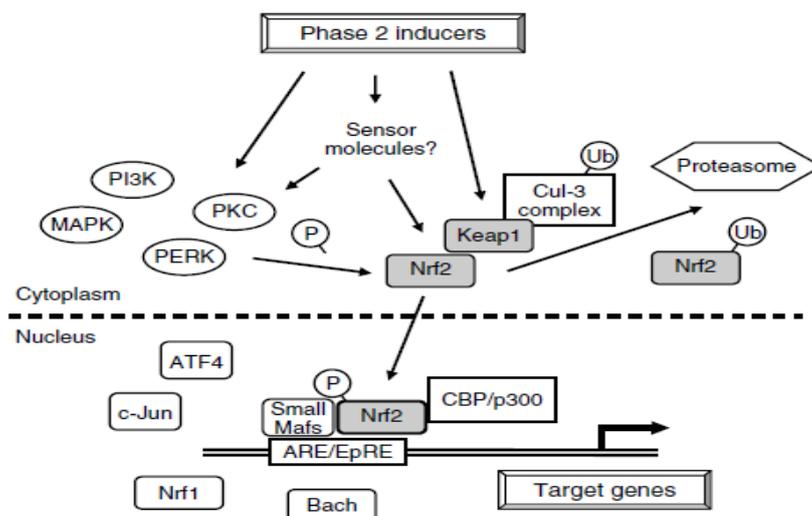


Abb. 5: Schematische Darstellung des Nrf2/ARE-Signalweges (aus Kobayashi und Yamamoto, 2005)

Neben oxidativem Stress scheinen auch Goldkomplexe einen Einfluss auf den Nrf2/ARE-Signalweg zu haben. Im Jahre 2010 wurde von Kim et al. festgestellt, dass Auranofin über eine MAPK-Aktivierung den Nrf2/ARE-Signalweg aktiviert, wodurch es zu einer verstärkten Expression des Enzyms Hämoxxygenase 1 (HO-1) kommt (Kim, 2010). Deshalb wurden auch die Gold(I)-Komplexe im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkung auf den Nrf2-Signalweg untersucht.

1.4.2 PI3K-Akt-Signalweg

Die Familie der in den 1980er Jahren entdeckten Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) ist an der Regulation des Zellüberlebens, der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt. Dabei leiten PI3K Signale von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in die Zelle, nach deren Bindung an membrangebundene Rezeptoren. Es kommt zur Bildung von *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (PIP3) aus *phosphatidylinositol 4,5- disphosphate* (PIP2) mit nachfolgender Aktivierung der Serin-Threonin-Proteinkinase Akt, auch als PKB bekannt.

PI3K werden in vier Klassen eingeteilt, von denen die ersten drei Klassen als Lipidkinasen Lipide und die vierte Klasse als Proteinkinasen Proteine phosphorylieren (Katso et al., 2001; Engelman, 2009).

Die Lipidkinasen PI3K der Klasse I werden nach Bindung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen an membrangebundene Rezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert. Sie setzen sich als Heterodimere zusammen aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit, wobei die regulatorische Untereinheit für die Bindung des Enzyms an den aktivierten Rezeptor bzw. seine Adapterproteine verantwortlich ist. Die katalytische Untereinheit katalysiert die Reaktion von PIP2 zu PIP3, welches daraufhin die nachgeschaltete Serin-Threonin-Proteinkinase Akt aktiviert (Abb.6). Ein wichtiger Inhibitor dieses Signalweges ist der Tumorsuppressor *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* (PTEN) mit intrinsischer Lipidphosphataseaktivität. Er wandelt PIP3 wieder um in PIP2, womit dann die Aktivierung der Proteinkinase Akt beendet ist (Liu et al., 2009).

PI3K der Klasse II bestehen nur aus einer katalytischen Untereinheit. Ihre Funktion in der Zelle ist bisher noch unklar (Liu et al., 2009). PI3K der Klasse III bestehen auch aus einer katalytischen Untereinheit, genannt *homologue of the yeast vacuolar protein sorting-associated protein 34* (VPS34). Dieser Lipidkinase wird eine Bedeutung zugesprochen bei der Regulation des Zellwachstums und der Regulation der Autophagie mangelernährter Zellen (Backer, 2008). PI3K der Klasse I sind die zurzeit am besten untersuchten. Über eine

Aktivierung von Akt stimulieren sie über nachfolgende Proteinphosphorylierungen die Zellzyklusprogression, das Zellüberleben, den Metabolismus und die Migration von Zellen.

Man hat entdeckt, dass in humanen Krebszellen verschiedene Komponenten dieses Signalweges mutiert sein können. Eine Mutation von PTEN führt zu einer Überaktivität von PI3K und nachfolgend zu einer hyperplastischen Proliferation und neoplastischen Transformation in verschiedenen Geweben. Des Weiteren wurden auch Mutationen von PI3K selbst und Amplifikationen der beiden Isoformen Akt1 und Akt2 in Tumorzellen beobachtet (Liu et al., 2009). Das Interesse für den PI3K-Akt-Signalweg in der Krebsforschung ist daher in den vergangenen Jahren gestiegen.

Ziel einiger Zytostatika könnte die Hemmung der PI3K sein, wie sie z.B. durch die Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 geschieht. Sie hemmen beide die katalytische Untereinheit der PI3K. Eine Nebenwirkung dieser Inhibition ist allerdings die Entwicklung einer dilatativen oder hypertrophen Kardiomyopathie, wie sich in Tierversuchen an p110a (katalytische Untereinheit der PI3K Klasse IA) defizienten Mäusen zeigte (McMullen und Jay, 2007). Daher ist der mögliche Einsatz bei Krebspatienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko kritisch zu betrachten. Dennoch wurden 2008 diverse PI3K Inhibitoren in klinische Studien aufgenommen (Garcia-Echeverria und Sellers, 2008).

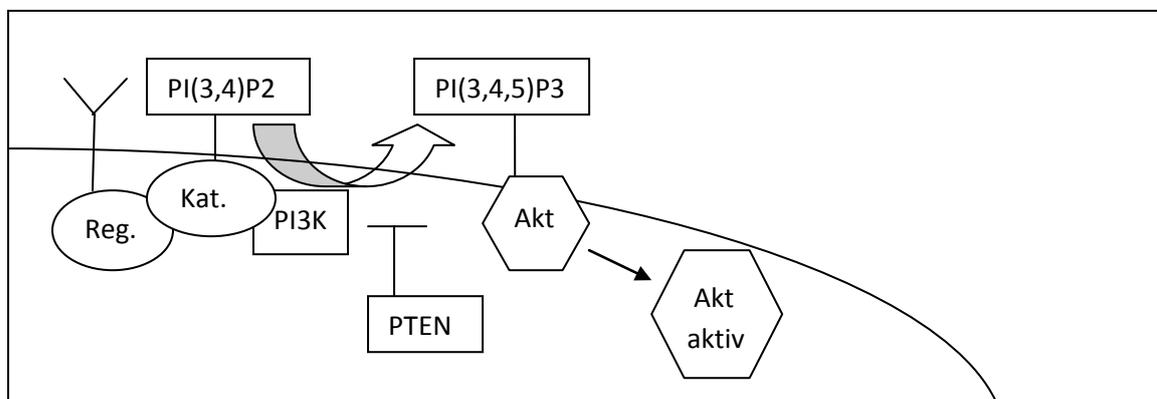


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung von Akt durch PI3K (verändert nach Carnero, 2010)
 Reg.= regulatorische Untereinheit der PI3K, Kat.= katalytische Untereinheit der PI3K

1.4.3 MAPK-Signalwege

Man unterscheidet drei Familien der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen): die Familie der *extracellular signal regulated kinase* (ERK), der p38 und der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK). Bei wachstumsfördernden Prozessen sind die Kinasen ERK1/2 aktiv. Sie werden durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert. JNK und p38-Kinasen werden durch extrazellulären Stress wie UV-Licht, oxidativen Stress, proinflammatorische Zytokine oder Hungersignale aktiviert.

Alle MAP-Kinasen werden kaskadenartig durch vorgeschaltete Kinasen in Gang gesetzt. Dies sind die Serin-Threonin-Kinase MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K) und die duale Serin-Threonin-/Tyrosinkinase MAP-Kinase-Kinase (MAP2K). Die Aktivierung erfolgt jeweils über Phosphorylierungen. MAP-Kinasen sind selbst Serin-Threonin-Kinasen, welche ihre Substrate an Seryl- oder Threonylresten phosphorylieren. Die erste Kinase dieser Kaskade, die MAP3K, wird jeweils über ein G-Protein aktiviert.

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist von Bedeutung in der Regulation des Zellwachstums und Zellüberlebens. Extrazelluläre Signale werden über die Bindung von Liganden an Tyrosinkinase-Rezeptoren in die Zelle geleitet. Dabei wird das G-Protein Ras aktiviert, welches daraufhin die MAP3K Raf aktiviert. Diese phosphoryliert die MAP2K MEK1/2, die schließlich die MAPK ERK1/2 aktivieren (Johnson und Lapadat, 2002).

In einigen menschlichen Tumoren sind ERK1/2 überexprimiert. Deshalb ist ERK als potenzielles Angriffsziel für Zytostatika in den Fokus geraten. Inhibitoren dieses Signalwegs sind bereits in klinische Studien aufgenommen worden. Es gibt bereits Studien zu der Wirksamkeit von Inhibitoren der Farnesyltransferase, welche die posttranslationale Prenylierung von Ras katalysieren. Diese Prenylierung ist bedeutend für die Anlagerung von Ras an die Plasmamembran (Sebolt-Leopold und Herrera, 2004). Eine Hemmung der Farnesyltransferase durch z.B. Lonafarnib oder Sarasar hemmt den Signalweg über die fehlende Aktivierung von Ras/Raf (Zangari et al., 2006; Tommasi et al., 2007).

In der Therapie des Hepatozellulären Carcinoms (HCC) kommt bereits der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib zum Einsatz, welcher Raf als Angriffsziel hat (Lui et al. 2006; Tommasi et al., 2007). Daraufhin wird die Aktivierung der ERK vermindert.

Trani et al. haben 2009 entdeckt, dass das Rheumamittel Aurothiomalat proapoptotisch in Prostatakarzinomzellen wirkt. Hierbei soll neben p38 und JNK auch ERK an der Aktivierung von Caspase 3 beteiligt sein, obwohl ERK hauptsächlich in Zellwachstum und Zellüberleben involviert ist (Trani et al., 2009).

Die genauen molekularen Mechanismen, über die JNK an der Krebsentstehung beteiligt sind, bleiben bislang noch unverstanden. Es werden JNK-Proteine 1 bis 3 unterschieden, die von verschiedenen Genen exprimiert werden (MAPK 8/9/10). JNK 1 und 2 kommen in allen Geweben vor, JNK 3 dagegen bevorzugt im Gehirn. Alle JNKs werden durch die MAP2Ks MKK4/7 aktiviert. Ein Hauptziel von JNK ist der Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1 (AP-1). JNK ist an der Regulation des Zellzyklus, dem Zellüberleben und der Apoptose beteiligt (Wagner und Nebreda, 2009).

1.5 Zellzyklus

1.5.1 Ablauf des Zellzyklus

Der Zellzyklus dient der Bildung zweier Tochterzellen aus einer Ursprungszelle. Dazu muss diese erst an Zellmasse zunehmen und ihre DNA duplizieren, damit sie anschließend zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben werden kann.

Im lebenden Organismus werden verschiedene Zelltypen unterschieden. Es gibt solche, die sich nach der Differenzierung nicht mehr teilen. Das sind z.B. Nervenzellen und Muskelzellen. Zellen, die sich nicht mehr teilen aber stimuliert werden können und wieder in der Lage sind den Zellzyklus zu durchlaufen, befinden sich in der G₀-Phase, der Ruhe-Phase des Zellzyklus. Zu diesen Zellen zählen Leberzellen. In einer dritten Gruppe befinden sich Zellen, die sich andauernd und schnell teilen. Das sind u.a. Epithelzellen (z.B. Hautzellen), Samenzellen oder Knochenmarkzellen. Der Zellzyklus setzt sich aus vier verschiedenen Phasen zusammen, der G₁-, S-, G₂- und M- Phase. Die ersten drei Phasen werden zu der Interphase zusammengefasst und der Mitose (M)-Phase gegenübergestellt.

Die G₁-Phase ist die erste Phase der Interphase, in der Zellwachstum und die Proteinsynthese für die DNA-Synthese erfolgen. In der S-Phase werden DNA (DNA-Replikation) und Proteine synthetisiert. Die G₂-Phase dient der Vorbereitung der Mitose. Hier werden auch Proteine für die Mitosephase synthetisiert. Während der Mitose wird die DNA mit Hilfe eines Spindelapparates zu den beiden Zellpolen gezogen, um anschließend auf zwei Tochterzellen aufgeteilt zu werden. Die Dauer eines Zellzyklus ist von Zelle zu Zelle verschieden. Bei einer sich schnell teilenden Zelle beträgt sie ca. 24 h, wobei die meiste Zeit mit 12 h auf die G₁-Phase fällt. Die Mitosephase beträgt nur ca. 2 % der Gesamtzeit, bei 24 h also ca. 30 Min. Neben den vier Phasen des Zellzyklus gibt es eine Ruhe-Phase, die G₀-Phase, in der sich differenzierte Zellen befinden. Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen können nicht terminal differenzierte Zellen ebenfalls aus dem Zellzyklus austreten und in die G₀-Phase eintreten. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren ist dieser Vorgang reversibel.

1.5.2 Regulation des Zellzyklus

Kontrollpunkte in den Zellzyklusphasen sollen Störungen des Zellzyklus verhindern. An dem *Check-point* während der G1-Phase werden Zellgröße, DNA-Qualität und Verfügbarkeit von Substraten für Proteinsynthese und DNA-Synthese überprüft, an dem *Check-point* während der G2-Phase wird kontrolliert, ob die Replikation erfolgreich war oder die DNA Schäden aufweist. Falls Fehler detektiert werden, wird der Zellzyklus angehalten. Nun kann der DNA-Schaden behoben oder die Apoptose induziert werden.

Außerdem wird an einem weiteren *Check-point* am Ende der M-Phase kontrolliert, ob die Chromosomensätze korrekt aufgeteilt wurden.

Externe Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, sowie intrazelluläre Cycline und Cyclin-abhängige Proteinkinasen (Cdk) sind wesentlich an der Regulierung des Zellzyklus und der Passage oben genannter *Check-point* beteiligt. Cycline liegen während des Zellzyklus intrazellulär in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Ihre Aufgabe ist es, die während des gesamten Zellzyklus vorhandenen Cdks über Phosphorylierung oder Dephosphorylierung zu aktivieren. Für die Regulation des Zellzyklus ist aber auch eine Inhibition der Cdks erforderlich. Zwei Familien von Cdk-Inhibitoren sind bekannt: die Familie der p21^{WAF1} (p21^{WAF1} und p57^{KIP2}) und die der p16^{INK4A} (p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}).

In Säugerzellen sind während der G1-Phase Cdk4/6 und Cdk2 von Bedeutung. Wachstumsfaktoren wie z.B. Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) oder Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) sind über ihre Aktivierung in der Lage die Zellteilung anzuregen.

Cdk2 wird durch Cyclin E aktiviert. Cyclin D1, Cyclin D2 oder Cyclin D3 binden und aktivieren Cdk4/6 (Assoian, 1997). Die Translokation des Komplexes Cyclin D/Cdk4/6 in den Zellkern ist entscheidend für den Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase. Im Zellkern phosphorylieren die genannten Cdks nacheinander das Retinoblastomprotein (pRb), wodurch dieses sich von seinem Transkriptionsfaktor E2F abspaltet. E2F wird auf diese Weise aktiv und induziert die Expression von Genen, welche für die S-Phase relevant sind, wie z.B. DNA-Polymerase, Ribonukleotid-Reduktase oder Thymidylatsynthase (DeGregori et al., 1995). Eines der E2F abhängigen Genprodukte ist auch das Cyclin A, welches am Übergang von der G1- zur S-Phase synthetisiert wird. Es bindet während der S-Phase an Cdk2, wodurch die S-Phase durchlaufen werden kann (DeGregori et al., 1995; Assoian, 1997). Während der G2-Phase erfolgt die Aktivierung des Komplexes CyclinB/Cdk1.

Störungen im Zellzyklus sind häufig mit der Entstehung von Krebs assoziiert. Das Protein p53 spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus beim Übergang von der

G1- in die S-Phase. Unter physiologischen Bedingungen wird p53 proteasomal abgebaut. Kommt es zu DNA-Schäden, so wird durch verstärkte Phosphorylierung von p53 sein Abbau behindert. Danach können zwei Wege eingeschlagen werden: zum einen kann durch Aktivierung von Bax die Apoptose induziert werden, zum anderen kann der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten werden über verstärkte Expression und Aktivierung des Cdk-Inhibitors p21^{WAF1} mit anschließender Hemmung der Cdk4/6 und Cdk2. Kommt es zu einer Mutation im Tumorsuppressorgen mit nachfolgendem Funktionsverlust des Proteins p53, läuft die Zelle durch einen Mangel an p21^{WAF1} unkontrolliert in die S-Phase des Zellzyklus. Das begünstigt, dass sich auch maligne Zellen ungehindert teilen können.

Verschiedene DNA-schädigende Zytostatika greifen in den Zellzyklus ein und können sowohl gesunde als auch maligne Zellen an ihrer Teilung hindern. Der Zellzyklus wird entweder beim Übergang von der G1- zur S-Phase über Aktivierung von p21^{WAF1} angehalten oder beim Übergang von der G2- zur M-Phase (Bunz et al., 1998).

Das Anthrazyklin-Antibiotikum Doxorubicin ist nicht nur in der Lage, radikale Sauerstoffspezies zu bilden und DNA-Strangbrüche zu verursachen, es kann auch den Zellzyklus in der G2-Phase anhalten und dadurch die Mitose verhindern (Ling et al., 1996; Lüpertz, 2008).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, organische Gold(I)-Komplexe auf ihre Toxizität in Krebszellen zu testen, welche im Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von der Arbeitsgruppe PD Peter C. Kunz synthetisiert wurden.

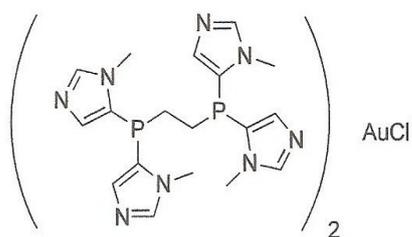
Dabei wurde die Art des durch die Substanzen ausgelösten Zelltodes ermittelt und nach möglichen Ursachen gesucht. Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte dabei fluoreszenzmikroskopisch (Life-Dead-Assay), anhand von DNA-Fragmentationsanalysen (DNA-Leiter) und über den Nachweis aktivierter Caspasen (ApoONE-Assay). Der Nachweis nekrotischer Zellen erfolgte ebenfalls mittels Life-Dead-Assay und außerdem mittels LDH-Assay. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen (Comet-Assay), zum Nachweis von intrazellulärem oxidativen Stress (DCF-Assay) und zur Analyse des Zellzyklus am Durchflusszytometer angewandt. Außerdem wurde der Einfluss von Gold(I)-Komplexen auf ausgewählte intrazelluläre Signalwege (Nrf2/ARE, PI3K/Akt, MAPK) mittels Western Blots untersucht.

Bei den zu untersuchenden Substanzen handelte es sich um fünf Gold(I)-Komplexe mit Diphosphan-Liganden und um weitere fünf mit N-heterozyklischen-Carben-Liganden. Sie wurden alle „intern“ bezeichnet mit CW, den Initialien von Frau Dr. Corinna Wetzel, welche die Substanzen im Rahmen ihrer Dissertation synthetisierte.

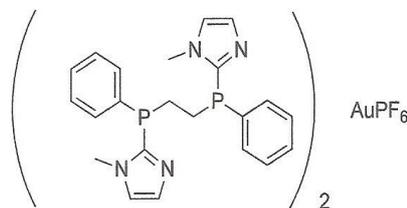
Von den Bis(imidazolylphosphan)-Gold(I)-Komplexen waren zwei Komplexe N-methyliert (CW143, CW90), zwei weitere nicht N-methyliert (CW55, CW35). Bei dem fünften Komplex mit Phosphan-Liganden handelte es sich um einen Bis(thiazolylphosphan)-Gold(I)-Komplex, welcher anstelle der Imidazolringe Thiazole aufwies (CW60). Von den N-heterozyklische-Carben-Gold(I)-Komplexen lagen ebenso welche mit Thiazolringen (CW171a/b) und welche mit Imidazolringen (CW165, CW104, CW109) vor. Letztere unterschieden sich durch das Fehlen oder das Vorhandensein von Methylgruppen an unterschiedlichen Positionen.

Im ersten Teil (A) dieser Arbeit werden die Gold(I)-Komplexe mit Phosphan-Liganden vorgestellt, im zweiten Teil (B) solche mit N-heterozyklischen-Carben-Liganden (Abb.7).

1.6.1 N-methylierte-Bis(imidazolylphosphan)-Gold(I)-Komplexe:

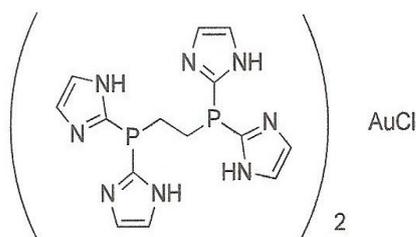


CW 143 M=1061,17 g/mol

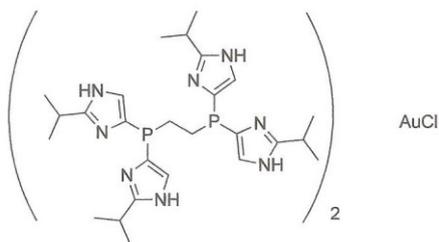


CW 90 M=1154,23 g/mol

1.6.2 Nicht-N-methylierte-Bis(imidazolylphosphan)-Gold(I)-Komplexe:

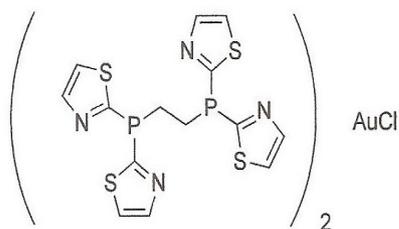


CW 55 M=948,61 g/mol



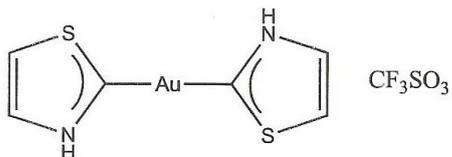
CW 35 M=1285,61 g/mol

1.6.3 Bis(thiazolylphosphan)-Gold(I)-Komplex CW60

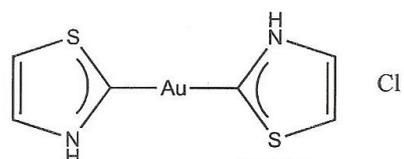


CW 60 M=1085,37 g/mol

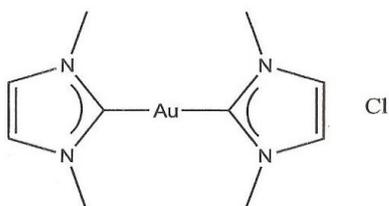
1.6.4 N-heterozyklische-Carben-Gold(I)-Komplexe



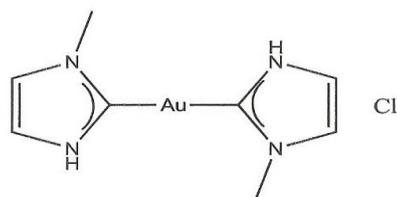
CW171a M = 518,3 g/mol



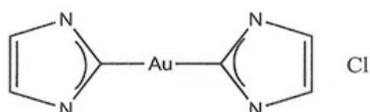
CW171b M = 404,7 g/mol



CW165 M = 426,5 g/mol



CW104 M = 398,5 g/mol



CW109 M = 370,5 g/mol

Abb. 7: Strukturformeln der Gold(I)-Komplexe aus dem Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2. Material

2.1 Zelllinien

- Rattengliomzellen C6
- Rattenhepatomzellen H4IIE

2.2 Medien

- DMEM 10 % FCS mit Phenolrot und farbloses DMEM (Gibco)
- DMEM 5 % FCS (Gibco)

2.3 Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Buffer	Promega
Bis Benzimid Hoechst 33342 50 mM in DMSO	Sigma-Aldrich
BM Chemilumineszenz Blotting Substrate (POD)	Roche
Borsäure	Roth
Bovines Serumalbumin, Fraktion V (BSA)	Calbiochem
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	VWR International
Coomassie Brilliantblau R250 (Serva Blau®)	Serva
Cytotoxicity Detection Kit	Roche
DC Protein Assay	Biorad
Desoxycholol	Sigma-Aldrich
Dimethylsufoxid (DMSO)	Merck
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich

Material

DMEM (<i>high glucose</i> ,L-Glutamin, Phenolrot)	Gibco
DNA-Ladepuffer Loading Dye (6x)	Fermentas
EDTA	ICN Biomedicals
Essigsäure	Roth
Ethanol (EtOH)	Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml) (EtBr)	Roth
FCS-Gold	PAA-Laboratories
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas
Glycin	Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Loading dye Solution 6 x	Fermentas
Methanol	VWR
3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl- Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Roth
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumlaurylsarkosinat	Merck
NaOH	Merck
NP-40	Sigma-Aldrich

Material

Okadasäure	Calbiochem
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phenol (Rotiphenol) pH8	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor-Cocktail	Calbiochem
Propidiumiodid 1 mg/ml	Roth
RNAse A	Serva
Restore Western Blotting Stripping Buffer	Thermo Scientific
Salzsäure (HCl 30 %)	Fluka
Spermintetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	VWR
TrisHCl	MP Biomedicals, ICN
Triton X-100	Fluka Analytical
Trizol (Tri®Reagent)	Sigma-Aldrich
Trockenmilch (Nonfat-Dried-Milk - Bovine)	Sigma-Aldrich
Trypsin (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA – HNa)	Gibco
Tween 20	MP Biochemicals
β-Mercaptoethanol	Merck
ε-Aminocapronsäure	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth

2.4 Verwendete Antikörper

Primär-Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Phospho-SAPK/JNK (Thr185/Tyr185) Antibody # 9251	Cell Signaling	1:1000 in 5 % BSA in TBST
JNK1/3 (C-17): sc-474	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 in 5 % BSA in TBST
p-ERK(E-4): sc-7383	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 in 5 % BSA in TBST
ERK 1(K-23): sc-94	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 in 5 % BSA in TBST
Nrf2(H-300): sc-13032	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 in 5 % Milchpulver in TBST
pAKT	Cell Signaling	1:1000 in 5 % BSA in TBST

Sekundär-Antikörper

Goat anti rabbit	Southern Biotechnology	1:3000 und 1:5000 in 5 % BSA in TBST
------------------	------------------------	---

2.5 Sonstige Materialien

- 6-well Platten Becton Dickinson
- 96-well Platten Greiner bio-one
- Chromatographie Papier 3MMCHR, Whatman
- Deckgläschen Roth
- Falcons, Greiner-bio-one, BD (Becton, Dickinson)
- Glasküvetten OS 1000, Hellma
- Mikroskopierschalen 35mm, Greiner-bio-one
- Objektträger
- Proteinmembranen PVDF Western Blotting Membranes, Roche
- Reaktionsgefäße 1,5 & 2 ml, Eppendorf
- Stepper und Spitzen, Eppendorf
- Zellkulturflaschen T75, Greiner bio-one
- Zählkammer (Neubauer), Welabo

2.6 Geräte

- Blotting Apparaturen: Pharamacia LKB Multiphor II, Biometra / OWL HEP-1, ThermoScientific, Scientific Peqlab
- CO₂-Inkubator (5 % CO₂) Jouan IG 150 Binder Serie BC
- Durchflusszytometer C6 Flow Cytometer®, Accuri
- Eismaschine Icematic F90, Compact Electronics
- Elektrophoresekammer Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Fluoreszenzmikroskop Axiolab mit HBO 50 Hg Lampe, Zeiss
- Fusion TX7, Fusion / Molekular Imaging peQLab
- Geldokumentationsanlage BIO-RAD, Geldoc 2000 / (QuantityOne v4.1.1
- Heizblock Ori-Block® DB-3, Techne
- inverses Lichtmikroskop Axiovert 100, Zeiss
- Kamera Fluoreszenzmikroskop CoolSNAP-Pro (INAS), Moticam 2300, Motic Microscopes
- pH - Meter Radiometer Copenhagen PHM 93
- Plattenlesegerät Wallac Victor 1420 Multilable Counter, Perkin Elmer / Wallac Workstation
- Power Supply EV231, E835, E143, Consort
- Rührer Heidolph MR2002
- Schüttler Swip, Edmund Bühler (EB) / Roto-Shake Genie, Scientific Industries Edmund Bühler (EB)
- Sterilbänke Jouan IC2.12 / Gelaire BSB4
- Sunrise (XFluorX4) Tecan
- Thermoprinter Mitsubishi P91
- Vortexer VF2, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Labortechnik
- Waagen: Sartorius 3716MP / Sartorius-Analysenwaage MC1
- Wasserbad Thermomix-1420 B. Braun, Deutschland / Certomat WR, B.Braun
- Wasser-Deionisierungsanlage Millipore, Schwalbach, Deutschland
- Zentrifugen: Centrifuge 5415, Eppendorf / MR 1821, Jouan

2.7 Computersoftware

- CFlow® Plus Software Accuri
- Image Pro Plus, Version 4.5.1.22 Media cybernetics
- Graph Pad Prism (oneway ANOVA mit Posthoc-Test: Dunnett)

- Quantity One 4.1.0 Bio Rad
- UV-Winlab Perkin Elmer
- Wallac 1420 Workstation Perkin Elmer
- Word, Excel, Powerpoint Microsoft Corporation (Version 2007)

2.8 Lösungen und Puffer

MTT-Assay:

5 mg MTT/ 50 ml ddH₂O

DNA-Leiter:

Lysepuffer

- 0,5 ml 1 M Tris-HCl-Lösung pH 8
- 1,5 ml 20 % SDS-Lösung
- 1 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8
- Ad 50 ml ddH₂O

RNase (Serva)

- 10 mg gelöst in 1 ml Natrium-Acetat-Lösung pH 5,2
- 100 µl TRis-HCl (1 M, pH 7,4)

1x TE-Puffer pH 8

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA
- Ad 50 ml ddH₂O

10x TBE-Puffer pH 8

- 450 mM Tris
- 450 mM Borsäure
- 10 mM EDTA
- Ad 1000 ml ddH₂O

Comet-Assay:

10x PBS pH 7,4

- 1370 mM NaCl 80 g NaCl
- 27 mM KCl 2 g KCl
- 100 NaH₂PO₄ 14,4 g NaH₂PO₄
- 17,8 mM KH₂PO₄ 2,4 g KH₂PO₄
- Ad 1000 ml ddH₂O

10 % Natriumlaurylsarkosinat-Lösung

- 50 g Natriumlaurylsarkosinat
- Ad 500 ml ddH₂O

0,5 M Na₂EDTA-Lösung pH 10

- 186 g Na₂EDTA
- Ad 500 ml

10 M NaOH-Lösung

- 400 g NaOH
- Ad 1000 ml ddH₂O

Lyse-Stammlösung pH 10

- 2,5 M NaCl
- 100 mM Na₂EDTA
- 10 mM Tris
- 100 ml Natriumlaurylsarkosinat-Lösung
- Ad 890 ml ddH₂O

Lyse-Gebrauchlösung

- 89 ml Lyse-Stammlösung
- 10 ml DMSO
- 1 ml Triton X-100

Elektrophoresepuffer pH > 13

- 300 mM NaOH 120 ml 10 M NaOH-Lösung
- 1 mM Na₂EDTA 8 ml 0,5 M Na₂EDTA-Lösung
- Ad 4l ddH₂O

Neutralisationspuffer pH 7,5

- 400 mM Tris 48,5 g Tris
- Ad 1000 ml ddH₂O

10 x Färbe-Stammlösung

- 10 mg Ethidiumbromid
- Ad 50 ml ddH₂O

0,5 % LMP-Agarose

- 20 mg LMP-Agarose
- 20 ml 1 x PBS

Zellzyklusanalyse

Lysepuffer (sterilfiltriert)

- 15 mM Tris
- 2 mM Na₂EDTA
- 0,5 mM Spermintetrahydrochlorid
- 80 mM KCl
- 20 mM NaCl
- 0,1 % vv Triton X-100
- pH mit 1 N HCl auf pH 7,5 eingestellt
- 15 mM β -Mercaptoethanol

Proteinisolierung und Western Blot:

RIPA-Puffer pH 8,0	100 ml
- 50 mM TRIS-HCl	7,88 g TRIS-HCl
- 150 mM NaCl	8,77 g NaCl
- 5 mM EDTA	1,46 g EDTA
- 1 % (v/v) NP-40	10 ml NP-40
- 0,1 % (w/v) SDS	1,0 g SDS
- 0,5 % Desoxycholat	0,5 g Desoxycholat

RIPA-Gebrauchspuffer RIPA-Puffer versetzt mit:

- 1 mM PMSF
- 1 x Protease Inhibitor Cocktail
- 1 mM DTT
- 0,01 % Okadasäure

10x PBS pH 7,4 (siehe oben)

2x Sammelgelpuffer pH 6,8

- 250 mM Tris 3,0285 g Tris
- 0,2 % SDS 0,2 g SDS
- Ad 100 ml ddH₂O

4xTrenngelpuffer pH 8,8

- 1,5 M Tris 18,171 g Tris
- 0,4 % SDS 0,4 g SDS
- Ad 100 ml ddH₂O

10x Laufpuffer

- 250 mM Tris 30,286 g Tris
- 1,92 M Glycin 144,6 g Glycin
- Ad 1000 ml ddH₂O

1x SDS-Laufpuffer

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin 50 ml 10 x Laufpuffer
- 0,1 % SDS 5 ml 10 % SDS
- ad 500 ml ddH₂O

4x SDS Probenpuffer

- 40 % Glycin 4 ml Glycin
- 20 % β- Mercaptoethanol 2 ml β-Mercaptoethanol
- 12 % SDS 1,2 g SDS
- 0,4 % Bromphenolblau 0,04g Bromphenolblau
- 4 ml 2 x Sammelgelpuffer
- Ad 10 ml ddH₂O

Anodenpuffer pH 10, 4

- 200 mM Tris 12,11 g Tris
- 20% Methanol 100 ml Methanol
- Ad 500ml ddH₂O

Kathodenpuffer pH=9, 4

- 25 mM TRIS 1,514 g TRIS
- 20 % Methanol 100 ml Methanol
- 40 mM ε-Aminocaprionsäure 2,624 g ε-Aminocaprionsäure
- Ad 500 ml ddH₂O

Coomassie-Färbelösung

- 40 % Methanol 100 ml Methanol
- 2 % Essigsäure 5 ml Essigsäure,
- 0,2 % Coomassie-brilliantblau 0,5 ml Coomassiebrilliantblau
- Ad 250 ml ddH₂O

Entfärbelösung

- 50 % Methanol 500 ml Methanol
- 1 % Essigsäure 10 ml Essigsäure
- Ad 1000 ml ddH₂O

10x TBS pH 7,4

- 100 mM Tris 12,144 g Tris
- 1,5 M NaCl 87,660 g NaCl
- Ad 1000 ml ddH₂O

1x TBST

- 1 x TBS 100 ml 10 x TBS
- 0,1 % Tween 20 1 ml Tween 20
- ad 1000 ml ddH₂O

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium
H4IIE	Rattenhepatomzellen	DMEM (high glucose, L-Glutamin, Phenolrot) + 10 % FCS Gold + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (Lagerung 4 °C)
C6	Rattengliomzellen	DMEM (high glucose, L-Glutamin, Phenolrot) + 5 % FCS Gold + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (Lagerung 4 °C)

3.1.1.1 C6 Gliomzellen

Es handelt sich bei dieser Zelllinie um einen Klon von einem durch N-Nitrosomethylharnstoff induzierten Rattengliom (Benda et al., 1968). Es sind pluripotente Glia-Progenitorzellen, die als Modell für Astrozyten im Labor dienen können (Abb.8).

C6 Zellen mit niedriger Passage entsprechen Oligodendrozyten und zeichnen sich durch eine starke Expression der zyklischen Nukleotidphosphorylase aus (CNP). Die Expression der CNP nimmt mit steigender Passage ab, die Expression der Glutamin-Synthetase nimmt dagegen zu. Höhere Passagen transdifferenzieren zu Astrozyten (Euringer, 2005).

Die Zellen wurden in DMEM mit 5 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin gehalten und zweimal wöchentlich passagiert. Verwendet wurden sie für Experimente bis Passage 40. Von ihrem Wachstumsuntergrund wurden die Zellen mit 0,05 % (1-fach) Trypsin gelöst, das ca. 2 Min. einwirken sollte. Ihre Verdopplungszeit betrug ca. 17 h (Wätjen, 2000). Für MTT-Assays wurden im 96-Well 10.000/Well ausgestreut.

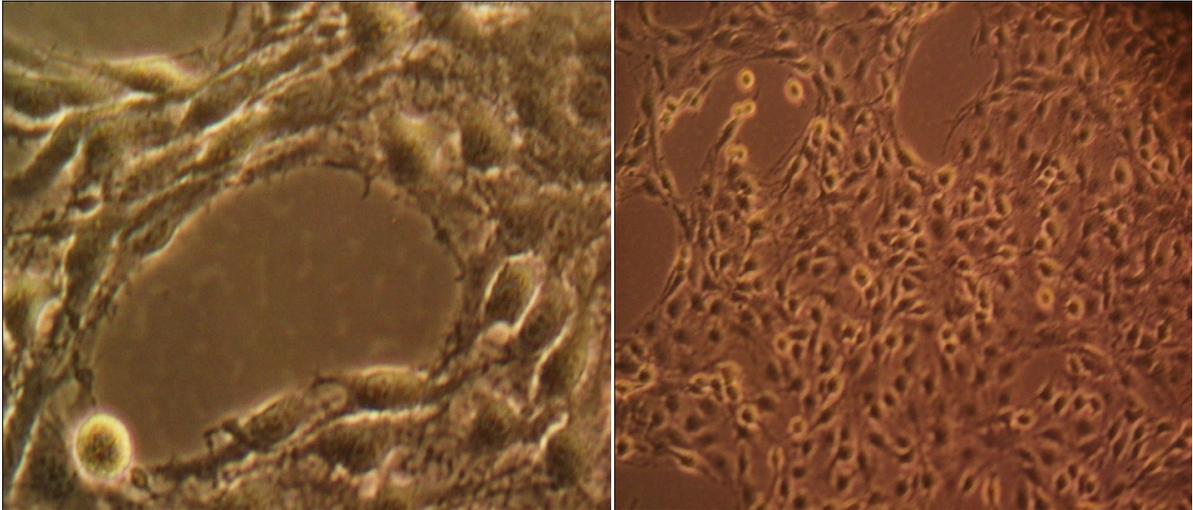


Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Rattengliomzellen C6, in Zellkultur, links: Vergrößerung 320-fach, rechts: Vergrößerung 100-fach

3.1.1.2 H4IIE Hepatomzellen

Bei H4IIE-Zellen (Abb.9) handelt sich um Rattenhepatomzellen, die 1964 von Pitot und seinen Mitarbeitern als Subklon aus dem Reuber-Hepatom H35 isoliert wurden (Pitot et al., 1964; Reuber, 1961). Evans und Kovacs haben diese Zelllinie weiter charakterisiert (Evans und Kovacs, 1977). Tumorzellen sind genomisch instabil und so ist es möglich, dass während der Zellteilung Subklone entstehen, die gegenüber dem ursprünglichen Tumor andere Eigenschaften besitzen, z.B. eine größere Proliferationsbereitschaft aufweisen (Lordick et al., 2010).

H4IIE wurden in DMEM (high glucose, L-Glutamin) mit 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin in T75 Zellkulturflaschen gehalten und zweimal wöchentlich subkultiviert. Dabei wurde 1 ml 0,5 % (10-fach) Trypsin zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden verwendet. Ihre Verdopplungszeit der Zellen betrug 18,5 h. Sie wurden bis zur Passage 35 für Experimente verwendet.

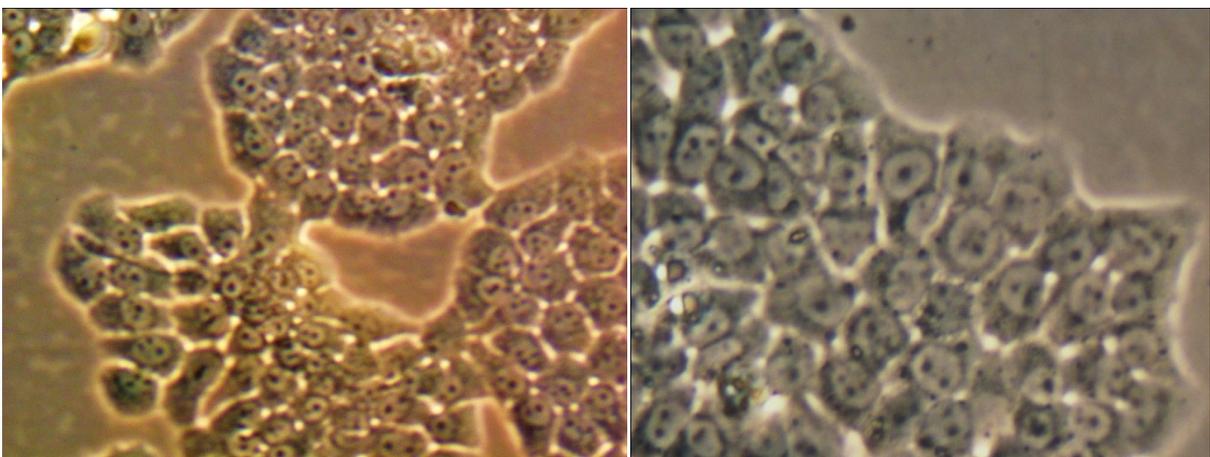


Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von H4IIE in Zellkultur, Vergrößerung 320-fach

3.1.2 Zellkultivierung

Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubator gehalten.

Vor jedem Passagieren wurde lichtmikroskopisch die Konfluenz der Zellen bestimmt, ihre Morphologie begutachtet und mögliche Kontaminationen ausgeschlossen.

Zur Subkultivierung der Zellen wurden diese je nach Zelllinie entweder mit 3 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung (C6) oder mit 1 ml 0,5 % Trypsin/EDTA-Lösung (H4IIE) 2 - 3 Min. lang behandelt. Das diente dazu, sowohl die Zell-Zell-Kontakte als auch die Kontakte der Zellen zum Untergrund aufzulösen. Die Serin-Protease Trypsin katalysiert die Spaltung von Proteinen und Peptiden nach basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin. Seine größte Aktivität entfaltet es bei 37 °C, weshalb es vor Gebrauch erwärmt wurde und die Behandlung der Zellen mit Trypsin im Inkubator erfolgte. Der Komplexbildner EDTA bindet zweiwertige Kationen wie Mg²⁺ und Ca²⁺, welche Membranproteine stabilisieren können. Durch den Zusatz von EDTA kann daher das Ablösen der Zellen vom Untergrund beschleunigt werden (Schmitz, 2009). Die Reaktion der Trypsins-EDTA-Lösung wurde mit 8 ml Medium (C6) bzw. 10 ml Medium (H4IIE) zum Stoppen gebracht. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde die Zellsuspension in ein Falcon überführt und 1 ml zur Zellzahlbestimmung abgenommen. Die restlichen 10 ml wurden bei 560 Umdrehungen/Min. für 5 Min. zentrifugiert.

Die Zellzählung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer, wobei 8 Großquadrate ausgezählt wurden. Die Anzahl ausgezählter Zellen wurde mit dem Verdünnungsfaktor 5 der Zellsuspension (400 µl PBS, 100 µl Zellsuspension) und mit 10⁴ multipliziert und anschließend noch durch 8 (Anzahl der ausgezählten Quadrate) dividiert. Das Ergebnis wurde in Zellen pro ml angegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend mit frischem Medium auf 1 Mio. Zellen pro ml eingestellt.

Nach dem Passagieren wurden die Zellen erst 48 h später für Experimente verwendet, damit sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Außerdem wurden die Zellen nur bis zu einer bestimmten Passage verwendet. Beides diente der Aufrechterhaltung der Vergleichbarkeit der Experimente untereinander. Für neue Versuche wurden Zellen gleicher Charge mit niedriger Passage aufgetaut.

3.1.3 Kryokonservierung

Es wurden nur Zellen mit möglichst niedriger Passage eingefroren. Sobald die Zellen in den Zellkulturflaschen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, wurden sie geteilt. Eisgekühltes DMSO wurde mit kaltem Medium vermischt im Verhältnis 1 : 6,2. Beim Abtrypsinieren der Zellen wurde das Trypsin mit kaltem Medium inaktiviert, die Zellen wurden zentrifugiert und dann die Zellzahl auf maximal 4×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je Kryoröhrchen wurden 500 μ l Zellsuspension abgefüllt und tropfenweise mit 600 μ l DMSO-Medium-Gemisch versehen. Anschließend wurden die Röhrchen für 2 - 3 Stunden erst bei -20 °C und danach bei -80 °C eingefroren. Das Medium nahm nach dem Einfrieren eine gelbliche Farbe an, die beim Auftauen wieder in die ursprüngliche Farbe übergang.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen in der Hand erwärmt und in eine mit 20 ml warmem Medium vorbereitete Zellkulturflasche (T75) geschüttet. Der im Röhrchen verbleibende Rest wurde mit etwas Medium resuspendiert und ebenfalls in die T75 gegeben. Die Zellen wurden 24 h lang anwachsen gelassen. Am nächsten Tag musste das Medium gewechselt werden, um das restliche DMSO im Medium zu entfernen. Sobald die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, konnten sie geteilt und für Experimente verwendet werden.

3.2 Zytotoxizitätsnachweis MTT-Assay

Um die Goldverbindungen auf ihre Zytotoxizität in C6 und H4IIE zu untersuchen, wurde der MTT-Assay durchgeführt.

Der MTT Assay dient der Aktivitätsbestimmung der mitochondrialen Dehydrogenasen, welche das gelbe lösliche Tetrazoliumsalz MTT (3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu einem blauen wasserunlöslichen Formazan reduzieren. Dies geschieht nur in Zellen mit intakten Mitochondrien. Die Menge an gebildetem Formazan ist proportional zur Zellzahl metabolisch aktiver Zellen. Nicht viable Zellen produzieren kein Formazan. Ruhende, sich nicht mehr teilende Zellen bilden weniger Formazan als sich aktiv teilende Zellen (Mosmann, 1983). Die Absorption des Formazans bei einer Wellenlänge λ von 560 nm kann als Maß für die Viabilität der Zellen dienen.

Die MTT-Assays wurden auf 96-Well-Platten durchgeführt. Für Versuche mit H4IIE und C6 wurden unterschiedliche Zellzahlen in einem Gesamtvolumen von je 100 μ l ausplattiert und jeweils für 24 h anwachsen gelassen. Die Zellzahl wurde je nach der Inkubationsdauer mit den Testsubstanzen variiert, um eine zu hohe Konfluenz der Kontrollzellen zum Zeitpunkt der

Messung zu vermeiden. Für Versuche mit C6 wurden 10.000/Well ausplattiert und für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Für Versuche mit H4IIE wurden für 3 h-, 6 h-, 12 h- und 24 h-Inkubationen jeweils 15.000/Well ausplattiert, für 48 h-Inkubationen 8.000/Well und für 72 h-Inkubationen 5.000/Well. Die Konfluenz lag zum Zeitpunkt der Messung der Absorption im Plattenlesegerät bei ca. 80 %.

Für die Inkubation wurden jeweils 0,5 µl Substanz (0,5 % DMSO/Well) in jedes Well pipettiert. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Zellen mit 20 µl/Well MTT-Lösung (5 mg/ml ddH₂O) für 60 Min. (H4IIE) bzw. 45 Min. (C6) bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das MTT aus dem 96-Well durch vorsichtiges Abschlagen entfernt und es wurden jeweils 100 µl DMSO in jedes Well pipettiert. Mindestens 10 Min. wurde die 96-Well Platte geschüttelt, um eine vollständige Lösung des Formazans in DMSO zu erreichen. Anschließend konnte die Absorption im Sunrise bei einer Wellenlänge λ von 560 nm gemessen werden.

3.3 Apoptose- und Nekrosenachweise

3.3.1 Life-Dead-Assay

Dieser Assay dient der Bestimmung der Zellviabilität am Fluoreszenzmikroskop.

Mit Hilfe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 (Bisbenzimid, 50 mM gelöst in DMSO, von Sigma-Aldrich) und Propidiumiodid (1 mg/ml gelöst in ddH₂O) lassen sich im Rahmen dieses Assays apoptotische von nekrotischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch unterscheiden.

Der lipophile Farbstoff Hoechst 33342 färbt unspezifisch Chromatin an, da er direkt an DNA binden kann. Er bindet spezifisch an AT-reiche DNA-Sequenzen (Sigma-Produktinformation), kann aber auch unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen an die DNA binden, was jedoch eine geringere optische Aktivität zur Folge hat (Latt und Stetten, 1976). Ungestresste Zellen und apoptotische Zellen weisen eine intakte Zellmembran auf, die von diesem Farbstoff durchdrungen werden kann. Die Kerne erscheinen bei einer Anregung mit der Wellenlänge von 346 nm im Fluoreszenzmikroskop blau (Emissionsmaximum bei 460 nm). Man kann apoptotische Kerne an ihrer geringeren Größe und ihrer Fragmentierung erkennen. Da apoptotische Zellen stark kondensiertes Chromatin aufweisen, fluoreszieren sie stärker als Zellkerne vitaler Zellen.

Der Farbstoff Propidiumiodid (3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridiniumdiiodid) kann nicht durch intakte Zellmembranen gelangen und färbt daher nur Zellen mit permeabler Zellmembran an. Diese Zellen erscheinen dann rot. Nekrotische Zellen sind meist zusätzlich zur Rotfärbung vergrößert oder bereits zerplatzt.

Zuerst wurden 150.000 Zellen auf 35 mm Schälchen ausgesät und 48 h anwachsen gelassen. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Testsubstanzen für 24 h bzw. 48 h. Im Anschluss wurden die beiden Farbstoffe Hoechst 33258 und PI zu je 1 µl in das Medium pipettiert und die Zellen für weitere 5 Min. inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und 2 Min. lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 30 µl PBS aufgenommen und wieder auf den Zellrasen zurückgegeben, damit abgestorbene, bereits abgelöste Zellen ebenfalls erfasst werden konnten. Anschließend erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiolab) bei 400-facher Vergrößerung. Dabei wurden stichprobenartig mindestens 6 Stellen des Deckgläschens fokussiert und die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen ermittelt.

Der apoptotische Index wurde wie folgt bestimmt, der nekrotische Index wurde analog errechnet.

$$\text{apoptotischer Index} = \frac{\text{Anzahl apoptotischer Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Die Indizes aus den einzelnen Versuchen wurden anschließend gemittelt.

3.3.2 DNA-Fragmentationsanalyse („DNA-Leiter“)

Diese molekularbiologische Methode bietet eine weitere Möglichkeit, apoptotische Vorgänge in der Zelle nachzuweisen. Mit ihr lässt sich die Aktivität der Mg²⁺/Ca²⁺ abhängigen Endonuklease *Caspase-activated DNase* (CAD) überprüfen, welche während der Apoptose aktiviert wird.

Ihr Inhibitor ICAD wird durch Caspase 3 gespalten und bedingt daher die Aktivierung des Enzyms. Da die CAD die DNA spezifisch in der Linkerregion zwischen den Histonen schneidet, entstehen DNA-Fragmente von mindestens 180 Bp und Vielfachen davon.

Mittels einer DNA-Elektrophorese werden DNA-Fragmente der Länge nach aufgetrennt, wobei kleine Fragmente besonders weit durch das Agarosegel wandern können und sich daher

nahe der Anode befinden, während große DNA-Fragmente in der Nähe der Auftragsstelle an der Kathode verbleiben. Auf diese Weise entsteht das typische Bandenmuster der DNA-Leiter, mit Fragmenten von mindestens 180 Bp, das als Nachweis von apoptotischen Vorgängen in der Zelle dienen kann.

3.3.2.1 DNA-Isolierung

500.000 bzw. 300.000 Zellen wurden jeweils in 2 ml Volumen in 6-Wellen ausplattiert. Sie wurden 48 h anwachsen gelassen und dann für 24 h bzw. 48 h mit den Testsubstanzen in einem Gesamtvolumen von 1 ml inkubiert. Als Positivkontrolle diente das apoptoseinduzierende Herbizid Paraquat (PQ), als Negativkontrolle 0,5 % DMSO. Anschließend wurde das Medium abgenommen, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen für 2 Min. mit 0,5 % Trypsin behandelt, um sie vom Untergrund abzulösen. Dann wurden sie mit dem eigenen Medium abgespült, in die Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und anschließend 2 Min. lang bei 13400 rcf zentrifugiert. Die Pellets wurden in Lysepuffer resuspendiert, mit 5 µl RNase versetzt und 40 Min. bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Proteinfällung wurden 125 µl 5 M NaCl-Lösung zugegeben und nach mehrmaligem Invertieren 1 h bei 4 °C stehen gelassen. Danach wurde 15 Min. bei 13400 rcf zentrifugiert, der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und das Pellet verworfen. Unter dem Abzug wurden 250 µl Chloroform und 500 µl Phenol zum Überstand pipettiert und gründlich gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut der Überstand abgenommen und mit 650 µl Chloroform versetzt. Es wurde wieder 15 Min. bei 13400 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde mit gekühltem Isopropanol versetzt. Die DNA-Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C.

3.3.2.2 DNA-Bestimmung und DNA-Elektrophorese

Vor der DNA-Quantifizierung wurde ein 1,75 % iges Agarosegel für die Gelelektrophorese gegossen. Dazu wurden 2,625 g Agarose eingewogen und mit 150 ml TBE-Puffer mehrfach in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung vorlag. Die Lösung wurde unter Rühren 5 - 10 Min. abkühlen gelassen, bevor 30 µl Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt werden konnte. Anschließend wurde die fertige Agaroselösung in die Elektrophoresekammer gegossen, sodass ein möglichst flaches Gel entstand. Dieses musste 30 Min. abkühlen und wurde dann mit TBE-Puffer beschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Eppendorf-Reaktionsgefäße, in denen die DNA ausgefallen war, wurden 15 min bei 13400 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Die Pellets

wurden in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen 15 Min. lang trocknen gelassen und anschließend jeweils in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe des Nanovue wurde die DNA-Menge bestimmt. Je Probe sollten jeweils 8 µg DNA auf das Gel aufgetragen werden. Dazu musste für jede Probe ein entsprechendes Volumen DNA-Lösung abgenommen werden und mit TE-Puffer auf das gleiche Volumen eingestellt werden. Alle Proben wurden mit 25 % dieses Volumens an Ladepuffer versetzt (1 : 5 verdünnt) und anschließend 5 Min. lang bei 65°C erhitzt. Bis zur Auftragung auf das Gel wurden sie auf Eis gelagert. Nachdem 5 µl Marker und die Proben auf das Gel aufgetragen worden waren, lief die Elektrophorese bei 140 V für ca. 2 h. Die Visualisierung erfolgte am GelDoc 2000 (BIORAD) mit der Software: Quantity One v4.1.1 Build 003 (1998, BIORAD).

3.3.3 ApoONE-Assay

Der ApoONE Assay dient dem Nachweis von intrazellulären apoptotischen Vorgängen.

Bei der Apoptose kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung proteolytischer Enzyme. Es handelt sich dabei um Cystein-Proteasen, sogenannte Caspasen (*Cysteine-aspartate specific proteases*), welche Proteine nach Asparaginsäureresten schneiden. Zunächst liegen diese Enzyme im Zytosol als Proenzyme vor, die durch Spaltung aktiviert werden. Dann kommt es zu einer Dimerisierung. Als aktive Initiatorcaspasen können sie weitere Procaspasen aktivieren bzw. als Effektorcaspasen andere zytosolische Proteine spalten und inaktivieren, wie z.B. den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD), das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) oder Strukturproteine.

Mit dem ApoONE-Assay lässt sich die Aktivität der Effektorcaspasen 3/7 bestimmen.

Es wurde das ApoONE Homogenous Caspase 3/7 Kit von Promega verwendet, welches sich zusammensetzt aus einem Substrat Rhodamin 110 Bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-Asparaginsäureamid) (Z-DEVD-R110) und aus einer Pufferlösung, welche die Zellen lysiert und für optimale Reaktionsbedingungen der Caspasen sorgt. Die Caspasen 3/7 sind als Cysteinproteasen in der Lage, das Substrat am C-terminalen Ende des Aspartatrestes zu schneiden, wodurch Rhodamin 110 fluoresziert, wenn es bei einer Wellenlänge von 498 nm (blau) angeregt wird. Das Emissionsmaximum liegt mit 521 nm im grünen Bereich. Die Emission wurde mit dem Plattenlesegerät Victor detektiert. Die Stärke des Fluoreszenzsignals war proportional zur Aktivität der Caspasen 3/7.

In einer 96-Well-Platte wurden 50.000 Zellen/Well ausplattiert, 24 h anwachsen gelassen und dann 6 h oder 24 h mit den Substanzen behandelt. Dabei wurden 0,5 µl der in DMSO gelösten

Substanzen in jedes Well pipettiert. Es wurden keine zwei benachbarten Wells inkubiert, damit das Fluoreszenzsignal eindeutig einem Well zugeordnet werden konnte.

Für Inkubationsdauern von 48 h wurden nur 25.000/Well ausplattiert und 24 h anwachsen gelassen, um eine zu starke Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Messung zu vermeiden.

Zum Zeitpunkt der Messung betrug die Konfluenz im Well 95 %. Als Positivkontrolle wurde Paraquat in der Konzentration von 1 mM verwendet.

3.3.4 LDH-Assay

Um nekrotische Prozesse photometrisch nachzuweisen, wurde der LDH-Assay durchgeführt. Bei der Laktat-Dehydrogenase (LDH) handelt es sich um ein zytosolisches Enzym, das sowohl die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ als auch ihre Rückreaktion katalysiert. Diese befindet sich ausschließlich im Zytosol und gelangt nur bei einer Lyse von Zellen in die Umgebung. Das macht man sich auch in der klinischen Diagnostik zu Nutze. Sterben in einem Organismus Zellen ab, so wird das entsprechende Isoenzym ins Blut freigesetzt, sodass Blutanalysen dann Hinweise auf Organschäden geben können.

Um auch in der Zellkultur Nekrosen über die LDH-Aktivität im Überstand nachweisen zu können, wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Roche entwickelt. Es enthält drei Lösungen, von denen die Lysis Solution dazu dient, Zellen zu lysieren und damit eine maximale LDH-Freisetzung als Referenz zu erzeugen (*high control*). Die beiden anderen Lösungen (*Loading Dye* und *Catalyst*) enthalten Iodotetrazoliumchlorid (INT), Natriumlactat und Diaphorase/ NAD^+ .

Gelangt LDH aus dem Zytosol in den Zellüberstand, so wird Laktat zu Pyruvat oxidiert, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Das Enzym Diaphorase katalysiert die Reaktion von INT zu einem roten Formazansalz unter Oxidation von NADH/H^+ zu NAD^+ . Die Absorption des Formazans wird im Plattenlesegerät „*Sunrise*“ über 20 Min. bei einer Wellenlänge λ von 490 nm bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und ist proportional zur Menge lysierter nekrotischer Zellen (Roche-Produktinformation).

Für den Versuch wurden in einer 96-Well Platte Zellen analog MTT-Assay ausplattiert, d.h. für Inkubationsdauern von 24 h wurden 15.000/Well und für 48 h 8.000/Well ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen. 15 Min. vor Ende der Inkubationszeit wurden 2,5 μl Lysis Solution in zwei unbehandelte Wells pipettiert und 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden

jeweils 50 µl Medium aus jedem Well entnommen und auf eine neue 96-Well-Platte überführt. Die Reaktionslösung wurde angesetzt und zu jeweils 50 µl in jedes Well pipettiert. Dann erfolgte die 20-minütige Messung am Sunrise. Der Anstieg der LDH-Aktivität wurde ermittelt aus der Differenz der gemittelten Endwerte und gemittelten Startwerte der Messung und bezogen auf die maximale Aktivität der LDH im Zellüberstand nach Zelllyse durch die Lysis Solution (Referenz).

3.4 Genotoxizität und oxidativer Stress

3.4.1 Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen

Mit Hilfe des Comet-Assays (Single Cell Gelelectrophoresis = SCG) ist es möglich, DNA-Schäden in einzelnen Zellen elektrophoretisch nachzuweisen.

Rydberg und Johanson waren 1978 die ersten, die DNA-Schäden in einzelnen Zellen quantifizierten. Sie färbten nach Zelllyse die DNA mit Acridinorange, um doppelsträngige DNA (grün fluoreszierend) von einzelsträngiger DNA (rot fluoreszierend) photometrisch zu unterscheiden. Heute wird diese Methode jedoch nicht mehr angewandt (Rydberg und Johnson, 1978).

Beim Comet-Assay werden die Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen auf Objektträger transferiert und ihre Zellmembranen lysiert. Nach einer alkalischen Denaturierung der DNA wird sie elektrophoretisch aufgetrennt. Fragmentierte DNA kann im elektrischen Feld weiter in Richtung Anode wandern als kondensierte DNA. Liegt DNA außerhalb des Nukleus in Form von kleinen fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Fragmenten vor, so ist von einer DNA-Schädigung auszugehen (Olive et al., 1991).

Für den Comet-Assay wurden H4IIE (500.000/Well) in einem 6-Well in einem Volumen von 2 ml ausplattiert und für 24 h anwachsen gelassen. Die Schädigung der Zellen durch die Gold(I)-Komplexe dauerte 3 h bzw. 8 h. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,5 % Trypsin abgelöst und mit frischem Medium herunter gespült. 20 µl dieser Zellsuspension wurden in 200 µl „Low-Melting-Point-Agarose“ (0,5% iger LMP-Agarose) auf einem beschichteten Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Nachdem die Agarose bei 4 °C fest geworden war, konnte das Deckglas wieder entfernt werden. Anschließend erfolgte die Lysierung der Zellen in einem alkalischen Lysepuffer über Nacht bei 4 °C. Die alkalische Denaturierung der DNA ermöglichte auch den Nachweis von Einzelstrangbrüchen. Am nächsten Tag wurde für 25 Min. eine alkalische Elektrophorese durchgeführt, bei der die negativ geladene DNA zur Anode wanderte. Durch DNA-Schäden

entstandene kleine DNA-Fragmente wanderten dabei im elektrischen Feld weiter als große Fragmente oder intakte DNA. Am Fluoreszenzmikroskop sollten später diese kleinen Fragmente den Schweif der Kometen bilden, während die an der Kathode zurückgebliebene, intakte, kondensierte DNA den Kopf formte (Abb.10).

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger in Wasser geschwenkt und 15 Min. mit Neutralisationspuffer bedeckt, um die alkalische Lösung und Detergenzien zu entfernen, welche die Ethidiumbromidfärbung beeinträchtigen könnten (Singh et al., 1988). Die Objektträger wurden erneut in Wasser geschwenkt und für 5 Min. in Ethanol gestellt, bevor sie mehrere Stunden an der Luft getrocknet wurden. Mit 30 μ l Ethidiumbromid-Lösung (10 mg / 50 ml ddH₂O) beträufelt, konnten die Objektträger bei 400-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Ethidiumbromid fluoresziert bei Anregung mit einer Wellenlänge von 515 - 560 nm. Um DNA-Strangbrüche zu detektieren, wurde die Gesamtlänge der sichtbaren Nukleotide bestimmt. Die Kometen setzen sich, wie oben beschrieben, aus einem Kopf und einem Schweif zusammen. Bei der Auswertung wurde pro Versuch für jeden Objektträger die Gesamtlänge von 50 Nukleotiden ermittelt. Kontrollen hatten eine Länge von 10 - 17 μ m.

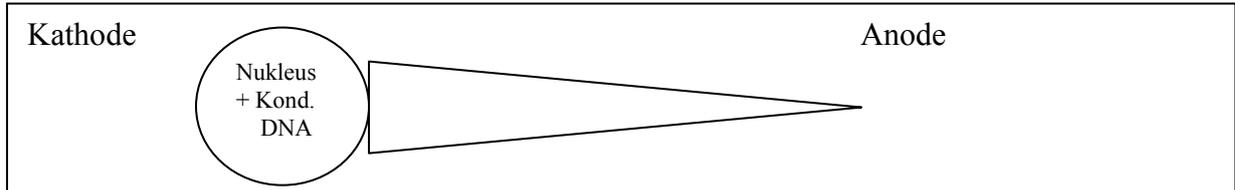


Abb. 10: Schematische Darstellung eines Kometen im elektrischen Feld

3.4.2 DCF-Assay im Plattenlesegerät

Diese Methode dient zum Nachweis von ROS und basiert auf der Oxidation von dem nicht-fluoreszierenden DCFH₂ zum fluoreszierenden DCF.

Inkubiert werden die Zellen mit DCFH₂-Diacetat (Abb.11), welches durch die Zellmembran diffundiert. Intrazellulär wird das Diacetat durch Esterasen abgespalten, wobei noch unklar ist, um welche Esterase es sich dabei handelt. Deacetyliertes DCFH₂ kann nicht mehr durch die Membran gelangen. Durch intrazelluläre radikale Sauerstoffspezies entsteht dann DCF, dessen Fluoreszenz bei Anregung mit einer Wellenlänge von 475 nm (485 – 500 nm) im Plattenlesegerät detektiert werden kann. Fluoreszierendes DCF emittiert Licht der Wellenlänge 515 – 530 nm (Chen et al., 2010).

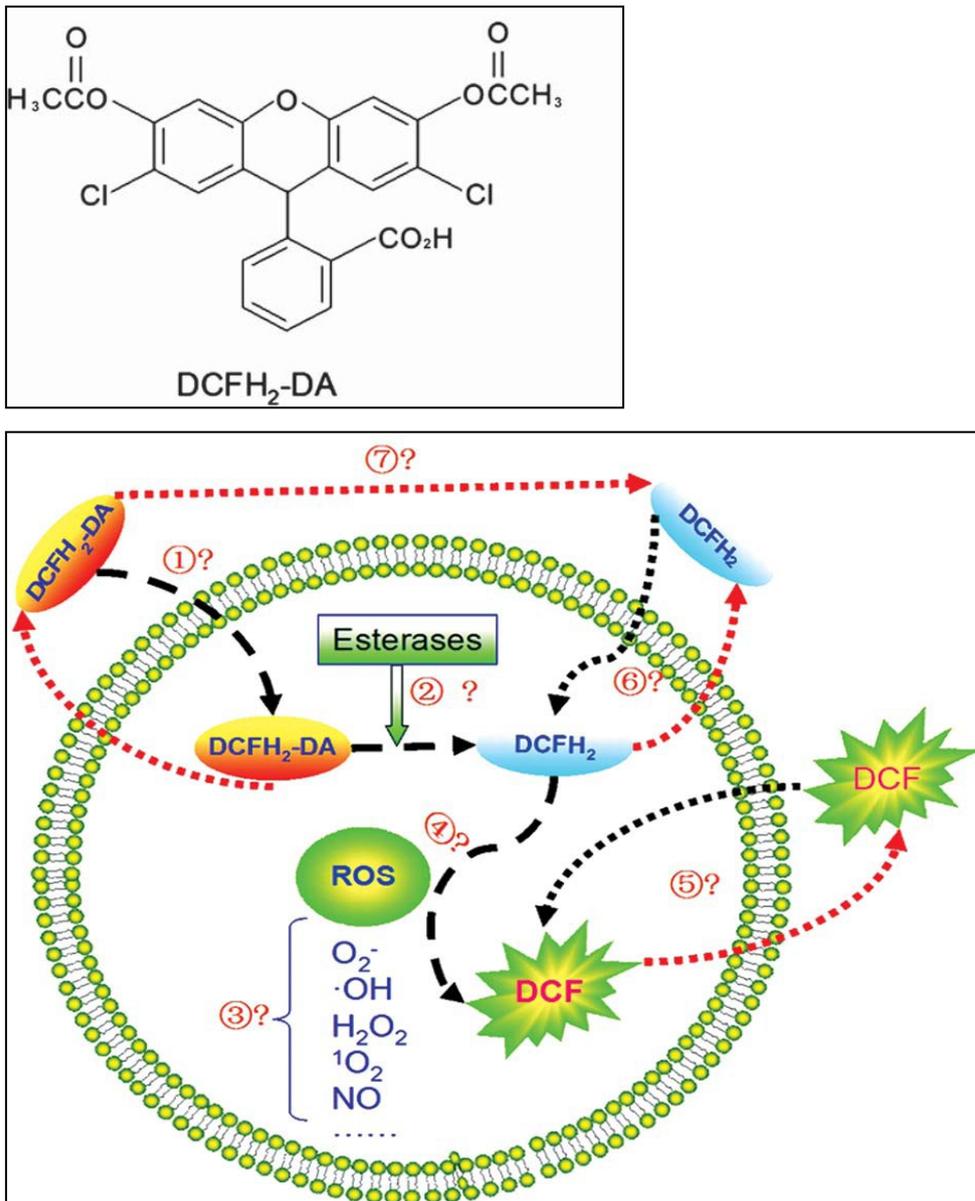


Abb. 11: Strukturformel von DCFH₂-Diacetat (oben), welches durch die Zellmembran in die Zelle dringt und dort zu DCFH₂ deacetyliert wird. DCF entsteht durch ROS intrazellulär (unten). (Abb. aus Chen et al., 2010)

H4IIE (100.000 Zellen/Well) wurden in einem 96-Well in jeweils 100 µl Medium ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen. Dann wurden die Zellen 30 Min. lang mit je 100 µl/Well 100 µM H₂DCF/DA-Lösung in farblosem DMEM inkubiert. Da die Fluoreszenzsonde lichtempfindlich ist, erfolgte die Arbeit in einem abgedunkelten Raum. Anschließend wurden die Lösungen mit 0,5 µl direkt ins Well pipettiert und sofort in das Plattenlesegerät gestellt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte eine Stunde lang bei 37 °C und einer Anregungswellenlänge von 475 nm (Emissionswellenlänge 525 nm). Als Positivkontrolle dienten Wasserstoffperoxidlösungen der Konzentrationen 0,5 mM und 1 mM.

3.5 Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer

Mit dem Durchflusszytometer / *fluorescence-activated-cell-sorter* (FACS) ist es möglich Zellzyklusanalysen durchzuführen. Dazu wird DNA mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Dabei wird der DNA markierende Fluoreszenzfarbstoff PI mit dem Laserlicht der Wellenlänge 488 nm angeregt und emittiert daraufhin selbst Licht der Wellenlänge 617 nm, das mit Hilfe des optischen Systems des FACS detektiert wird. Parallel zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen ist es über die Streuung des Laserlichts auch möglich, eine Aussage über die Größe und Granularität der Zellen zu treffen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) dient als Maß für die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) die Granularität der Zellen angibt (Luttmann et al., 2009).

Zur Zellzyklusanalyse wurden H4IIE (500.000 Zellen/Well/2 ml) auf einer 6-Well Platte ausgesät und 48 h anwachsen gelassen. Dann erfolgte die Inkubation mit den Gold(I)-Komplexen für 24 h und 48 h. Dazu wurden 995 µl des konditionierten Mediums abgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. 5 µl der in DMSO gelösten Gold(I)-Komplexe wurden hinzugegeben. Das restliche Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurde das Medium wieder zurück auf das Well gegeben. Nach 24 h bzw. 48 h wurde das Medium abgenommen. 200 µl 0,5 % Trypsin wurden in jedes Well pipettiert und 2 Min. bei 37 °C einwirken gelassen. Dann wurden die Zellen mit dem eigenen Medium herunter gespült und 5 Min. bei 200 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert, mit 5 µl RNase (1 mg/ml) und 5 µl PI (1 mg/ml) versetzt und für 1 h im Kühlschrank (4 °C) ruhen gelassen. Danach erfolgte die Messung und Auswertung am FACS. Bei der Auswertung wurden die Daten bzgl. der Größe und Granularität in Punktwolkendiagrammen (dot plots) dargestellt. In Histogrammen erfolgte die Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen.

3.6 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege

3.6.1 Proteinisolierung

Es wurden H4IIE (500.000 Zellen/Well) in je 2 ml Gesamtvolumen in einem 6-Well ausplattiert. Nach 72 h Anwachszeit wurden die Zellen mit der jeweiligen Testsubstanz in 1 ml Gesamtvolumen für 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h und 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das 6-Well auf Eis gestellt und das Medium dekantiert. Es folgte ein Waschvorgang

mit 1 x PBS. Um die Proteine vor Dephosphorylierung zu schützen, wurde das 1 x PBS mit 0,1 µl/ml Okadasäure versetzt. Die Zellen wurden anschließend mit RIPA-Puffer je 200 µl/Well aufgenommen und sofort bei -80 °C für mind. 30 Min. tiefgefroren, bevor sie wieder aufgetaut wurden. Nach erneutem Einfrieren und Auftauen wurden die Proben bei 13200 rpm und 4 °C 10 Min. lang zentrifugiert. Der proteinreiche Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Von dem Überstand wurden 10 µl abgenommen und mit 40 µl destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 5 verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Proteinbestimmung nach Lowry. Der Rest des proteinreichen Überstandes wurde bei -80 °C tiefgefroren.

3.6.2 Proteinbestimmung mittels BioRad-DC Protein-Assay

Mit diesem Assay kann kolorimetrisch der Proteingehalt von Lösungen bestimmt werden. Die Reaktion ist ähnlich der Proteinbestimmung nach Lowry. Lowry et al. beschreiben die Zusammensetzung der Reaktionsgemische wie folgt: Reagenz A ist Lösung aus 2 % Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH, Reagenz B besteht aus 0,5 % CuSO₃ · 5H₂O in 1 % Natrium-Tartrat oder Kalium-Tartrat, Reagenz C ist eine alkalische Kupferlösung, Reagenz D ist eine Kupfer-Carbonat-Lösung und Reagenz E ist schließlich verdünnte Folin-Reagenz (Lowry et al., 1951). Nach Lowry et al. kommt es bereits in Abwesenheit von Kupfer durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zu einer Färbung der Proteine. Nach Reaktion der Proteine mit Kupfer im alkalischen Milieu ist die Farbintensität jedoch 3 – 15-fach erhöht. Diese Reaktion ist bereits nach 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur abgeschlossen. Die Folin-Reagenz wird anschließend zu der Kupfer-Tartrat-Protein-Lösung hinzugefügt, wobei eine Reduktion der Folin-Reagenz erfolgt (Lowry et al., 1951).

Heute werden bei dem BioRad-DC Protein-Assay nur drei Lösungen verwendet: Reagenz A, S und Reagenz B. Reagenz A und S werden zu A' gemischt und anschließend zu Reagenz B hinzugefügt. Der Assay basiert auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und einer Folin-Reagenz (DC Protein Instruction Manual Bio-Rad).

Die Farbentwicklung kommt dadurch zustande, dass Proteine unter alkalischen Bedingungen mit Kupfer-Cu²⁺-Ionen reagieren (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺ komplexierten Proteine reduzieren die Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz. Erst wird Cu²⁺ im Proteinkomplex zu Cu⁺ reduziert. Dann wird das Molybdän bzw. Wolfram, als Heteropolyphosphorsäuren in der Folin-Reagenz vorliegend, von der Oxidationsstufe VI zur Oxidationsstufe IV reduziert (Rehm, et al., 2009). Der Farbumschlag der Folin-Reagenz von gelb nach blau bei der Reduktion kann photometrisch bestimmt werden bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Für die Proteinbestimmung wird eine Regressionsgerade benötigt, die man mit Hilfe von unterschiedlichen Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) erstellt (0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,8 mg/ml; 1 mg/ml).

In einer 96-Well-Platte wurden zuerst je 25 µl Reagenz A' pro Well vorgelegt, welche aus Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung) und Reagenz S zuvor hergestellt worden ist.

Wie der Standard für die Regressionsgerade wurden auch die Proben, in einer 1 : 5 - Verdünnung auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl Reagenz B (Folin-Reagenz) in jedes Well mit einem Stepper zugegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die Messung der Absorption des blauen Komplexes im Sunrise bei 595 nm. Bei der Auswertung lässt sich anhand der Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proben ermitteln.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS Page dient der Proteinauftrennung nach ihrer Molekularmasse ohne Berücksichtigung der Eigenladung.

Das Polyacrylamidgel der SDS-Page besteht im flüssigen Zustand aus Acrylamidmonomeren, die nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylthylendiamin (TEMED) polymerisieren und über das quervernetzende Reagenz N'N'-Methylenbisacrylamid ein dreidimensionales Netz bilden. Es werden zeitversetzt übereinander zwei Gele gegossen, ein Trenngel und ein Sammelgel. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine, sodass die Proteine nahezu gleichzeitig in das kleinporigere Trenngel einlaufen können, wo sie dann der Größe nach aufgetrennt werden.

Natriumdodecylsulfat (SDS) verhindert, dass die Proteine nach ihrer Eigenladung aufgetrennt werden, da SDS als anionisches Detergens wirkt, das die räumliche Struktur der Proteine aufhebt, sie linearisiert und die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass alle Proteine gleichmäßig negativ geladen sind (Luttmann, 2009).

Bei einem Strom von 15 mA (kleine Page) bzw. 30 mA (große Page) wurden die Proteine im Sammelgel fokussiert. Sobald sie das Trenngel erreicht hatten, wurde eine Spannung von 100 bis 150 V angelegt. Dabei wanderten kleine Proteine schneller durch die Poren des Trenngels zur Anode, während große Proteine in der Nähe der Auftragsstelle an der Kathode zurückblieben.

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche mit Agarose zuvor abgedichtet werden mussten. Zuerst wurde ein 10 % iges Trenngel für ein kleines Gel pipettiert (Rezept

siehe unten), gegossen und anschließend mit ca.0,5 ml Butanol überdeckt. Für ein großes Gel wurde das doppelte Rezept verwendet. Nach einer Stunde, in der das Trenngel polymerisieren konnte, wurde das Butanol entfernt und das 4,5 % ige Sammelgel pipettiert und gegossen. Der Kamm wurde vorsichtig ins Sammelgel eingeschoben. Dieses polymerisierte innerhalb von 30 Min. Anschließend wurde das Gel in die Gelelektrophorese-Kammer eingespannt, wobei die Aussparung in Richtung Puffertank zeigte, und beide Tanks wurden mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt. Nachdem die Luftblasen unter dem Gel entfernt worden waren, um einen gleichmäßigen Lauf der Proteine zu garantieren, wurde der Kamm gezogen.

Vor dem Auftragen mussten die Proben wie folgt behandelt werden: Die errechnete Proteinmenge wurde mit ddH₂O und 4 x SDS-Probenpuffer versetzt, sodass die aufzutragende Probe 1 x SDS-Probenpuffer enthielt. Alle Proben hatten das gleiche Gesamtvolumen. Dann erfolgte eine Denaturierung der Proteine im Heizblock bei 95 °C für 10 Min. mit anschließender Abkühlung auf Eis. Kurz vor dem Auftragen wurden die Proben noch einmal kurz zentrifugiert. Aufgetragen wurden die Proteinproben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze. Als Marker standen Prestained- und Unstained-Marker zur Verfügung, die in die ersten Taschen des Gels pipettiert wurden.

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4,5 %
Acrylamid-Bisacrylamidlösung 30%	2 ml	3 ml	0,6 ml
Trenngel-/Sammelgelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	2 ml
dH ₂ O	2,5 ml	1,5 ml	1,388 ml
APS 10%	30 µl	30 µl	24 µl
TEMED	5 µl	5 µl	4 µl

3.6.4 Western Blot

Das Ziel des Western Blots ist es, Proteine von dem Elektrophoresegel unter Anlegen einer Spannung auf eine PVDF-Membran zu übertragen, um sie später mittels Chemilumineszenz detektieren zu können.

Vor dem Blot wurden Whatman-Papiere und die PVDF-Membran auf Gelgröße (6 cm x 9 cm oder 6,5 cm x 14 cm) zugeschnitten. Die Whatman-Papiere wurden einige Minuten in

Anoden- bzw. Kathoden-Puffer geschwenkt, während die Membran erst kurz vor dem Blotting mit Methanol aktiviert wurde.

Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten aus der Elektrophoresekammer ausgespannt und das Trenngel vom Sammelgel separiert. Dann wurde die Blotting-Apparatur wie folgt aufgebaut: Auf die unten liegende Anode wurden drei in Anodenpuffer geschwenkte Whatman-Papiere gelegt. Darauf wurden die Membran und das Trenngel platziert, bevor drei in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere folgten. Mit der Kathode zuletzt war dann der Aufbau vollendet. Anschließend wurde bei 270 mA 30 Min. lang geblottet.

3.6.5 Proteindetektion mittels Antikörpern

Nach dem Blotten wurde die Membran 1 Stunde lang mit 5 % Milchpulver in TBST auf dem Schüttler geschüttelt. Dies dient dazu, unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren, sodass Primärantikörper hier nicht mehr binden konnten.

Um Proteine auf der Membran sichtbar machen zu können, mussten zuerst Primärantikörper verwendet werden, die mit ihrer Fab-Region spezifisch an die gesuchten Proteine binden konnten. Die Inkubation erfolgte eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf dem Schwenker. Nach der Inkubation folgen drei Waschvorgänge mit TBST à 15 Min. Danach wurden an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt, die an die Fc-Region der Primärantikörper banden. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper erneut dreimal je 15 Min. lang mit TBST gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Membran mit 600 µl BM Chemiluminescence Western Blotting Kit für eine Minute bei Raumtemperatur.

Das Kit wurde kurz vorher hergestellt aus Substrat A (Luminol und Enhancer) und Substanz B. Das Substrat Luminol (enthalten in Substrat A) wurde von der „horseradish peroxidase“ (HRP) des Sekundärantikörperes oxidiert und die Chemilumineszenz daraufhin im Fusion TX7 sichtbar gemacht.

Danach wurde die Membran mit Coomassie-Blue, einem Triphenylmethanfarbstoff, gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich an basische Seitenketten von Aminosäuren an und färbt damit Proteine unspezifisch. Damit ist ein genereller Proteinnachweis auf der PVDF-Membran möglich. So lässt sich überprüfen, ob in alle Taschen der SDS-Page die gleiche Proteinmenge pipettiert wurde.

3.6.6 Strippen von PVDF-Membranen

Nach der Chemilumineszenz-Detektion wurde die PVDF-Membran kurz in Methanol geschwenkt, um die Membran erneut zu aktivieren. Dann wurde sie in TBS kurz gewaschen und anschließend 30 Min. lang bei 37 °C mit Restore Western Blotting Stripping Buffer (Thermo Scientific) vollständig bedeckt auf dem Schüttler stehen gelassen. Im Anschluss folgten zwei weitere Waschschrirte von jeweils 5 Min. Dauer. Für 1 h wurden die freien Proteinbindungsstellen mit Milchpulver blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper für eine weitere Stunde. Nach dreimaligem Waschen in TBST auf dem Schüttler für jeweils 15 Min. wurde die Membran schließlich mit dem Sekundärantikörper eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C geschwenkt.

4. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, fünf Gold(I)-Komplexe mit Diphosphan-Liganden und weitere fünf mit N-heterozyklischen-Carben-Liganden auf ihre Toxizität auf Rattenkrebszellen zu untersuchen. Dabei wurde hauptsächlich mit H4IIE-Zellen gearbeitet.

Zur groben Abschätzung der biologischen Wirksamkeit der Substanzen wurden zuerst MTT-Assays auf beiden Rattenzelllinien C6 und H4IIE durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationsdauern getestet. Es zeigte sich, dass unter den Substanzen einige eine vielversprechende Toxizität im mikromolaren Bereich aufwiesen. Diese wurden auf H4IIE-Zellen weiter untersucht, um die Art und Ursache des Zelltodes zu ermitteln. Zeigten die behandelten Zellen morphologische und molekularbiologische Veränderungen, die auf Apoptose hindeuteten, so wurden weitere Untersuchungen angestellt, welche die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Assay) oder DNA-Strangbrüche (Comet-Assay) nachweisen sollten, um nach der Ursache für die Apoptoseinduktion zu fahnden. Auch der Einfluss der Substanzen auf den Zellzyklus wurde analysiert. Mit Hilfe des Western Blots wurde außerdem untersucht, ob intrazelluläre Apoptose-induzierende Signalwege durch die Gold(I)-Verbindungen beeinflusst wurden.

Alle zu untersuchenden Goldkomplexe wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, einem membrangängigen Lösungsmittel. Bei allen Versuchen wurde die Konzentration an DMSO im Well konstant bei 0,5 % gehalten. Nach A. Kulawik haben 0,5 % DMSO nur einen sehr geringen toxischen Effekt auf die Zellen, sodass eine durch Lösungsmittel induzierte Toxizität ausgeschlossen werden kann (Kulawik, 2007).

Bei allen Versuchen wurde parallel lichtmikroskopisch die Morphologie der Zellen begutachtet und dies bei der Auswertung und Deutung der Versuche berücksichtigt.

A Ergebnisse zu Gold(I)-Komplexen mit Diphosphan-Liganden

4.1 Zytotoxizitätsnachweis mittels MTT-Assay

4.1.1 Vorversuche zur Zytotoxizität in H4IIE

4.1.1.1 Zytotoxizität von Wasserstoffperoxid in H4IIE-Zellen

Zuerst wurde im Rahmen eines Vorversuches die Toxizität von dem membrangängigen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in H4IIE-Zellen mittels MTT-Assay getestet, um es als Positivkontrolle für weitere Versuche zu etablieren. Die Absorption diente hierbei als Maß für die Zellviabilität.

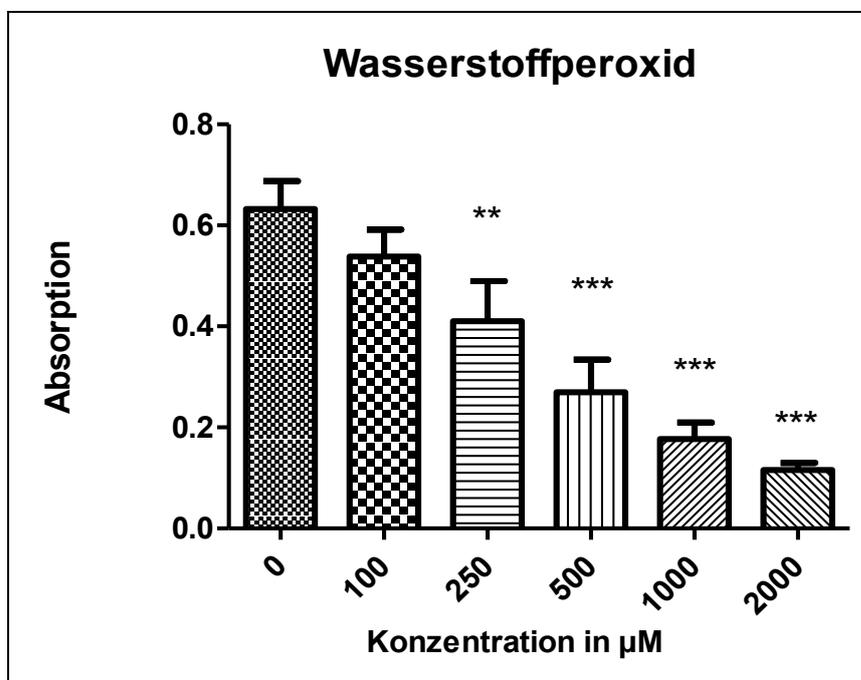


Abb. 12: Zytotoxizität von Wasserstoffperoxid in H4IIE. Auf einer 96-Well-Platte wurden H4IIE (15.000/Well) 24 h lang anwachsen gelassen und für weitere 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 inkubiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte (\pm SD), Signifikanz gegenüber Kontrolle, ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

H_2O_2 erwies sich als toxisch in H4IIE und zeigte eine signifikante Absorptionsabnahme bei einer Konzentration von 250 μM H_2O_2 im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb.12). Der IC_{50} -Wert lag bei ca. 500 μM . H_2O_2 konnte als Positivkontrolle für weitere Versuche mit H4IIE-Zellen dienen.

4.1.1.2 Zytotoxizität bei unterschiedlicher Konfluenz

In einem Vorversuch sollte untersucht werden, ob alleine schon die Konfluenz einen Einfluss auf das Ausmaß der Toxizität der Substanzen hat. Dazu wurden in einem MTT-Assay H4IIE-Zellen derselben Passage zu unterschiedlichen Zellzahlen von 5.000 bis 50.000/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Anwachsdauer von 24 h wurde lichtmikroskopisch die Konfluenz bestimmt. Bei 5.000/Well betrug die Konfluenz vor der Inkubation mit den beiden ausgewählten Substanzen 30 %, bei 8.000/Well ca. 50 %, bei 15.000/Well ca. 70 %, bei 25.000/Well 85 % und bei 50.000/Well 90-95 %. Dann wurden die unterschiedlichen Zellzahlen exemplarisch mit CW109 und CW60 zu jeweils 5 μM und 10 μM behandelt. Als Negativkontrolle diente auch hier DMSO.

Im Zytotoxizitätstest mit CW109 und CW60 nahm bei zunehmender Konzentration die Absorption prozentual ungefähr im gleichen Maße ab bzgl. des vorangegangenen Wertes, unabhängig von der Zellzahl und Konfluenz im Well (Abb.13 und Abb.14).

Der geringfügige Unterschied bei 10 μM von CW60 zwischen 15.000/Well und 8.000/Well (Abb. 15) widerspricht dem nicht, weil bei 15.000/Well eine größere Standardabweichung vorliegt. Man kann also davon ausgehen, dass die unterschiedliche Konfluenz zum Zeitpunkt der Schädigung der Zellen keinen gravierenden Einfluss auf das Ausmaß der Zytotoxizität hat und eine höhere Konfluenz keinen wesentlichen Schutz vor der toxischen Wirkung bietet.

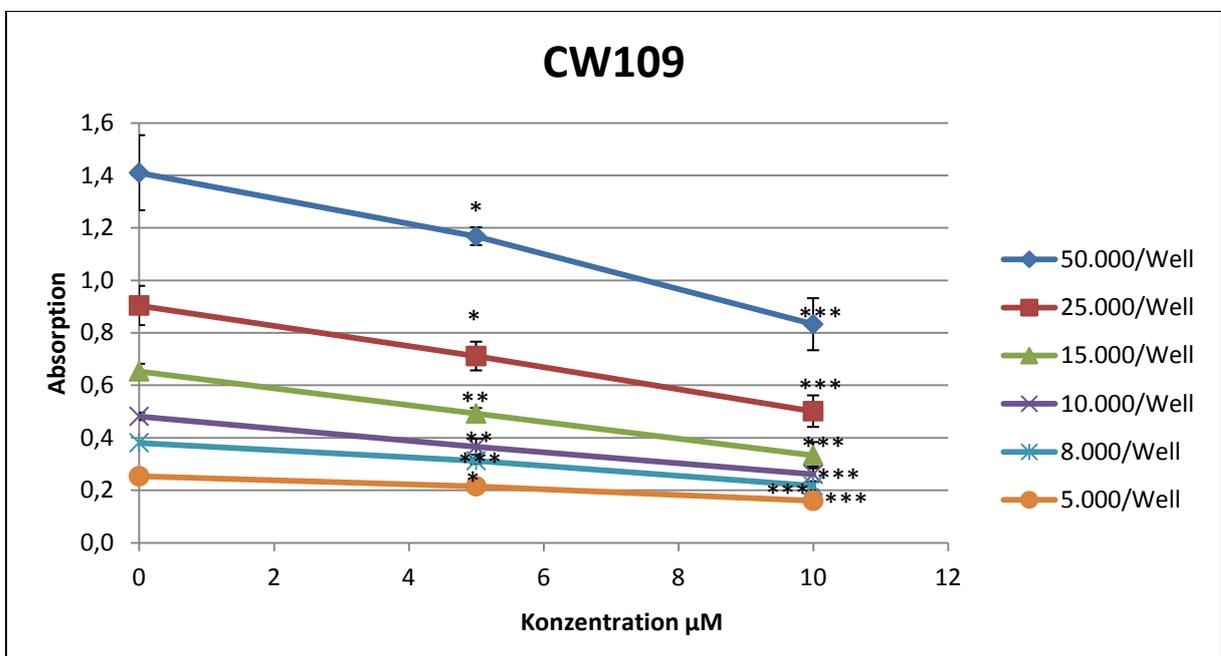


Abb. 13: Zytotoxizität von CW109 in H4IIE mit unterschiedlicher Konfluenz im 96-Well. H4IIE (5.000/Well bis 50.000/Well) wurden für 24 h mit 5 μM und 10 μM von CW109 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

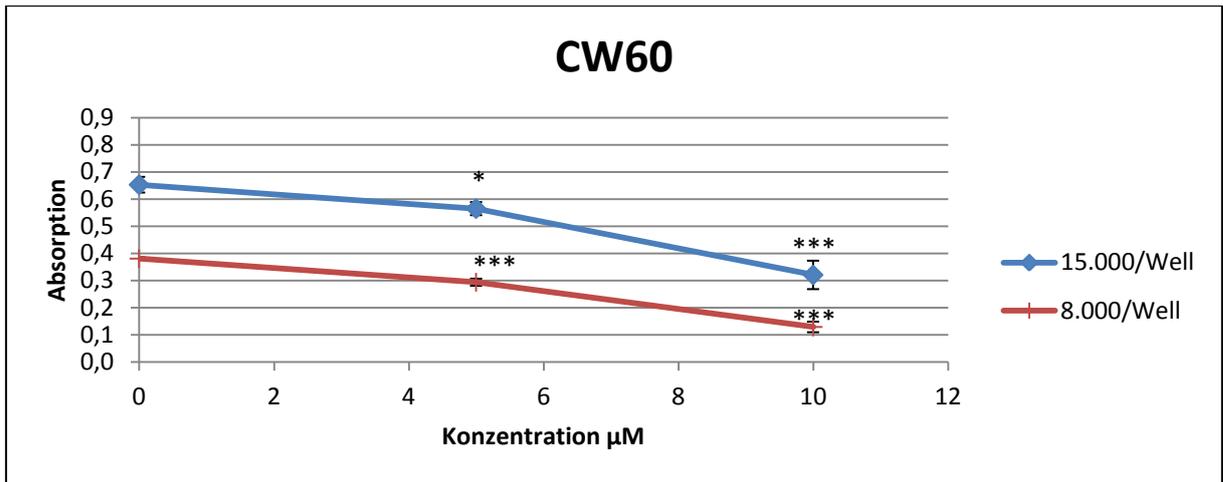


Abb. 14: Zytotoxizität von CW60 in H4IIE mit unterschiedlicher Konfluenz im 96-Well. H4IIE wurden für 24 h mit 5 μM und 10 μM von CW60 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SD). n = 3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

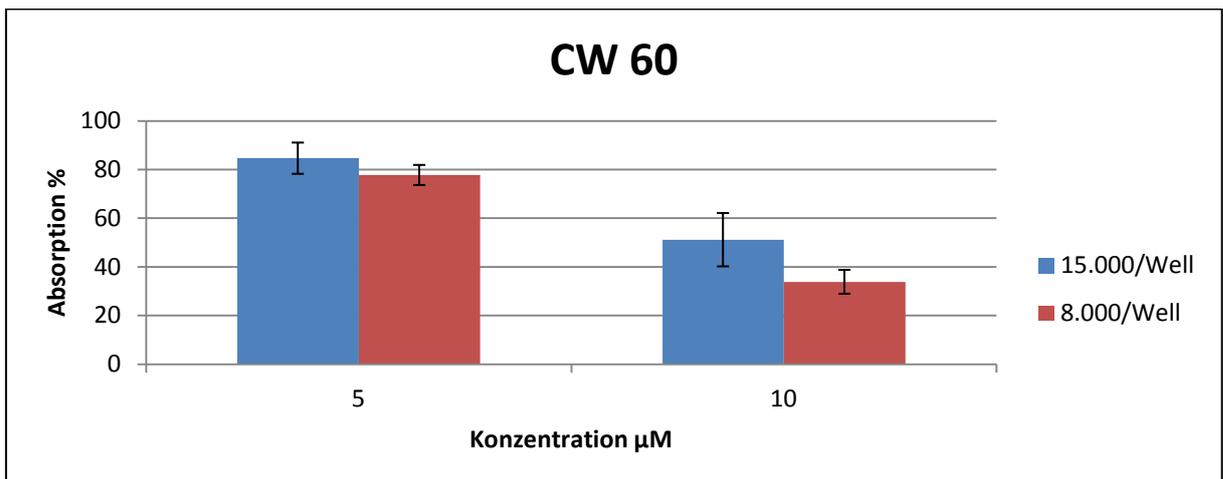


Abb. 15: Zytotoxizität von CW60 in H4IIE mit unterschiedlicher Konfluenz im 96-Well. H4IIE wurden für 24 h mit 5 μM und 10 μM von CW60 inkubiert. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 560 nm in Prozent (%) bzgl. der Negativkontrolle (+/- SD). n=3

Mit dem MTT-Assay wurde die Zytotoxizität aller Substanzen in den Zelllinien C6 und H4IIE untersucht, um einen Überblick über das Ausmaß ihrer Toxizität zu erhalten.

Sowohl C6 (10.000/Well) als auch H4IIE (15.000/Well) wurden jeweils nach 24 h Anwachsdauer in einem 96-Well für weitere 24 h mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen inkubiert. H4IIE wurden außerdem für 48 h und 72 h mit den Substanzen behandelt. Nachdem die Carbene CW171a/b und die Phosphane CW60 und CW90 nach 24 h bereits eine starke Toxizität zeigten, wurden zusätzlich Inkubationen für 3 h, 6 h und 12 h durchgeführt, um zu ermitteln, ab welchem Zeitpunkt die Toxizität eintrat.

4.1.2 Zytotoxizität der Gold(I)-Komplexen mit Diphosphan-Liganden in C6 und H4IIE

Von den fünf Diphosphan-gold(I)-Komplexen zeigten CW35 und CW143 nach 24 h Inkubation bei Konzentrationen von bis zu 10 μM ($n=3$) und bis zu 50 μM ($n=2$) in C6-Zellen keine Toxizität (siehe Rohdaten). Auch in H4IIE-Zellen waren beide Substanzen bis zu einer Konzentration von 50 μM nach einer Inkubationsdauer von 72 h nicht toxisch (Abb. 16 und Abb. 17). Mit beiden Substanzen wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, da sie unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine zu geringe Wirkung zeigten.

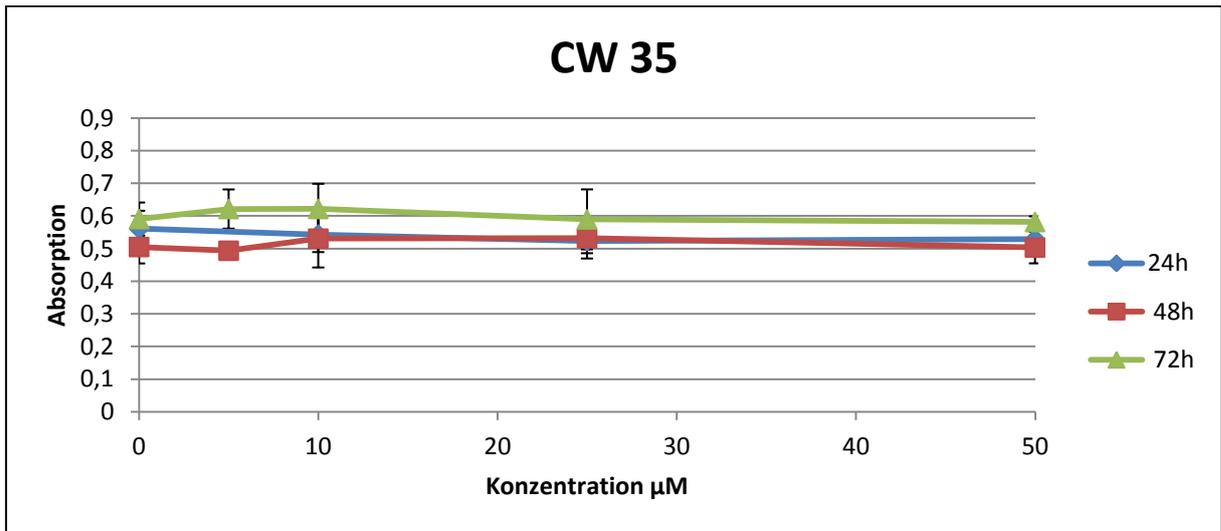


Abb. 16: Zytotoxizität von CW35 in H4IIE. H4IIE wurden für 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW35 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). $n=3$, Signifikanz gegenüber Kontrolle

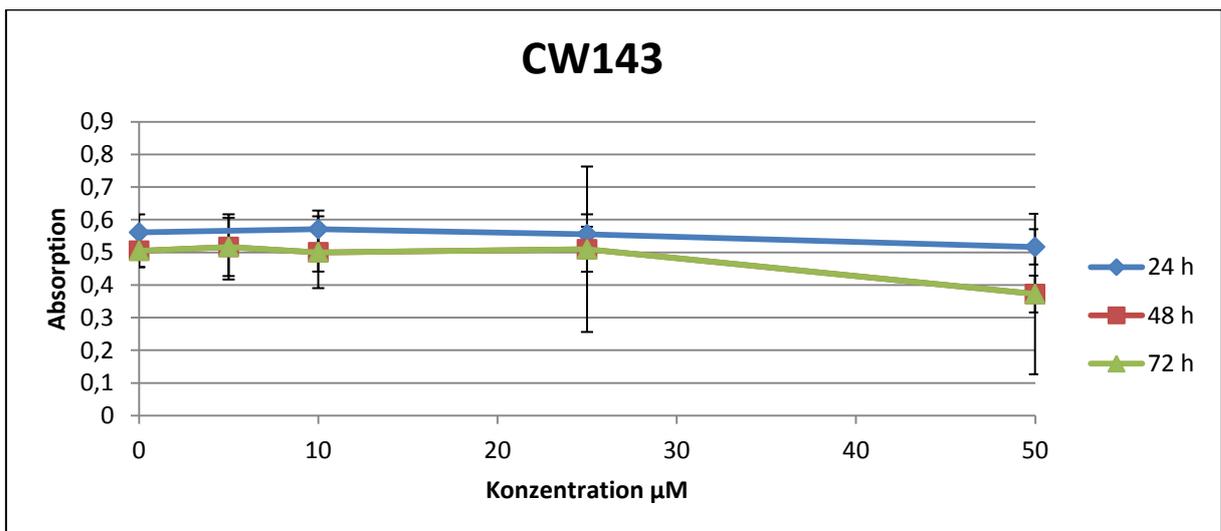


Abb. 17: Zytotoxizität von CW143 in H4IIE. H4IIE wurden für 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW143 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). $n=3$, Signifikanz gegenüber Kontrolle

Die Toxizität der anderen drei Substanzen mit Phosphan-Liganden wurde ebenfalls auf beiden Zelllinien untersucht. CW55 zeigte in C6-Zellen nach 24 h Inkubation bis zu einer Konzentration von 10 μM ($n=3$) und sogar bis zu 50 μM ($n=2$) keine Toxizität (siehe Rohdaten). Auch in H4IIE-Zellen zeigte sich nach 24 h keine toxische Wirkung bis zu 50 μM (Abb. 18). Erst nach 48 h Inkubationsdauer war bei einer Konzentration von 5 μM ein signifikanter Unterschied zur Absorption der Kontrollzellen (behandelt mit DMSO) zu sehen. Hier scheint die Inkubationsdauer entscheidend für die toxische Wirkung der Substanz zu sein. Da CW55 in H4IIE-Zellen keine Toxizität im MTT-Assay nach 24 h zeigte, wurde auch diese Substanz nicht weiter untersucht hinsichtlich ihres apoptotischen Potenzials.

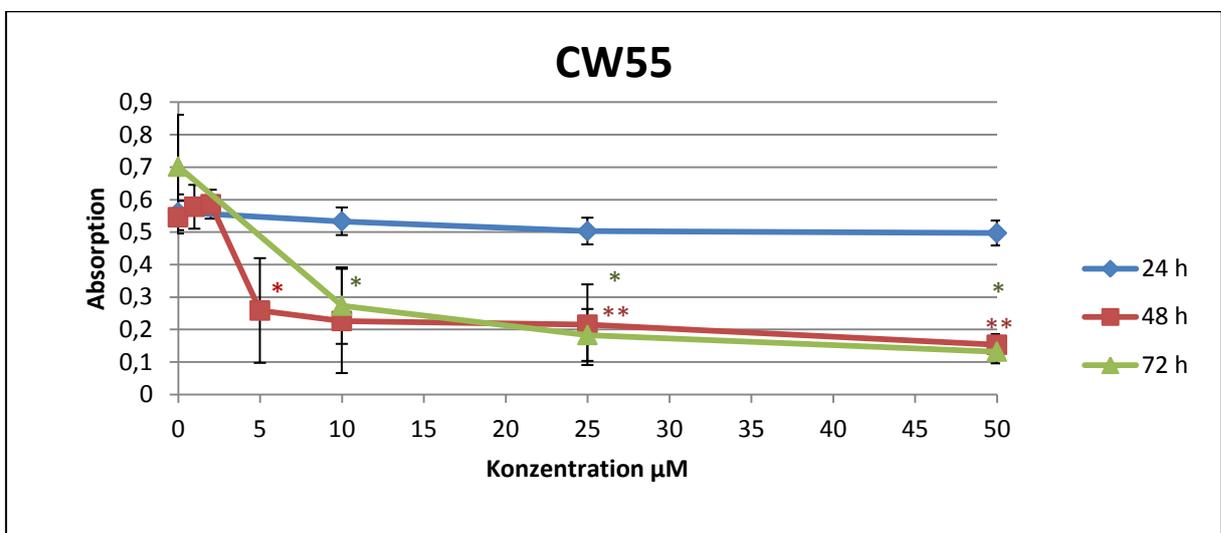


Abb. 18: Zytotoxizität von CW55 in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden für 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW55 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl metabolisch kompetenter Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). $n=3$, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

CW90 zeigte nach 24 h Inkubation von C6 einen signifikanten Abfall der Absorption bei der Konzentration von 5 μM (IC_{50}) (Abb. 19). Daraufhin wurden auch H4IIE-Zellen mit CW90 bis zu einer Konzentration von 10 μM für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h inkubiert (Abb. 20). Nach 24 h Inkubation von H4IIE-Zellen mit Konzentrationen bis zu 10 μM zeigte sich keine Veränderung der Zellviabilität. Erst nach 48 h war in H4IIE-Zellen ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle bei einer Konzentration von 5 μM zu verzeichnen.

C6 scheinen demnach nach 24 h sensibler auf CW90 zu reagieren als H4IIE, die erst nach 48 h eine vergleichbare Schädigung zeigten.

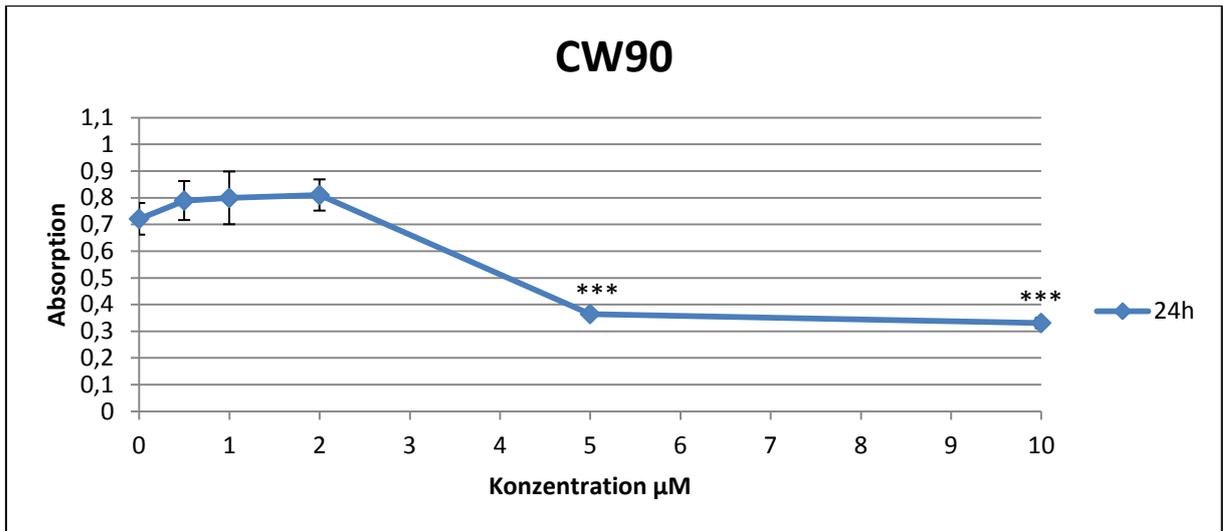


Abb. 19: Zytotoxizität von CW90 in C6-Zellen. C6 (10.000/Well) wurden für 24 h mit CW90 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD), n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

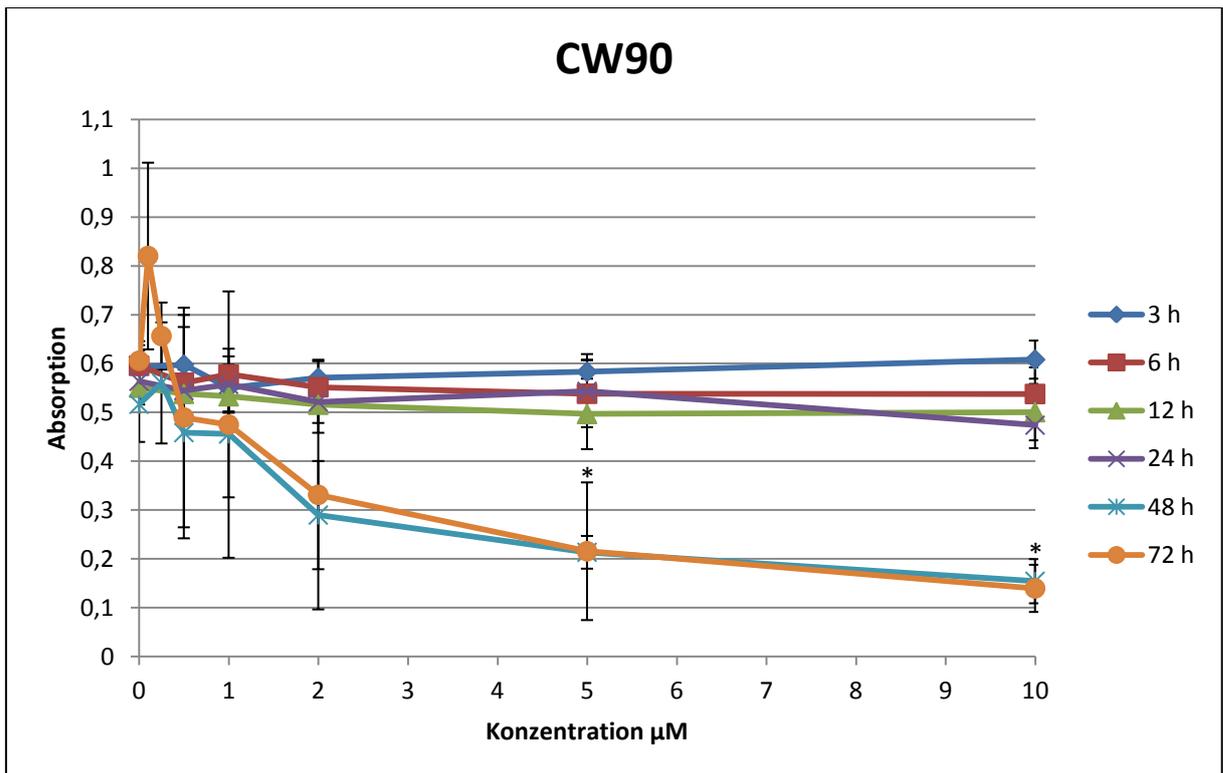


Abb. 20: Zytotoxizität von CW90 in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden für 3 h, 6 h, 12 h und 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW90 inkubiert. Es wurden Konzentrationen bis zu 10 μM verwendet. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD), n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$

Von allen Diphosphan-gold(I)-Komplexen erwies sich CW60 mit den beiden Bis(thiazolylphosphan)-Liganden als die Substanz mit dem stärksten zytotoxischen Potenzial in beiden Zelllinien (Abb. 21 und Abb. 22). Der IC₅₀-Wert lag nach 24 h Inkubation in C6-Zellen bei ca. 5 µM, in H4IIE bei ca. 6,5 µM.

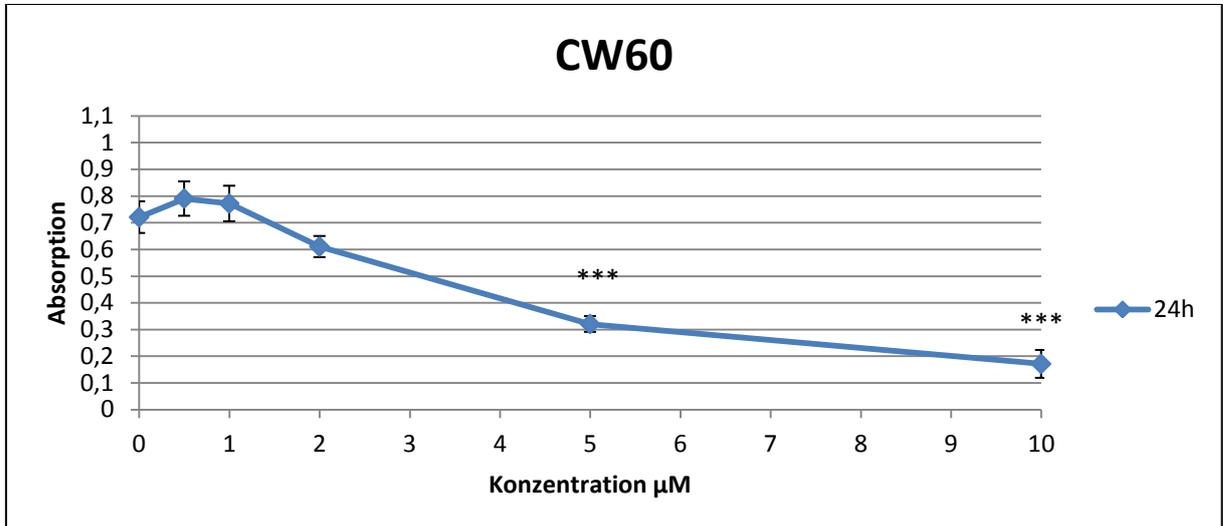


Abb. 21: Zytotoxizität von CW60 in C6-Zellen. C6 (10.000/Well) wurden mit CW60 für 24 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD), n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = p < 0,001

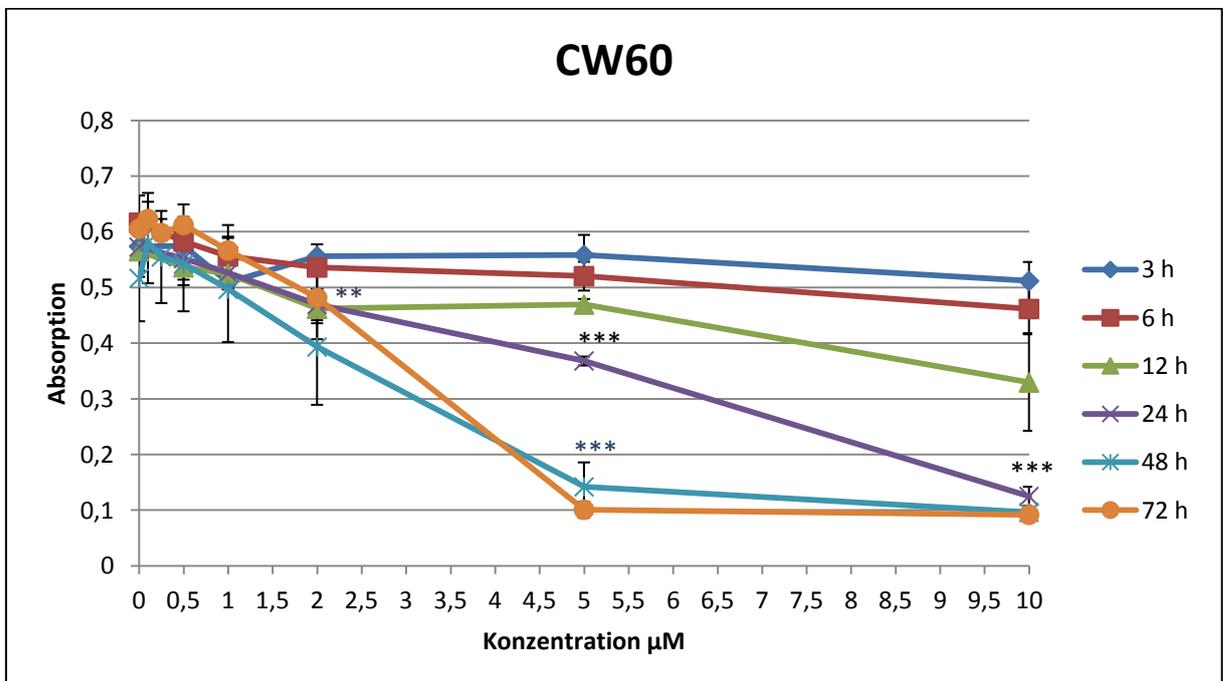


Abb. 22: Zytotoxizität von CW60 in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden für 3 h, 6 h, 12 h und 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW60 inkubiert. Es wurden Konzentrationen bis zu 10 µM verwendet. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD), n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

Lichtmikroskopisch waren morphologische Veränderungen der H4IIE-Zellen nach Inkubation mit CW60 5 μM erkennbar (Abb. 23).

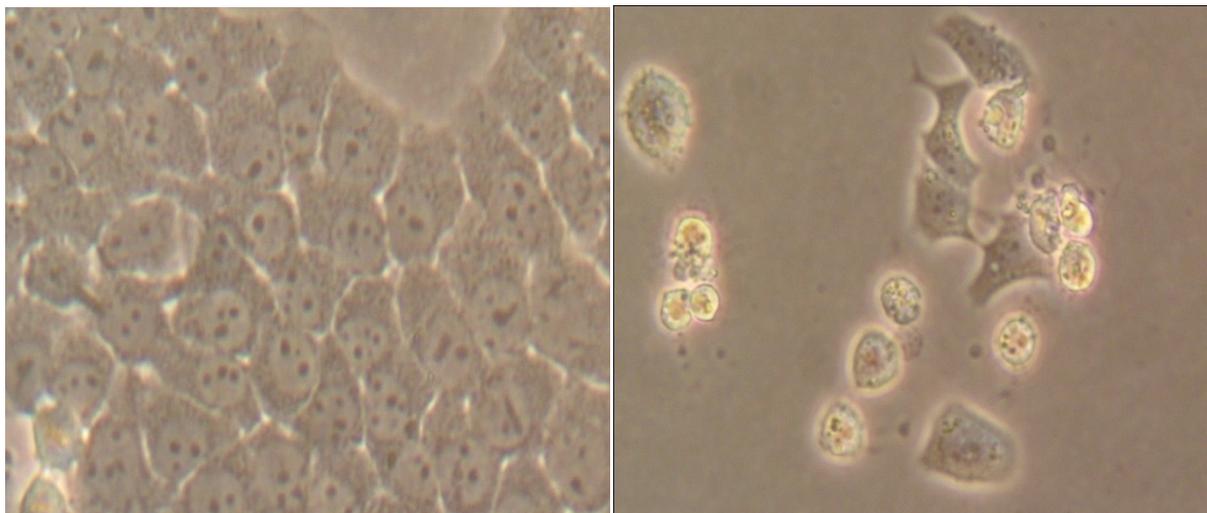


Abb. 23: Morphologie der H4IIE-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (320-fache Vergr.)

Links: Mit DMSO behandelte Zellen als Negativkontrolle, **Rechts:** Durch CW60 5 μM geschädigte Zellen nach 72 h Inkubation im 96-Well.

4.2 Apoptosenachweise und Nekrosenachweise der Gold(I)-Komplexe mit Diphosphan-Liganden in H4IIE

4.2.1 Life-Dead-Assay mit Diphosphanen

Um die Art des Zelltodes von H4IIE-Zellen zu untersuchen, wurde der Life-Dead-Assay durchgeführt, bei dem sich Nekrosen und Apoptosen fluoreszenzmikroskopisch unterscheiden ließen. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) und Hoechst 33342 behandelt, wobei PI die DNA nekrotischer Zellen färbte und im Fluoreszenzmikroskop rot erscheinen ließ, während Hoechst 33342 die DNA von Zellen mit intakter Zellmembran anfärbte und die Nuklei blau leuchteten. Diese Methode wurde angewandt, um einen ersten Anhaltspunkt für die Art des Zelltodes zu bekommen. Methoden zum enzymatischen Nachweis von Apoptosen und Nekrosen wurden angeschlossen.

Zuerst wurde der Life-Dead-Assay mit CW60 zu unterschiedlichen Konzentrationen mit einer Inkubation von 24 h durchgeführt. Erst bei 10 μM war eine signifikante Erhöhung an Nekrosen und Apoptosen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar im Vergleich zur Negativkontrolle, die nur mit DMSO behandelt war (Abb. 24 und Abb. 26). Anschließend wurden die Zellen auch für 48 h mit 2,5 μM und 5 μM inkubiert. Bei 5 μM waren signifikant mehr Nekrosen und Apoptosen sichtbar als bei der Kontrolle (Abb. 25 und Abb. 27).

Apoptotische Vorgänge wurden also durch CW60 bereits nach 24 h ab einer Konzentration von 10 μM induziert und nach 48 h sogar bei einer Konzentration von 5 μM .

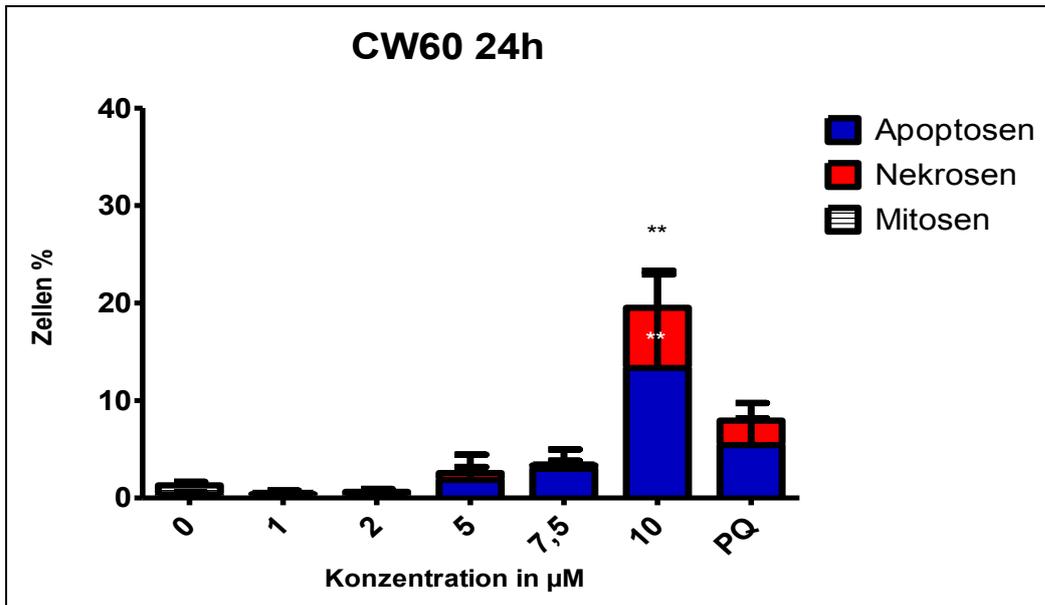


Abb. 24: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-SD) der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent, nach 24 h Inkubation mit CW60. Signifikanz gegenüber Kontrolle, ** $p < 0,01$

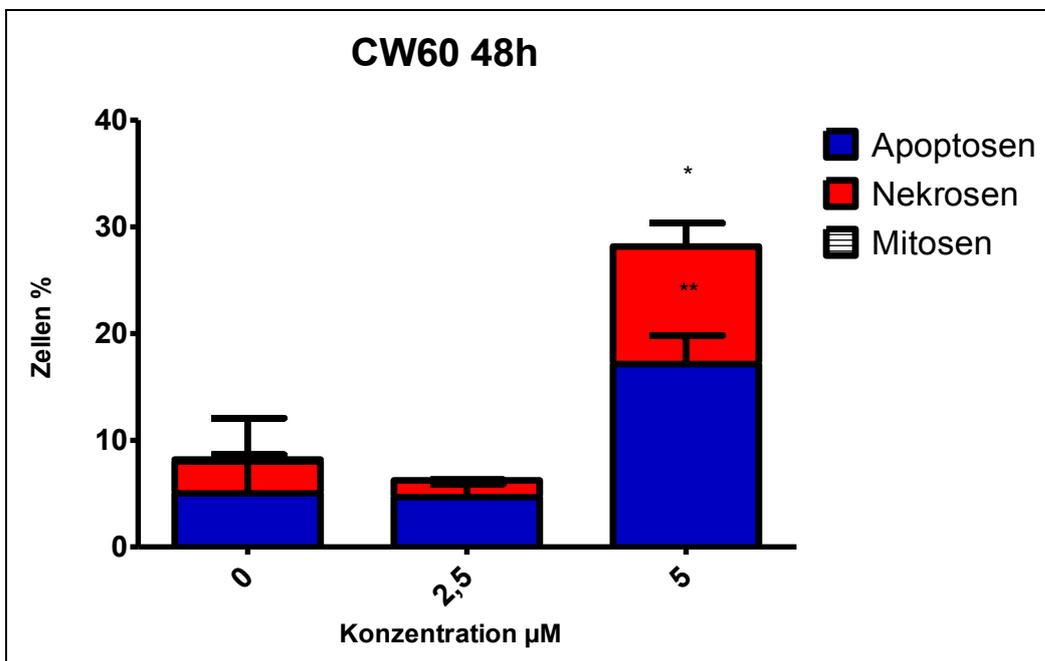


Abb. 25: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-SD) der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent, nach 48 h Inkubation mit CW60. Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

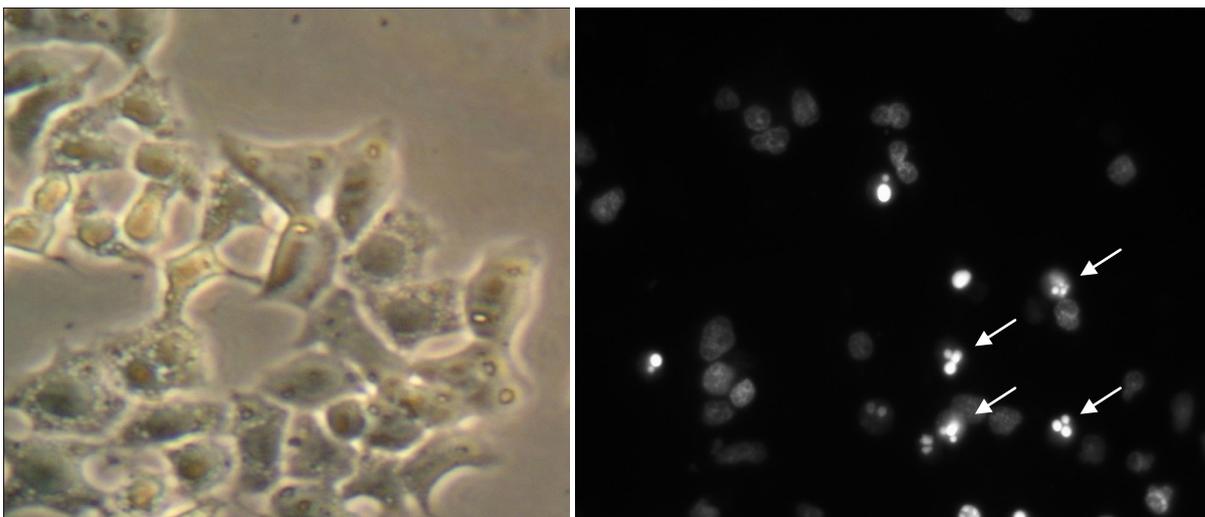


Abb. 26: Nachweis von apoptotischen Zellen (Pfeile) mittels Life-Dead-Assay (rechts), lichtmikroskopische Aufnahme (320-fache Vergr.) von H4IIE nach 24 h Inkubation mit CW60 10 μ M mit deutlicher Schädigung (links). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte.

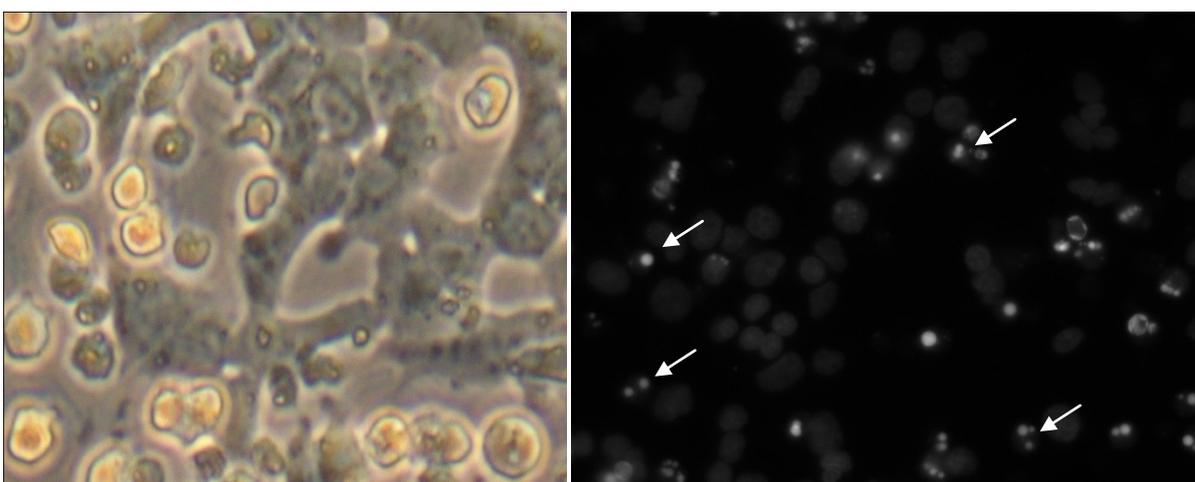


Abb. 27: Nachweis von apoptotischen Zellen (Pfeile) mittels Life-Dead-Assay am Fluoreszenzmikroskop (rechts). Lichtmikroskopische Aufnahme (320-fache Vergr.) von H4IIE-Zellen nach 48 h Inkubation mit CW60 5 μ M (links) mit deutlich sichtbarer Zellschädigung. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte.

Der Life-Dead-Assay wurde mit CW90 in H4IIE-Zellen mit Inkubationsdauern von 24 h und 48 h durchgeführt. Nach 24 h Inkubation mit CW90 10 μ M war kein Unterschied zur Kontrolle sichtbar (Abb. 28). Nach 48 h Inkubation mit CW90 5 μ M und 10 μ M zeigten sich apoptotische und nekrotische Zellen (Abb. 29). Aufgrund starker Schwankungen in dem Ausmaß der Zellschädigung sind die Unterschiede im Mittel nicht signifikant verglichen mit der Kontrolle.

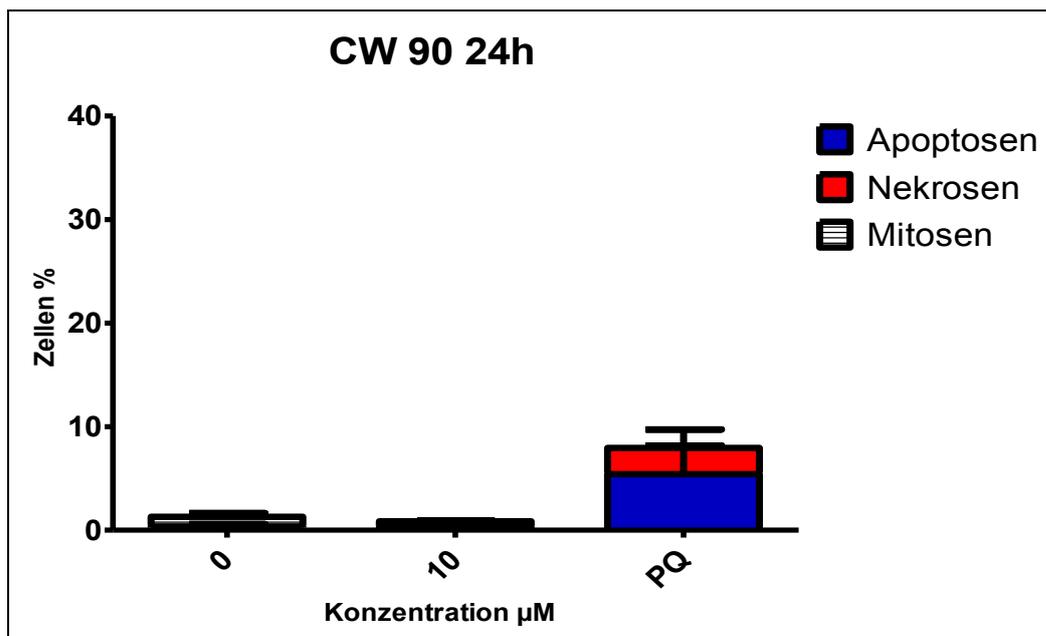


Abb. 28: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SD) der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent nach Inkubation mit CW90 für 24 h.

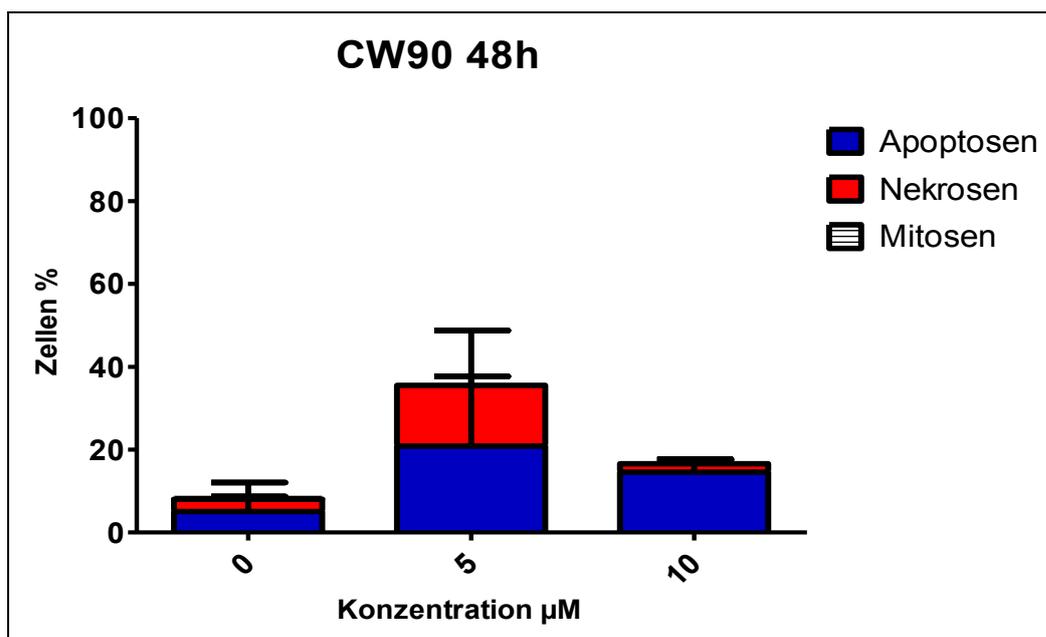


Abb. 29: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-SD) der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent nach Schädigung der Zellen mit CW90 für 48 h.

Es war zu diesem Zeitpunkt noch unklar, ob die im Life-Dead-Assay nachgewiesenen Nekrosen primär oder sekundär entstanden sind. Primäre Nekrosen werden direkt durch die Substanz verursacht, während sekundäre Nekrosen nur in Zellkultur vorkommen durch das Fehlen von Gewebsmakrophagen, welche *in vivo* die apoptotischen Körperchen

phagozytieren würden. In Zellkultur fehlen diese Makrophagen, sodass es nach einiger Zeit bei der apoptotischen Zelle zu einem Verlust ihrer Membranintegrität kommt und damit auch zur Anfärbung der Zellen mittels PI, das nur durch permeable Zellmembranen penetriert. Daher wurden weitere Versuche zum Nachweis apoptotischer und nekrotischer Vorgänge durchgeführt.

4.2.2 DNA-Leiter mit Diphosphanen

Auch mit Hilfe der Methode der DNA-Leiter konnten nach 24 h Inkubation Apoptosen auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden.

Kommt es intrazellulär zu apoptotischen Vorgängen, werden Enzyme aktiv, sogenannte Caspase-aktivierte DNAsen (CAD), welche DNA nur zwischen den Histonen schneiden können und daher DNA-Fragmente mit einer Länge von 180 Bp und Vielfachen davon produzieren. Bei nekrotischen Vorgängen erfolgt die Fragmentierung der DNA zufällig, sodass DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen entstehen, die sich dann als „Schmier“ in der Gelelektrophorese zeigen. Als Positivkontrolle diente 1 mM des Herbizids Paraquat (PQ), einer toxischen quartären Ammoniumverbindung.

Für CW60 konnte in der Konzentration von 5 μ M nach 24 h eine DNA-Leiter nachgewiesen werden für n=3 (Abb. 30), wie es auch bereits in der Dissertation von C. Wetzel veröffentlicht wurde. Für CW90 bei 5 μ M konnte nach 24 h keine Leiter nachgewiesen werden für n=2.

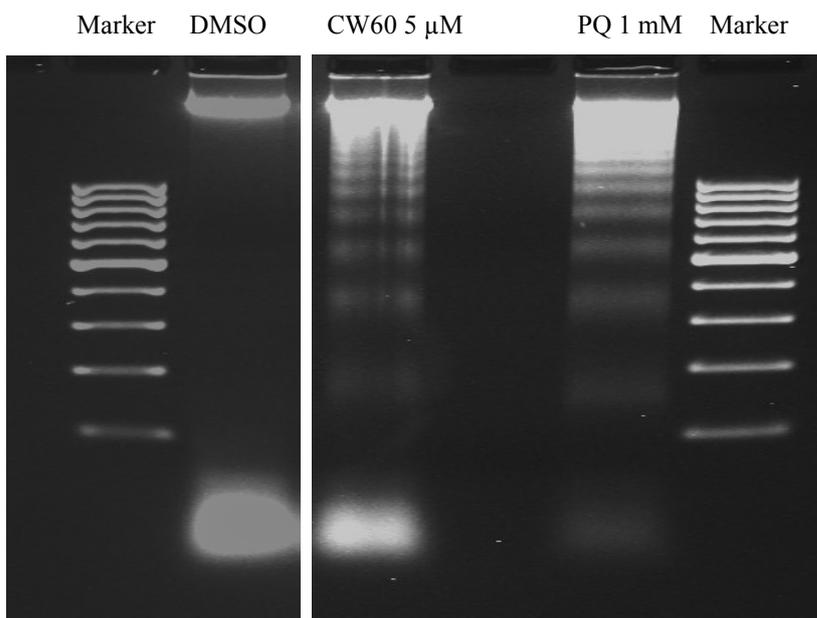


Abb. 30: DNA-Leiter mit CW60 nach Inkubation für 24 h mit 5 μ M. Als Positivkontrolle diente PQ 1 mM.

4.2.3 ApoONE-Assay mit Diphosphanen

Um apoptotische Vorgänge in Zellen nachzuweisen, wurde der ApoONE-Assay durchgeführt. Es handelt sich um eine Methode, mit der die Aktivität der Caspasen 3/7 bestimmt wird. Diese Enzyme sind während der Apoptose aktiv und führen zur Aktivierung weiterer Caspasen und zur Degradierung von Zellbestandteilen, wie Proteinen und DNA. Sind Caspasen aktiv, so spalten sie das im Kit enthaltene Substrat. Das Produkt beginnt unter Lichteinstrahlung zu fluoreszieren.

Es galt nun, die Anstiege der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Konzentrationen und nach unterschiedlichen Inkubationsdauern von 6 h, 24 h und 48 h zu untersuchen.

Bei Behandlung mit CW90 in den Konzentrationen von 5 μM , 10 μM und 25 μM zeigte sich nur für 25 μM nach 48 h Inkubation ein signifikanter Anstieg der Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 31). Nach Inkubation mit CW60 5 μM und 10 μM für 6 h, 24 h und 48 h, war nach 48 h bei 5 μM ein nicht signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität zu sehen (Abb. 32). Nach einer Inkubation von 48 h mit einer Konzentration von 10 μM war der Anstieg signifikant.

Als Positivkontrolle diente jeweils 1 mM Paraquat (PQ), das nach Inkubationszeiten von 24 h und 48 h einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität erkennen ließ.

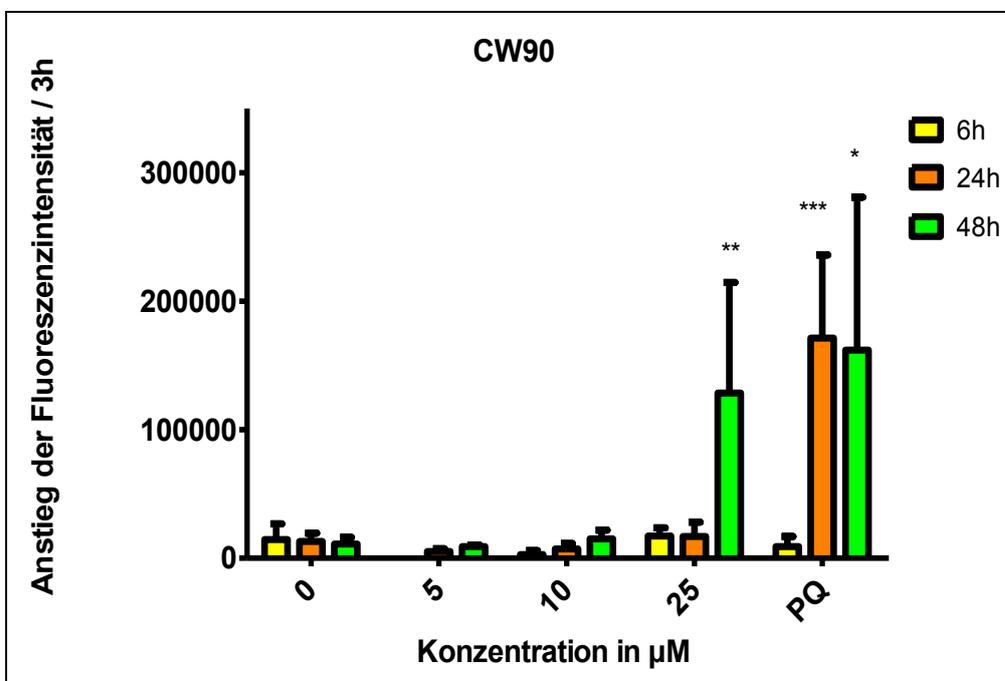


Abb. 31: Caspaseaktivität der Caspase 3/7. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Caspaseaktivität nach Behandlung mit CW90 für 48 h mit einer Konzentration von 25 μM . Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SD) der Anstiege der Fluoreszenzintensität gemessen über 3 h für n=3. Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

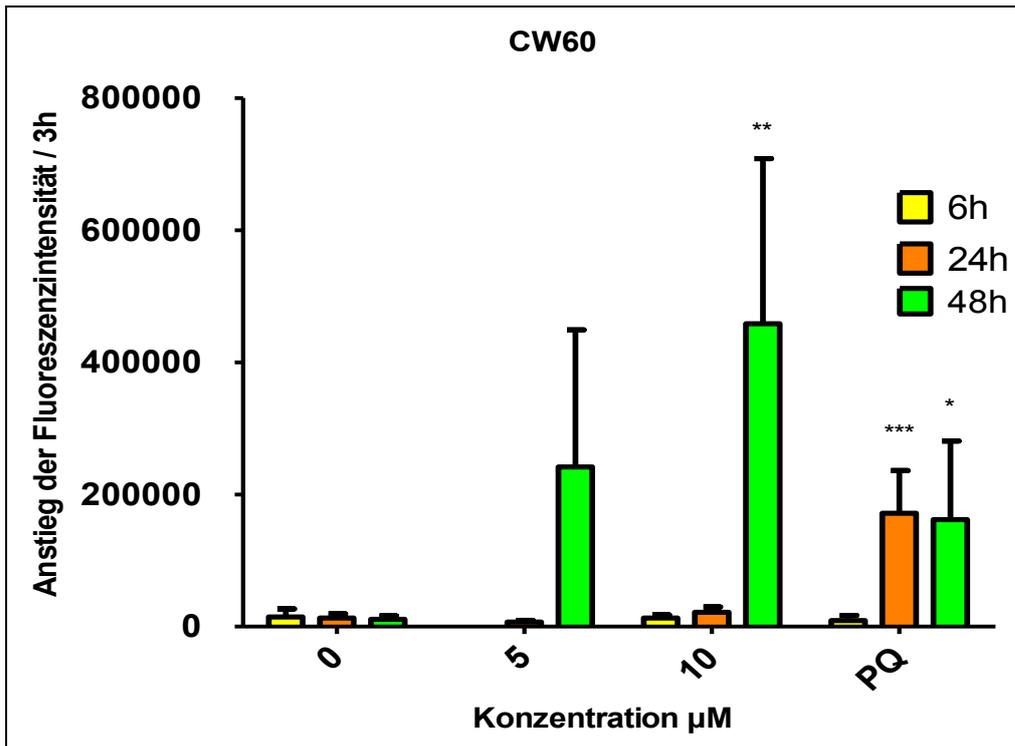


Abb. 32: Caspaseaktivität der Caspase 3/7. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Caspaseaktivität nach Behandlung mit CW60 für 48 h mit einer Konzentration von 10 µM. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SD) der Anstiege der Fluoreszenzintensität gemessen über 3 h für n=3. Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

4.2.4 LDH-Assay mit Diphosphanen

Um nekrotische Zellveränderungen nachzuweisen, wurde der LDH-Assay durchgeführt. Es wird damit die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt, welche ein zytosolisches Enzym ist, das nur bei erhöhter Membranpermeabilität oder Zelllyse aus der Zelle gelangt. Damit kann das Ausmaß der LDH-Aktivität im Zellüberstand als Nekrose-Indikator verwendet werden. Der Nachweis geschah über die Messung von Absorptionssignalen im Plattenlesegerät. Es wurden die gleichen Inkubationszeiten wie beim ApoONE-Assay verwendet und beide Versuche parallel durchgeführt. H4IIE wurden mit CW90 bis zu einer Konzentration von 25 µM für 6 h, 24 h und 48 h inkubiert. Es zeigte sich bis zu 25 µM nach 48 h kein signifikanter Anstieg an Nekrosen (Abb. 33). Nach Inkubation mit CW60 10 µM kam es nach 48 h zu einem signifikanten Anstieg an Nekrosen. Nach 24 h war auch ein Anstieg zu verzeichnen, der aber nicht signifikant war verglichen mit der Kontrolle (Abb. 34). Die vorangegangenen Versuche berücksichtigend, könnte es sich bei den durch CW60 nach 48 h induzierten Nekrosen möglicherweise um sekundäre Nekrosen handeln, die aus apoptotischen Zellen hervorgegangen sind.

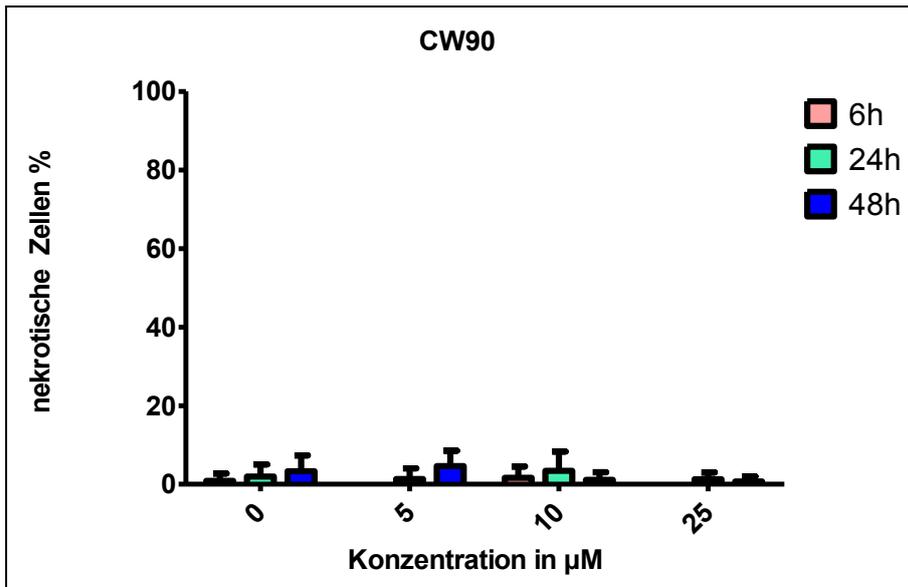


Abb. 33: Nekrosenachweis mittels LDH-Assay. Im 96-Well wurden H4IIE für 6 h, 24 h (15.000/Well) und 48 h (8.000/Well) mit CW90 bis zu 25 µM inkubiert. Die Absorption des Formazans bei 490 nm wurde anschließend im Plattenlesegerät bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und ist proportional zur Menge lysierter nekrotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Absorptionsanstiege in Prozent bzgl. *high control* (+/- SD).

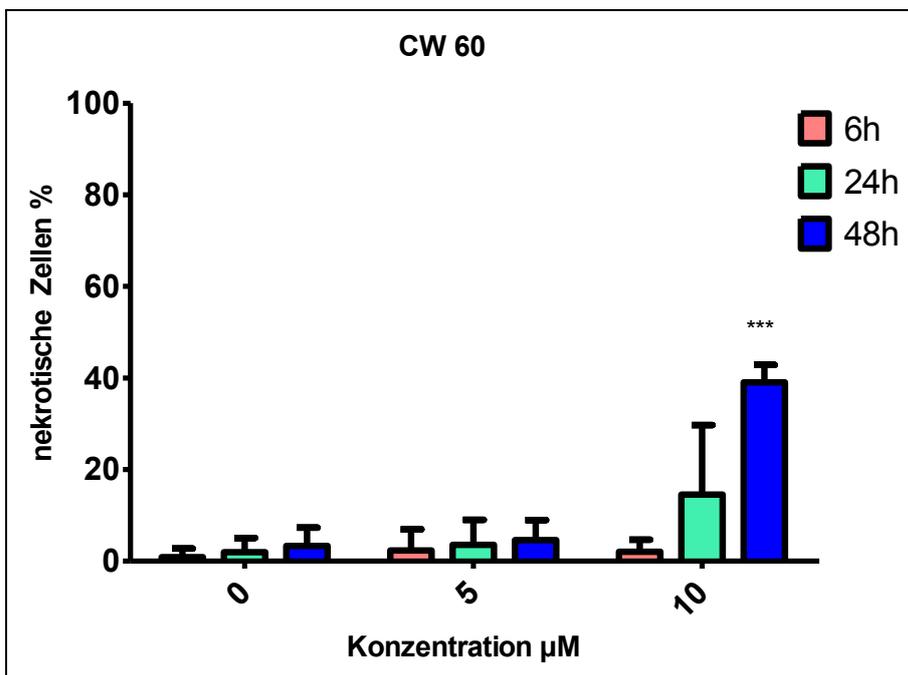


Abb. 34: Nekrosenachweis mittels LDH-Assay. Im 96-Well wurden H4IIE für 6 h, 24 h (15.000/Well) und 48 h (8.000/Well) mit CW60 bis zu 10 µM inkubiert. Die Absorption des Formazans bei 490 nm wurde im Plattenlesegerät bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und ist proportional zur Menge lysierter nekrotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Absorptionszunahmen in Prozent bzgl. der Absorption der *high control* (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

4.3 Comet-Assay mit Diphosphanen

Es stellte sich die Frage, wodurch in die Apoptose ausgelöst wird. Eine Möglichkeit wäre die Induktion von DNA-Strangbrüchen, da andere Zytostatika wie Platin-Komplexe (Cisplatin) oder Anthrazykline (Doxorubicin) auch DNA-Strangbrüche verursachen können.

Es wurde der alkalische Comet-Assay durchgeführt, um sowohl Einzelstrangbrüche als auch Doppelstrangbrüche nachweisen zu können.

Zuerst wurden H4IIE-Zellen 3 h mit CW60 und CW90 inkubiert. Als Positivkontrolle diente hier 1 mM Wasserstoffperoxid. Sowohl CW60 als auch CW90 zeigten keine detektierbaren DNA-Strangbrüche bis zu einer Konzentration von 10 μM , nach 3 h und 8 h Inkubation (Abb. 35, Abb. 36).

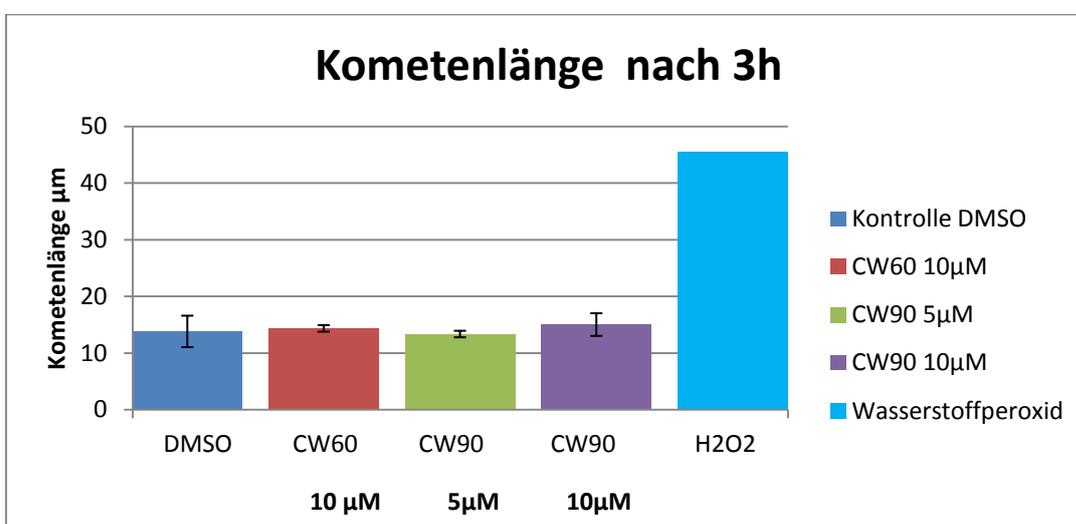


Abb. 35: Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels Comet-Assay. H4IIE (500.000/Well) wurden 3 h mit CW60 und CW90 behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kometenlängen in μm (+/- SD). PK = H₂O₂ (n=2)

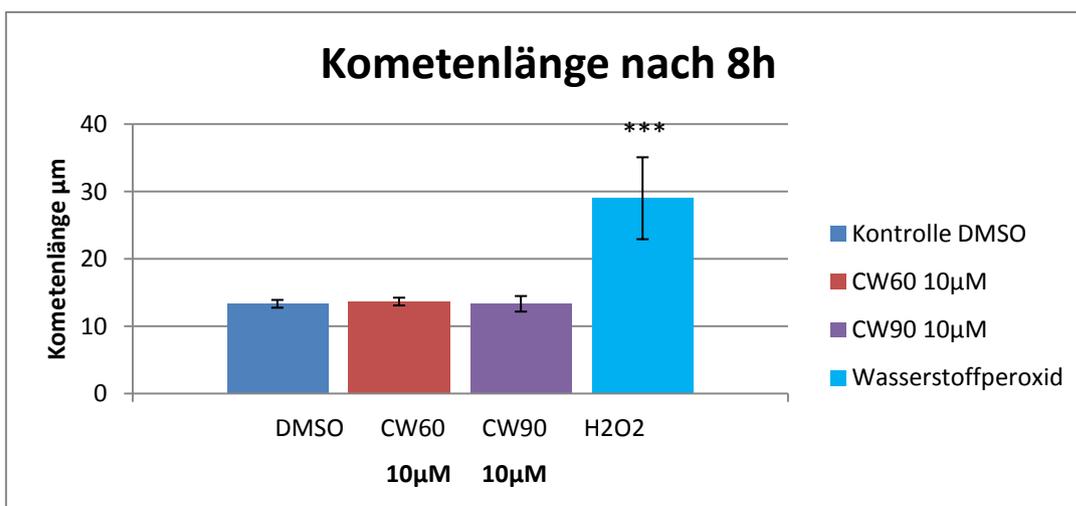


Abb. 36: Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels Comet-Assay. H4IIE (500.000/Well) wurden 8 h mit CW60 und CW90 behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kometenlängen in μm (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

4.4 Detektion von ROS mittels DCF-Assay mit Diphosphanen

Mit dem DCF-Assay lassen sich intrazelluläre radikale Sauerstoffspezies (ROS) nachweisen. Nach Inkubation der H4IIE-Zellen mit den Gold(I)-Komplexen wurde die Bildung von ROS über 1 h lang im Plattenlesegerät gemessen.

Als Positivkontrolle diente H_2O_2 , das bei einer Konzentration von 1 mM einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität erkennen ließ. Demnach induziert Wasserstoffperoxid in H4IIE-Zellen ROS. CW60 und CW90 dagegen zeigten nach einer Inkubation von 1 h keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abb. 37). Damit ist eine Induktion von oxidativem Stress in H4IIE durch CW90 und CW60 unter den experimentellen Bedingungen sehr unwahrscheinlich.

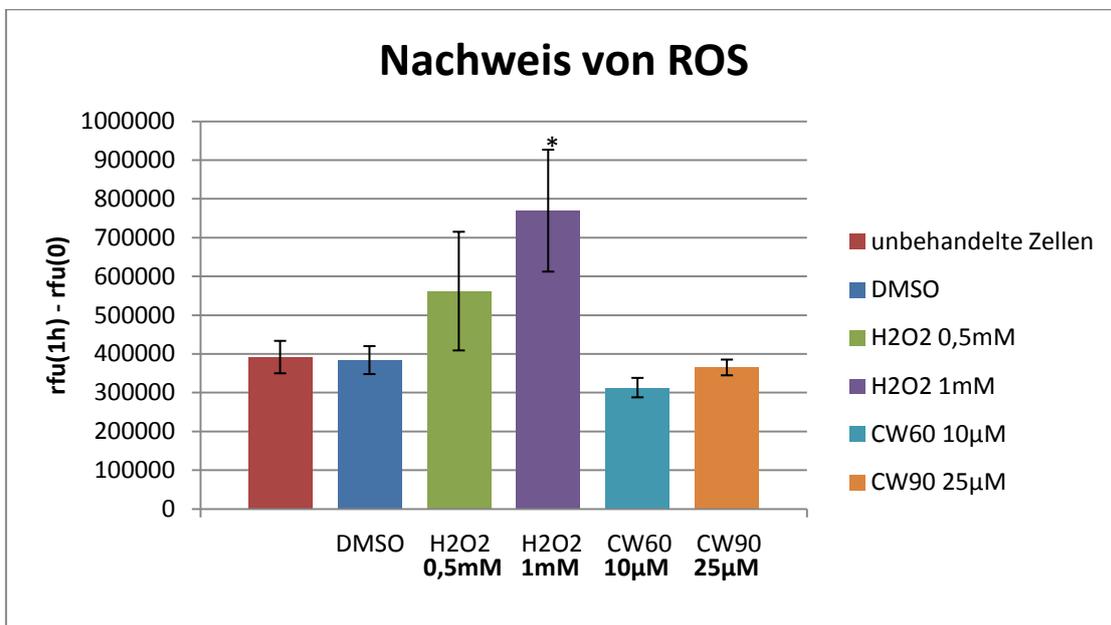


Abb. 37: Nachweis von ROS in H4IIE-Zellen. H4IIE (15.000/Well) wurden für 1 h mit CW90 und CW60 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anstiege der Fluoreszenzintensität in rfu (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$

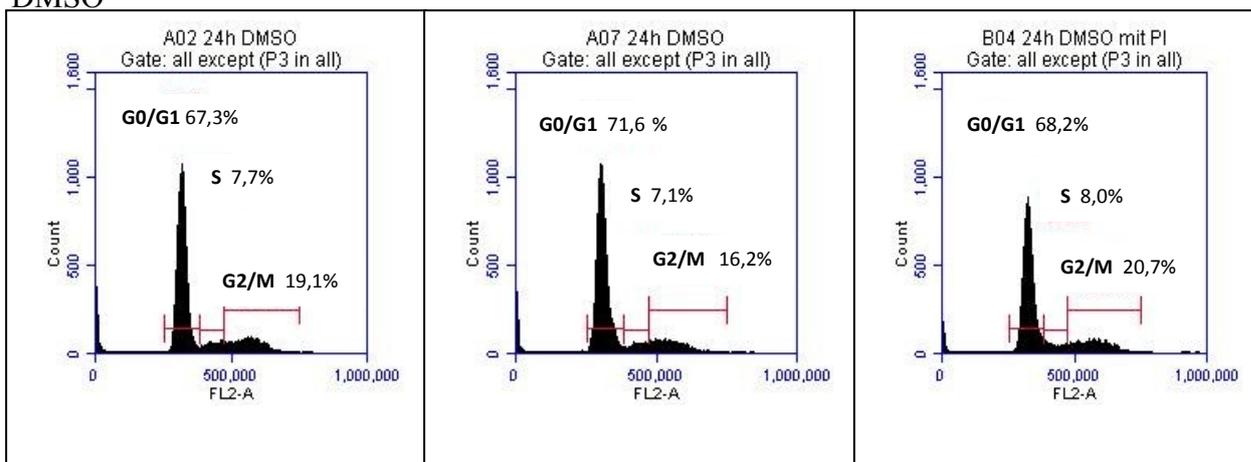
4.5 Zellzyklusanalyse mit Diphosphanen

Nachdem weder ROS noch DNA-Strangbrüche in H4IIE-Zellen nach Schädigung mit den Substanzen detektiert werden konnten, wurde der Zellzyklus genauer untersucht. Eine Zellzyklusanalyse wurde am FACS durchgeführt nach Inkubation von H4IIE über 24 h mit der Substanz CW60 zu 5 μ M. Dabei war eine leichte Verschiebung von der G1- zur G2/M-Phase erkennbar (Abb. 38). Es befanden sich signifikant weniger Zellen in der G1-Phase verglichen mit der Kontrolle, jedoch war der Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase nicht signifikant. Daraufhin wurden die Inkubationsdauer auf 48 h verlängert und der Versuch

erneut durchgeführt für n=2. Allerdings waren die Zellen nach dieser Zeit so stark geschädigt, dass eine Auswertung nicht mehr möglich war.

Demzufolge lässt sich für CW60 nach 24 h Inkubation mit 5 μM nur ein leichter Einfluss auf den Zellzyklus konstatieren. Es bleibt offen, ob CW60 bei einer größeren Konzentration oder einer längeren Inkubationsdauer in die Regulation des Zellzyklus eingreift. Die Ergebnisse der Analyse von CW60 5 μM sind mit den Ergebnissen der Carbene in einem gemeinsamen Diagramm in Teil B dargestellt (siehe Abb.71).

DMSO



CW60 5 μM

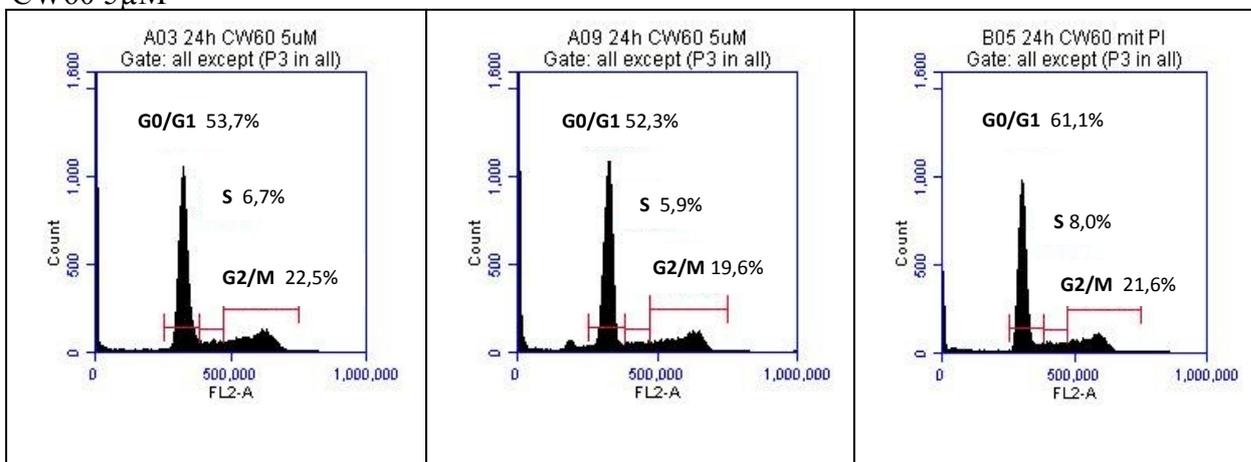


Abb. 38: Histogramme der Zellzyklusanalyse. H4IIE wurden 24 h mit CW60 5 μM inkubiert.

Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelten Zellen. n=3

4.6 Beeinflussung von Signalwegen in H4IIE durch Diphosphane

4.6.1 PI3K-Akt-Signalweg

Ob die synthetisierten Gold(I)-Phosphan-Komplexe CW60 und CW90 Einfluss auf den PI3K-Akt-Signalweg haben, wurde mittels der Methode des Western Blots untersucht. Nachdem die Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit den Substanzen inkubiert worden waren, wurden

die Proteine isoliert und anschließend mittels SDS-Page der Größe nach aufgetrennt. Schließlich wurde das gesuchte 60 kDa große phosphorylierte Enzym pAkt mittels markierter Antikörper nachgewiesen. Eine veränderte Phosphorylierung könnte ein Hinweis auf einen Eingriff der Substanz in diesen Signalweg sein.

Die Western Blots für CW60 wurden bei 10 μM für unterschiedliche Inkubationszeiten angefertigt (Abb. 39, Coomassie gefärbte Membran: dritte bis fünfte Taschen von links CW60 1h, 4h und 24h: siehe Rohdaten). CW60 zeigte bei 10 μM für 1 h und 4 h Inkubation keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. In den beiden ersten beiden Blots ließ sich nach 24 h Inkubation mit CW60 eine leichte Abschwächung des Signals verglichen mit der Kontrolle erkennen. Es könnte sich um eine leichte Inhibition der Phosphorylierung der Akt handeln. Beim dritten Blot wurden nur noch die Proteine nach Schädigung mit CW60 10 μM für 24 h aufgetragen. Auch hier war das Signal etwas schwächer als bei der Kontrolle.

Es scheint, als könnte CW60 bei einer Konzentration von 10 μM nach 24 h Schädigung der Zellen eine leichte Inhibition der Phosphorylierung von Akt bewirken.

Für CW90 zeigte sich in mehreren unabhängigen Versuchen kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 39 rechts). Demnach ist von einer Inhibition des Signalweges durch CW90 bei der Konzentration von 25 μM nach 24 h Inkubation nicht auszugehen.

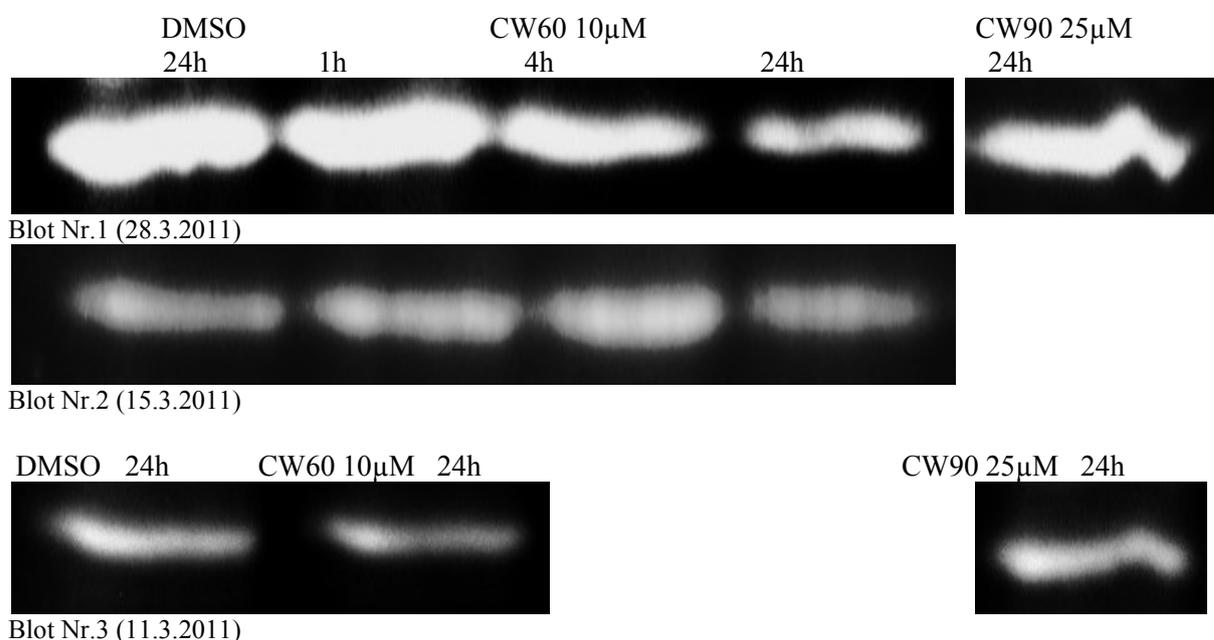


Abb. 39: Western Blots mit pAkt (60 kDa). H4IIE (500.000/Well) wurden mit CW60 10 μM für 1 h, 4 h und 24 h und CW90 25 μM 24 h inkubiert. Proteine wurden anschließend isoliert, quantifiziert und mittels SDS-Page nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran erfolgte die Proteindetektion mit Hilfe von Antikörpern.

4.6.2 Nrf2-ARE-Signalweg

Es wurde auch Westerns Blots mit Nrf2 durchgeführt, um einen Einfluss auf den Nrf2-ARE-Signalweg aufzuzeigen. Dieser wird z.B. durch Flavonoide (Baicalein), durch ROS und durch Induktoren wie z.B. Tertiär-Butylhydrochinon (tBHQ, Positivkontrolle = PK) aktiviert. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gold(I)-Komplexe auf ihre Wirkung auf den Nrf2-Signalweg untersucht.

Es wurde das Protein Nrf2 mit einem molekularen Gewicht von 100 kDa mittels Western Blotting detektiert. Eine stärkere Bande weist auf eine Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalwegs hin, möglicherweise durch einen verminderten Abbau von Nrf2 im Zytosol oder durch eine verstärkte Expression des Proteins.

In einem von drei Blots waren für CW60 10 μ M nach 1 h, 4 h und 24 h deutlich stärkere Banden bei 100 kDa sichtbar im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 40). In den beiden anderen Experimenten erschienen die Banden ungefähr gleich stark wie die Kontrolle (Abb. 40, Coomassie gefärbte Membran des Blots Nr.1: siehe Rohdaten). Eine Beeinflussung des Nrf2-ARE-Signalweges konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Für CW90 25 μ M konnte nach 24 h Inkubation in zwei unabhängigen Versuchen keine Veränderung der Bandenstärke von Nrf2 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 73).

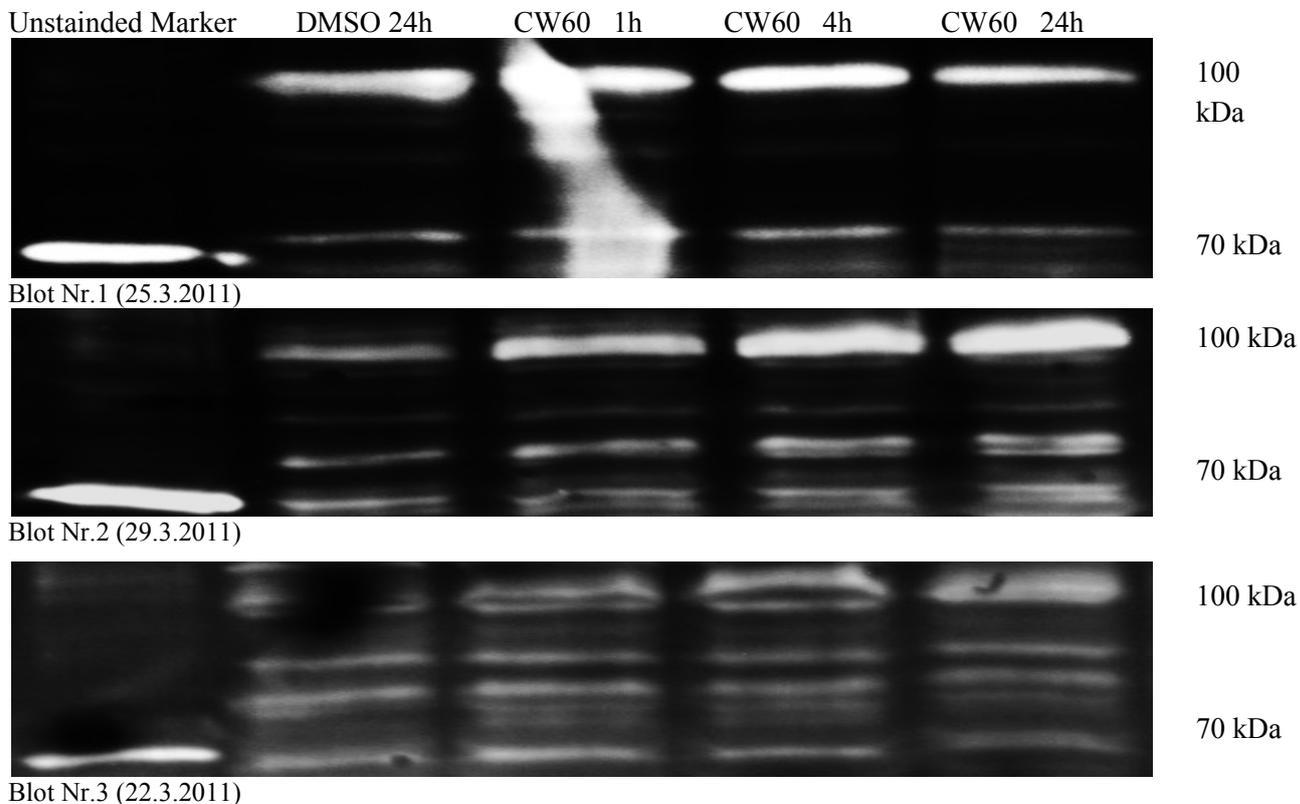


Abb. 40: Western Blots zur Detektion von Nrf2 (100kDa). H4IIE (500.000/Well) wurden mit CW60 1 h, 4 h, 24 h inkubiert. Nach der Proteinisolierung und Proteinbestimmung erfolgten die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page und das Blotting auf PVDF-Membranen. Nrf2-Detektion mittels Antikörpern.

4.6.3 ERK-Signalweg

In dieser Arbeit ist auch der Einfluss der Gold(I)-Komplexe auf den ERK-Signalweg mittels Western Blots untersucht worden.

Das zu detektierende Enzym ERK1 hat ein molekulares Gewicht von 44 kDa.

In zwei unabhängigen Experimenten erschienen die Banden zu den mit CW60 behandelten Zellen (nach 1 h, 4 h, und 24 h) sowohl beim Blot von pERK1/2 als auch ERK1 in etwa gleich stark wie die Kontrolle. Daher ist eine Beeinflussung des ERK-Signalwegs unter den gegebenen experimentellen Bedingungen als unwahrscheinlich anzusehen. Exemplarisch ist einer der Blots abgebildet (Abb. 41).

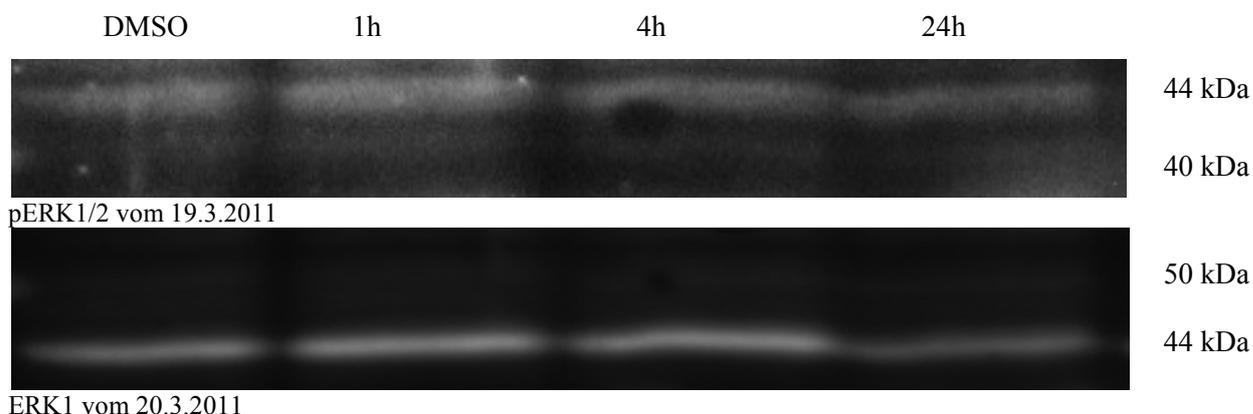


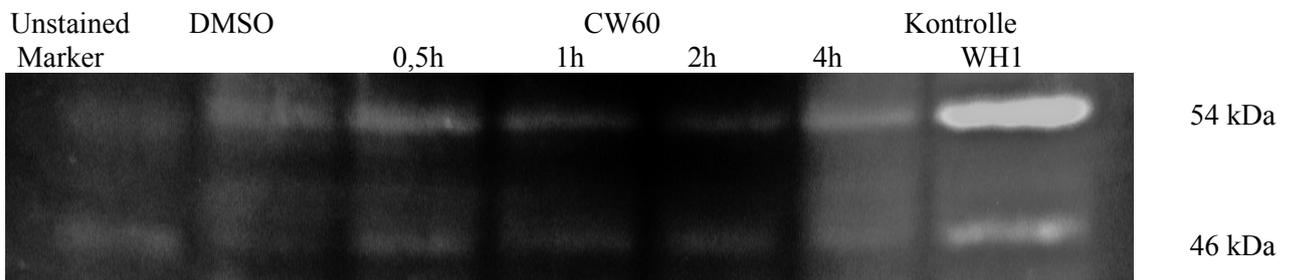
Abb. 41: Western Blot zur Detektion von ERK1 und pERK1/2. H4IIE (500.000/Well) wurden mit CW60 1 h, 4 h und 24 h inkubiert. Nach der Proteinisolierung und Proteinbestimmung erfolgten die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page und das Blotten auf PVDF-Membranen. Detektion von ERK und pERK mittels Antikörpern.

4.6.4 JNK-Signalweg

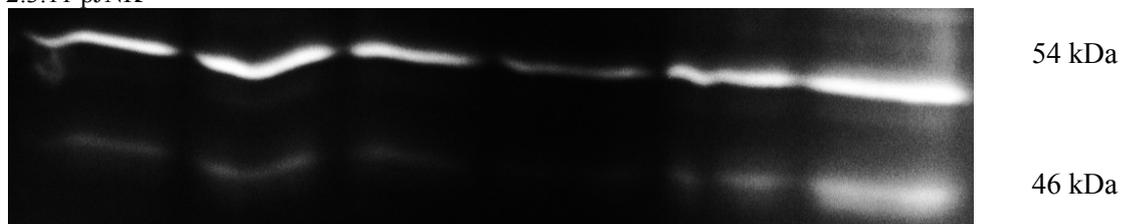
Western Blots zur Detektion von pJNK und JNK wurden durchgeführt, um ein Eingreifen des Gold(I)-Komplexe CW60 in den JNK-Signalweg zu untersuchen.

Beim Nachweis des phosphorylierten Proteins JNK1/3 auf der PVDF-Membran mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper fällt in der unten stehenden Abbildung (Abb. 42) eine stärkere Bande ganz rechts bei 54 kDa und 46 kDa auf. Diese ist die Positivkontrolle mit [(cym)Ru(en)Cl]Cl, als WH1 bezeichnet, einem Ruthenium(II)-Komplex, der im Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität von Wilhelm Huber im Rahmen seiner Promotion synthetisiert worden ist. WH1 ist im Institut für Toxikologie auf seine Zytotoxizität untersucht worden. Im MTT-Assay zeigte es bereits bei 10 μ M nach 24 h eine signifikante Abnahme der Zellviabilität von H4IIE (Noffke et al., 2011). Für die vorliegende Arbeit wurde WH1 als Positivkontrolle für die Phosphorylierung der JNK1/3 verwendet. In einem von zwei pJNK-Blots waren bei CW60 nach 1 h, 4 h und 24 h stärkere Banden

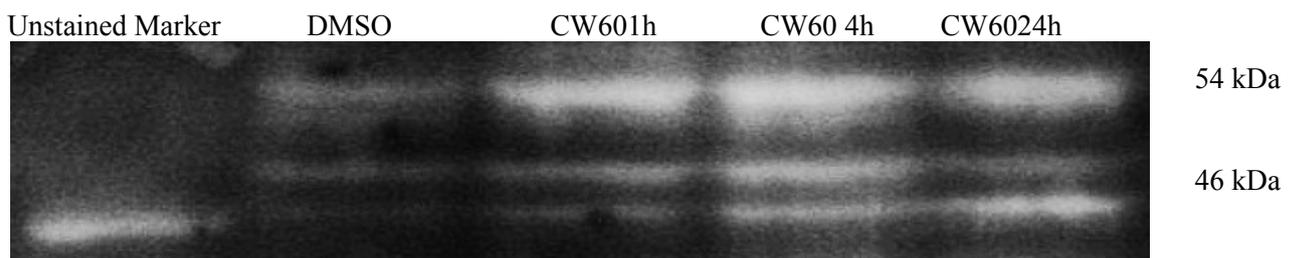
sichtbar. Die Banden von CW60 im dazugehörigen JNK1/3-Blot unterschieden sich in ihrer Stärke nicht von der Kontrolle. Möglicherweise könnte es sich also um eine verstärkte Phosphorylierung der JNK1/3 handeln, induziert durch CW60 10 μ M nach Inkubationsdauern von 1 h, 4 h und 24 h (Abb. 42, Blot Nr. 2). Dieses Ergebnis ließ sich in einem zweiten Blot nicht bestätigen. Hier zeigten die zu CW60 gehörigen Banden von pJNK nach 0,5 h und 4 h die gleiche Stärke wie die Negativkontrolle (DMSO) (Abb. 42, Blot Nr.1). Bei der Detektion von unphosphorylierter JNK1/3 lagen nach Inkubationen mit CW60 nach 0,5 h, 1 h und 4 h genauso starke Banden vor wie nach Inkubation mit DMSO. Die Bande nach 2 h war sogar noch schwächer als die Kontrolle. Zusammenfassend lässt sich keine eindeutige Aussage über eine Induktion des JNK1/3-Signalweges treffen, sodass weitere Versuche folgen müssten.



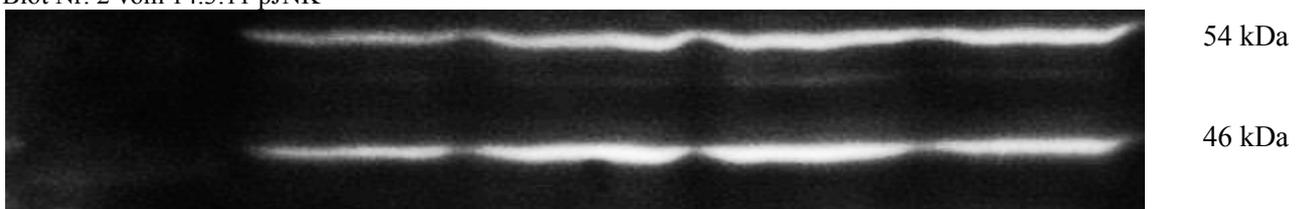
Blot Nr.1 vom 2.3.11 pJNK



Blot Nr.1 vom 2.3.11 JNK1/3



Blot Nr. 2 vom 14.3.11 pJNK



Blot Nr.2 vom 16.3.2011 JNK1/3

Abb. 42: Western Blots zur Detektion von JNK1/3 und pJNK. Inkubationen von H4IIE erfolgten mit CW60 10 μ M für 1 h, 4 h und 24 h. Nach der Proteinisolierung und Proteinbestimmung erfolgten die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page und das Blotten auf PVDF-Membranen.

Detektion von ERK und pERK mittels AK.

B Ergebnisse zu Gold(I)-Komplexen mit NHC-Liganden

4.7 Zytotoxizität der Gold(I)-Komplexe mit NHC-Liganden in C6 und H4IIE

Im zweiten Teil der Arbeit wurden fünf von der AG PD Peter C. Kunz synthetisierte N-heterozyklische Carben-Gold(I)-Komplexe hinsichtlich ihrer Zytotoxizität in H4IIE-Zellen untersucht. Hierfür wurde zuerst der MTT-Assay angewandt zur Einschätzung des Ausmaßes ihrer Toxizität. Dabei zeigten einige Carbene vielversprechende Ergebnisse.

CW165 zeigte in H4IIE-Zellen nach 24 h ab einer Konzentration von 10 μM bereits eine Toxizität (Abb. 44). Der IC_{50} -Wert lag nach 24 h Inkubation in H4IIE bei ca. 25 μM . Nach 48 h Inkubation war ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle bereits bei einer Konzentration von 2 μM von CW165 zu sehen. In C6-Zellen dagegen schien CW165 nach 24 h Inkubationsdauer weniger toxisch zu sein (Abb. 43). Der IC_{50} -Wert lag hier bei ca. 50 μM .

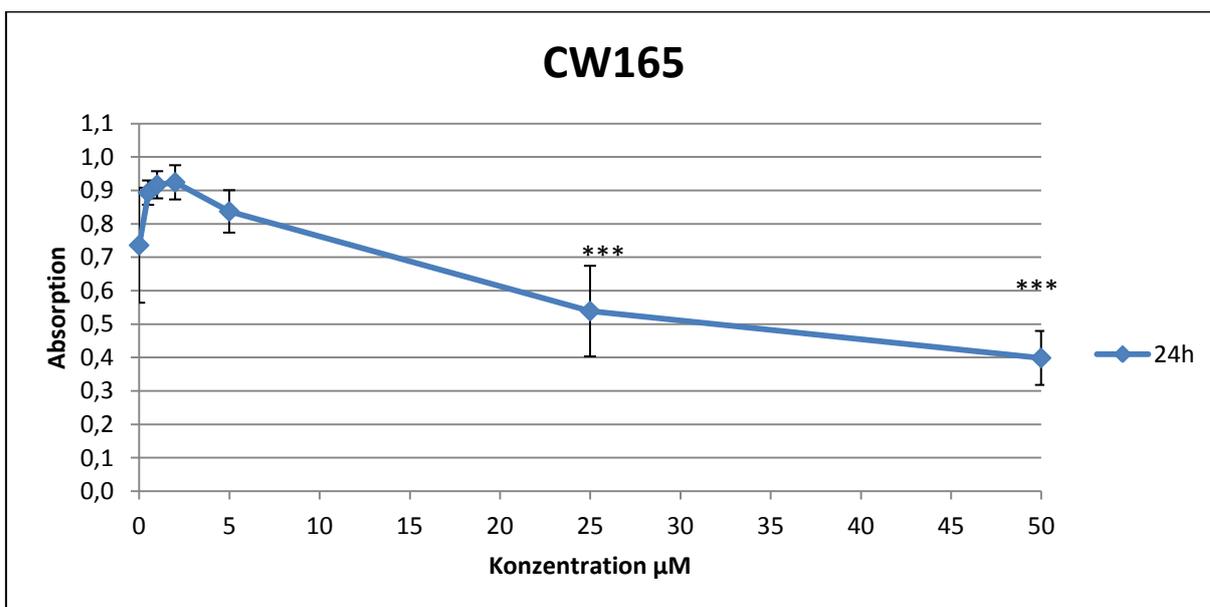


Abb. 43: Zytotoxizität von CW165 in C6-Zellen. 10.000/Well wurden für 24 h mit CW165 bis zu 50 μM inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (\pm SD). $n=3$, Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

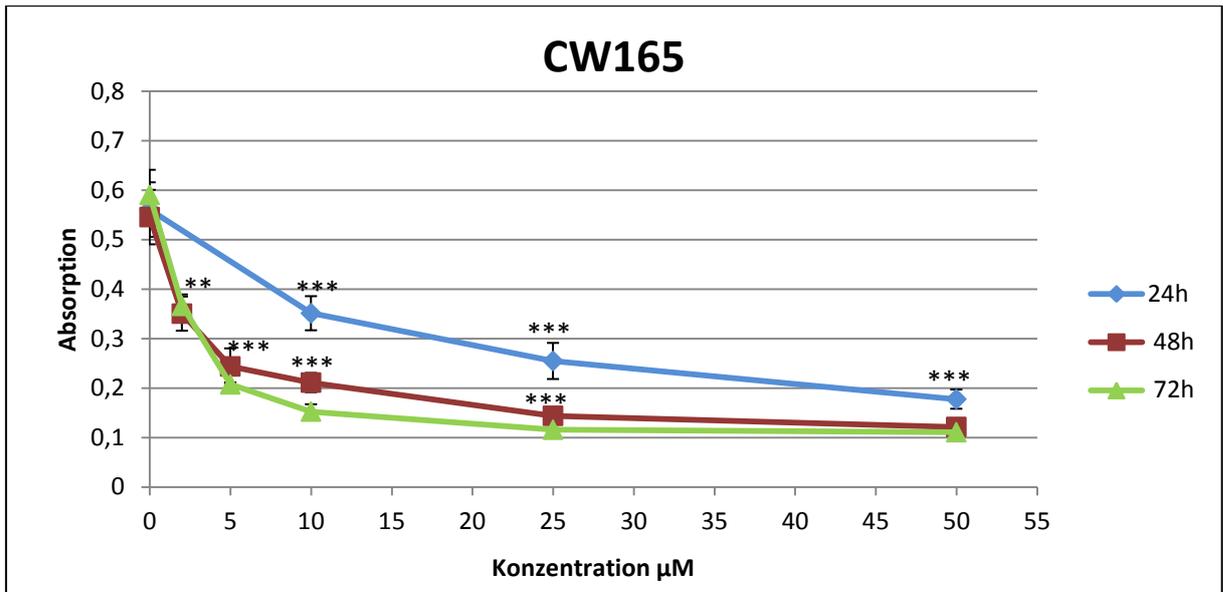


Abb. 44: Zytotoxizität von CW165 in H4IIE. H4IIE wurden 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW165 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Der MTT-Assay mit CW104 ergab, dass die beiden Rattenzelllinien deutlich unterschiedlich auf CW104 reagierten. Auf C6-Zellen zeigte der Komplex CW104 nach 24 h Inkubation bis zu 50 µM keine Toxizität. Es war in zwei unabhängigen Versuchen (n=2) keine Änderung der Absorption messbar im Vergleich zur Kontrolle (siehe Rohdaten). Auf den empfindlicheren H4IIE-Zellen lag der IC_{50} -Wert nach 24 h Inkubation bei ca. 10 µM in drei unabhängigen Versuchen (Abb. 45). Nach einer Inkubationsdauer von 48 h bewirkten bereits 5 µM von CW104 einen signifikanten Abfall der Zellviabilität.

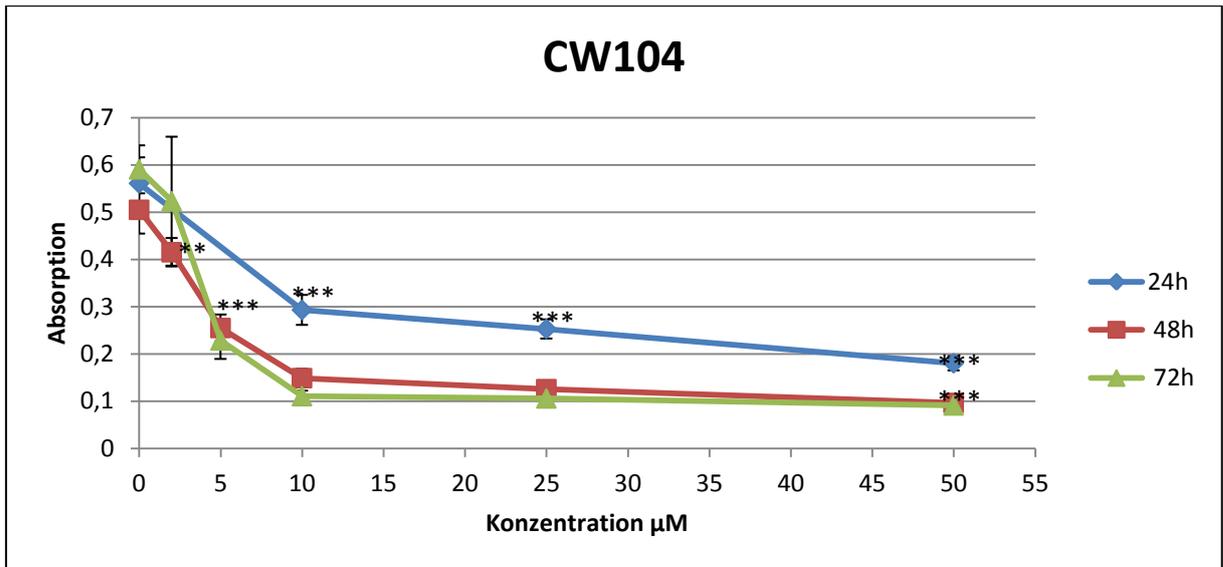


Abb. 45: Zytotoxizität von CW104 in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW104 inkubiert. Die Zellviabilität danach wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl metabolisch kompetenter Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

CW109 wirkte in den beiden Rattenzelllinien unterschiedlich stark. Nach einer Inkubation von 24 h zeigte sich in C6-Zellen in zwei unabhängigen Versuchen (n=2) keine Toxizität bis zu 50 µM (siehe Rohdaten). In H4IIE dagegen lag der IC_{50} -Wert nach 24 h bei 10 µM (Abb. 46). Nach 48 h Inkubation der H4IIE-Zellen war bereits bei 5 µM ein signifikanter Abfall der Zellviabilität zu erkennen.

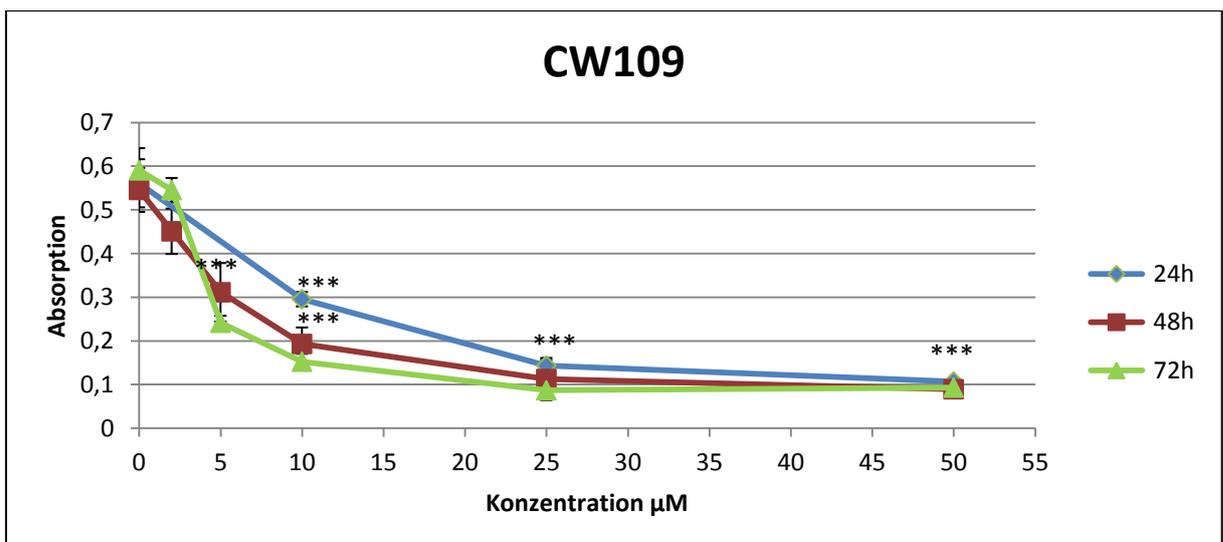


Abb. 46: Zytotoxizität von CW109 in H4IIE. H4IIE wurden 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW109 inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

Als besonders toxisch erwiesen sich die Carbene CW171a/b in beiden Zelllinien bereits nach kurzen Inkubationsdauern (Abb. 47 und Abb. 48). In C6-Zellen lag der IC₅₀-Wert nach 24 h bei ca. 2 µM, in H4IIE-Zellen dagegen bei ca. 1 µM. Nach 3 h war CW171a bereits toxisch in H4IIE. Bei einer Konzentration von 5 µM nahm die Absorption signifikant ab. Nach 48 h war CW171a bereits bei einer Konzentration von 0,25 µM toxisch, was ungefähr dem IC₅₀-Wert entsprach. Ab einer Konzentration von 0,5 µM nach 48 h war keine weitere Abnahme der Absorption im MTT-Assay feststellbar, das Minimum der Absorption war erreicht.

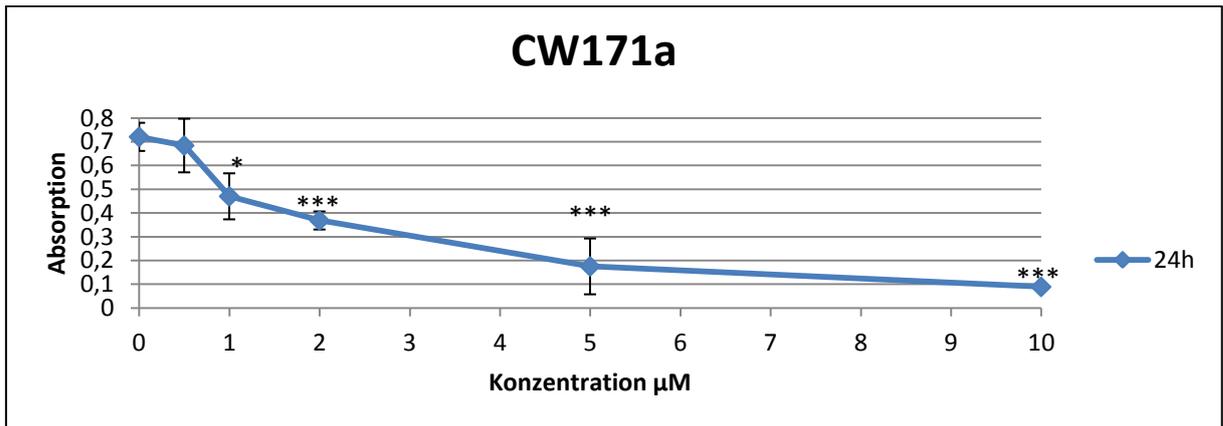


Abb. 47: Zytotoxizität von CW171a in C6. 10.000 Zellen/Well wurden 24 h lang mit CW171a inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = p < 0,05; *** = p < 0,001

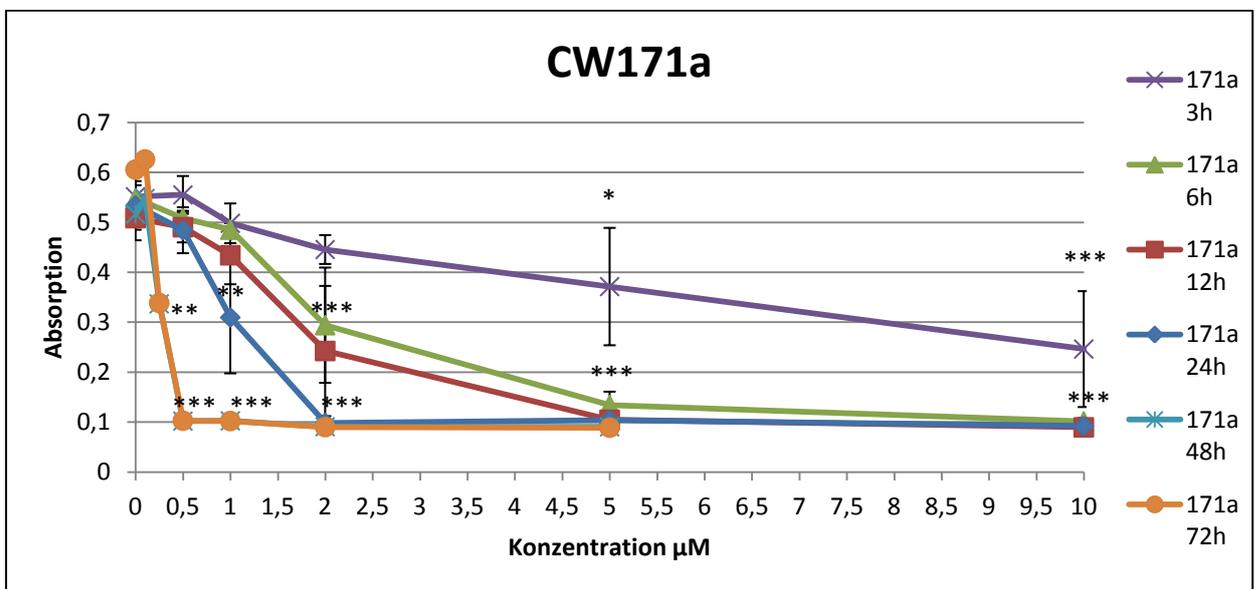


Abb. 48: Zytotoxizität von CW171a in H4IIE. H4IIE wurden 3 h, 6 h, 12 h, 24 h (15.000/Well), 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW171a inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = p < 0,05, ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

Lichtmikroskopisch sind deutliche Veränderungen der H4IIE-Zellen erkennbar, nach 48 h Inkubation mit CW171a 0,5 μ M im 96-Well (Abb. 49) und nach 72 h (Abb. 50). Die Zellen sind im Vergleich zur Negativkontrolle geschrumpft und abgerundet. Sie haben untereinander jegliche Zellkontakte verloren und liegen einzeln verstreut im Well.

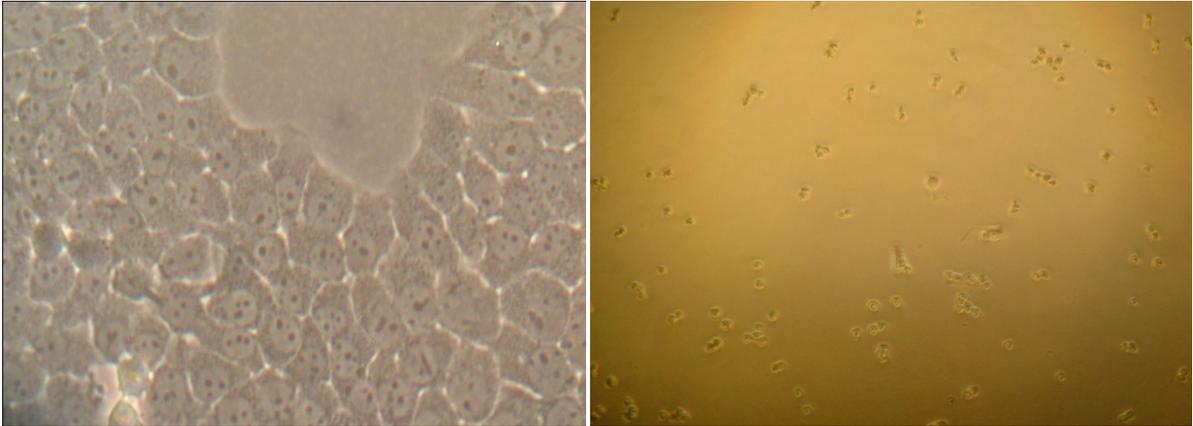


Abb. 49: Morphologie der H4IIE Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergr.) Links: Negativkontrolle, Rechts: Durch CW171a 0,5 μ M geschädigte Zellen nach 48 h Inkubation im 96-Well

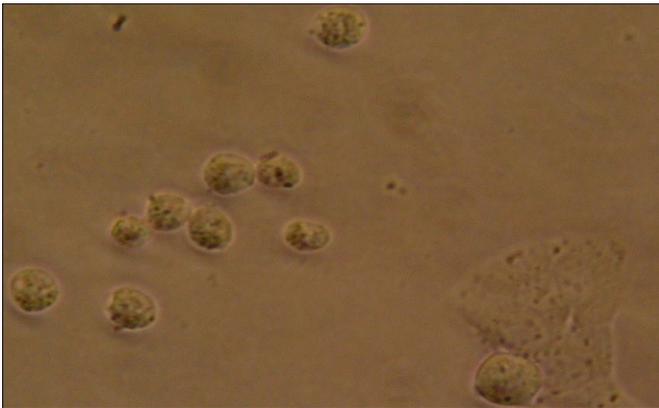


Abb. 50: Morphologie der H4IIE-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahme (320-fache Vergr.) von H4IIE nach 72 h Schädigung mit CW171a 0,5 μ M im 96-Well.

CW171b verhielt sich ähnlich toxisch wie CW171a in beiden Zelllinien (Abb. 51, siehe Rohdaten). Vermutlich liegt es an der Strukturähnlichkeit beider Substanzen, die sich nur durch das Gegen-Ion unterscheiden. Daher wurden weiterführende Untersuchungen nur mit Substanz CW171a durchgeführt.

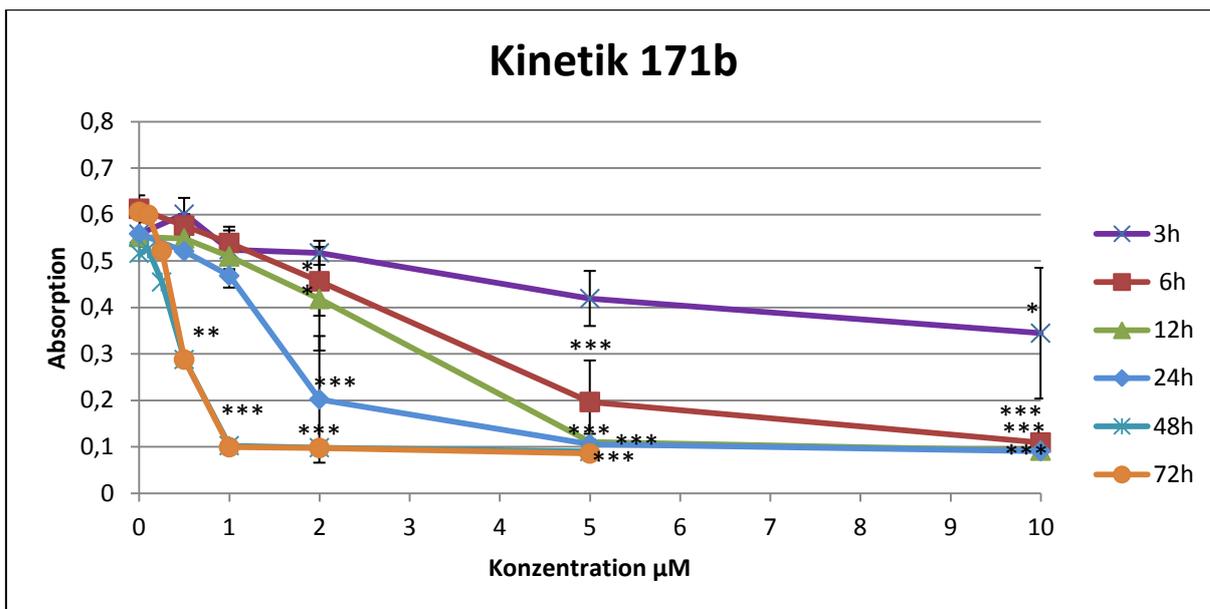


Abb. 51: Zytotoxizität von CW171b in H4IIE. H4IIE wurden 3 h, 6 h, 12 h, 24 h (15.000/Well) 48 h (8.000/Well) und 72 h (5.000/Well) mit CW171b inkubiert. Die Zellviabilität wurde danach mittels MTT-Assay ermittelt. Die Absorption bei 560 nm korreliert hierbei mit der Anzahl der metabolisch kompetenten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte (+/- SD). n=3, Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

4.8 Apoptosenachweise und Nekrosenachweise der Gold(I)-Komplexe mit NHC-Liganden in H4IIE

4.8.1 Life-Dead-Assay mit Carbenen

Mit Hilfe des Life-Dead-Assays wurden apoptotische von nekrotischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch unterschieden, wie bereits oben erläutert. CW165 zeigte nach 24 h Inkubation von H4IIE-Zellen keinen signifikanten Anstieg an apoptotischen oder nekrotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle bis zu einer Konzentration von 10 µM (Abb. 52), obwohl lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch vereinzelt apoptotische Zellen sichtbar waren (Abb. 53).

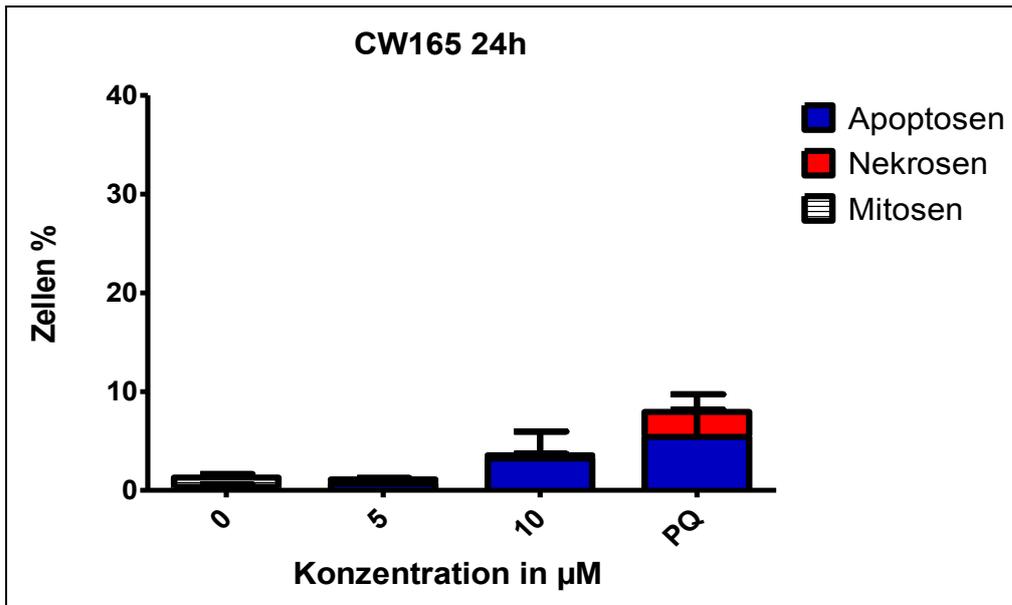


Abb. 52: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden 48 h lang anwachsen gelassen (150.000/35mm Schälchen) und 24 h mit CW165 5 μM und 10 μM inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent (+/- SD).

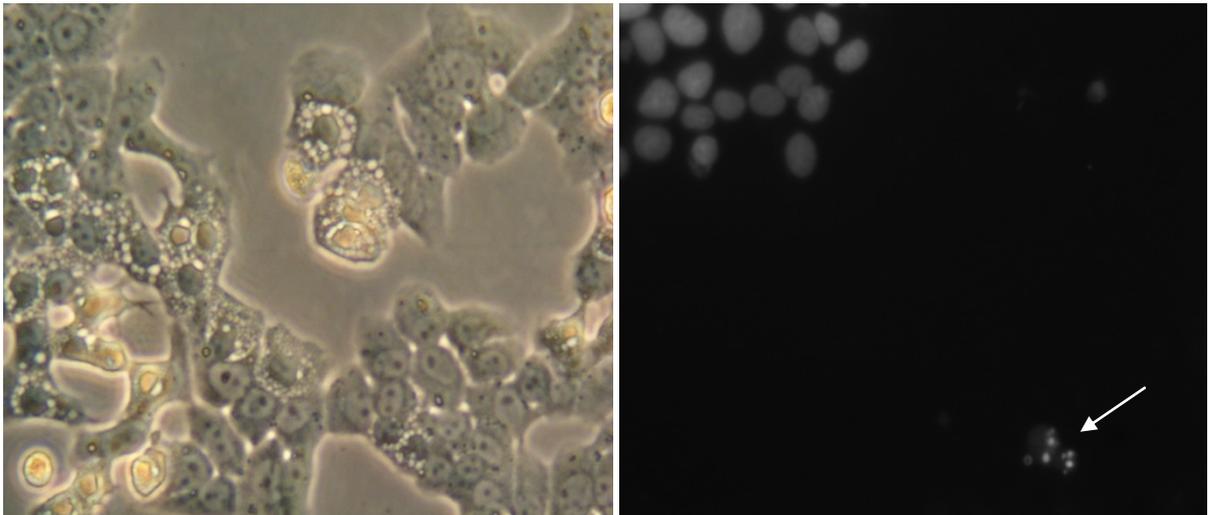


Abb. 53: Nachweis von apoptotischen Zellen (Pfeil) mittels Life-Dead-Assay am Fluoreszenzmikroskop (rechts), lichtmikroskopische Aufnahme (320-fache Vergr.) von H4IIE-Zellen nach 24 h Inkubation mit CW165 10 μM (links) mit deutlich sichtbarer Zellschädigung. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte.

CW104 wies nach 24 h Inkubation der H4IIE-Zellen ebenfalls keinen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen bis zu einer Konzentration von 10 μM auf (Abb. 54). Nach 48 h waren bei einer Konzentration von 5 μM sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen erkennbar (Abb. 55).

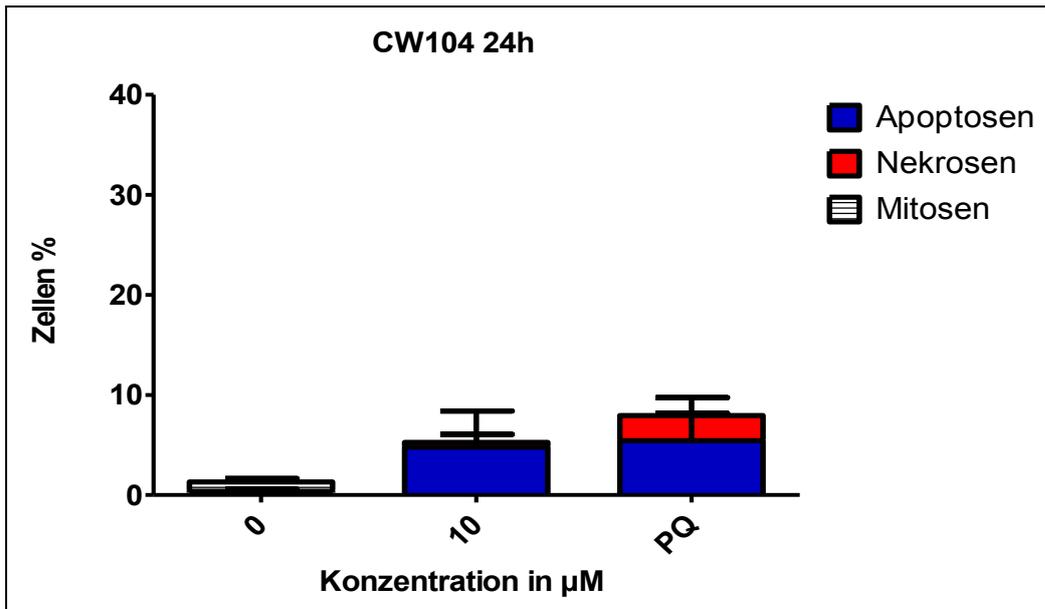


Abb. 54: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden 48 h lang anwachsen gelassen (150.000/35mm Schälchen) und 24 h mit CW104 10 μM inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent (+/- SD).

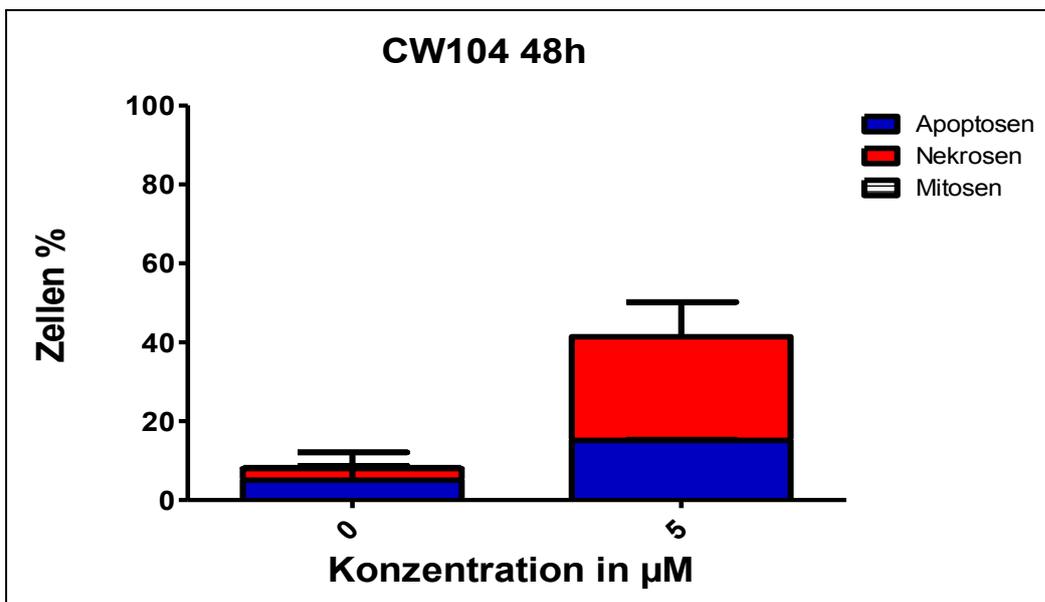


Abb. 55: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. H4IIE wurden 48 h anwachsen gelassen (150.000/35mm Schälchen) und weitere 48 h mit CW104 5 μM inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Einzelversuchen ausgezählten Apoptosen, Nekrosen und Mitosen in Prozent (+/- SD).

Nach Inkubation mit CW109 10 μM für 24 h war ein signifikanter Anstieg an apoptotischen H4IIE-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar (Abb. 56). Dies belegen auch die

beiden Aufnahmen am Lichtmikroskop und Fluoreszenzmikroskop (Abb. 58). Nach 48 h war eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen bereits bei einer Konzentration von 5 μM zu sehen (Abb. 57).

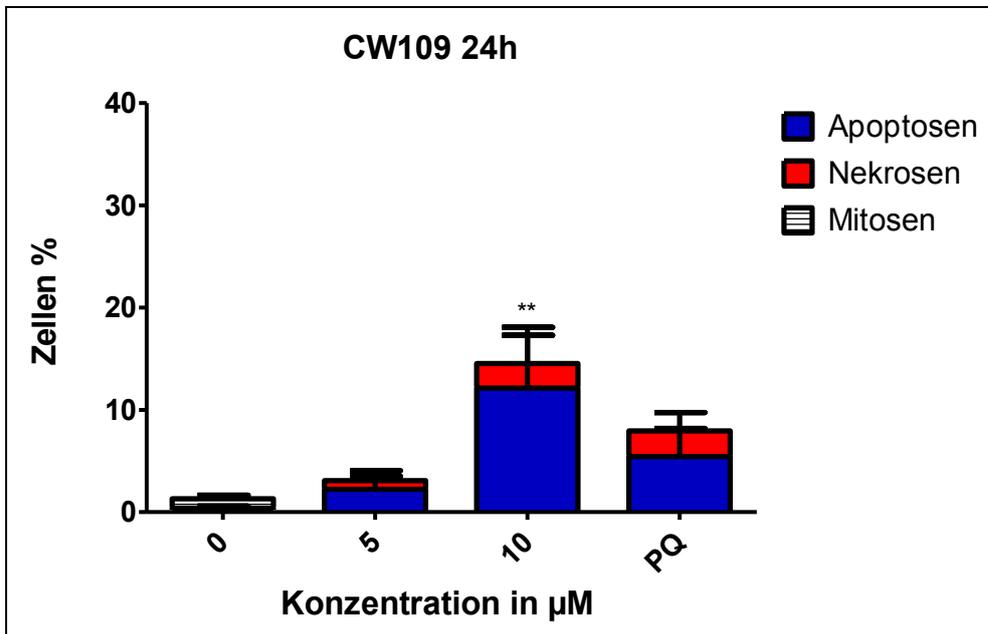


Abb. 56: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. H4IIE (150.000/35mm Schälchen) wurden 48 h anwachsen gelassen, 24 h mit CW109 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Einzelversuchen ausgezählten apoptotischen, nekrotischen und mitotischen Zellen in Prozent (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, ** = $p < 0,01$

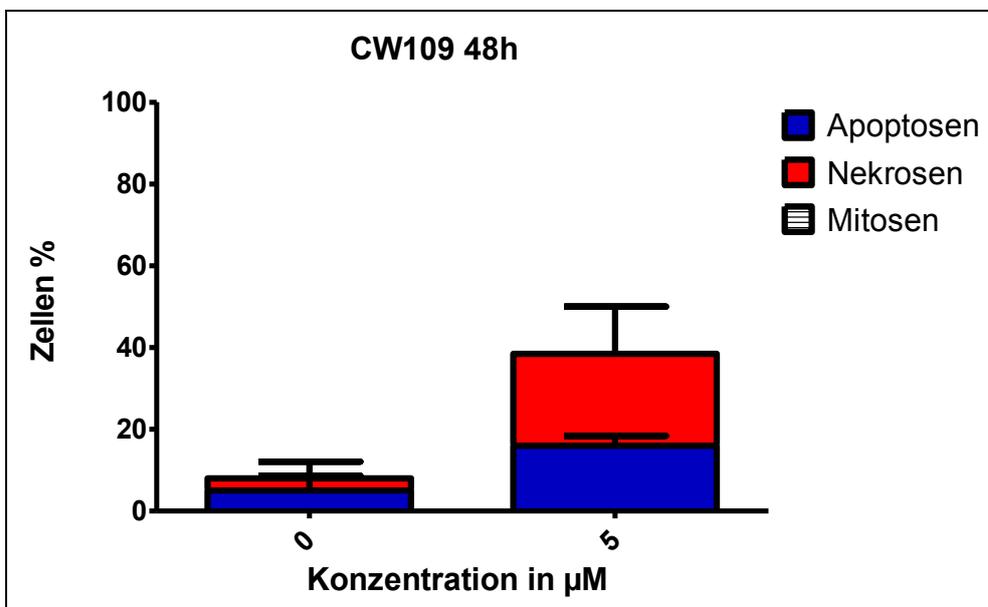


Abb. 57: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. H4IIE (150.000/35mm Schälchen) wurden 48 h anwachsen gelassen und 48 h mit CW109 5 μM inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Einzelversuchen ausgezählten apoptosen, nekrotischen und mitotischen Zellen in Prozent (+/-SD).

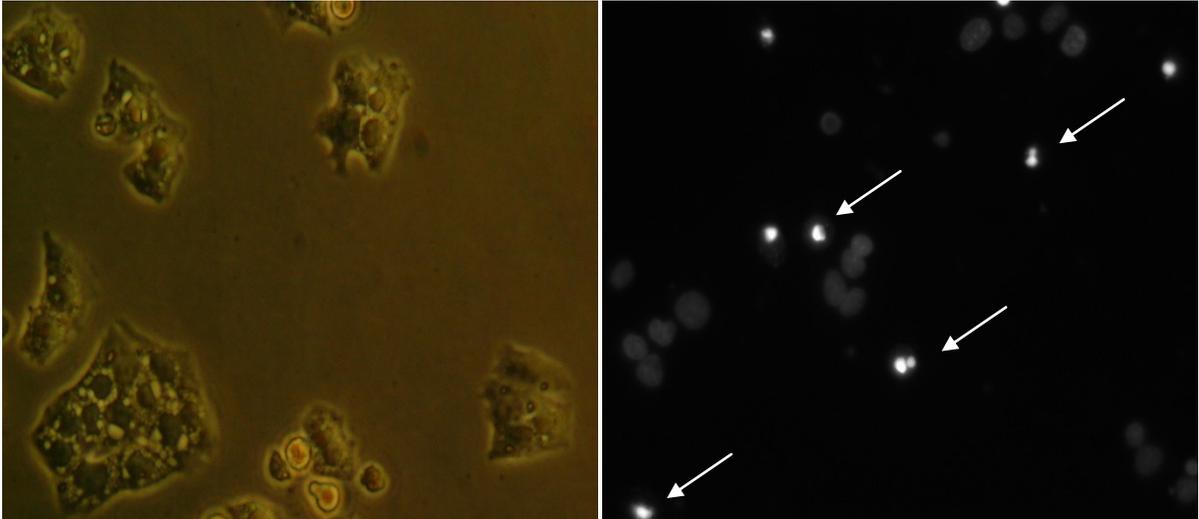


Abb. 58: Nachweis von apoptotischen Zellen (Pfeile) mittels Life-Dead-Assay am Fluoreszenzmikroskop (rechts), Lichtmikroskopische Aufnahme (320x Vergr.) von H4IIE-Zellen nach 24 h Inkubation mit CW109 10 μ M mit deutlich sichtbarer Zellschädigung (links). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte.

Wider Erwarten zeigte die hochtoxische Substanz CW171a nach 24 h Inkubation keinen Anstieg apoptotischer Zellen. Jedoch nahm der Anteil nekrotischer Zellen verglichen mit der Kontrolle signifikant zu bei einer Konzentration von 2,5 μ M (Abb. 59). Dies ist ein erster Hinweis auf die Auslösung eines nekrotischen Zelltodes durch CW171a.

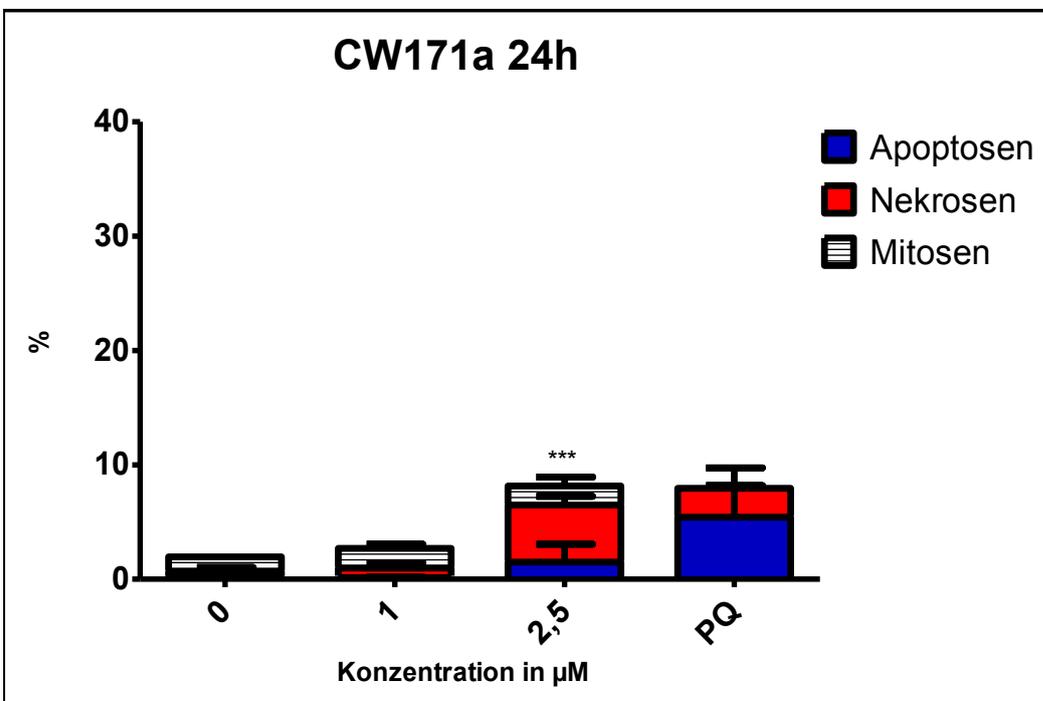


Abb. 59: Apoptosenachweis mittels Life-Dead-Assay in H4IIE-Zellen. 150.000/35mm Schälchen wurden 48 h anwachsen gelassen und 24 h mit CW171a 1 μ M und 2,5 μ M inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Einzelversuchen ausgezählten apoptotischen, nekrotischen und mitotischen Zellen in Prozent (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

4.8.2 DNA-Leiter mit Carbenen

Zur Absicherung der Ergebnisse des Life-Dead-Assays wurde die Methode der DNA-Leiter angewandt. In drei unabhängigen Versuchen konnten nach 48 h Inkubation mit CW109 5 μ M und mit CW104 10 μ M DNA-Leitern gezeigt und damit apoptotische Vorgänge nachgewiesen werden (Abb. 60a). Der Apoptosenachweis für CW109 und CW104 im Life-Dead-Assay wurde durch dieses Experiment bestätigt.

Für CW171a konnte nach 24 h Inkubation, aufsteigend von 0,5 μ M bis zu einer Konzentration von 5 μ M, keine DNA-Leiter gezeigt werden. Auch nach 48 h Inkubation mit CW171a war bis zu der Konzentration von 5 μ M keine DNA-Leiter sichtbar (Abb. 60b). CW171a bewirkte im Life-Dead-Assay lediglich einen Anstieg nekrotischer Zellen nach 24 h Inkubation. Da auch hier keine DNA-Leiter nachweisbar war, lag bereits die Vermutung nahe, dass es sich bei CW171a primär nicht um eine Apoptose induzierende Substanz handelt.

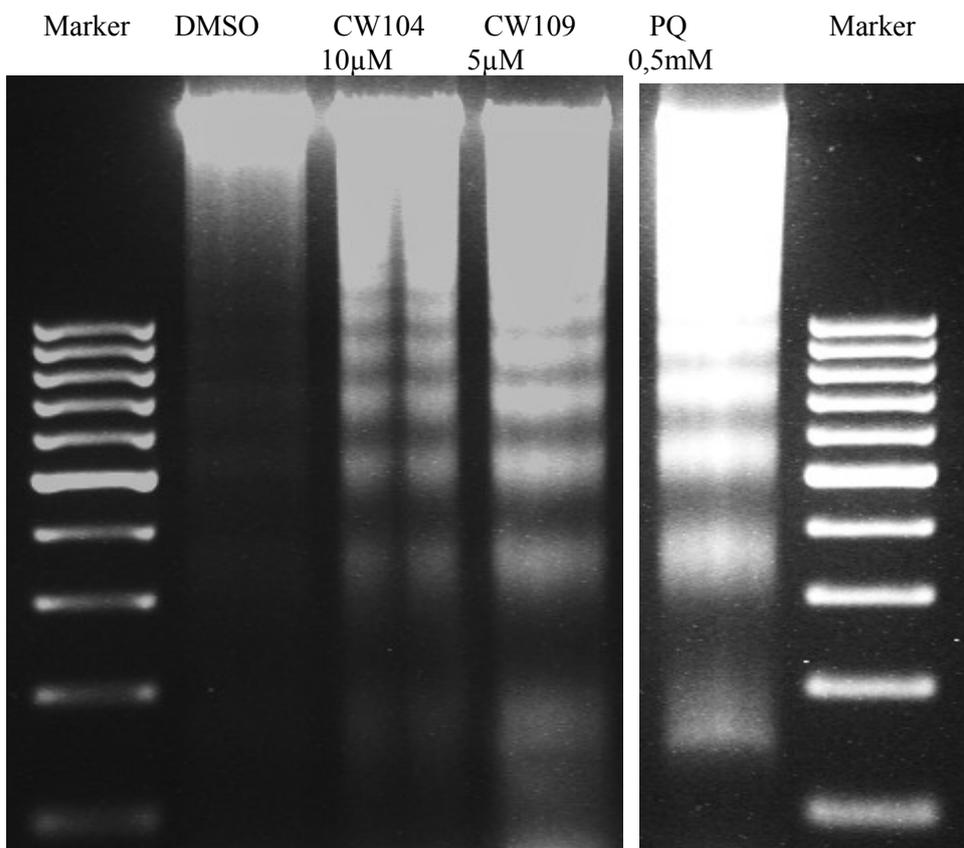


Abb. 60a: DNA-Leiter zum Apoptosenachweis. H4IIE wurden 48 h anwachsen gelassen und 48 h lang mit CW109 5 μ M und CW104 10 μ M geschädigt. Anschließend wurde die DNA isoliert, mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und im Gel-Doc sichtbar gemacht. Positivkontrolle = 0,5 mM Paraquat (PQ)

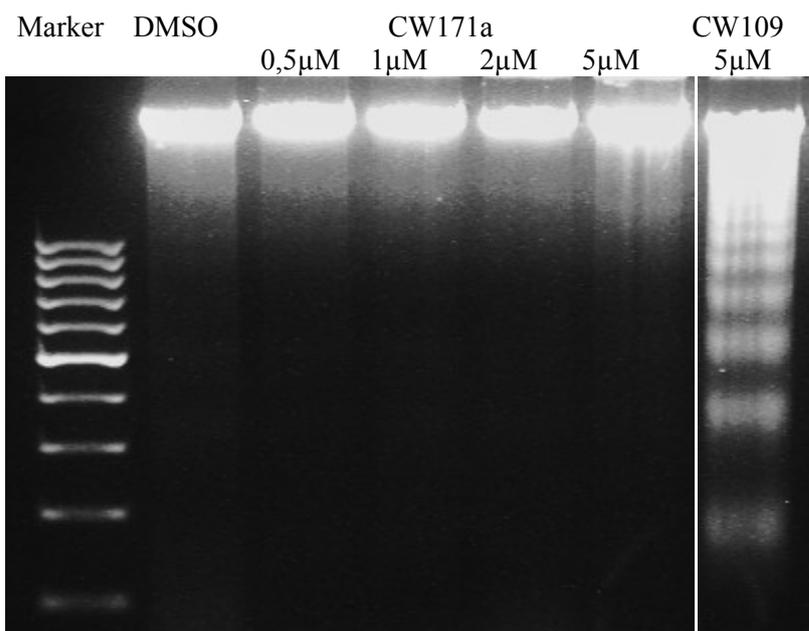


Abb. 60b: DNA-Leiter zum Apoptosenachweis. H4IIE wurden 48 h anwachsen gelassen und 48 h lang mit CW171a und CW109 geschädigt. Anschließend wurde die DNA isoliert, mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und im Gel-Doc sichtbar gemacht.

4.8.3 ApoONE-Assay mit Carbenen

Im Anschluss wurden CW165, CW104, CW109 und CW171a mittels ApoONE-Assay auf ihr apoptotisches Potenzial untersucht, indem die Caspase 3/7-Aktivität in H4IIE-Zellen indirekt über Fluoreszenzintensitätsmessungen bestimmt wurde.

CW165 zeigte nach 6 h, 24 h und 48 h keinen signifikanten Anstieg der Aktivität bis zu einer Konzentration von 10 µM (Abb. 61). Höhere Konzentrationen wurden nicht getestet.

Für CW104 zu 10 µM war sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubationsdauer eine Aktivitätszunahme erkennbar (Abb. 62), woraus man eine Apoptoseinduktion ableiten kann.

Auch nach Inkubationen von 24 h und 48 h mit CW109 von 10 µM war ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität und damit der Caspaseaktivität detektierbar (Abb. 63). Dies bestätigt die Ergebnisse des Life-Dead-Assays und der DNA-Leiter.

Nur für CW171a war nach 48 h keine Induktion der Caspaseaktivität nachweisbar (Abb. 64). Dieses Ergebnis stützt die Erkenntnis, dass CW171a primär keine Apoptosen in H4IIE-Zellen induziert.

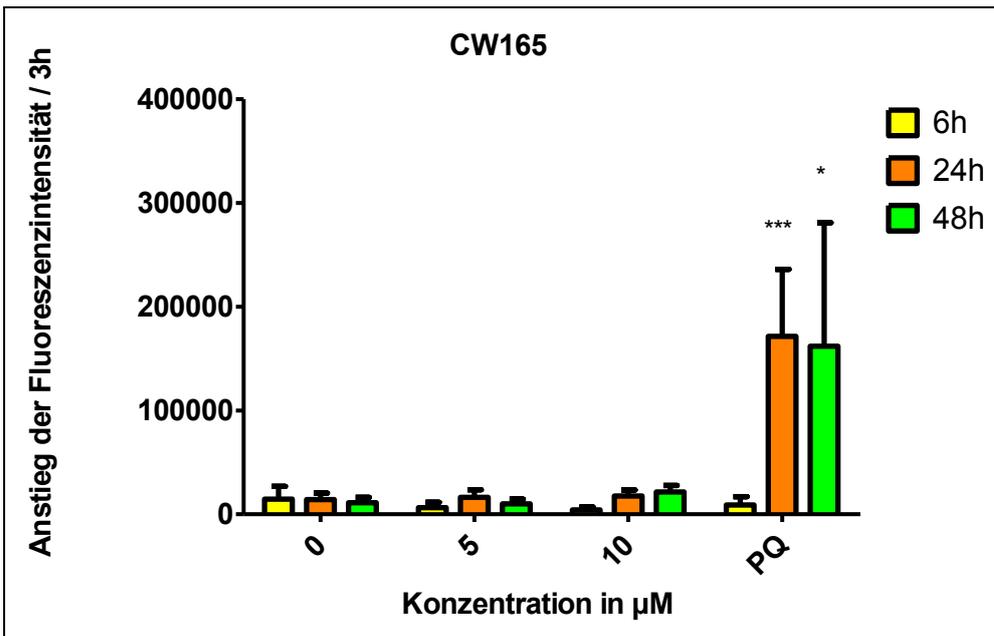


Abb. 61: Caspaseaktivität der Caspase 3/7. H4IIE-Zellen wurden 6 h, 24 h und 48 h mit CW165 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anstiege der Fluoreszenzintensität gemessen über 3h für n=3 (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

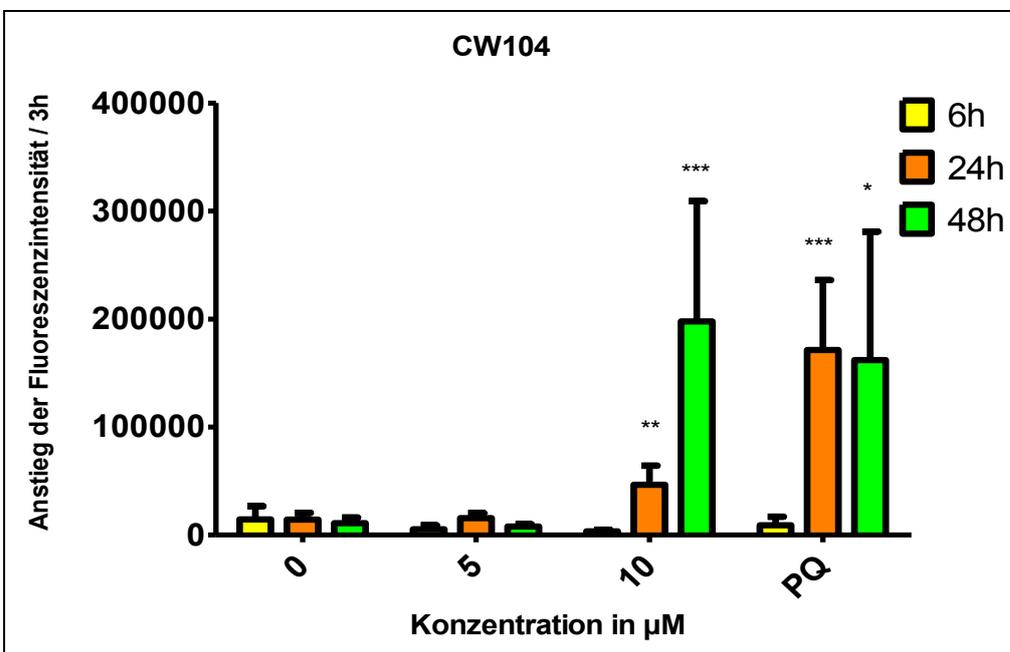


Abb. 62: Caspaseaktivität der Caspase 3/7. H4IIE-Zellen wurden 6 h, 24 h und 48 h mit CW104 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anstiege der Fluoreszenzintensität gemessen über 3 h für n=3 (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

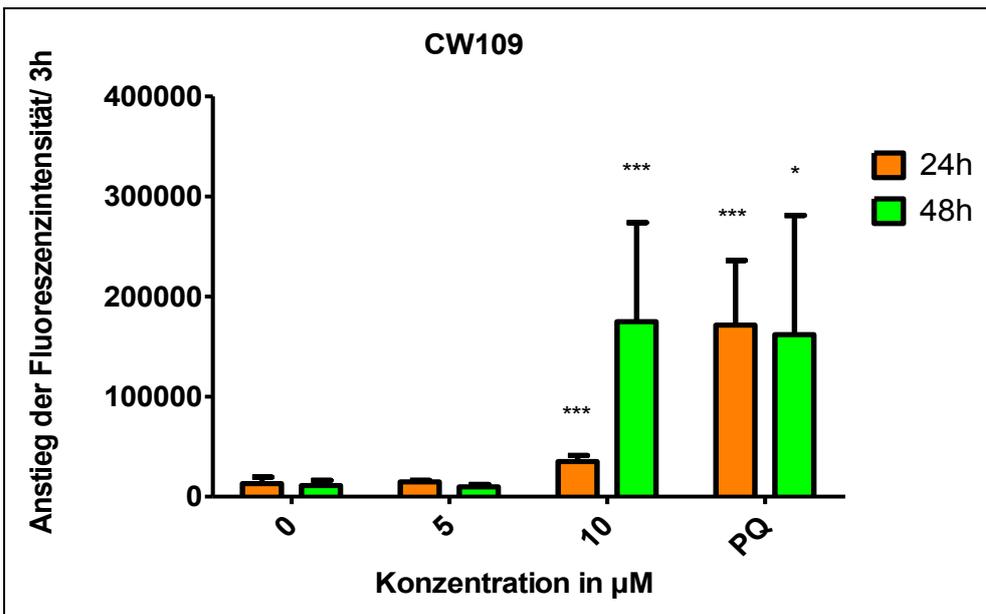


Abb. 63: Caspaseaktivität der Caspase 3/7. H4IIE-Zellen wurden 6 h, 24 h und 48 h mit CW109 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anstiege der Fluoreszenzintensität gemessen über 3 h für n=3 (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

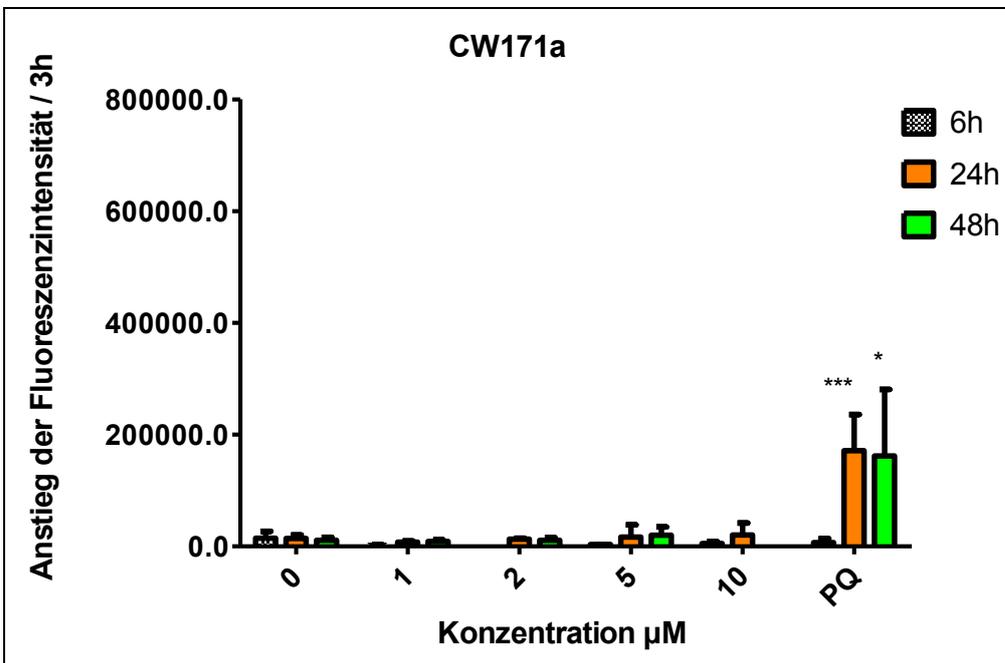


Abb. 64: Caspaseaktivität der Caspase 3/7. H4IIE-Zellen wurden 6 h, 24 h und 48 h mit CW171a inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwert der Anstiege der Fluoreszenzintensität gemessen über 3 h für n=3 (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

4.8.4 LDH-Assay mit Carbenen

Um auszuschließen, dass neben apoptotischen auch nekrotische Vorgänge in der Zelle stattfanden, wurde der LDH-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Weder bei CW165 noch bei CW104 und CW109 ließen sich nach 24 h Inkubationsdauer bis zu einer Konzentration von 25 μM signifikante Anstiege der LDH-Aktivität verzeichnen (Abb. 65, 66, 67). Auch nach 48 h waren bei CW165 und CW104 keine nekrotischen Vorgänge mit Hilfe des LDH-Assays detektierbar (Abb. 65, 66). Eindeutige Ergebnisse zeigte dagegen Substanz CW171a (Abb. 68). Bereits nach einer kurzen Inkubationsdauer von 6 h war bei einer Konzentration von 5 μM ein signifikanter Anstieg an Nekrosen zu sehen. Nach 24 h Inkubationsdauer war sogar bereits bei 1 μM durch das entstandene Formazan makroskopisch eine Rotfärbung im Well sichtbar, die mittels Plattenlesegerät photometrisch quantifiziert wurde.

Damit ist bestätigt, dass CW171a als einzige Substanz primär nekrotische Vorgänge auslöst, wie es sich bei den vorangegangenen Experimenten bereits angedeutet hat.

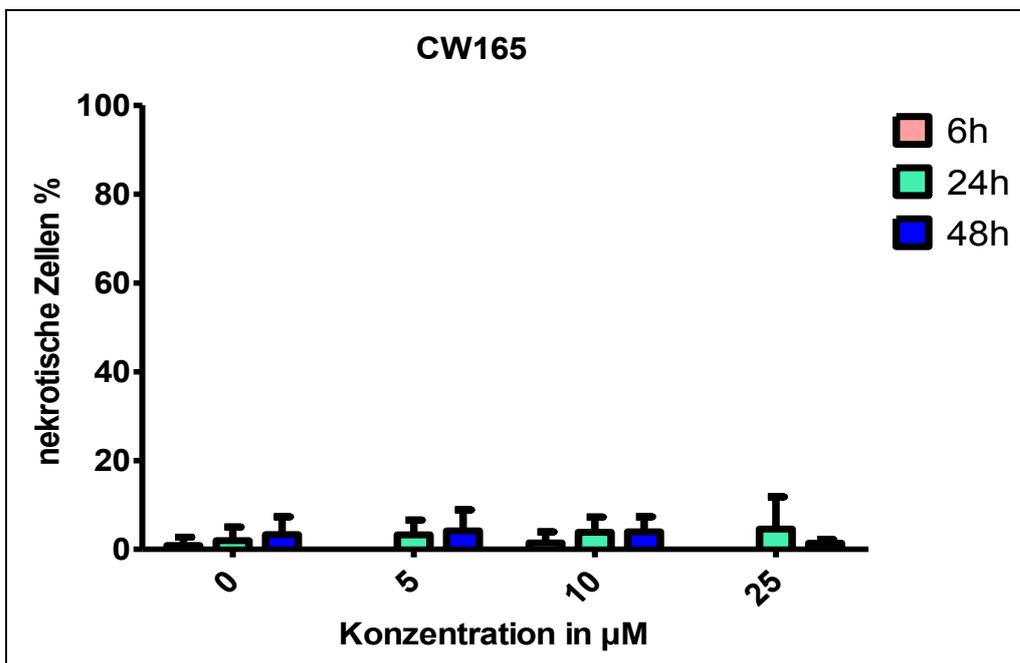


Abb. 65: Nekrosenachweis für CW165 mittels LDH-Assay. H4IIE wurden im 96-Well für 6 h, 24 h (15.000/Well) und 48 h (8.000/Well) mit CW165 bis zu 25 μM inkubiert. Die Absorption des Formazans bei 490 nm wurde im Plattenlesegerät bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und ist proportional zur Menge lysierter nekrotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der nekrotischen Zellen in Prozent (%) bzgl. *high control* (+/- SD).

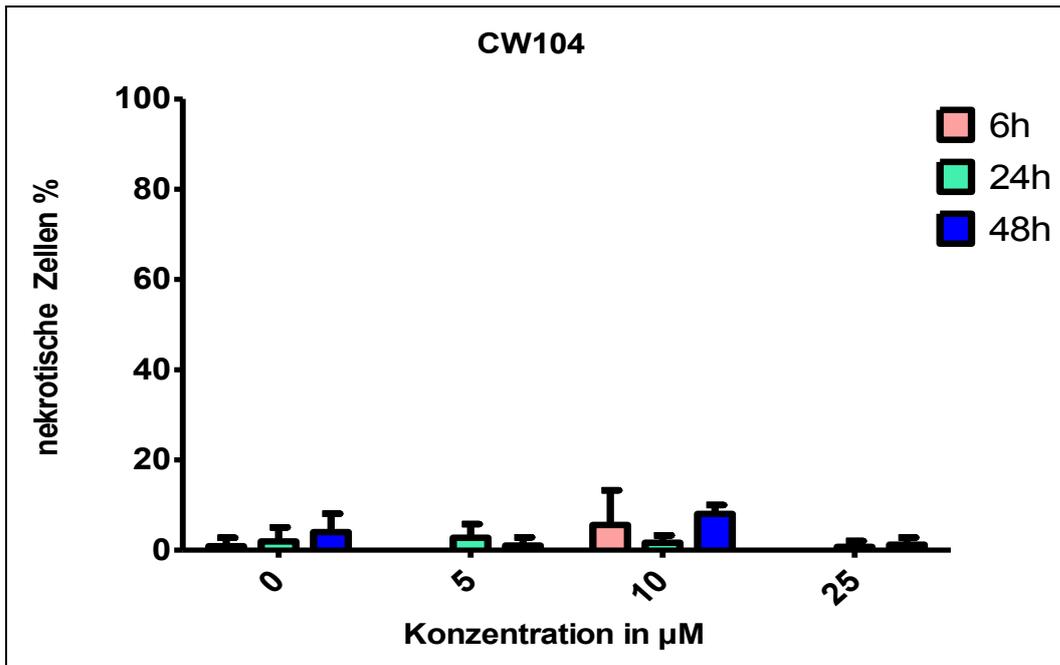


Abb. 66: Nekrosenachweis für CW104 mittels LDH-Assay. H4IIE wurden im 96-Well für 6 h, 24 h (15.000/Well) und 48 h (8.000/Well) mit CW104 bis zu 25 µM inkubiert. Die Absorption des Formazans bei 490 nm wurde im Plattenlesegerät bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und korreliert mit der Menge lysierter nekrotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der nekrotischen Zellen in Prozent (%) bzgl. *high control* (+/- SD).

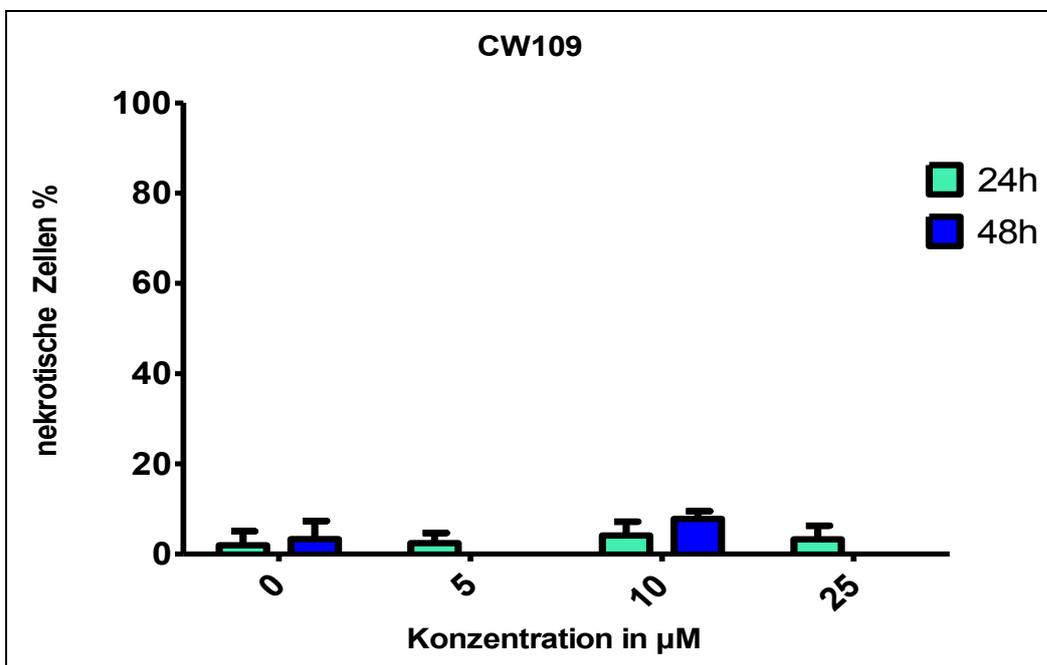


Abb. 67: Nekrosenachweis für CW109 mittels LDH-Assay. H4IIE wurden im 96-Well für 6 h, 24 h (15.000/Well) und 48 h (8.000/Well) mit CW109 inkubiert. Die Absorption des Formazans bei 490 nm wurde im Plattenlesegerät bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und korreliert mit der Menge lysierter nekrotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der nekrotischen Zellen in Prozent (%) bzgl. *high control* (+/- SD).

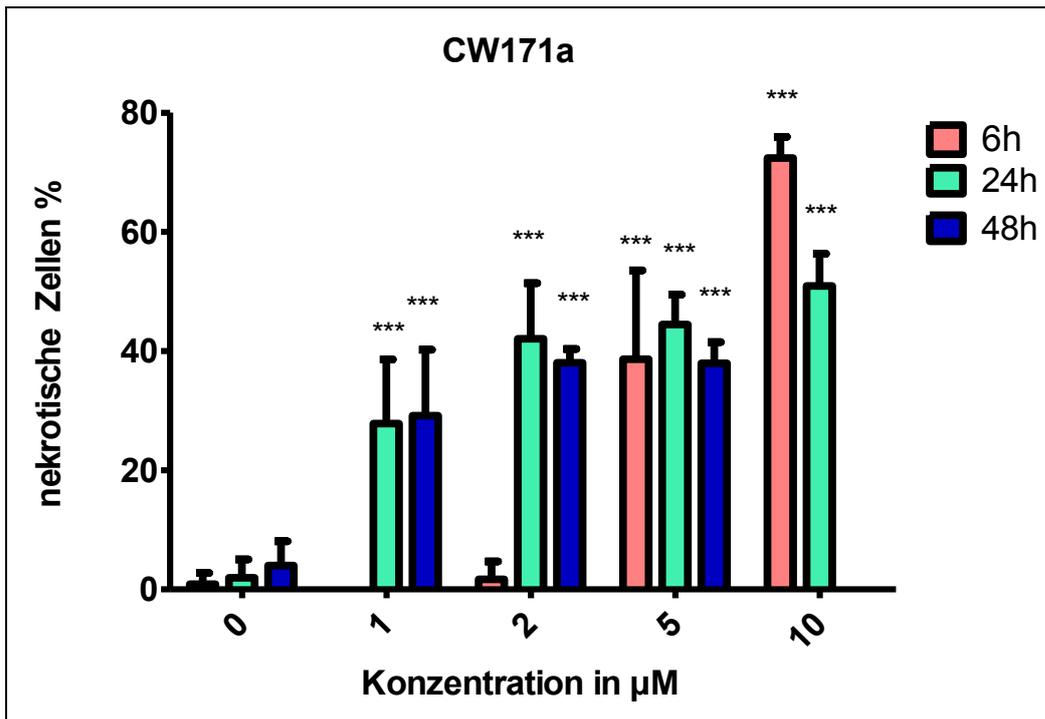


Abb. 68: Nekrosenachweis für Cw171a mittels LDH-Assay. H4IIE wurden im 96-Well für 6 h, 24 h (15.000/Well) und 48 h (8.000/Well) mit CW171a inkubiert. Die Absorption des Formazans bei 490 nm wurde anschließend im Plattenlesegerät bestimmt. Dabei gibt die Menge des gebildeten roten Formazans die Aktivität der LDH im Zellüberstand an und korreliert mit der Menge lysierter nekrotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte nekrotischer Zellen in Prozent (%) bzgl. *high control* (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

4.9 Comet-Assay mit Carbenen

Um DNA-Strangbrüche nachzuweisen, wurde der Comet-Assay durchgeführt, bei dem die Längen von 50 Nukleoiden pro Versuch bestimmt werden.

H4IIE wurden dazu sowohl 3 h (siehe Rohdaten) als auch 8 h lang mit den zu testenden Substanzen CW171a und CW104 inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1 mM H_2O_2 , das sowohl nach 3 h und nach 8 h eine deutliche Zunahme der Kometenlängen zeigte. Nach beiden Inkubationsdauern waren bei beiden Substanzen keine signifikanten Änderungen der Kometenlängen im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen (Abb. 69). Man muss für beide Substanzen CW104 und CW171a annehmen, dass eine Induktion von DNA-Strangbrüchen nicht die Ursache für ihre Zytotoxizität ist, da sogar nach 8 h bei toxischen Konzentrationen von 10 µM bzw. 5 µM keine Strangbrüche nachweisbar waren.

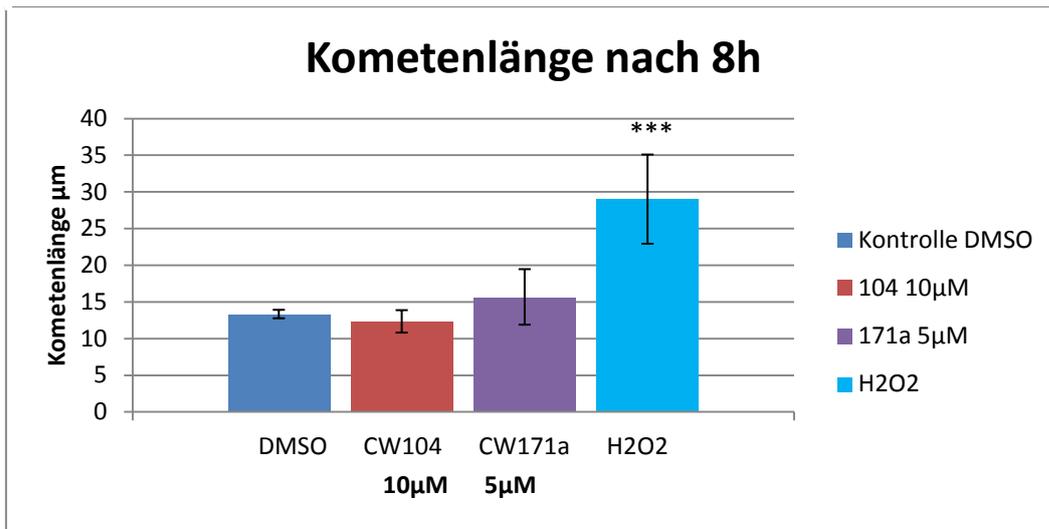


Abb. 69: Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels Comet-Assay. H4IIE (500.000/Well) wurden 8 h lang mit CW104 und CW171a behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kometenlängen in µm (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$

4.10 Detektion von ROS mittels DCF-Assay mit Carbenen

Mittels DCF-Assay können intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen werden. 15.000 H4IIE pro Well wurden 2 h lang mit den Substanzen inkubiert. Bei der Inkubation mit 1 mM Wasserstoffperoxid konnte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität über 1 h festgestellt werden (Abb. 70). H_2O_2 ist ein potenter Induktor von ROS. Die untersuchten Carbene CW104, CW109, CW171a und CW165 zeigten keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle nach 1 h. Sie sind demnach keine Induktoren von oxidativem Stress in der Zelle. Von den Substanzen CW104, CW109, CW171a und CW165 wurden jeweils Konzentrationen getestet, bei denen eine Zytotoxizität sicher nachgewiesen worden war. Für CW104 und CW109 10 µM nach 24 h Inkubation waren sogar im ApoONE-Assay und Life-Dead-Assay Apoptosen detektiert worden. Daher muss man davon ausgehen, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen auch die Bildung von ROS nicht als Ursache der Zytotoxizität der genannten Carbene angesehen werden kann.

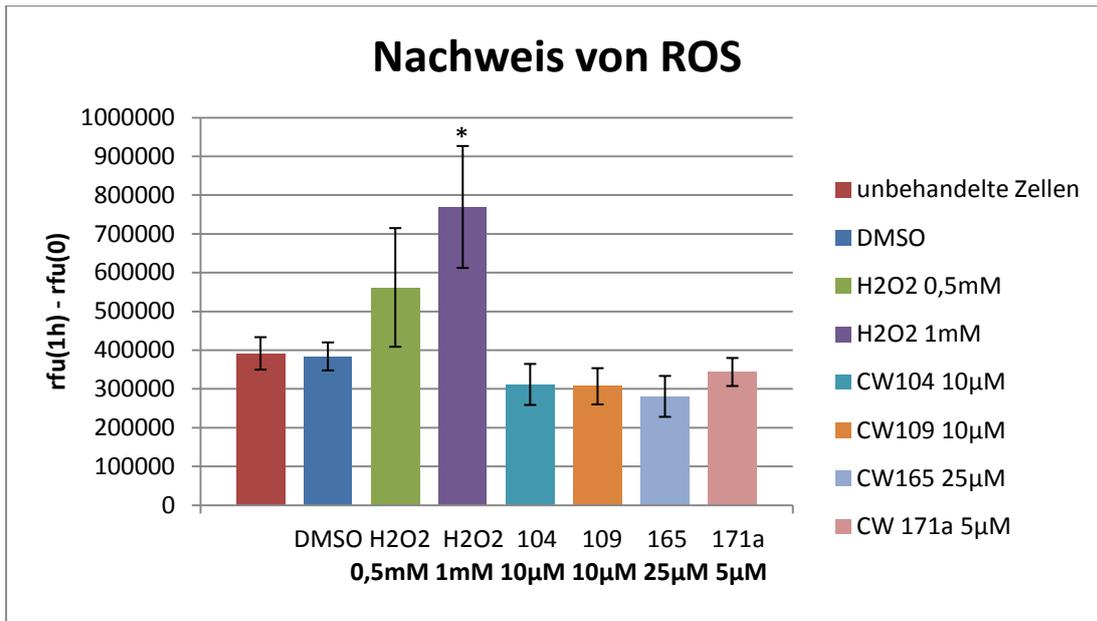


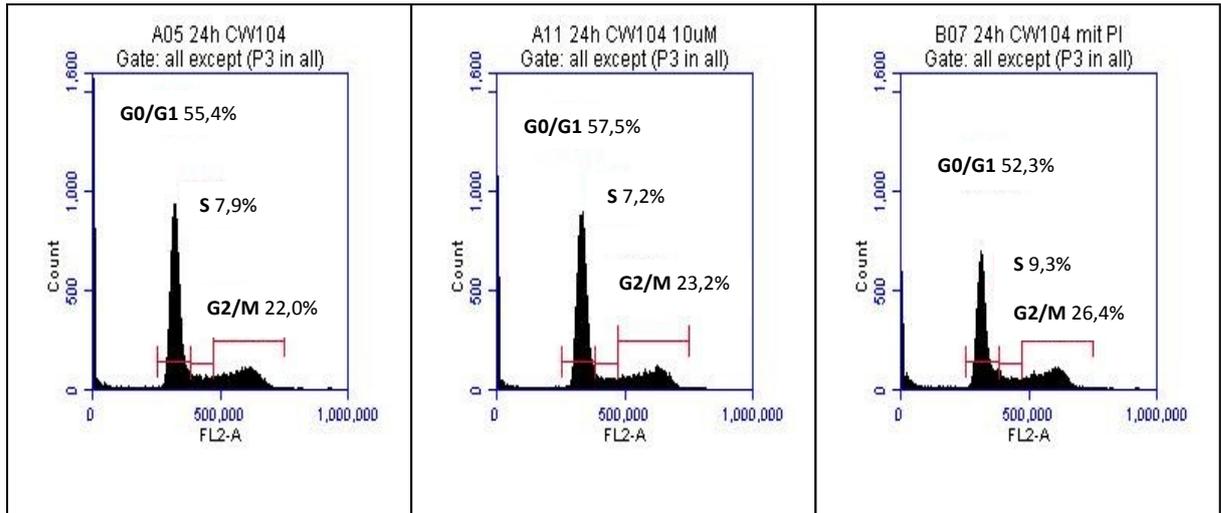
Abb. 70: Nachweis von ROS mittels DCF-Assay. H4IIE wurden 1 h lang mit CW104, CW109, CW165 und CW171 inkubiert. Als Positivkontrolle diente H₂O₂. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, * = p < 0,05

4.11 Zellzyklusanalyse mit Carbenen

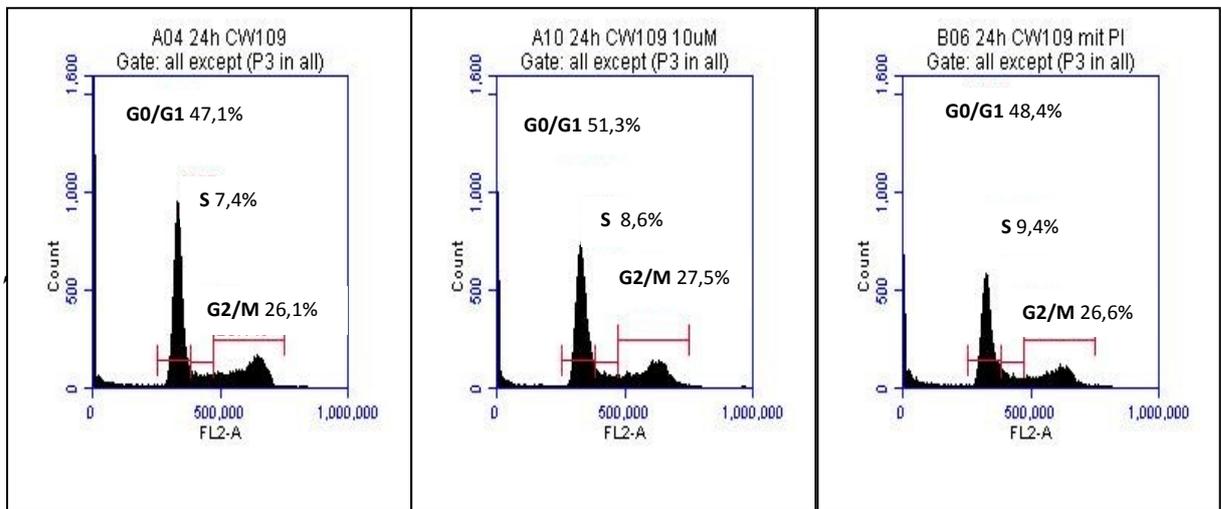
Nachdem auch die Carbene weder DNA-Strangbrüche noch oxidativen Stress intrazellulär verursachten, wurde ein möglicher Einfluss auf den Zellzyklus von H4IIE-Zellen untersucht. Nach 24 h Inkubation mit CW109 und CW104 mit jeweils 10 µM, der Konzentration, bei der Apoptosen sicher nachweisbar waren, ließ sich eine Verschiebung der Zellen von der G0/G1- in die G2/M-Phase feststellen, was auf einen G2-Arrest hindeutet (Abb. 71a/b). CW171a dagegen zeigte keine Änderung der Verteilung der Zellen bzgl. der verschiedenen Zellzyklusphasen. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen der anderen Versuche, die zeigten, dass es sich bei CW171a um eine primär nekrotische Substanz handelt, die weder genotoxisch ist, noch einen Einfluss auf den Zellzyklus hat.

Sichtbar ist auch die Zunahme an toten Zellen nach Schädigung mit den Substanzen. Geschrumpfte, tote Zellen wurden bei der Zellzählung im FACS ausgeschlossen. Daher lag für die untersuchten Carbene der Anteil aller Zellen, die in dem Life-Gate waren, bei ca. 80 %. Sowohl bei der Kontrolle aus auch bei der Schädigung mit CW171a wurden fast 100 % erreicht (Histogramme: siehe Rohdaten). Eine 48-stündige Inkubation von H4IIE mit den ausgewählten Substanzen erbrachte eine so starke Zellschädigung, dass die Versuche am FACS nicht auswertbar waren.

CW104 10 μ M



CW109 10 μ M



DMSO

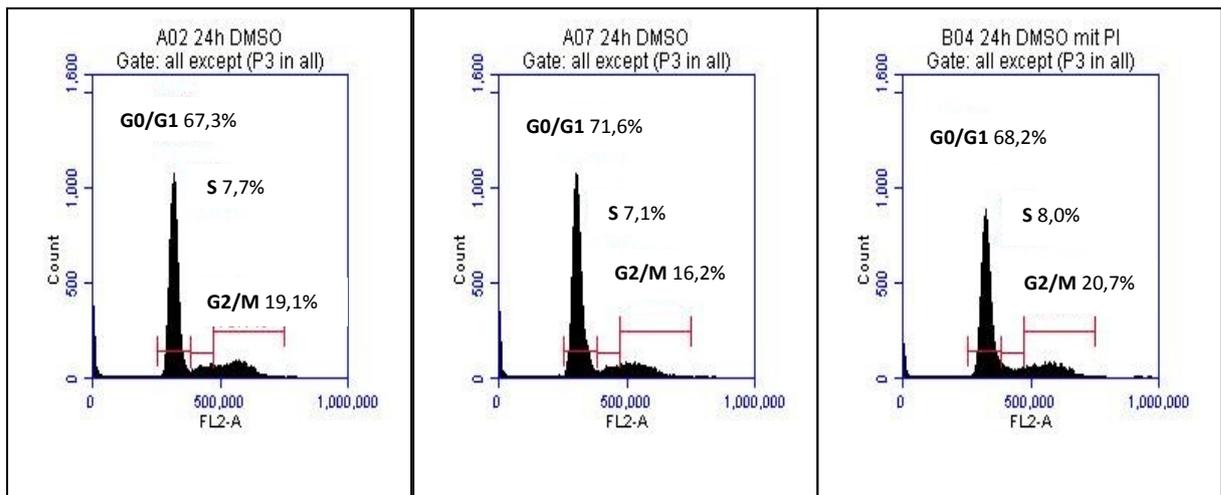


Abb. 71a: Zellzyklusanalyse am FACS. Es wurden H4IIE (500.000/Well) ausgesät, für 48 h anwachsen gelassen und mit den Substanzen CW104 (erste Reihe), CW109 (zweite Reihe) jeweils 24 h lang geschädigt. Als Negativkontrolle dienten mit DMSO (dritte Reihe) behandelte Zellen. Dargestellt sind die Histogramme von CW109, CW104 und DMSO. n=3

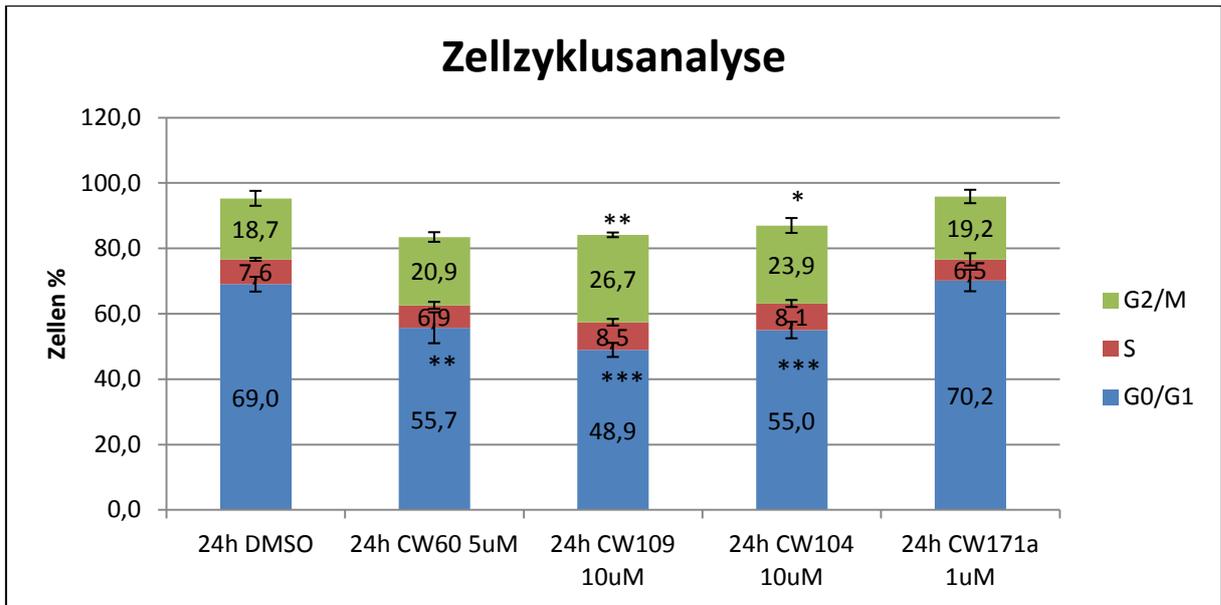


Abb. 71b: Zellzyklusanalyse am FACS. Es wurden H4IIE (500.000/Well) ausgesät, für 48 h anwachsen gelassen und mit den Substanzen CW60, CW109, CW104 und CW171a jeweils 24 h lang geschädigt. Als Negativkontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Im Diagramm dargestellt ist für jede Substanz die Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M in Prozent (+/- SD). Signifikanz gegenüber Kontrolle, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,5$

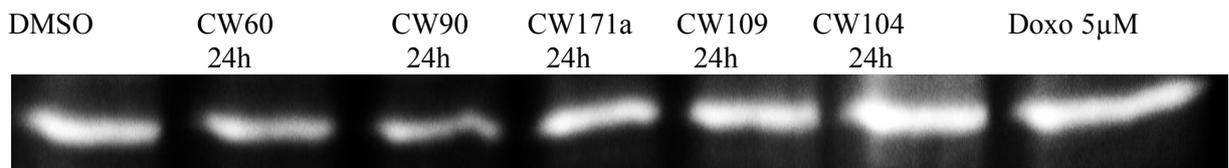
4.12 Beeinflussung von Signalwegen in H4IIE durch Carbene

Wie bereits bei den Diphosphanen erläutert, sollte auch für die Carbene ein möglicher Einfluss auf den PI3K-Akt-Signalweg und den Nrf2-ARE-Signalweg überprüft werden. Dazu wurden H4IIE-Zellen mit den Carbenen CW109, CW104 und CW171a für unterschiedliche Zeiten inkubiert und anschließend ihre Proteine isoliert. Die Zellen wurden jeweils mit CW109 und CW104 1 h, 4 h und 24 h lang geschädigt, mit CW171a 6 h und 24 h.

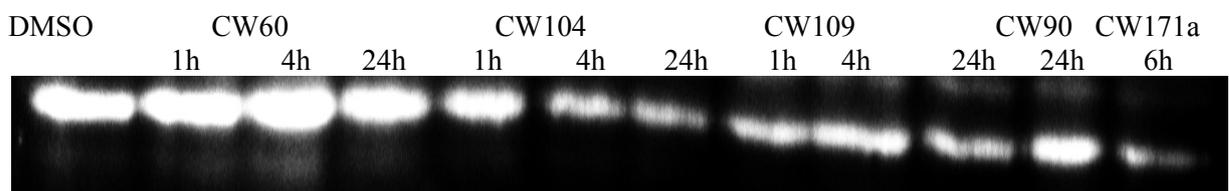
4.12.1 PI3K-Akt-Signalweg

Mittels Western Blot wurde pAkt mit einem molekularen Gewicht von 60 kDa detektiert. Eine Zunahme der Bandenstärke weist auf eine verstärkte Phosphorylierung der Akt, also eine verstärkte Aktivierung hin. Eine Abschwächung des Signals könnte eine Dephosphorylierung oder eine verminderte Phosphorylierung bedeuten. Dies wiederum könnte auf eine verminderte Aktivität von Akt hinweisen und auf eine Hemmung des PI3K-Akt-Signalweges. Bei 10 μ M CW104 konnte man nach 4 h eine Abschwächung des Signales sehen im Vergleich zur Kontrolle für $n = 2$ (Abb. 72, Blot Nr. 2, 3). Für CW109 ließ sich bei 10 μ M nach 24 h eine Abschwächung des Signals in zwei unabhängigen Versuchen feststellen (Abb. 72, Blot Nr. 2, 3). Anhand der gleichmäßig Coomassie gefärbten Membran (siehe Rohdaten) lässt sich erkennen, dass die Proteinmenge in der vierten Taschen von rechts (CW109 10 μ M

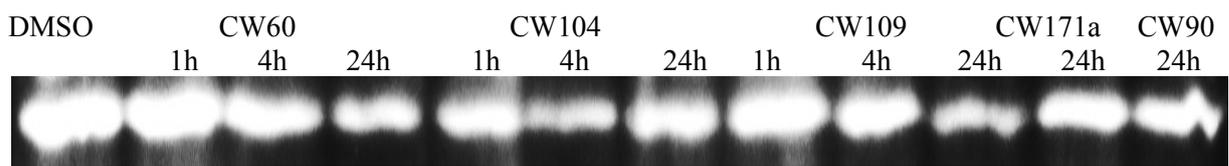
24 h) mit der zweiten Tasche von links (DMSO) optisch übereinstimmt. In einem dritten Versuch war die Bande von CW109 10 μ M nach 24 h Inkubation genauso stark wie bei der Kontrolle (Abb. 72 Blot Nr. 1). Eine schwache Beeinflussung durch CW104 nach 4 h Inkubation und CW109 nach 24 h Inkubation mit jeweils 10 μ M ist nicht sicher auszuschließen.



Blot Nr.1 (11.3.11)



Blot Nr.2 (15.3.11)



Blot Nr.3 (29.3.2011)

Abb. 72: Western Blots zur Detektion von pAkt (60kDa). H4IIE wurden jeweils mit CW109 (10 μ M) und CW104 (10 μ M) für 1 h, 4 h und 24 h und mit CW171a (2,5 μ M) für 24 h inkubiert. Nach der Proteinisolierung und Proteinbestimmung erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page und das Blotten auf PVDF-Membranen. Detektion von pAkt mittels Antikörpern.

4.12.2 Nrf2-ARE-Signalweg

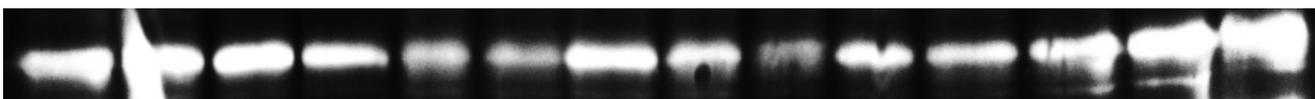
Eine Aktivierung dieses Signalweges würde mit einer verminderten Degradation oder einer verstärkten Expression von Nrf2 in der Zelle einhergehen. Eine erhöhte Konzentration von Nrf2 in der Zelle wäre sichtbar an einer verstärkten Bande im Western Blot im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO). Der Nrf2-Induktor tBHQ zeigt ein stärkeres Signal bei 100 kDa. Er diene hier als Positivkontrolle (PK).

Durch die Carbene wurde kein stärkeres Signal hervorgerufen als bei der Negativkontrolle (Abb. 73).

Eine Abschwächung des Signales war in einem Blot bei CW104 jeweils nach 1 h und nach

4 h und bei CW109 nach 4 h zu sehen (Abb. 73, Blot Nr. 1, Coomassie gefärbte Membran: siehe Rohdaten). Nach 24 h war die Bande allerdings wieder genauso stark wie bei der Kontrolle. Möglicherweise handelt es sich nur um einen kurzzeitigen Effekt, der nach 24 h nicht mehr sichtbar ist. In einem zweiten Blot konnten dieses Ergebnis für CW109 bestätigt werden (Abb. 73, Blot Nr. 2). Weitere Versuche müssten folgen.

DMSO	CW60			CW104			CW109			CW171a		CW90	PK
	1h	4h	24h	1h	4h	24h	1h	4h	24h	6h	24h	24h	



Blot Nr.1 (25.3.)

DMSO	CW60			CW109			CW104			CW171a		CW90	PK
	1h	4h	24h	1h	4h	24h	1h	4h	24h	6h	24h	24h	



Blot Nr.2 (29.3.11)

Abb. 73: Western Blots zur Detektion von Nrf2 (100 kDa). H4IIE (500.000/Well) wurden 72 h anwachsen gelassen und mit den Substanzen CW104 (10 μ M) und CW109 (10 μ M) jeweils 1 h, 4 h und 24 h, mit der Substanz CW171a (2,5 μ M) 6 h und 24 h inkubiert. Nach der Proteinisolierung und Proteinbestimmung erfolgte die Auftrennung mittels SDS-Page und das Blotten auf PVDF-Membranen. Detektion von Nrf2 mittels Antikörpern.

4.13 Tabellarische Übersicht über die Ergebnisse aller Experimente

a) in C6

	CW60	CW90	CW55	CW143	CW35	CW171a	CW165	CW109	CW104
Toxizität 24h	+	+	--	--	--	+	+	--	--
	IC ₅₀ = 5µM (n=3)	IC ₅₀ = 5µM (n=3)	bis 10µM (n=3) 50µM (n=2)	bis 10µM (n=3) 50µM (n=2)	bis 10µM (n=3) 50µM (n=2)	IC ₅₀ = 2µM (n=3)	IC ₅₀ > 50µM (n=3)	bis 50µM (n=2)	bis 50µM (n=2)

b) in H4IIE

	CW60	CW90	CW55	CW143	CW35	CW171a	CW165	CW109	CW104
Toxizität 3h	-- bis 10µM	-- bis 10µM				+			
6h	-- bis 10µM	-- bis 10µM				+			
12h	-- bis 10µM	-- bis 10µM				+			
24h	+	--	--	--	--	+	+	+	+
	IC ₅₀ = 6,5µM	bis 10µM	bis 50µM	bis 50µM	bis 50µM	IC ₅₀ = 1,5µM	IC ₅₀ = 17µM	IC ₅₀ = 10µM	IC ₅₀ = 10µM
48h	+	+	+	--	--	+	+	+	+
	IC ₅₀ = 3µM	ab 5µM	ab 5µM	bis 50µM	bis 50µM	IC ₅₀ < 0,5µM	IC ₅₀ = 4µM	IC ₅₀ = 5µM	IC ₅₀ = 5µM
72h	+	+	+	--	--	+	+	+	+
	IC ₅₀ = 3,5µM	ab 5µM	ab 10µM	bis 50µM	bis 50µM	IC ₅₀ < 0,5µM	IC ₅₀ = 4µM	IC ₅₀ = 4µM	IC ₅₀ = 4µM
Apoptosen Life Dead 24h	+	--				0	0	+	0
	10µM	10µM				2,5µM	10µM	10µM	10µM
48h	+	0						0	0
	5µM	5µM						5µM	5µM
Apoptosen ApoONE 24h	--	--				--	--	+	+
	bis 10µM	bis 25µM				bis 10µM	bis 10µM	10µM	10µM
48h	+	+				--	--	+	+
	ab 10µM	ab 25µM				bis 5µM	bis 10µM	10µM	10µM
Apoptosen DNA- Leiter 24h	+	--				--			
	5µM	5µM (n=2)				bis 5µM			
48h						--		+	+
						bis 5µM		5µM	10µM

Ergebnisse

	CW60	CW90	CW55	CW143	CW35	CW171a	CW165	CW109	CW104
Nekrosen Life Dead 24h	+ 10µM	-- 10µM				+ ab 2,5µM	-- bis 10µM	0 5µM	-- bis 10µM
48h	+ 5µM	0 5µM						0 5µM	0 5µM
Nekrosen LDH- Assay 6h	-- bis 10µM	-- bis 10µM				+ ab 5µM	-- bis 10µM		-- bis 10µM
24h	0 10µM	-- bis 25µM				+ ab 1µM	-- bis 25µM	-- bis 25µM	-- bis 25µM
48h	+ ab 10µM	-- bis 25µM				+ ab 1µM	-- bis 25µM	-- bis 10µM	-- bis 25µM
Genotox. Comet- Assay 8h	-- bis 10µM	-- bis 10µM				-- 5µM			-- 10µM
ROS DCF- Assay	-- bis 10µM	-- bis 25µM				-- 5µM	-- 25µM	-- 10µM	-- 10µM
ZZA	G0/G1 ↓ 5µM					-- 1µM		G0/G1↓ G2/M↑ 10µM	G0/G1↓ G2/M↑ 10µM
PI3K	(+) 10µM	-- 25µM				-- 2,5µM		0 10µM	0 10µM
Nrf2	0 10µM	-- 25µM				-- 2,5µM		0 10µM	0 10µM
ERK	-- 10µM								
JNK	0 10µM								

-- negativ , + positiv , 0 nicht signifikant/eindeutig , IC₅₀-Werte wurden graphisch ermittelt

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden fünf Diphosphan-Gold(I)-Komplexe und fünf NHC-Gold(I)-Komplexe in Rattengliomzellen C6 und Rattenhepatomzellen H4IIE auf ihre Zytotoxizität untersucht, wobei weiterführende Versuche mit H4IIE-Zellen zur Erforschung der eigentlichen Ursache für den Zelltod erfolgten.

Unter den Gold(I)-Komplexen waren solche mit N-methylierten-Bis(imidazolylphosphan)-Liganden, Nicht N-methylierten- Bis(imidazolylphosphan)-Liganden, Thiazolyl-substituierten Diphosphanliganden und N-heterozyklischen Carben-Liganden.

Unter diesen Substanzen wurden solche herausgefunden, welche bereits in niedrigen Konzentrationen Krebszellen durch Induktion der Apoptose abzutöten vermochten. Niedrige Konzentrationen sind von besonderem Interesse, weil durch sie auch Nebenwirkungen im Organismus minimiert werden. Die Apoptose galt als der erstrebenswerte durch Zytostatika induzierte Zelltod, weil sie keine Entzündungsreaktionen nach sich zieht. Ferner sollten die molekularen Wirkmechanismen von diesen Substanzen mit solchen Eigenschaften erforscht werden.

Im Folgenden werden die obigen Versuchsergebnisse anhand verschiedener Labormethoden mit ihren Interpretationsmöglichkeiten und -grenzen diskutiert unter Berücksichtigung der chemischen Eigenschaften der Komplexe und ihrer möglichen Wirkungsweisen, wodurch sich neue weiterführende Fragestellungen oder Hypothesen ergeben. Ebenso werden die Einsatzmöglichkeiten der interessanten Diphosphan-Gold(I)-Komplexe und NHC-Gold(I)-Komplexe als potenzielle Zytostatika diskutiert.

5.1 Zytotoxizitätstests

Bei der Interpretation des MTT-Zytotoxizitätstests ist zu beachten, dass bei diesem Assay die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt wird. Diese Enzyme sind aktiv in intakten Mitochondrien. Die Menge des Reaktionsproduktes Formazan ist also proportional zu der Zellzahl lebender und metabolisch aktiver Zellen. Allerdings produzieren ruhende metabolisch weniger aktive Zellen auch weniger Formazan. Diese Zellen sind aber nicht tot, obwohl im Plattenlesegerät eine geringere Absorption des Formazan gemessen wird.

Bei der Auswertung werden die Absorptionswerte nach Schädigung der Zellen immer verglichen mit den Kontrollzellen (DMSO), die in der Viabilität nicht eingeschränkt sind. Auch ein Zellzyklusarrest kann im Vergleich zur Kontrolle geringere Absorptionswerte

bewirken, da von vornherein einfach weniger Zellen im Well aufgrund der langsameren Proliferation vorhanden sind. Der MTT-Assay liefert demnach lediglich eine erste Abschätzung des antiproliferativen Potenzials der Substanzen, ermöglicht aber noch keine eindeutige Aussage über das Ausmaß und erst Recht nicht über die Ursache der Toxizität einer Substanz.

Bei den Goldkomplexen mit Diphosphan-Liganden ist aufgefallen, dass der Nicht-N-methylierte Bis(imidazolylphosphan)-Au(I)-Komplex CW35 und der N-methylierte Bis(imidazolylphosphan)-Au(I)-Komplex CW143 bis zu einer Konzentration von 50 μM nach 72 h keine Toxizität in C6- und H4IIE-Zellen aufwiesen. Die Liganden beider Substanzen tragen Imidazolringe, die jeweils über ein C-Atom mit einem der beiden Phosphoratome des Liganden verbunden sind. Die insgesamt vier Imidazolringe im Liganden von CW35 tragen als Reste an einem ihrer C-Atome jeweils einen Ethyl-2-Methylrest, während sie in den Liganden von CW143 N-methyliert sind.

Der ebenfalls in beiden Zelllinien wenig toxische Nicht-N-methylierte Bis(imidazolylphosphan)-Au(I)-Komplex CW55 besitzt keine weiteren Reste an den Imidazolringen. Nach 24 h Inkubation mit CW55 bis zu 50 μM war kein toxischer Effekt in C6 und H4IIE zu sehen. Erst nach 48 h zeigte sich in H4IIE-Zellen eine Toxizität mit einem IC_{50} -Wert im Bereich von 5 μM .

Auffällig ist, dass der Komplex CW60 mit Thiazolyl-substituierten Diphosphanliganden im MTT-Assay nach 24 h in beiden Zelllinien einen IC_{50} -Wert im Bereich von 5 μM aufwies.

Es ist wahrscheinlich, dass zur Toxizität von CW60 die Thiazolringe entscheidend beitragen, welche möglicherweise mit intrazellulären und extrazellulären Thiolgruppen interagieren.

CW60 ist hydrolyseempfindlich und wird im wässrigen Milieu zu CW171a/b zersetzt. CW90 wird im wässrigen Milieu nicht zersetzt, da sein N-methylierter Bis(imidazolylphosphan)-Ligand durch jeweils einen Phenylring an beiden Phosphoratomen stabilisiert wird. Allerdings zeigte CW90 eine weniger starke toxische Wirkung in H4IIE-Zellen als CW60. Nach 24 h zeigte sich bis zu 10 μM von CW90 kein toxischer Effekt. Erst nach 48 h Inkubation mit CW90 trat bei 5 μM eine signifikante Absorptionsminderung ein. In C6-Zellen war CW90 etwas toxischer mit einem IC_{50} -Wert im Bereich von ca. 5 μM nach 24 h. CW60 und CW90 zeigen in C6-Zellen ein ähnliches zytotoxisches Potenzial nach 24 h Inkubation.

Bei der Untersuchung der NHC-Gold(I)-Komplexe fiel auf, dass CW171a/b die stärkste Toxizität bereits im nanomolaren Bereich in C6- und H4IIE-Zellen zeigten. Nach 24 h lag der IC₅₀-Wert von CW171a in H4IIE bei einer Konzentration von 1 µM, nach 48 h bei ca. 0,25 µM. Für CW171b waren die IC₅₀-Werte in H4IIE geringfügig höher. Nach 24 h betrug der IC₅₀-Wert 1,5 µM, nach 48 h 0,5 µM. Diese außerordentliche Toxizität ist sicherlich auf die Struktur der Substanzen zurückzuführen. Sie tragen als einzige der fünf Carbene Thiazolringen anstelle von Imidazolringen. Die anderen drei Carbene CW104, CW109 und CW165 waren nach 24 h etwas weniger toxisch. Ihre IC₅₀-Werte lagen im Bereich von 10 µM. Im MTT-Assay war ihr zytotoxisches Potenzial untereinander gleich stark. CW109 weist keinen weiteren Rest an beiden Imidazolringen auf, während bei CW104 eine Methylgruppe jeweils an ein N-Atom der beiden Imidazolringe gebunden ist. CW165 trägt zwei Methylgruppen an beiden N-Atomen der beiden Imidazolringe. Dem MTT-Assay nach zu urteilen, hat das Vorhandensein von einer oder zwei Methylgruppen am Imidazolring keine Auswirkung auf die Toxizität im Vergleich zum Fehlen dieser Reste.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, in wie weit die Gold(I)-Komplexe in Rattengliomzellen C6 und Rattenhepatomzellen H4IIE toxisch wirken. Wie Gold(I)-Komplexe in humanen Leberzellen in Zellkultur oder gar auf Zellen im lebenden Organismus reagieren könnten, sollte noch untersucht werden. Auch die Aufnahme in die Zelle kann von humanen Zellen anders erfolgen als von Rattenzellen, aufgrund unterschiedlicher Transporter in der Zellmembran.

Im Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität wurde auch untersucht, wie sich die beiden Gold(I)-Komplexe CW60 und CW90 in einer humanen Kolonkarzinomzelllinie Hct116 verhielten. Beide Substanzen zeigten in Hct116 nach 24 h Inkubation eine toxische Wirkung. Allerdings sind hier die Versuchsbedingungen des MTT-Assays geringfügig anders gewesen als in H4IIE Zellen und daher nur bedingt vergleichbar. Hier wurden 10.000/Well für 24 h anwachsen gelassen. Im Well lag die Konzentration von DMSO bei 1 %, nicht wie bei den anderen Versuchen bei 0,5 %. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurden die Zellen 30 Min. lang mit der MTT-Lösung inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide IC₅₀-Werte von CW60 und CW90 in Hct116 fast genau mit den Werten für H4IIE übereinstimmen.

C. Wetzl beschreibt in ihrer Dissertation auch die Wirkung der Diphosphan-gold(I)-Komplexe in humanen Ovarialkrebszellen A2780, welche aus dem Ovarialkarzinom einer unbehandelten Frau isoliert wurden. Man unterscheidet bei A2780-Zellen zwischen Cis-Platin

sensiblen und Cis-Platin resistenten Zellen, wobei letztere aus ersteren hervorgegangen sind. Die Cis-Platin resistenten Zellen wurden in der AG Kassack, welche mit dem Institut für Toxikologie der HHU kooperiert, über Wochen durch kontinuierliche Inkubation mit geringen Konzentrationen an Cis-Platin gezüchtet.

Im MTT-Assay zeigten CW90 und CW60 in geringen Konzentrationen in beiden Zelllinien eine größere Toxizität als die Referenzsubstanz Cisplatin. Die IC_{50} -Werte lagen für CW90 in beiden Zelllinien unter 1 μ M, für CW60 auf A2780 sens. bei 0,45 μ M und auf A2780 cis. bei 2,18 μ M. Die Inkubationszeit für diese Experimente betrug 72 h (Wetzel, 2011).

Alle Daten wurden bisher im Zellkulturmodell erhoben. Dabei wurde versucht, die Umweltbedingungen der Zellen möglichst nahe an denen im Organismus zu halten. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 gehalten. Außerdem wurde stets auf eine ausreichende Konfluenz von ca. 70 – 80 % bei der Durchführung der Versuche geachtet, sodass einerseits die Zellen Kontakt zu ihren Nachbarzellen aufnehmen konnten und im Zellverband lebten, andererseits auch die Versuche untereinander möglichst vergleichbar waren. Damit die Konfluenz nach sehr langen Inkubationszeiten von bis zu 72 h nicht zu hoch war, wurden zu Beginn des Experiments weniger Zellen ausgesät. Diese Zellen waren weniger konfluent bei Exposition mit der Substanz. Es stellte sich die Frage, ob bei Substanzexposition eine geringe Konfluenz Zellen leichter in die Apoptose treiben könnte oder anders formuliert eine hohe Konfluenz vor Apoptose schützen könnte. Dazu wurde ein Experiment durchgeführt. In einem MTT-Assay mit H4IIE einer Passage und unterschiedlichen Zellzahlen pro Well (5.000-50.000/Well) zeigte sich, dass die Konfluenz keinen gravierenden Einfluss auf die Toxizität der untersuchten Substanzen hat. Die Toxizitätskurven für die verschiedenen Zellzahlen wiesen ähnliche Verläufe auf (Abb. 52 und Abb. 53). Auch die IC_{50} -Werte von CW60 und CW109 nach 24 h Inkubation stimmten mit denen aus späteren Versuchen überein. Daher kann die unterschiedliche Konfluenz bei den verschiedenen angewandten Methoden als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

5.2 Apoptosenachweise und Nekrosenachweise

Aufgrund des toxischen Potenzials einiger der Gold(I)-Komplexe wurden weitere Versuche zum Apoptose- und Nekrosenachweis mit einzelnen von ihnen durchgeführt. Zuerst wurden fluoreszenzmikroskopisch, dann auf molekularer Ebene Apoptosenachweise erbracht.

Beim Life-Dead-Assay war nach Behandlung der Zellen mit der vielversprechenden Substanz CW171a, die bereits im nanomolaren Bereich toxisch war, am Fluoreszenzmikroskop außer

mitotischen und nekrotischen Veränderungen keine für Apoptosen typische Veränderungen der Zellmorphologie erkennbar.

Bei der Auszählung apoptotischer und nekrotischer Zellen am Fluoreszenzmikroskop beim Life-Dead-Assay sind bei einigen Konzentrationen viele Nekrosen aufgefallen. Es könnte sich hierbei um sekundäre Nekrosen gehandelt haben, die erst dadurch entstanden sind, dass apoptotische Zellen nicht durch Phagozyten abgeräumt worden sind, wie das im lebenden Organismus der Fall gewesen wäre. Auch hier stößt das Zellkulturmodell an seine Grenzen, einen intakten Organismus zu simulieren.

Daher wurden noch weitere Untersuchungen zum Nachweis apoptotischer Vorgänge angeschlossen. **DNA-Leitern** sollten apoptotische Vorgänge sichtbar machen.

Nach der Isolierung der DNA aus lysierten Zellen wurde diese per Elektrophorese aufgetrennt. Waren durch Caspasen DNA-Fragmente einer Länge von 180 Bp und Vielfache davon entstanden, zeigte sich das typische Bild einer DNA-Leiter, die ein Zeichen für die Aktivität der Caspasen war und somit zum Apoptosenachweis verwendet werden konnte. DNA-Leitern waren sichtbar nach Inkubationen mit CW60 5µM für 24 h und CW104 10µM sowie CW109 5µM für jeweils 48 h. Für CW171a waren auch in diesem Experiment keine Apoptosen nachweisbar.

Anschließend sollte der Apoptosenachweis auf Enzymebene erfolgen.

Mittels **ApoONE-Assay** wurde für die Diphosphangold(I)-Komplexe CW60 und CW90 und für die N-heterozyklischen Carbene CW104 und CW109 ein Anstieg der Caspaseaktivität gezeigt.

Es war unerwartet, dass der ApoONE-Assay für den Diphosphangold(I)-Komplexe CW60 einen Anstieg der Caspaseaktivität erst nach 48 h zeigte. Bei der Interpretation der Ergebnisse der genannten Experimente ist auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zu achten. Im Life-Dead-Assay wurden jeweils 150.000 Zellen in 35 mm-Schälchen ausgestreut, die 48 h lang anwachsen gelassen wurden. Bei der Inkubation der H4IIE zur Vorbereitung der DNA-Leiter wurden ebenfalls 6-Well-Platten vergleichbaren Durchmessers verwendet. Die Anwachsdauer betrug auch hier 48 h. Diese Experimente sind daher miteinander vergleichbar. Beide zeigten eine Apoptoseinduktion bereits nach 24 h. Der ApoONE-Assay wurde dagegen auf 96-Well-Platten durchgeführt. Die Anwachsdauer betrug nur 24 h, bevor die Zellen mit den Substanzen für weitere 24 h bzw. 48 h geschädigt wurden. Hier wurden apoptotische Vorgänge erst nach 48 h Inkubation detektierbar. Die unterschiedliche Anwachszeit der H4IIE könnte eine Erklärung für die voneinander abweichenden Versuchsergebnisse sein. Beim Life-Dead-Assay und der DNA-Leiter befanden sich die Zellen insgesamt 72 h in ihrem

Well, wenn man die Anwachszeit von 48 h und anschließende Inkubationszeit von 24 h addiert. Beim ApoONE-Assay betrug nach jeweils 24 h Anwachsdauer und Inkubationsdauer die Gesamtzeit nur 48 h als die Messung erfolgte. Nach weiteren 24 h Inkubationsdauer (Gesamtzeit 72 h bis zur Messung) zeigte sich schließlich ein Anstieg der Caspaseaktivität als Hinweis auf apoptotische Vorgänge in den Zellen. Möglicherweise hätten die Ergebnisse anders ausgesehen, wenn die Zellen für den ApoONE-Assay auch 48 h anwachsen gelassen und anschließend 24 h mit den Substanzen inkubiert worden wären. Das institutsinterne Versuchsprotokoll sah eine Anwachszeit von 24 h vor, an der im Rahmen dieser Arbeit zunächst einmal festgehalten worden war.

Bei der Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Experimente zum Apoptosenachweis ist ferner zu berücksichtigen, dass beim Life-Dead-Assay ein Auszählen der Zellen am Mikroskop erfolgt, wodurch die Auswertung untersucherabhängig ist. Zuverlässiger erscheint der ApoONE-Assay, bei dem über Messung von Fluoreszenzintensitätsänderungen Enzymaktivierungen nachgewiesen werden, die in der frühen Phase der Apoptose geschehen. Darüberhinaus ist nicht auszuschließen, dass andere Caspasen als Caspasen 3/7 durch die Substanzen aktiviert werden. Der ApoONE-Assay weist nur die Aktivität der Caspasen 3/7 nach. Allerdings handelt es sich hierbei um die relevanten Effektorcaspasen.

Der **LDH-Assay** sollte das Gesamtbild abrunden.

Von allen untersuchten Substanzen war außer bei CW171a/b nur noch bei CW60 ein signifikanter Anstieg an Nekrosen im LDH-Assay nach 48 h erkennbar.

Dieser Anstieg an Nekrosen bei CW60 ließe sich durch sekundäre Nekrosen erklären, die aus primär apoptischen Zellen hervorgegangen sind. Primäre Nekrosen würden vermutlich schon bei geringeren Konzentrationen auftreten, wie es bei CW171a bereits nach 6 h der Fall war. Sollten Nekrosen bei CW60 auf die Hydrolyse von CW60 zu CW171a/b zurückzuführen sein, dann bliebe die Frage offen, warum erst bei 10 μ M und nicht bereits bei geringeren Konzentrationen Nekrosen nachweisbar sind. CW60 wird schließlich auch bei geringen Konzentrationen zu CW171a/b hydrolysiert. Möglicherweise leistet aber auch die lange Inkubationsdauer von 48 h einen entscheidenden Beitrag zu dem Ergebnis.

Festzuhalten ist, dass es sich bei CW60 offensichtlich um eine Substanz handelt, die primär apoptotisch zu sein scheint, wie bereits mittels DNA-Leiter, Life-Dead-Assay und ApoONE-Assay nachgewiesen wurde, wohingegen sein Produkt CW171a primär nekrotisch wirkt.

5.3 Zusammenhang von CW60 und CW171a/b beim Zelltod

Im Folgenden wird der Zusammenhang von CW60 und seinen Abbauprodukten CW171a/b sowie ihre Rolle beim Zelltod betrachtet.

CW60 zerfällt im wässrigen Milieu in die beiden stark toxischen und Nekrose auslösenden Carbene CW171a/b. (C. Wetzel, persönliche Mitteilung). Eigentlich müsste CW60 ein ähnlich großes zytotoxisches Potenzial aufweisen wie seine beiden Produkte.

C. Wetzel hat in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 untersucht, ob die bei der hydrolytischen Zersetzung von CW60 entstehenden N-heterozyklischen Carbene für die Toxizität des Diphosphangold(I)-Komplexes verantwortlich sein könnten. Sie hält CW60 für ein „Prodrug“, welches erst in der Zelle zu CW171a/b reagiert (persönliche Mitteilung). In ihren Versuchen zeigten CW60 und seine Zerfallsprodukte CW171a/b in der Cis-Platin sensiblen Ovarialkarzinomzelllinie A2780 sens. eine vergleichbare Toxizität mit IC_{50} -Werten von 2,5 μM . Daraus schließt C. Wetzel, dass CW171a/b entscheidend zur Zytotoxizität von CW60 beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass CW171a/b im MTT-Assay nach 24 h Inkubation schon in sehr geringen Konzentrationen in H4IIE toxisch waren, bei denen CW60 noch keine Wirkung zeigte. Der IC_{50} -Wert von CW60 lag bei ca. 5 μM nach 24 h, der von CW171a bei ca. 1 μM . Außerdem löste CW60 primär Apoptosen, CW171a dagegen primär Nekrosen aus, wie in mehreren unabhängigen Experimenten nachgewiesen. Daher scheint es zunächst unwahrscheinlich, dass die Wirkung von CW60 allein auf den Zerfall in CW171a/b zurückzuführen ist.

Es ist bislang noch nicht gesichert, ob CW171a/b Nekrosen von extrazellulär oder von intrazellulär induziert. Wahrscheinlich ist es jedoch, dass die in DMSO gelöste Substanzen CW171a/b schnell in die Zelle aufgenommen werden und folgend nekrotische Vorgänge von intrazellulär auslösen.

Wie im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, löst CW60 Apoptosen aus, wenn es allein auf isolierte Zellen gegeben wird. Offenbar wird die Substanz in die Zelle aufgenommen und entfaltet seine Wirkung intrazellulär. Andersherum könnte CW60 auch über Todesrezeptoren die Apoptose in Gang setzen. Letzteres ist jedoch wenig wahrscheinlich.

Sollten CW171a/b tatsächlich ihre nekrotische Wirkung intrazellulär entfalten können, so stellt sich die Frage, warum CW60 primär apoptotisch wirkt, obwohl es in wässriger Lösung, also sowohl extra- als auch intrazellulär, zu CW171a/b zerfällt.

Es ist anzunehmen, dass der extrazelluläre Zerfallsprozess von CW60 zu CW171a/b im wässrigen Milieu langsamer erfolgt, als die Aufnahme von CW60 in die Zelle. Extrazellulär

sind die Konzentrationen von CW171a/b dann so gering, dass nur wenige Moleküle in die Zelle aufgenommen werden und intrazellulär nekrotisch wirken könnten.

Des Weiteren könnte man vermuten, dass CW60 intrazellulär nur langsam zu CW171a/b zersetzt wird, da CW60 möglicherweise mit intrazellulären SH-Gruppen-haltigen Proteinen wechselwirkt, die seinen hydrolytischen Abbau verhindern. Über Interaktionen von CW60 mit intrazellulären Proteinen könnte es wiederum auch zur Einleitung der Apoptose kommen. Die Apoptose wird dann offensichtlich schneller eingeleitet, als CW60 zu CW171a/b abgebaut wird. Das würde auch erklären, warum CW60 in mehreren unabhängigen Versuchen nach 24 h eine Induktion der Apoptose in H4IIE zeigt und erst nach 48 h bei 10 μ M nekrotische Vorgänge im LDH-Assay nachweisbar sind. Diese Nekrosen könnten durch eine verminderte Wechselwirkung der Substanz mit intrazellulären Proteinen nach 48 h zustande kommen, wodurch dann der Abbau von CW60 zu CW171a/b beschleunigt wird. Nach längeren Inkubationszeiten (48 h) wird also intrazellulär genügend CW171a/b gebildet, welche nekrotischen Vorgänge auslösen.

Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurden nur CW60 und CW171a isoliert auf die Zellen gegeben. Es müsste noch bestätigt werden, ob die Substanzen auch tatsächlich die Zellmembran durchdringen können, und untersucht werden, ob CW171a/b nicht doch extrazellulär Nekrosen auslösen. (Abb. 74).

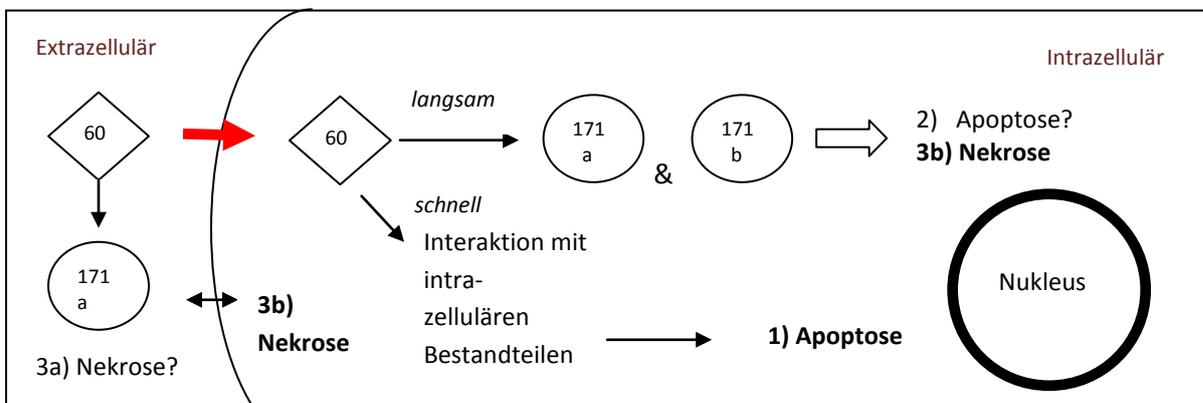


Abb. 74: Wirkungsweisen von CW60 und CW171a/b. Folgende Möglichkeiten kommen theoretisch infrage: 1) CW60 zerfällt intrazellulär nur langsam zu CW171a/b und wirkt primär apoptotisch über Interaktion mit SH-Gruppen, (wahrscheinlich), 2) CW60 zerfällt intrazellulär zu CW171a/b, welche intrazellulär apoptotisch wirken (kaum wahrscheinlich), 3a) CW171a wirkt extrazellulär an der Zellmembran nekrotisch (eher unwahrscheinlich) oder 3b) löst von intrazellulär die Nekrose aus (wahrscheinlich)

Für den eher unwahrscheinlichen Fall, dass die hochpotente Substanz CW171a extrazellulär nekrotisch wirkt und intrazellulär möglicherweise eine apoptotische Wirkung hat, könnte man

sich in der Krebstherapie Nanopartikel zur Hilfe nehmen, sogenannte „Nanofähren“, die Gegenstand neuster Forschung sind, um die Substanz in die Zelle einzuschleusen. Sie können Chemotherapeutika durch die Zellmembran schleusen, indem sie von der Zelle endozytiert werden und so Zytostatika in großen Konzentrationen an den Wirkungsort bringen (Langer, 2006). Außerdem können „Nanofähren“ 40-fach höhere Dosen an Chemotherapeutika zu Tumorzellen transportieren als Kontrollen (Von Maltzahn, 2011).

Aber auch für die anderen Gold(I)-Komplexe könnten „Nanofähren“ interessant sein, da der Gesamtorganismus weniger beeinträchtigt wird, wenn hohe Konzentrationen zytotoxischer Chemikalien direkt an den Wirkungsort - den Tumor - transportiert werden.

5.4 Aufnahme der Gold(I)-Komplexe in die Zelle

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die Gold(I)-Komplexe in die Zelle aufgenommen werden. Auranofin könnte laut Literatur über Wechselwirkungen mit Zellmembran assoziierten Thiolgruppen aufgenommen werden. Im Zytosol kann es ebenso mit Thiolgruppen interagieren.

Fraglich ist, ob die Thiolgruppen enthaltenden Gold(I)-Komplexe CW60 und CW171a/b auch über diesen Mechanismus in die Zelle geschleust werden. Ob CW35, CW143 in die Zellen aufgenommen werden, ist nicht sicher, da sie bereits im MTT-Assay keine toxische Wirkung auf die Zellen zeigten. Ob CW171a/b in die Zelle aufgenommen werden, ist ebenfalls nicht eindeutig belegt, da nekrotische Vorgänge auch von der Zellmembran aus in Gang gesetzt werden können. CW171a/b tragen jedoch Thiazolringe, die eine Aufnahme in die Zelle über Wechselwirkungen mit Thiolgruppen an der Zellmembran wahrscheinlich ermöglichen könnten.

CW60 und die Carbene CW104, CW109 wirken apoptotisch, wodurch eine zelluläre Aufnahme durch H4IIE sehr wahrscheinlich ist. Über die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Wirkung entscheiden u.a. das Verhältnis von Lipophilie und Hydrophilie einer Substanz. CW143 ist hydrophiler, CW55 und CW35 dagegen sind lipophiler als CW60 und CW90, welche von den Diphosphangold(I)-Komplexen die stärkste Toxizität zeigten.

Es scheint auch die Balance zwischen Hydrophilie und Lipophilie verantwortlich dafür zu sein, dass CW60 von allen Diphosphangold(I)-Komplexen das größte zytotoxische Potenzial aufweist (Wetzel, 2011).

5.5 Genotoxizität und oxidativer Stress

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, worüber die Gold(I)-Komplexe die Apoptose einleiten könnten, eine davon wäre z.B. die Induktion von oxidativem Stress oder von DNA-Strangbrüchen. Verschiedenste Zytostatika sind in der Lage, in DNA zu interkalieren und DNA-Strangbrüche zu induzieren. Cisplatin kann als Aquakomplex an DNA binden und DNA-Interstrang- sowie DNA-Intrastrang- oder sogar DNA-Protein-Vernetzungen induzieren. Doxorubicin interkaliert in die DNA, führt auch infolge Topoisomerase-II-Hemmung zu DNA-Strangbrüchen und induziert oxidativen Stress, der wiederum DNA-Strangbrüche bewirken kann. Der Zellzyklus wird durch Doxorubicin in der G2/M-Phase angehalten (Ling, et al., 1996; Lüpertz, 2008). Im Durchflusszytometer ist dies deutlich sichtbar an einer Verschiebung der Zellen von der G0/G1-Phase zur G2/M-Phase.

Um auch die Wirkung der Gold(I)-Komplexe im Hinblick auf ihre Genotoxizität zu überprüfen, wurde der alkalische Comet-Assay durchgeführt, mit dem sich sowohl Einzelstrang-, als auch Doppelstrangbrüche nachweisen lassen.

Nach bis zu 8 h Inkubation der Zellen mit CW60, CW90, CW104 und CW171a zeigten sich keine Kometen als Zeichen für eine DNA-Schädigung.

Es wurde auch parallel der DCF-Assay durchgeführt, um intrazellulären oxidativen Stress nachzuweisen. Für die Substanzen ergab sich nach 1 h Inkubation kein Anstieg von ROS. Daraus kann zunächst geschlossen werden, dass die untersuchten Substanzen primär nicht genotoxisch wirken. Bestätigen könnte man das Ergebnis des Comet-Assays mit einem γ H₂AX-Assay, einer exakteren Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen. Der Comet-Assay lässt experimentatorabhängige Unterschiede in der Länge der einzelnen Kometen zu. Geringe DNA-Schäden fallen aus dem Fokus der Betrachtung heraus, da sie bei der Auswertung am Mikroskop nicht berücksichtigt werden. Der γ H₂AX-Assay ist auch geeignet, um DNA-Doppelstrangbrüche nachzuweisen. In eukaryotischen Zellen kommt es innerhalb kurzer Zeit nach Induktion von DNA-Strangbrüchen zur Phosphorylierung von H₂AX-Histonen an einem Serinrest. Diese werden danach als γ H₂AX-Histone bezeichnet (Rogakou et al., 1999). Sie könnten über die Bindung von DNA-reparierenden Proteinen an der DNA-Reparatur beteiligt sein (Rogakou et al, 1998; Redon et al., 2011). Mittels Antikörpern gegen γ H₂AX können also DNA-Schäden sichtbar gemacht werden. Genotoxizitäts-Assays auf der Grundlage der Visualisierung von γ H₂AX *in vitro* sind u.a. auch von Audebert et al. verwendet worden, um z.B. den DNA-schädigenden Einfluss von

polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Benzapyrenen in humanen Zelllinien zu ermitteln (Audebert et al., 2010).

5.6 Zellzyklusanalyse

Nachdem in H4IIE-Zellen weder DNA-Strangbrüche noch oxidativer Stress nachgewiesen werden konnten, wurde ihr Zellzyklus nach 24 h Inkubation mit den Substanzen untersucht. Dazu wurden H4IIE in 6-Wellen für 48 h anwachsen gelassen, analog dem Life-Dead-Assay und DNA-Leiter-Versuch. Daher sind hier Vergleiche untereinander direkt möglich.

CW171a hatte keinerlei Einfluss auf den Zellzyklus nach 24 h Inkubation mit 1 μM , wie es für eine primär nekrotische Substanz zu vermuten war.

Für CW60 10 μM waren nach 24 h signifikant weniger Zellen in der G0/G1-Phase als bei der Kontrolle, aber nicht signifikant mehr Zellen in der G2/M-Phase.

Nach Inkubation mit CW104 und CW109 jeweils 10 μM nahm die Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase signifikant ab, während die Zahl der Zellen in der G2/M-Phase signifikant zunahm im Vergleich zur Kontrolle. Es handelt sich um eine Verschiebung der Zellen von der G0/G1- in die G2/M-Phase. Es scheint, als könnten CW104 und CW109 einen Arrest des Zellzyklus in der G2/M-Phase bewirken. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den Wachstumsstopp der Zellen. Es ist allerdings noch nicht geklärt, wodurch der Zellzyklusarrest zustande kommt, da weder oxidativer Stress noch DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden konnten.

5.7 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch Gold(I)-Komplexe

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für eine Apoptoseinduktion in der Zelle, sollte die Wirkung der Gold(I)-Komplexe auf unterschiedliche intrazelluläre Signalwege betrachtet werden. Es wurden die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und ERK und die Phosphorylierung der Akt im PI3K/Akt-Signalweg untersucht, da ein Eingriff in diese Signalwege zur Apoptose führen könnte.

Da Kim et al. bereits eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs über eine MAP-Kinaseaktivierung durch Auranofin nachweisen konnten (Kim et al., 2010), kam eine veränderte Phosphorylierung von Nrf2 nach Inkubation mit Gold(I)-Komplexen in Betracht.

5.7.1 PI3K/Akt-Signalweg

Für CW60 10 μM konnte man eine leicht verminderte Phosphorylierung der Akt nach 24 h annehmen in drei unabhängigen Versuchen (n=3). Bei dieser Konzentration wurden nach 24 h

bereits Apoptosen im Life-Dead-Assay nachgewiesen und auch eine DNA-Leiter war sogar bei geringerer Konzentration nach 24 h sichtbar. Die verminderte Phosphorylierung könnte also ein Grund für die Apoptoseinduktion in H4IIE sein. Sicherlich kommen aber noch weitere mögliche Ursachen für die Auslösung der Apoptose in Betracht, da die Abnahme der Phosphorylierung nur schwach zu erkennen war.

Auch der Einfluss der Carbene auf den PI3K/Akt-Signalweg wurde untersucht.

Für CW104 war im pAkt-Blot eine Abschwächung des Signales bei 10 μ M nach 4 h zu sehen (für $n = 2$). Man kann daraus jedoch nicht sicher auf eine Hemmung der Akt-Phosphorylierung schließen. Eine eindeutige Klärung würden weitere Versuche bringen.

Für CW109 ließ sich bei 10 μ M nach 24 h eine Abschwächung des Signals in zwei unabhängigen Versuchen feststellen. In einem dritten Versuch war die Bande von CW109 bei 10 μ M nach 24 h Inkubation genauso stark wie bei der Kontrolle. Auch hier wären weitere Untersuchungen notwendig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

5.7.2 Nrf2/ARE-Signalweg

Der Nrf2/ARE-Signalweg wird durch antioxidative Substanzen aktiviert, sodass durch verstärkte Expression oder verminderten Abbau mehr Nrf2 in der Zelle angehäuft wird. Wie bereits beschrieben, kann es auch durch Auranofin zu einer Aktivierung des Signalweges kommen. Ob eine verstärkte Expression von Nrf2 durch CW60 nach Inkubationsdauern von 1 h, 4 h und 24 h mit einer Konzentration von jeweils 10 μ M hervorgerufen wird, ist noch nicht eindeutig belegt. Einer von drei Blots lässt lediglich vermuten, dass CW60 in den Signalweg eingreifen könnte.

Andersherum kann eine verminderte Bandenstärke im Blot durch einen verstärkten Abbau oder eine verminderte Expression von Nrf2 zustande kommen. Für CW109 sah man in zwei unabhängigen Versuchen nach 4 h eine Abschwächung des Signals für Nrf2 in der Zelle. Da nach 24 h das Signal allerdings wieder genauso stark wie bei der Kontrolle war, könnte es sich höchstens um einen kurzzeitigen Effekt handeln. Das Carben CW109 verhält sich entgegengesetzt zu Auranofin, welches den Signalweg aktiviert. Weitere Untersuchungen wären an dieser Stelle sinnvoll.

5.7.3 MAPK-Signalwege

CW60 hat keinen Einfluss auf den Signalweg der ERK, wie in zwei unabhängigen Versuchen nachgewiesen werden konnte. Ob CW60 in den JNK-Signalweg eingreift, bleibt noch unklar.

5.8 Zytostatika und ihre Wirkung auf Mitochondrien

Die Entwicklung von Zytostatika mit Mitochondrien als Angriffsziel ist eine Möglichkeit, zwei große Probleme der Krebstherapie zu umgehen: einerseits das Problem der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Medikamenten und andererseits die fehlende Selektivität der Zytostatika, welche nicht zwischen Krebszellen und gesunden Zellen differenzieren können. Krebszellen unterscheiden sich von normalen Zellen durch veränderte Mitochondrien und ein erhöhtes mitochondriales Membranpotenzial, wodurch die Apoptoseregulation gestört sein kann. Diese Veränderungen kann man sich zu Nutze machen bei der Entwicklung von neuen Zytostatika, die selektiv an veränderten Mitochondrien wirken. Dadurch ließen sich auch die Nebenwirkungen der heutigen unselektiven Zytostatika reduzieren (Übersichtsartikel: Barnard und Berners-Price, 2007).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind die Mitochondrien an der Regulation der Apoptose beteiligt. Von den beiden möglichen Signalwegen der Apoptose wird der intrinsische Signalweg in Säugerzellen für besonders wichtig erachtet. Hierbei kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP = mitochondrial outer membrane permeabilization) und anschließenden Freisetzung von Cytochrom c. Die Caspase-Aktivierung wird dabei über die Bildung des Apaf-1-Apoptosoms eingeleitet (Barnard und Berners-Price, 2007). Für den anschließenden Zelltod ist aber nicht nur eine Aktivierung der Caspasekaskade verantwortlich. Eine Zelle mit funktionslosen Mitochondrien kann ihren Energiebedarf nicht mehr decken und muss zugrunde gehen, auch unabhängig von einer Caspaseaktivierung.

In der Literatur sind mehrere Möglichkeiten für die Steigerung der Mitochondrienpermeabilität beschrieben. Einerseits kann durch Proteine der Bcl-2-Familie die äußere Mitochondrienmembran durchlässig gemacht werden, andererseits kann über die Öffnung einer Permeabilitäts-Transitions-Pore (PT) in der inneren Mitochondrienmembran die Durchlässigkeit der Membran gesteigert werden (Barnard und Berners-Price, 2007). Durch die geöffnete PT können Wasser und kleine Moleküle von bis zu 1,5 kDa in die Mitochondrienmatrix gelangen und eine Schwellung verursachen, wodurch schließlich auch die äußere Mitochondrienmembran durchlässig wird. Es sind diverse Proteine im Gespräch, die an der Bildung der PT beteiligt sein sollen. Der Adenin-Nukleotid-Translokator ANT in der inneren Mitochondrienmembran und der spannungsabhängige Anionenkanal VDAC in der äußeren Mitochondrienmembran sollen Bestandteile sein, sowie Cyclophyllin D, Kreatinkinase, Bcl-2-Proteine oder der periphere Benzodiazepin-Rezeptor PBR (Halestrap et al., 2002; Barnard und Berners-Price, 2007).

Einige gegenüber Zytostatika resistente Tumorzellen zeichnen sich dadurch aus, dass proapoptotische Proteine mutiert und in ihrer Funktion verändert oder antiapoptotische Proteine z.B. aus der Bcl-2 Familie überexprimiert sind. DNA-schädigende Agenzien, welche die Apoptose über eine Aktivierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine auslösen, sind nicht mehr wirksam bei resistenten Tumorzellen, die sich durch veränderte proapoptotische Bcl-2-Proteine auszeichnen. Sind antiapoptotische Bestandteile der PT wie z.B. Cyclophyllin D oder PBR überexprimiert, so kann die Apoptose auch nicht mehr über eine Erhöhung der Mitochondrienpermeabilität eingeleitet werden (Machida et al., 2006; Galluzzi et al., 2006).

Daher besteht großes Interesse an Chemotherapeutika, die direkt die Permeabilität der Mitochondrien erhöhen können, ohne auf die Aktivierung weitere Proteine angewiesen zu sein (Barnard und Berners-Price, 2007).

Die Funktion der Mitochondrien ist vielfältig. Sie sind nicht nur an der Apoptoseinduktion über die Steigerung der Mitochondrienmembranpermeabilität und Cytochrom-c-Freisetzung beteiligt. Sie sind auch wichtige ATP- und NADPH-Produzenten. Der Zitratzyklus und die β -Oxidation laufen in Mitochondrien ab. Weitere Mechanismen sind die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (McKeage, 2002). Die ROS-Entstehung wird moduliert durch antioxidative Enzyme wie Glutathionreduktase, Glutathion-Peroxidase, Thioredoxinreduktase (TrxR) und Thioredoxinperoxidase.

5.9 Thioredoxinreduktase als mögliches Target für Gold(I)-Komplexe

Das Thioredoxin-System umfasst Thioredoxin, NADPH und die TrxR, wobei letztere Thioredoxin - NADPH-abhängig und unter $FADH_2$ -Verbrauch - reduziert (Holmgren und Lu, 2010). Man unterscheidet drei Isoformen der TrxR. TrxR1 ist im Zytosol und im Nukleus, TrxR2 in den Mitochondrien lokalisiert. Eine weitere Form - die TrxR3, auch Thioredoxin-Glutathion-Reduktase (TRG) genannt - kann zusätzlich auch Glutathiondisulfide reduzieren und ist im Testis exprimiert. Es handelt sich bei den TrxR um Selen-haltige Redoxenzyme mit vielfältigen Aufgaben. Beispielweise regeneriert TrxR1 über die Reduktion von Thioredoxin die Ribonukleotidreduktase (RNR), welche im Rahmen der DNA-Synthese Nukleotide zu Desoxynukleotiden umwandelt (Holmgren und Lu, 2010; Arnér und Holmgren, 2006). Thioredoxin ist ein Elektronendonator für diverse Enzyme (Barnard und Berners-Price, 2007). Es stellt u.a. Elektronen bereit für die Proteinreparatur durch die Methionin-Sulfoxidreduktase (MSR) und ist über die Thioredoxin-Peroxidase (Prx) an der antioxidativen Abwehr beteiligt. Thioredoxin kann auch in den Vorgang der Apoptose eingreifen, indem es an die

Apoptosesignal-regulierende Kinase 1 (ASK1) bindet, diese inaktiviert und die Apoptoseinduktion dadurch hemmt. Außerdem kann es die Caspaseaktivität durch Protein-S-Nitrosylierung oder Denitrosylierung beeinflussen. Die Expression von Proteinen des Thioredoxinsystems ist in vielen Krankheiten verändert, wie z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis, Diabetes mellitus, kardiovaskulären oder neurodegenerativen Erkrankungen (Holmgren und Lu, 2010).

Es ist auch belegt, dass Thioredoxin in den meisten malignen Zellen verstärkt exprimiert wird, wobei seine antioxidativen Eigenschaften in den Hintergrund treten. Tumorzellen mit erhöhter Expression von Thioredoxin-1 - bevorzugt im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert - zeichnen sich durch verstärkte Proliferation, aggressives Wachstum und eine gestörte Apoptose aus. Auch ein vermindertes Überleben der Patienten ist damit assoziiert (Raffel et al., 2003; Burke-Gaffney et al., 2005). Zusätzlich können große Konzentrationen von TrxR die Resistenz von Tumorzellen fördern (Burke-Gaffney et al., 2005). Daher ist die TrxR als mögliches Angriffsziel neuer Zytostatika von Interesse.

Die selenhaltige TrxR reagiert besonders mit Metallkomplexen z.B. aus Platin und Gold. Der Gold(I)-Komplex Auranofin soll bereits in geringen Konzentrationen die TrxR hemmen, wobei Au(I) an redoxaktive C-terminale Selenocystein-Reste des Enzyms bindet (Barnard und Berners-Price, 2007) (Abb. 75). Auch das nahe verwandte Enzym Glutathionreduktase (GR) kann durch Goldkomplexe inhibiert werden. Gold besitzt jedoch eine größere Affinität gegenüber Selen in Selenocystein als gegenüber Schwefel in Cystein. Daher ist auch die Inhibition der TrxR stärker als die der GR, weil die TrxR nicht nur eine Cystein-Cystein-Brücke am N-terminalen Ende, sondern auch eine Cystein-Selenocystein-Brücke am C-terminalen Ende trägt (Rubbiani et al., 2010).

Nach Schädigung der mitochondrialen TrxR2 durch Auranofin beobachteten Rigobello et al., 2002 und 2004 eine Mitochondrienpermeabilitätsänderung mit Mitochondrienschwellung und einen Verlust des Mitochondrienmembranpotenzials. Diese Veränderungen traten bei Konzentrationen auf, bei denen auch die TrxR gehemmt wurde (Rigobello et al., 2002; Rigobello et al., 2004; Barnard und Berners-Price, 2007).

Auranofin wird verantwortlich gemacht für eine Akkumulation von H_2O_2 in Mitochondrien (Rigobello et al., 2005). Im Regelfall oxidiert das an der Atmungskette entstandene H_2O_2 unter Katalyse von Prx Thioredoxin, welches durch die TrxR wieder reduziert wird. Bei einer Hemmung der TrxR durch Auranofin akkumuliert Thioredoxin in seiner oxidierten Form in den Mitochondrien. Dort öffnet es die PT-Pore oder steigert die Permeabilität der äußeren

Mitochondrienmembran, sodass es zur Freisetzung von Cytochrom c mit konsekutiver Einleitung der Apoptose kommt (Abb. 75).

Da die Konzentration an reduziertem Thioredoxin durch Hemmung der TrxR immer weiter abnimmt, akkumuliert auch H_2O_2 in den Mitochondrien und entfaltet zusätzlich seine Wirkung als Generator von ROS, wodurch oxidativer Stress entstehen kann (Barnard und Berners-Price, 2007).

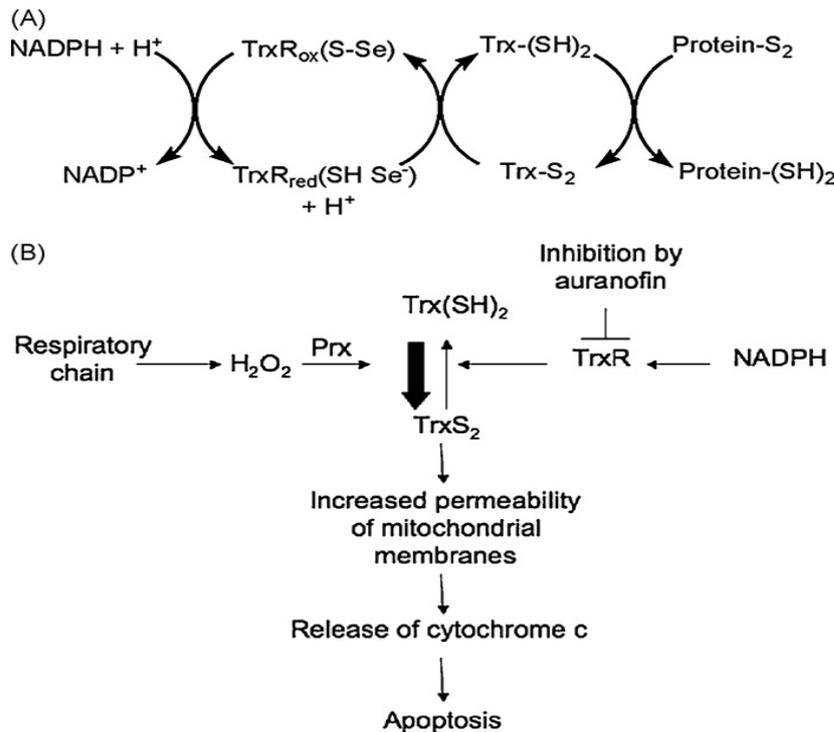


Abb. 75:

- (A) Funktion der TrxR und von Thioredoxin in Mitochondrien
- (B) Veränderungen des Thioredoxinsystems durch Auranofin (aus Barnard und Berners-Price, 2007)

Wie bereits beschrieben, haben neben Auranofin und anderen linearen Phosphinkomplexen auch tetraedrische Diphosphan-Gold(I)-Komplexe antikanzerogenes Potenzial.

$[Au(dppe)_2]^+$ und verwandte tetraedrische Au(I)- Phosphine-Komplexe sind stabiler in Anwesenheit von Thiolgruppen als Auranofin. Ihre Toxizität soll maßgeblich durch ihre lipophilen, kationischen Eigenschaften begründet sein, wodurch sie in der negativ geladenen mitochondrialen Matrix akkumulieren können (Barnard und Berners-Price, 2007). In Tumorzellen könnte die Akkumulation der kationischen Substanzen verstärkt sein, da diese sich durch ein erhöhtes mitochondriales Membranpotenzial auszeichnen im Vergleich zu gesunden Zellen (Wetzel, 2011). Barnard und Berners-Price konnten nachweisen, dass $[Au(dppe)_2]^+$ dosisabhängig die Permeabilität der Mitochondrienmembran steigert. Die Balance zwischen Hydrophilie und Lipophilie soll entscheidend dazu beitragen, dass

spezifisch Mitochondrien von Tumorzellen angegriffen werden, wobei gesundes Gewebe geschont werden sollte (Barnard und Berners-Price, 2007).

Es ist denkbar, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten tetraedrischen Gold(I)-Komplexe mit Diphosphanliganden ebenfalls aufgrund ihrer Lipophilie gut in Mitochondrien akkumulieren können und aufgrund der hohen Affinität von Gold zu Thiolen auch an SH- und SeH-Gruppen von Enzymen wie z.B. der TrxR und GR binden können (Wetzel, 2011). C. Wetzel konnte bereits in Experimenten eine Hemmung der TrxR durch die beiden Bis(imidazolylphosphan)-Gold(I)-Komplexe CW90 und CW60 nachweisen. Sie sollen die TrxR sogar 3-fach selektiver inhibieren als die GR. Verwendet wurde dazu ein Thioredoxin-Glutathion-Reduktase-Assay, der auf der Reaktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) unter Zugabe von TrxR und NADPH/H⁺ zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (5-TNB) basiert (Wetzel, 2011). C. Wetzel nimmt an, dass CW90 und CW60 nach Passieren von Lipiddoppelschichten als lipophile Kationen im Zytoplasma und in Mitochondrien akkumulieren und dann mit Enzymen wie der TrxR und GR über Ligandenaustauschreaktionen wechselwirken können (Rackham et al., 2007; Wetzel, 2011). C. Wetzel stellt fest, dass die Gold(I)-Diphosphanliganden durch Aufklappen eines Liganden an die Thiolat-Gruppen der Enzyme binden. Sie wirft die Frage auf, ob vielleicht sogar die Bis(carben)-Gold(I)-Komplexe CW171a/b, CW109 und CW104, welche aus den Diphosphan-Gold(I)-Komplexen CW60, CW55 und CW143 durch Hydrolyse entstehen, die reaktiven Spezies sein könnten, welche für die Enzyminhibition der TrxR verantwortlich sind. Dazu müssten die Diphosphane, nachdem sie in die Zelle aufgenommen worden sind, intrazellulär zu ihren Carbenen zerfallen, welche daraufhin die Apoptose auslösen könnten. Scheinbar im Widerspruch zu dieser Annahme steht, dass die Diphosphan-Gold(I)-Komplexe CW143 und CW55 im Vergleich zu ihren Carbenen CW104 und CW109 in H4IIE ein deutlich geringeres zytotoxisches Potenzial besitzen. CW104 und CW109 wirken bereits nach 24 h apoptotisch, während die Ursprungssubstanz CW143 in H4IIE nach 72 h bis zu 50 µM keine Toxizität zeigt und CW55 in H4IIE erst nach 48 h toxisch wirkt. Eine schlüssige Erklärung dafür könnte eine sehr langsame Aufnahme der Diphosphane in die Zelle oder eine verzögerte intrazelluläre Zersetzung zu ihren Carbenen sein.

Desweiteren widerspricht der Theorie von den Carbenen als eigentliche reaktive Spezies, dass die hochtoxischen Carbene CW171a/b primär nekrotisch wirken, während ihr Ursprungsgold(I)-Komplex CW60 die Apoptose in Gang zu setzen scheint. Demnach kann

möglicherweise eher davon ausgegangen werden, dass CW60 selbst direkt mit Enzymen wechselwirkt und dadurch die Apoptose einleitet.

Für N-heterozyklische Carben-Gold(I)-Komplexe (NHCs) des Typs $[(R_2Im)_2Au]^+$ fanden Baker et al. heraus, dass sie auch mitochondriale Schwellungen verursachen können. Dabei sind verschiedene Substanzen untersucht worden, die sich hinsichtlich ihrer Substituenten und ihrer Lipophilie unterschieden. Bei Konzentrationen von 1 μ M bis 10 μ M verursachten die Substanzen dosisabhängig Mitochondrienschwellungen, wobei die lipophilen Substanzen die größten Effekte zeigten. Die Schwellung wurde wahrscheinlich über MPT ausgelöst, da eine Aufhebung dieses Effekts durch Zugabe von Ciclosporin A erzielt werden konnte (Baker et al., 2006; Barnard und Berners-Price, 2007).

Da es durch die NHC-Komplexe zu Veränderungen an den Mitochondrien gekommen ist, wäre es auch denkbar, dass sie ebenso wie die Diphosphangold(I)-Komplexe über Ligandenaustauschreaktionen die TrxR hemmen. Untersuchungen hinsichtlich der Reaktivität der NHC-Komplexe gegenüber Cystein und Selenocystein ergaben, dass auch diese Komplexe eine höhere Affinität gegenüber Selenocystein aufwiesen, wie es bereits von anderen Gold(I)-Komplexen bekannt war.

Das Carben CW171a zeichnet sich durch ein optimales Verhältnis von Lipophilie und Hydrophilie aus sowie durch die Fähigkeit, schnell seine Liganden gegen Thiolgruppen auszutauschen, welche für eine Enzymhemmung essentiell ist. Beides könnte ein möglicher Grund für die hohe Toxizität der Substanz CW171 sein (Wetzel, 2011). C. Wetzel konnte experimentell nachweisen, dass CW171a nach kurzer Zeit seine Liganden gegen Cysteinmethylester austauschen kann. In den oben aufgeführten Zytotoxizitätstests waren bereits nach einer Inkubationszeit von 6 h morphologische Zellschädigungen erkennbar.

CW109 dagegen zeigte sich stabiler gegenüber Cysteinmethylestern nach Untersuchungen von C. Wetzel. Es trennt sich also nicht so schnell von seinen Liganden, wodurch seine geringe Toxizität oder seine erst nach frühestens 24 h eintretende Toxizität erklärt werden könnte.

Eine eindeutige Aussage über die eigentliche Ursache der Zytotoxizität auf H4IIE- und C6-Zellen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Eine zytotoxische Wirkung über DNA-Strangbrüche und radikale Sauerstoffspezies ist aufgrund oben genannter Ergebnisse eher auszuschließen. Sowohl Bis(imidazoly]phosphan)-Gold(I)-Komplexe, als auch NHC-Gold(I)-Komplexe könnten nach Literatur sehr wahrscheinlich an Mitochondrien wirken. Für beide Gruppen kommt eine Hemmung der TrxR über Wechselwirkungen mit

Thiolgruppen in Betracht, wie es teilweise auch schon für CW60 und CW90 von C. Wetzel nachgewiesen werden konnte. Sicherlich wären diesbezüglich weiterführende Untersuchungen sinnvoll.

5.10 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist geklärt worden, welche Art des Zelltodes durch die Gold(I)-Komplexe induziert wird. Es ist gezeigt worden, dass CW171a im untersuchten Zellsystem eher primär Nekrosen induziert, während CW60, CW90 und die Carbene CW109 und CW104 Apoptosen auslösen.

Es bleibt noch ungeklärt, über welche Mechanismen sowohl die Diphosphane CW60 und CW90 als auch die Carbene CW104, CW109 eine Apoptoseinduktion einleiten können und warum CW171a bereits in niedrigen Konzentrationen ausschließlich nekrotisch wirkt.

Weder oxidativer Stress noch DNA-Strangbrüche konnten nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse des Comet-Assays könnte der γ H₂AX-Assay angewendet werden. Die Zellzyklusanalyse hat ergeben, dass die Carbene CW104 und CW109 eine Verschiebung der Zellen von der G₀/G₁-Phase in die G₂/M-Phase bewirken. Auch CW60 könnte einen leichten Einfluss auf den Zellzyklus haben. Nach 48 h Inkubationen waren die Zellen zu stark geschädigt, als dass man einen Zellzyklusarrest hätte feststellen können. Die Western Blots haben gezeigt, dass CW60 bei einer Konzentration von 10 μ M nach 24 h Inkubation die Phosphorylierung von Akt leicht mindern könnte. Hier liegen möglicherweise erste Ansatzpunkte für eine Erklärung der Apoptoseinduktion durch die getesteten Substanzen.

Aufgrund ausführlicher Beschreibungen der Mitochondrien hemmenden Wirkung anderer Gold(I)-Komplexe in der Literatur, ist auch ein Effekt der untersuchten Gold(I)-Komplexe auf Mitochondrien denkbar. C. Wetzel hat bereits für CW60 und CW90 eine Hemmung der TrxR nachweisen können. Diese Untersuchungen müssten auch mit den übrigen Gold(I)-Komplexen durchgeführt werden, da es in der Literatur bereits deutliche Hinweise dafür gibt, dass auch NHC-Gold(I)-Komplexe die TrxR hemmen können. Eine Messung der Aktivität der TrxR kann hierbei z.B. mit Hilfe von Fluoreszenz-Assays erfolgen (Holmgren und Lu, 2010).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse zeigen, dass diskutierte Goldverbindungen wie CW171a und CW60 ein hohes toxisches Potenzial besitzen und daher vielversprechende Verbindungen für die Suche nach Leitstrukturen für neue Zytostatika sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams, J.M. (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes and Development* 17, 2481-2495
2. Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., Sparatore, F. (2009) Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug discovery Today* 14, 501-508
3. Arnér, E. S. J. & Holmgren, A. (2006) The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 16, 420-426
4. Assoian, R. (1997) Anchorage-dependent Cell Cycle Progression. *The Journal of Cell Biology* 136, 1-4
5. Audebert, M. , Riu, A., Jacques, C., Hillenweck, A., Jamin, EL, Zalko, D., Cravedi, J.P. (2010) Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol Lett.* 199, 182-192
6. Backer, J. M. (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* 410, 1–17
7. Baker, M. A., Barnard, P.J., Berners-Price, S.J., Brayshaw, S.K., Hickey, J.L., Skelton, B.W., White, A.H., (2006) Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure and anti-mitochondrial activity. *Dalton Trans.* 14, 3708-3715
8. Barnard, P.J., Berners-Price, S.J. (2007) Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Science Direct. Coordination Chemistry Reviews* 251, 1889-1902
9. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W. (1968) Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science* 161, 370-371
10. Berners-Price, S.J., Mirabelli C.K., Johnson, R. K., Mattern, M.R., McCabe, F.L., Faucette L.F., Sung, C.-M., Mong, S.-M., Sadler, P.J., Crooke, S.T. (1986) In Vivo

- Antitumor Activity and in Vitro Cytotoxic Properties of Bis[1,2-bis(diphenylphosphino)ethane]gold(I)Chloride. *Cancer Res.* 46, 5486-5493
11. Berners-Price, S.J., Sadler, P.J. (1988) Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity. *Bioinorganic chemistry Structure & Bonding* 70, 27-102
 12. Berners-Price, S.J., Girard, G.R., Hill, D.T., Sutton, M., Jarrett, S., Faucette, L.F., Johnson, R.K., Mirabelli, C.K., Sadler, P.J. (1990) Cytotoxicity and Antitumor Activity of Some Tetrahedral Bis(diphosphino)gold(I) Chelates. *Journal of Medicinal Chemistry* 33, 1386-1392
 13. Blocka, A.K. (1983) Auranofin versus injectable gold. Comparison of pharmacokinetic properties. *Am. J. Med.* 75, 114-122
 14. Brattein, M., Fine, W., Khaled, F., Thompson, J., Brattain, D. (1981) Heterogeneity of Malignant Cells from a human colon carcinoma. *Cancer research* 41, 1751-1756
 15. Burke-Gaffney, A., Callister, M.E.J., Nakamura, H. (2005) Thioredoxin: friend or foe in human disease? *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 398- 404
 16. Carnero, A. (2010) The PKB/AKT Pathway in cancer. *Current Pharmaceutical Design* 16, 34-44
 17. Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. (2010) 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research* 44, 587-604
 18. Crooke, S.T. (1982) A comparison of the molecular pharmacology of gold and platinum complexes. *J. Rheumatol.* 9, 61-70
 19. D'Arcy Hart, P. (1946) Chemotherapy of Tuberculosis- Part I. *Br. Med. J. Nov.* 30, 805-810

20. DC-Protein Instruction Manual Bio-Rad:
http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/BIORAD_DC_Instr_Protein_Assay.pdf (Stand: 16.7.2011)
21. DeGregori, J., Kowalik, T., Nevins, J. (1995) Cellular targets for Activation by the E2F1 Transcription Factor Include DNA-Synthesis- and G1/S-Regulatory Genes. *Molecular and Cellular Biology*. 15, 4215-4224
22. Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11908–11913
23. Dong, Y., Berners-Price, S. J., Thorburn, D.R., Antalis, T., Dickinson, J., Hurst, T., Qiu, L., Khoo, S.K., Parson, P.G. (1997) Serin Protease Inhibition and Mitochondrial Dysfunction Associated with Cisplatin Resistance in Human Tumor Cell Lines: Targets for Therapy. *Biochemical Pharmacology* 53, 1673-1682
24. Einhorn, L.H., Donohue, J. (1977) Cis.diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann. Intern. Med.* 87, 293-298
25. Elder R. C. Eidness, M. K., Heeg, M. J., et al. (1983). Gold based antiarthritic drugs and metabolites. *A.C.S. Symp. Ser.* 209, 385-90
26. Engelman, J. A. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews. Cancer* 6, 550-562
27. Euringer, E. (2005) Einfluss von Hypothermie auf die Volumenregulation von Gliazellen in vitro Untersuchung zu zellulären Mechanismen. Dissertation, München
Internet: www.edoc.ub.uni-muenchen.de/4510/ (Stand: 27.3.11)
28. Evans, Kovacs (1977) Properties of the H4IIE tumor cell system. *Cell Proliferation* 10, 233-243

29. Fabisiak, J.P., Tyurina, Y.Y., Tyurin, A.A., Lazo, J.S., Kagan, V.E. (1998) Random versus selective membrane phospholipid oxidation in apoptosis: Role of phosphatidylserin. *Biochemistry* 37, 13781-13790
30. Forestier, J. (1934) Rheumatoid arthritis and its treatment by gold salts. *The Lancet*.
31. Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G. (2006) Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4812
32. Garcia-Echeverria C, Sellers WR. (2008) Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 27, 5511-26
33. Gius, D., Spitz, D.R. (2006) Forum Editorial Redox Signaling in Cancer Biology. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 1249-1252
34. Gottlieb, N.L., Major, J.C. (1978) Ocular chrysiasis - a clinical study correlated with gold concentrations in the chrySTALLINE lens during chrysotherapy. *Arthritis Rheum.* 21, 704-708
35. Gottlieb, N.L. (1982) Comparative pharmacokinetics of parenteral and oral gold compounds. *The Journal of Rheumatology* 8, 99-109
36. Halestrap, A., McStay, G.P., Clarke, S., J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-166
37. Herrlinger, J.D. (1983) Difference in the pharmacokinetics, protein binding and cellular distribution of gold when different gold compounds are used. *Modern Aspects of Gold Therapy*, 52-57
38. Holmgren, A., Lu, J. (2010) Thioredoxin and Thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *BBRC* 369, 120-12
39. Inamdar N.M., Ahn Y.I., Alam J. (1996) The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the

- recognition sequences of MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 570–76 28
40. Ishii T., Itoh K., Takahashi S., Sato H., Yanagawa T., et al. (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275,16023–29
41. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86.
42. Itoh, K., Tong, K.I., Yamamoto, M. (2004) Molecular Mechanism activating Nrf2-Keap1 Pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biology & Medicine* 36, 1208-1213
43. Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298, 1911-1912
44. Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M.D. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 615–675
45. Kean, W.F., Anastassiadis, T.P. (1979) Long term chrysotherapy. Incidence of toxicity and efficacy during sequential time periods. *Arthritis Rheum.* 22, 495-501
46. Kean W.F. and Kean I.R.L. (2008) Clinical pharmacology of gold. *Inflammopharmacology* 16, 112-125
47. Kean, W.F., Lock, C., J., L. (1983) Penicillamine does not chelate gold(I). *J. Rheumatol.* 10, 527-530
48. Kelton, J.G., Carter, C.J., Rodger, C., Bebenek, G., Gauldie, J., Sheridan, D., Kassam, Y.B., Kean, W.F., Buchanan, W.W., Rooney, P.J. (1984) The relationship between platelet-associated IgG, platelet lifespan and reticuloendothelial cell function. *Blood.* 63, 1434-1438

49. Kim Y.-C., Masutani H., Yamaguchi Y., Itoh K., Yamamoto M., et al. (2001) Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. *J. Biol. Chem.* 276,18399–406
50. Kim, N.H., Oh, M.-K., Park, H.J., Kim, I.-S. (2010) Auranofin, a gold(I)containing antirheumatic compound, activates Keap/Nrf2-Signaling via Rac1/iNOS Signal and Mitogen activated kinase activation. *Journal of pharmacological sciences* 113, 246-254
51. Kobayashi, M., Yamamoto, M. (2005) Forum Review Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 385-394
52. Kulawik, A. (2006/07) Zytotoxische Effekte polyphenolischer Verbindungen in kultivierten Säugerzellen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
53. Langer, K. (2006) Nanotechnologie bringt Arzneistoffe sicher ans Ziel. *Forschung Frankfurt* 4/2006
54. Latt, SA, Stetten G. (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Histochem. Cytochem.* 24, 24-33
55. Ling, Y.-H., El-Naggar A., Priebe, W., Perez-Soler, R. (1996) Cell Cycle-Dependent Cytotoxicity, G2/M-Arrest, and Disruption of p34^{cdc2}/Cyclin B₁ Activity Induced by Doxorubicin in Synchronized P388 Cells. *Molecular Pharmacology* 49, 832-841
56. Liu, L. Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie D. et al. (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 66, 11851-8
57. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T., Zhao, J. (2009) Targeting the phosphoinositide 3 kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 8, 627-644

58. Lordick, F., Siewert, J.-R., Rothmund, M., Schumpelick, V. (2010) Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 3. Auflage
59. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L., Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri (Download from: www.jbc.org Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf März 2011)
60. Lüpertz, R. (2008). Oxidative Modulation zellulärer Signalwege: Einfluss redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren auf die Sensitivität von Krebszellen gegenüber Doxorubicin und TNF α . Dissertation, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf
61. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (2009) Der Experimentator: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage
62. Machida, K., Ohta, Y., Osada, H. (2006) Suppression of Apoptosis by Cyclophilin D via Stabilization of Hexokinase II Mitochondrial Bindung in Cancer Cells. Biol. Chem. 281, 14314-14320
63. Matés, J. M., Sánchez-Jiménez, F. M. (2007) Review - Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. IJBCB 32, 257-170
64. McKeage, M.J., Maharaj, L., Berners-Price, S.J. (2002) Mechanisms of cytotoxicity and antitumour activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. Coordination chemistry reviews 232, 127-135
65. McMullen, J.R., Jay, P.Y. (2007) PI3K (p110 α) Inhibitors as Anti-Cancer Agents. Cell Cycle 6, 910-913
66. Melino, G. & Vaux, D. (2010) Cell death, Wiley-Blackwell

67. Menninger, H., Herborn, G., Sander, O., Blechschmidt, J. und Rau, R. (1998) A 36 month comparative trial of methotrexate and gold sodium thiomalate in the treatment of early active and erosive rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* 37, 1060-1068
68. Mossman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63
69. Nagai, H., Sumino, Y. (2008) Therapeutic Strategy of Advanced Hepatocellular Carcinoma by Using Combined Intra-Arterial Chemotherapy, *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 3, 220-226
70. Noffke, A.L., Bongartz, M., Wätjen, W., Böhler, P., Spingler, B., Kunz, P.C. (2011) Synthesis, X-ray crystal structure and cytotoxicity of a new tetranuclear ruthenium arene complex, *Journal of Organometallic Chemistry* 696, 1096-1101
71. Nguyen, T., Sherratt, P., Pickett, C. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233-260
72. Olive, P. L., Wlodek, D., Banáth, J. P. (1991) DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Research* 51, 4671-4676
73. Omata Y., Folan, M., Shaw, M., Messer, R., L., Lockwood, P. E., Hobbs, D., Bouillaguet, S., Sano, H., Lewis, J.B., Wataha, J.C. (2006) Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). *Toxicology in vitro* 20, 882-890
74. Panayi, G.S., Wooley P., Batchelor, J.R. (1978) Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations and toxic reactions to drugs. *B.M.J.* 2, 1326-1328

75. Pearson, R.G. (1963). Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533-3539
76. Pitot, H.C., Peraino, C., Morse, P.A., Rotter, V.R. (1961) Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 13, 229-245
77. Prester T., Talalay P. (1995) Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8965–69
78. Promega-Produktinformation zum ApoONE-Caspase-Assay:
<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/apoone-homogeneous-caspase-3-7-assay-protocol/> (Stand: 16.7.2011)
79. Rackham, O. Nichols, S.J. Leedman, P.J. Berners-Price, S.J. Filipovska, A. (2007) A gold (I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: Implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 74, 992
80. Raffel, J. et al (2003) Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J. Lab. Clin. Med.* 142, 46-51
81. Redon, C. et al. (2011) Recent developments in the use of H2AX as a quantitative DNA double strand break biomarker. *AGING* 3, S.168-174
82. Rehm, H., Letzel, T., *Der Experimentator: Proteomics.* Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. 11/2009 6. Auflage
83. Ren Y, Smith A. (1995) Mechanism of metallothionein gene regulation by heme-hemopexin. *J. Biol. Chem.* 270, 23988–95
84. Reuber, M.D. (1961) A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J.Natl Cancer Inst.* 26, 891-899

85. Rigobello, M.P., Scutari, G., Boscolo R., Bindoli, A. (2002) Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a Gold(I)-phosphine derivative. *Br. J. Pharmacol.* 136, 1162-1168
86. Rigobello, M.P., Scutari, G., Folda, A., Bindoli, A. (2004) Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c. *Biochem. Pharmacol.* 67, 689-696
87. Rigobello, M.P., Folda, A., Baldoin, M.C., Scutari, G., Bindoli, A. (2005) Effect of Auranofin on the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Role of thioredoxin reductase. *Free radical research* 39, 687-695
88. Roche- Produktinformation:
Roche Applied Science Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Version July 2005 und Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Version 2008 (ContentVersion: February 2011)
https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644793001_en_08.pdf
(Stand: 16.7.2011)
89. Rogakou, E., Pilch, D., Orr, A., Ivanova, V., Bonner, W. (1998) DNA-Double stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation On Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 5858-5868
90. Rogakou, E., Boon, C., Redon, C., Bonner, W. (1999) Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-strand Breaks In Vivo. *The Journal of Cell Biology* 146, 905-915
91. Rubbiani, R., Kitanovic, I., Alborzina, H., Can, S., Kitanovic, A., Onambele, L., Stefanopoulou, M., Geldmacher, Y., Sheldrick, W., Wolber, G., Prokop, A., Wölfl, S., Ott, I. (2010) Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties, *Journal of Medical Chemistry* 53, 8608-8618
92. Rushmore T.H., Pickett C.B. (1990) Transcriptional regulation of the rat glutathione

- S*-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 14648–53
93. Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266, 11632–39
94. Rydberg, B. and Johnson, K.J., (1978) DNA Repair Mechanisms. Academic Press, New York, 465-468
95. Sadler, P.J. (1976) The Biological Chemistry of gold. Advances in understanding with modern techniques. *Gold bull.* 9, 110-118
96. Sadler P.J. and Rodney E.Sue (1994) The Chemistry of gold drugs. Department of Chemistry, Birkbeck College, University of London, Gordon House Christopher Ingold Laboratories, 29 Gordon Square, London WC1H 0PP, UK.
97. Sebolt-Leopold, J., Herrera, R. (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews.* 4, 937-947
98. Schmitz, S. (2009) *Der Experimentator: Zellkultur.* Elsevier Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage
99. Schneider, M., Lelgemann, M., Abholz, H.-H. u.a. (2011) Management der frühen rheumatoiden Arthritis Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie e.V. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
100. Shaw, C. F. (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* 99, 2589-2600
101. Sies, H. (1997) Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress, *Experimental Physiology* 82, 291-295

102. Sigler, J.W., Bluhm, G.B., Duncan, H., Sharp, J.T., Ensign, D.C., McCrum, W.R. (1974) Gold salts in the treatment of rheumatoid arthritis. A double blind study. *Annals of Internal Medicine* 80, 21-26
103. Sigma-Produktinformation:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=B2261|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (Stand 16.7.2011)
104. Simon, T. M., Kunishmia. D. H., Biert, G. J., et al. (1979) Inhibitory effects of new oral gold compounds on HeLa cells. *Cancer* 44, 1865-75
105. Simon, H.-U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000) Role of reactive species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415-418
106. Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E., (1988) A simple technique for quantification of Low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191
107. Smith, P.F., Hoke, G.D., Alberts, D.W., Bugelski, P.J., Lupo, S., Mirabelli, C.K., Rush, G.F. (1989) Mechanism of Toxicity of an Experimental Bidentate Phosphine Gold Complexed Antineoplastic Agent in Isolated Rat Hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 249, 944-950
108. Surh, Y. J., Kundu, J., Na, H.-K. (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 74, 1526-1539
109. Sutton, B. M. (1986) Gold compounds for rheumatoid arthritis. *Gold bull.* 19. 15-16
110. Talalay P., Fahey J.W., Holtzclaw W.D., Prestera T., Zhang Y. (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.* 82–83:173–79 23.
111. Tommasi, S., Pinto, R., Paradiso, A. (2007) Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma. *Current Pharmaceutical Design* 13, 3279-3287

112. Trani, M., Sorretino, A., Busch, C., Landström, M. (2009) Pro-apoptotic effect of aurothiomalat in prostate cancer cells. *Cell Cycle* 8, 306-313
113. Van Riel, P.L., Gribnau, F.W., Van De Putte, L.B., et al. (1983) Loose stools during auranofin treatment: clinical study and some pathogenic possibilities. *J. Rheumatol.* 10, 222-226
114. Von Maltzahn G., Park, J.-H., Lin, K., Singh, N., Schöppe, C., Mesters, R., Berdel, W., Ruoslahti, E., Sailor, M., Bhatia, S. (2011) Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. *Nature Materials* 10, 545-552
115. Wätjen, W. (2000) Cadmium-induzierte Apoptose in Säugerzellen - Einfluss von intrazellulärer Signaltransduktion und oxidativem Stress. Dissertation. Bremen
116. Wagner, E., F., Nebreda, A., R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer* 9, 537-549
117. Walz, D.T., Dimartino, M.J., Griswold, D.E. et al. (1983) Biologic actions and pharmacokinetic studies of Auranofin. *Am. J. Med.* 75, 90-108
118. Ward, J.R., Williams, N.J., Egger, M.J. et al. (1983) Comparison of auranofin, gold sodium thiomalate, and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 26, 1303-1315
119. Wetzel, C. (2011) Gold (I)-Komplexe heterozyklischer Phosphane - Von Katalyse über Carbene zu Chemotherapeutika. Dissertation, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf
120. Wild A.C., Gipp J.J., Mulcahy R.T. (1998) Overlapping antioxidant response element sequences mediate basal and-naphthoflavone-induced expression of the human - glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene. *Biochem. J.* 332, 373–81
121. Winterbauer, R.H., Wilske, K.R., Wheelis, R.F. (1976) Diffuse pulmonary injury associated with gold treatment. *N. Engl. J. Med.* 17, 919-21

122. Zangari, M., Cavallo, F., Tricot, G. (2006) Farnesyltransferase inhibitors and rapamycin in the treatment of multiple myeloma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 449-453
123. Zhang, D. (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews* 38, 769-789
124. Zipper, L. M., Mulcahy, R. T. (2002) The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 277, 36544–36552

7. Anhang

7.1 Summary

As cancer is one of the leading causes of death worldwide, new opportunities are yet to come to face limited effectiveness of already existing cytostatic drugs due to severe side effects or resistance of cancer cells. Organometal compounds have become more and more important in oncology. Gold compounds already used in medicine against various diseases and also well known in the therapy of rheumatic arthritis, showed promising cytotoxicity in different tumour cell lines.

Recently new gold (I) complexes $[L_2Au]Cl$ with short names CW35, CW143, CW55, CW90 and CW60 were developed by PD P.C. Kunz and coworkers of the Institute of Anorganic Chemistry of the Heinrich-Heine-University. L means 1,2-diphosphanylethane ligands bearing different heteroaryl substituents which tune the lipophilicity.

In this thesis these compounds and five NHC gold (I) complexes were tested for their cytotoxic potential on rat glioma cells C6 and rat hepatoma cells H4IIE.

Using the MTT-Assay it was demonstrated that some of the compounds were cytotoxic in the low micromolar range at different times of incubation (CW60, CW90, CW171a, CW109, CW104, CW165, CW55) whereas others (CW143, CW35) showed no cytotoxic potential at all, up to 50 μM after 72 h on both cell lines.

In this thesis it was focused on substances that were able to induce apoptotic cell death in cancer cells in the micromolar range. Low concentrations were of special interest, as it is easier to bring small amounts of chemicals to the target cells. The apoptotic cell death was the preferred way of death, as it induces no inflammatory reaction in the target cells.

To sum up, a few of the tested compounds showed a promising apoptotic effect on H4IIE cells. Further examinations revealed that CW60 induced an apoptotic cell death in H4IIE after 24 h and 48 h of incubation, which was demonstrated by caspase 3/7 activation after 48 h incubation with 10 μM . Moreover an intensified chromatin condensation and nuclear fragmentation was visualized via Hoechst 33342 staining. DNA segments of at least 180 bp and multiples were detected by DNA electrophoresis (DNA ladder). Necrotic cell death was investigated via staining with PI. CW109 and CW104 induced an apoptotic cell death in H4IIE cells after 24 h and 48 h of incubation at concentrations of 5 μM and 10 μM . Even CW90 showed an apoptotic effect after 48 h of incubation. CW171a, which was most toxic compared to all of the substances, turned out to induce necrotic cell death only. None of the experiments showed an apoptotic reaction in H4IIE cells.

Investigating the molecular mechanisms of apoptosis induction, the comet assay was used in order to analyse the generation of DNA strand breaks as well as the DCF-Assay to detect reactive oxygen species as potential initiators of apoptosis in cells. Neither DNA strand breaks were detected after incubation up to 8 h nor increased levels of reactive oxygen species after 1 h of incubation.

The analysis of the cell cycle showed that the NHC gold (I) compounds CW109 and CW104 were able to induce a shift of cells from the G0/G1 phase to the G2/M phase meaning that they could be able to induce a cell cycle arrest.

Further it was investigated if the tested compounds influence intracellular signalling pathways, such as the pathways of PI3K/AKT, Nrf2/ARE, JNK and ERK. Western Blots indicated a light influence of CW60 10 μM after incubation of 24 h on the phosphorylation of the protein kinase Akt. Even CW109 and CW104 seemed to be able to have an effect on the phosphorylation of Akt, which has to be investigated further. This could be an indication of the molecular mechanisms of gold (I) compounds.

7.2 Rohdaten

Zytotoxizität MTT-Assay, H4IIE-Zellen, Vorversuch zur Testung des Einflusses der Konfluenz auf die Zytotoxizität der Substanzen am Bsp. von CW109 und CW60, Inkubationsdauer 24h (Abb. 13 und Abb. 15)

Substanz	CW60			CW60		
Zellzahl/Well	8.000			15.000		
Konz.(μ M)	0	5	10	0	5	10
1	0,383	0,281	0,134	0,669	0,541	
2	0,373	0,295	0,114	0,697	0,566	0,303
3	0,378	0,307	0,141	0,639	0,589	0,377
4	0,389			0,607		0,284
Substanz	CW109			CW109		
Zellzahl/Well	5.000			8.000		
Konz.(μ M)	0	5	10	0	5	10
1	0,255	0,212	0,151	0,383	0,299	0,224
2	0,265	0,212	0,180	0,373	0,321	0,230
3	0,239	0,222	0,149	0,378	0,317	0,199
Zellzahl/Well	10.000			15.000		
Konz.(μ M)	0	5	10	0	5	10
1	0,479	0,362	0,231	0,669	0,483	0,303
2	0,497	0,338	0,290	0,697	0,480	0,391
3	0,469	0,398	0,263	0,639	0,516	0,306
Zellzahl/Well	25.000			50.000		
Konz.(μ M)	0	5	10	0	5	10
1	0,903	0,650	0,438	1,376	1,204	0,760
2	0,979	0,728	0,557	1,567	1,136	0,946
3	0,829	0,756	0,509	1,287	1,165	0,792

Zytotoxizität von Wasserstoffperoxid auf H4IIE, MTT-Assay, Vorversuch (Abb. 12)

Konz.(μ M)	0	100	250	500	1000	2000
1	0,579	0,497	0,381	0,254	0,170	0,105
2	0,689	0,599	0,500	0,341	0,213	0,132
3	0,629	0,519	0,350	0,215	0,150	0,111

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW35 (Abb. 16)

Zeit(h)	24h				
Konz.(μ M)	0	10	25	50	
1	0,501	0,492	0,486	0,496	
2	0,610	0,599	0,561	0,573	
3	0,572	0,539	0,524	0,519	
Zeit(h)	48h				
Konz.(μ M)	0	5	10	25	50
1	0,476	0,504	0,498	0,501	0,503
2	0,563	0,501	0,631	0,604	0,552
3	0,476	0,476	0,464	0,492	0,455

Anhang

Zeit(h)	72h				
Konz.(μM)	0	5	10	25	50
1	0,548	0,561	0,549	0,489	0,564
2	0,577	0,623	0,613	0,610	0,598
3	0,647	0,681	0,703	0,670	0,583

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW143 (Abb. 17)

Zeit(h)	24h				
Konz.(μM)	0	10	25	50	
1	0,501	0,509	0,486	0,455	
2	0,610	0,622	0,595	0,557	
3	0,572	0,582	0,587	0,538	
Zeit(h)	48h				
Konz.(μM)	0	5	10	25	50
1	0,476	0,477	0,460	0,464	0,309
2	0,563	0,630	0,568	0,589	0,416
3	0,476	0,443	0,473	0,476	0,392
Zeit(h)	72h				
Konz.(μM)	0	5	10	25	50
1	0,548	0,534	0,453	0,215	0,111
2	0,577	0,636	0,616	0,616	0,545
3	0,647	0,712	0,663	0,684	0,527

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW55 (Abb. 18)

Zeit(h)	24h						
Konz.(μM)	0	10	25	50			
1	0,501	0,496	0,460	0,468			
2	0,610	0,580	0,542	0,541			
3	0,572	0,524	0,507	0,483			
Zeit(h)	48h						
Konz.(μM)	0	1	2	5	10	25	50
1	0,476			0,162	0,130	0,159	0,152
2	0,563	0,570	0,563	0,169	0,138	0,128	0,121
3	0,476	0,475	0,500	0,445	0,412	0,357	0,187
4	0,668	0,689	0,694				
Zeit(h)	72h						
Konz.(μM)	0	10	25	50			
1	0,881	0,258	0,171	0,147			
2	0,577	0,398	0,269	0,159			
3	0,647	0,164	0,110	0,091			

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW90 (Abb. 20)

Zeit(h)	3					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,630	0,616	0,586	0,609	0,616	0,629

Anhang

2	0,616	0,690	0,568	0,570	0,590	0,632	
3	0,532	0,488	0,496	0,535	0,544	0,563	
Zeit(h)	6						
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	
1	0,613	0,579	0,622	0,600	0,617	0,585	
2	0,626	0,589	0,593	0,560	0,495	0,550	
3	0,547	0,514	0,520	0,495	0,503	0,478	
Zeit(h)	12						
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	
1	0,562	0,579	0,579	0,553	0,574	0,538	
2	0,578	0,564	0,551	0,545	0,486	0,530	
3	0,512	0,472	0,470	0,450	0,431	0,434	
Zeit(h)	24						
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	
1	0,562	0,573	0,594	0,562	0,567	0,515	
2	0,600	0,567	0,587	0,527	0,593	0,484	
3	0,529	0,495	0,491	0,476	0,470	0,423	
Zeit(h)	48						
Konz.(μ M)	0	0,25	0,5	1	2	5	10
1	0,496	0,465	0,215	0,317	0,177	0,181	0,160
2	0,602	0,701	0,627	0,573	0,294	0,213	0,197
3	0,452	0,516	0,534	0,478	0,399	0,248	0,107

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW90 (Abb. 20)

Zeit(h)	72							
Konz.(μ M)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5	10
1	0,582	1,040	0,579	0,230	0,162	0,104	0,103	0,100
2	0,613	0,689	0,681	0,614	0,602	0,573	0,138	0,113
3	0,623	0,732	0,710	0,625	0,662	0,317	0,407	0,207
4							0,140	0,128

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW60 (Abb. 22)

Zeit(h)	3h					
Konz. (μ M)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,5655	0,553	0,5	0,557	0,526	0,472
2	0,591	0,565	0,515	0,563	0,598	0,534
3	0,566	0,606	0,512	0,550	0,552	0,523
Zeit(h)	6h					
Konz. (μ M)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,565	0,539	0,518	0,492	0,493	0,450
2	0,624	0,593	0,578	0,542	0,530	0,425
3	0,662	0,617	0,573	0,575	0,544	0,510
Zeit(h)	12h					
Konz. (μ M)	0	0,5	1	2	5	10

Anhang

1	0,513	0,500	0,494	0,448	0,458	0,277
2	0,587	0,555	0,533	0,447	0,475	0,282
3	0,597	0,555	0,549	0,492	0,476	0,430
Zeit(h)	24h					
Konz. (µM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,524	0,533	0,5101	0,447	0,359	0,111
2	0,600	0,528	0,510	0,461	0,372	0,120
3	0,595	0,596	0,558	0,501	0,374	0,145

Zeit(h)	48h							
Konz. (µM)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5	10
1	0,496	0,528	0,505	0,493	0,448	0,380	0,139	0,088
2	0,602	0,665	0,651	0,640	0,606	0,503	0,188	0,109
3	0,452	0,551	0,510	0,494	0,437	0,297	0,100	0,092
Zeit(h)	72h							
Konz. (µM)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5	10
1	0,582	0,571	0,577	0,580	0,516	0,407	0,088	0,089
2	0,613	0,663	0,626	0,653	0,605	0,555	0,099	0,093
3	0,623	0,636	0,591	0,604	0,580	0,483	0,117	0,094

Zytotoxizitätstest MTT-Assay, H4IIE-Zellen, CW104 (Abb.45)

Zeit(h)	24h					
Konz.(µM)	0	10	25	50		
1	0,501	0,257	0,230	0,167		
2	0,610	0,307	0,263	0,178		
3	0,572	0,316	0,266	0,197		
h)	48h					
Konz.(µM)	0	2	5	10	25	50
1	0,476	0,407	0,275	0,169	0,135	0,098
2	0,563	0,449	0,268	0,149	0,134	0,103
3	0,476	0,390	0,222	0,130	0,108	0,089
Zeit(h)	72h					
Konz.(µM)	0	2	5	10	25	50
1	0,548	0,438	0,223	0,121	0,106	0,090
2	0,577	0,681	0,270	0,113	0,111	0,095
3	0,647	0,451	0,193	0,098	0,101	0,088
4		0,442	0,214	0,118	0,113	0,093

Zytotoxizitätstest MTT-Assay H4IIE-Zellen, CW109 (Abb. 46)

Zeit(h)	24h			
Konz.(µM)	0	10	25	50
1	0,501	0,277	0,132	0,102
2	0,610	0,305	0,158	0,109

Anhang

3	0,572	0,305	0,142	0,110		
Zeit(h)	48h					
Konz.(µM)	0	2	5	10	25	50
1	0,476	0,475	0,351	0,218	0,084	0,089
2	0,563	0,487	0,350	0,212	0,169	0,092
3	0,476	0,392	0,234	0,150	0,086	
4	0,668					0,087
Zeit(h)	72h					
Konz.(µM)	0	2	5	10	25	50
1	0,548	0,516	0,260	0,162	0,087	0,094
2	0,577	0,571	0,232	0,164	0,091	0,095
3	0,647	0,549	0,233	0,132	0,083	0,091
4				0,142	0,084	0,085

Zytotoxizitätstest MTT-Assay H4IIE-Zellen, CW165 (Abb.44)

Zeit(h)	24h			
Konz.(µM)	0	10	25	50
1	0,501	0,326	0,214	0,157
2	0,610	0,391	0,283	0,181
3	0,572	0,338	0,269	0,196

Zytotoxizitätstest MTT-Assay H4IIE-Zellen, CW165 (Abb.44)

Zeit(h)	48h					
Konz.(µM)	0	2	5	10	25	50
1	0,476	0,323	0,238		0,142	0,121
2	0,563	0,420	0,280	0,228	0,169	0,138
3	0,476	0,309	0,214	0,167	0,122	0,106
4	0,668			0,239		
Zeit(h)	72h					
Konz.(µM)	0	2	5	10	25	50
1	0,548	0,349	0,212	0,154	0,119	0,112
2	0,577	0,393	0,206	0,137	0,113	0,106
3	0,647	0,357	0,205	0,167	0,117	0,115

Zytotoxizitätstest MTT-Assay H4IIE-Zellen, CW171a (Abb. 47 und Abb. 48)

Zeit(h)	3					
Konz.(µM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,554	0,537	0,498	0,431	0,245	0,116
2	0,593	0,599	0,538	0,479	0,477	0,337
3	0,508	0,530	0,459	0,427	0,394	0,287
Zeit(h)	6					
Konz.(µM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,540	0,522	0,482	0,162	0,110	0,096
2	0,578	0,511	0,500	0,350	0,130	0,109
3	0,527	0,492	0,475	0,372	0,163	0,100

Anhang

Zeit(h)	12					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,519	0,494	0,380	0,096	0,099	0,086
2	0,547	0,519	0,496	0,286	0,114	0,098
3	0,460	0,459	0,427	0,346	0,102	0,086
Zeit(h)	24h					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,535	0,479	0,182	0,091	0,097	0,092
2	0,583	0,533	0,388	0,106	0,114	0,098
3	0,485	0,442	0,360	0,099	0,102	0,087

Zeit(h)	48						
Konz.(μM)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5
1	0,496	0,507	0,259	0,099	0,101	0,090	0,086
2	0,602	0,648	0,318	0,111	0,107	0,095	0,100
3	0,452	0,490	0,435	0,097	0,101	0,088	0,087
Zeit(h)	72						
Konz.(μM)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5
1	0,582	0,563	0,125	0,096	0,102	0,091	0,090
2	0,613	0,619	0,358	0,098	0,102	0,091	0,090
3	0,623	0,696	0,534	0,116	0,103	0,089	0,088

Anhang

Zytotoxizitätstest MTT-Assay H4IIE-Zellen, CW171b (Abb. 51)

Zeit(h)	3					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,528	0,626	0,542	0,517	0,365	0,183
2	0,546	0,561	0,477	0,492	0,410	0,415
3	0,601	0,616	0,554	0,544	0,483	0,437
Zeit(h)	6					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,610	0,595	0,550	0,378	0,114	0,096
2	0,585	0,548	0,500	0,465	0,184	0,109
3	0,643	0,585	0,567	0,526	0,292	0,122
Zeit(h)	12					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,587	0,578	0,507	0,295	0,094	0,083
2	0,516	0,520	0,482	0,451	0,109	0,098
3	0,553	0,548	0,541	0,510	0,129	0,095
Zeit(h)	24					
Konz.(μM)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,590	0,521	0,473	0,103	0,095	0,083
2	0,543	0,519	0,441	0,146	0,112	0,095
3	0,543	0,523	0,491	0,358	0,111	0,095

Anhang

Zeit(h)	48						
Konz.(μ M)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5
1	0,4958	0,4935	0,4095	0,247	0,0925	0,0955	0,0865
2	0,6018	0,674	0,5825	0,3255	0,112	0,1025	0,0955
3	0,452	0,4095	0,372	0,291	0,1025	0,096	0,087
Zeit(h)	72						
Konz.(μ M)	0	0,1	0,25	0,5	1	2	5
1	0,582	0,579	0,439	0,143	0,089	0,095	0,084
2	0,613	0,647	0,558	0,265	0,119	0,100	0,089
3	0,623	0,573	0,569	0,455	0,089	0,098	0,085

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW35

Zeit(h)	24							
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	25	50
1	0,759	0,849	0,820	0,808	0,799	0,813		
2	0,653	0,726	0,685	0,687	0,666	0,644		
3	0,751	0,764	0,783	0,789	0,810	0,796	0,767	0,728
4	0,806						0,792	0,795

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW143

Zeit(h)	24							
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	25	50
1	0,812	0,866	0,886	0,855	0,825	0,820		
2	0,848	0,866	0,890	0,867	0,844	0,848	0,829	0,831
3	0,806	0,802	0,807	0,799	0,778	0,796	0,819	0,797

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW55

Zeit(h)	24							
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	25	50
1	0,812	0,813	0,876	0,832	0,904	0,811		
2	0,848	0,794	0,852	0,797	0,812	0,848	0,830	0,860
3	0,806	0,816	0,814	0,787	0,823	0,807	0,798	0,848

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW90 (Abb. 19)

Zeit(h)	24					
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,759	0,866	0,878	0,870	0,355	0,326
2	0,653	0,720	0,689	0,753	0,362	0,315
3	0,751	0,783	0,832	0,809	0,378	0,352

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW60 (Abb. 21)

Zeit(h)	24					
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,759	0,810	0,837	0,647	0,346	0,149
2	0,653	0,719	0,704	0,569	0,288	0,134
3	0,751	0,843	0,775	0,617	0,329	0,231

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW165 (Abb. 43)

Zeit(h)	24							
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	25	50
1	0,812	0,918	0,963	0,984	0,902	0,854		
2	0,848	0,912	0,886	0,895	0,775	0,778	0,620	0,438
3	0,806	0,852	0,902	0,895	0,835		0,615	0,453
4	0,480						0,383	0,306

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW104

Zeit(h)	24							
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10	25	50
1	0,812	0,859	0,878	0,858	0,928	0,919		
2	0,848	0,884	0,837	0,868	0,837	0,842	0,845	0,789
3	0,806						0,897	0,809

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW109

Zeit(h)	24			
Konz.(μ M)	0	10	25	50
1	0,8055	0,8175	0,8605	0,8915
2	0,4795	0,4795	0,523	0,5335

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW171a (Abb. 47)

Zeit(h)	24					
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,759	0,615	0,427	0,354	0,093	0,078
2	0,653	0,624	0,403	0,341	0,124	0,103
3	0,751	0,815	0,582	0,412	0,310	0,087

Zytotoxizitätstest MTT-Assay C6-Zellen, CW171b

Zeit(h)	24					
Konz.(μ M)	0	0,5	1	2	5	10
1	0,759	0,733	0,574	0,445	0,371	0,094
2	0,653	0,623	0,491	0,352	0,309	0,095
3	0,751	0,878	0,778	0,579	0,348	0,318

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW60, 24h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 24)

Konz. (µM)	Apoptosen				Nekrosen				Mitosen			
	0	0,2	0,1	0,1		0,4	0,0	0,4		0,6	0,9	1,3
1	0,2	0,1	0,1		0,5	0,1	0,3		0,4	0,0	0,0	
2	0,1	0,1	0,1		0,3	0,0	0,3		0,4	0,6	0,0	
5	0,5	0,6	0,7	5,7	0,6	0,2	0,4	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
7,5	2,0	1,7	5,3		0,1	0,1	0,9		0,0	0,1	0,2	
10	21,8	2,9		15,3	9,3	1,9		7,3	0,0	0,0		0,0
PQ	3,0	4,8	8,4		0,9	2,2	4,4		0,0	0,0	0,0	

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW60, 48h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 25)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	2,2	3,8	9,2	1,3	0,0	7,6	0,6	0,0
2,5	3,3	5,0	5,7	1,5	1,6	1,6	0,0	0,0	0,0
5	20,2	15,2	16,0	9,6	13,6	9,9	0,0	0,0	0,0

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW90, 24h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 28)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	0,2	0,1	0,1	0,4	0,0	0,4	0,6	0,9
10	0,2	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,0	0,0	0,0
PQ	3,0	4,8	8,4	0,9	2,2	4,4	0,0	0,0	0,0

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW90, 48h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 29)

Konz. (µM)	Apoptosen				Nekrosen				Mitosen			
	0	2,2	3,8	9,2		1,3	0,0	7,6		0,6	0,0	0,0
5	6,2	8,1	41,5	27,6	5,4	6,0	33,8	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0
10	11,4	17,1	15,3		3,2	0,9	1,9		0,0	0,0	0,0	

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW171a, 24h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 59)

Konz. (µM)	Apoptosen				Nekrosen				Mitosen			
	0	0,2	0,1	0,1		0,4	0,0	0,4		0,6	0,9	1,3
1	0,1	0,1	0,2		0,4	1,3	0,8		1,4	2,1	1,7	
2,5	0,6	3,3	0,6		4,3	4,9	5,8		2,5	1,5	1,0	
PQ	3,0	4,8	8,4		0,9	2,2	4,4		0,0	0,0	0,0	

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW109, 24h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 56)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	0,2	0,1	0,1	0,4	0,0	0,4	1,3	0,6
5	0,8	4,3	1,7	0,4	1,3	0,8	0,1	0,0	0,0
10	6,9	18,6	10,9	0,2	5,5	1,5	0,0	0,0	0,0
PQ	3,0	4,8	8,4	0,9	2,2	4,4	0,0	0,0	0,0

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW109, 48h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 57)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	3,8	9,2	2,2	0,0	7,6	1,3	0,6	0
5	18,8	14,5	14,6	35,3	12,9	19,26	0	0	0

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW104, 24h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 54)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	0,2	0,1	0,1	0,4	0,0	0,4	1,3	0,6
10	3,5	2,0	8,9	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
PQ	3,0	4,8	8,4	0,9	2,2	4,4	0,0	0,0	0,0

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW104, 48h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 55)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	2,2	3,8	9,2	1,3	0,0	7,6	0,6	0
5	15	15,2	15,3	33,4	16,4	28,8	0	0	0

Life-Dead-Assay H4IIE-Zellen, CW165, 24h Inkubation, Werte angegeben in Prozent ausgezählter Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. 52)

Konz. (µM)	Apoptosen			Nekrosen			Mitosen		
	0	0,2	0,1	0,1	0,4	0,0	0,4	0,9	1,3
5	0,5	0,8	0,6	0,3	0,0	0,2	0,1	0,5	0,3
10	1,1	6,3	2,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,0
PQ	3,0	4,8	8,4	0,9	2,2	4,4	0,0	0,0	0,0

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, CW171a, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (Abb. 64)

Zeit(h)	6				24				
Konz. (μM)	0	1	5	10	0	1	2	5	10
1	6506	2731	3491	2900	8563	5762	13625	0	
2	3309	119	3276	3451	11625	9718	14514	4536	
3	3029	2398	3415	8814	7391	7872	11428	47825	
4	17009				5974				
5	31612				15520			14557	43744
6	25879				19258				15590
7					23174				1517
Zeit(h)	48								
Konz. (μM)	0	1	2	5	10				
1	4584	9787	6013	35213					
2	6989	5530	12065	0					
3	12917	10966	15126	18810					
4	11157			26142	0				
5	13390				0				
6	20296				0				
7	8198				0				

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, CW165, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (Abb. 61)

Zeit(h)	6			24			48		
Konz. (μM)	0	5	10	0	5	10	0	5	10
1	6506		2589	8563		24291	4584	6562	26802
2	3309	3650	3650	11625		13933	6989	6992	14668
3	3029	3259	1136	7391		14698	12917	7703	23077
4	17009			5974			11157	11456	
5	31612		5011	15520	9985		13390		
6	25879	12309	8731	19258	14478		20296	17404	
7				23174	24479		8198		

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, CW104, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (Abb. 62)

Zeit(h)	6			24			48		
Konz. (μM)	0	5	10	0	5	10	0	5	10
1	6506		3459	8563		64085	4584	5627	229277
2	3309	4051		11625		47021	6989	8530	73995
3	3029	2433	1907	7391		28573	12917	9520	289962
4	17009			5974			11157		
5	31612			15520	12808		13390		
6	25879	9461	4956	19258	13175		20296		
7				23174	21076		8198		

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, CW90, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (Abb. 31)

Zeit(h)	6			24				48			
Konz. (µM)	0	10	25	0	5	10	25	0	5	10	25
1	6506	6138		8563	3407	649		4584	8873	15153	
2	3309	224		11625	5030	6813		6989	8010	8399	
3	3029			7391	7428	6766	18091	12917	10453	21805	
4	17009		11149	5974		11283		11157			
5	31612		23834	15520		10681	27349	13390			132402
6	25879	2167	16830	19258				20296			212715
7				23174			5309	8198			40783

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, CW60, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (Abb.32)

Zeit(h)	6		24			48		
Konz. (µM)	0	10	0	5	10	0	5	10
1	6506		8563	9612	28670	4584	223766	
2	3309		11625	6368	23355	6989	43822	
3	3029		7391	5236	12828	12917	457395	
4	17009	12577	5974			11157		740410
5	31612	8731	15520			13390		370362
6	25879	18079	19258			20296		264173
7			23174			8198		

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, CW109, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (Abb. 63)

Zeit(h)	24			48		
Konz.(µM)	0	5	10	0	5	10
1	8563		40877	4584	8946	187482
2	11625		28638	6989	7903	70440
3	7391		35664	12917	12576	266980
4	5974			11157		
5	15520	15322		13390		
6	19258	12849		20296		
7	23174	16004		8198		

Apoptosenachweis mittels ApoONE-Assay, H4IIE-Zellen, Positivkontrolle Paraquat (PQ), angegeben sind die Fluoreszenzanstiege nach 3-stündiger Messung in rfu

Zeit(h)	6	24	48
Konz.(µM)	1mM	1mM	1mM
1	16907	267583	337548
2	14812	134205	76745
3	2044	151546	103671
4	2273	132355	129905

Nekrosenachweis mittels LDH-Assay, H4IIE-Zellen, CW171a, Werte sind angegeben in Prozent bzgl. high control (Abb. 68)

Zeit (h)	6					24					48			
Konz. (μM)	0	1	2	5	10	0	1	2	5	10	0	1	2	5
1	0,0	0,0		19,1		0,0	37,8	33,0	42,4		4,8	16,6	40,7	41,3
2	1,1	0,0		44,3		4,7	16,4	51,7	50,2	47,3	5,6	33,3	37,1	38,2
3	0,0	0,0	0,0	54,5	76,5	7,0	29,3	41,5	40,8		9,6	37,2	36,4	34,3
4	0,0			36,6	70,3	0,1					0,0			
5	0,0		5,1			0,0				57,1	0,0			
6	5,0		0,0		70,4	0,0				48,3	0,0			
7	0,0													

Nekrosenachweis mittels LDH-Assay, H4IIE-Zellen, CW60, Werte sind angegeben in Prozent bzgl. high control (Abb. 34)

Zeit (h)	6			24h			48		
Konz. (μM)	0	5	10	0	5	10	0	5	10
1	0,00				0,00	31,15	4,80	8,69	43,08
2	1,13	0,00	0,00	0,00	0,79	3,51	5,55	0,00	38,58
3	0,00			4,71	9,85	23,56	9,62	5,12	35,54
4	0,00			6,96		0,00	0,00		
5	0,00	9,27	5,51	0,08			0,00		
6	5,00	0,00	2,77	0,00			0,00		
7	0,00	0,08	0,00	0,00					

Nekrosenachweis mittels LDH-Assay, H4IIE-Zellen, CW165, Werte sind angegeben in Prozent bzgl. high control (Abb. 65)

Zeit (h)	6			24			48			
Konz. (μM)	0	10	0	5	10	25	0	5	10	25
1	0,00	4,31	0,00	0,00	0,00	0,00	4,80	3,20	0,00	
2	1,13	0,00	4,71	3,04	4,66	0,75	5,55	0,00	5,78	
3	0,00	0,00	6,96	6,69	6,80	12,95	9,62	9,33	5,97	
4	0,00		0,08				0,00			2,36
5	0,00		0,00				0,00			0,75
6	5,00		0,00				0,00			1,03
7	0,00									

Nekrosenachweis mittels LDH-Assay, H4IIE-Zellen, CW104, Werte sind angegeben in Prozent bzgl. high control (Abb. 66)

Zeit (h)	6			24			48			
Konz. (μM)	0	10	0	5	10	25	0	5	10	25
1	0,00	16,29	0,00	0,00	0,00		4,80	3,11	9,39	
2	1,13	6,10	4,71	2,36	1,88		5,55	0,00	5,78	

Anhang

3	0,00	0,00	6,96	5,98	3,16	0,00	9,62	0,00	8,94	
4	0,00		0,08				0,00			0,00
5	0,00		0,00			0,00	0,00			0,72
6	5,00		0,00			2,24	0,00			3,02
7	0,00									

Nekrosenachweis mittels LDH-Assay, H4IIE-Zellen, CW90, Werte sind angegeben in Prozent bzgl. high control (Abb. 33)

Zeit (h)	6		24				48			
	0	10	0	5	10	25	0	5	10	25
1	0,00	4,98	0,00	0,00	0,00		4,80	0,43	0,00	
2	1,13	0,00	4,71	0,00	1,10		5,55	5,32	3,33	
3	0,00	0,00	6,96	5,39	9,09	3,21	9,62	8,14	0,00	
4	0,00		0,08				0,00			0,00
5	0,00		0,00			0,00	0,00			0,00
6	5,00		0,00	0,00		0,69	0,00			2,18
7	0,00									

Nekrosenachweis mittels LDH-Assay, H4IIE-Zellen, CW109, Werte sind angegeben in Prozent bzgl. high control (Abb. 67)

Zeit (h)	24				48		
	0	5	10	25	0	5	10
1	0,00	0,00	0,57		4,80	0,00	7,66
2	4,71	2,98	5,50		5,55	0,00	6,20
3	6,96	4,35	6,26	0,00	9,62	0,00	9,58
4	0,08			5,89	0,00		
5	0,00				0,00		
6	0,00			3,93	0,00		

DNA-Strangbruchnachweis mittels Comet-Assay, H4IIE-Zellen, angegeben sind die Kometenlängen in μm (Abb. 35, Abb. 36 und Abb. 69)

Subst.	DMSO		CW104		CW90			CW171a		CW60		H2O2	
	0		10		5	10		2	5	10		1000	
Zeit (h)	3	8	3	8	3	3	8	3	8	3	8	3	8
	1	15	13		12	13		14	21	13	14	14	
2	18	14		14	14	13	14	14	14	14	14		26
3	11	13	14	11	13	15	12	13	20	15	13		36
4	13		13										53
5	12		11			17							38

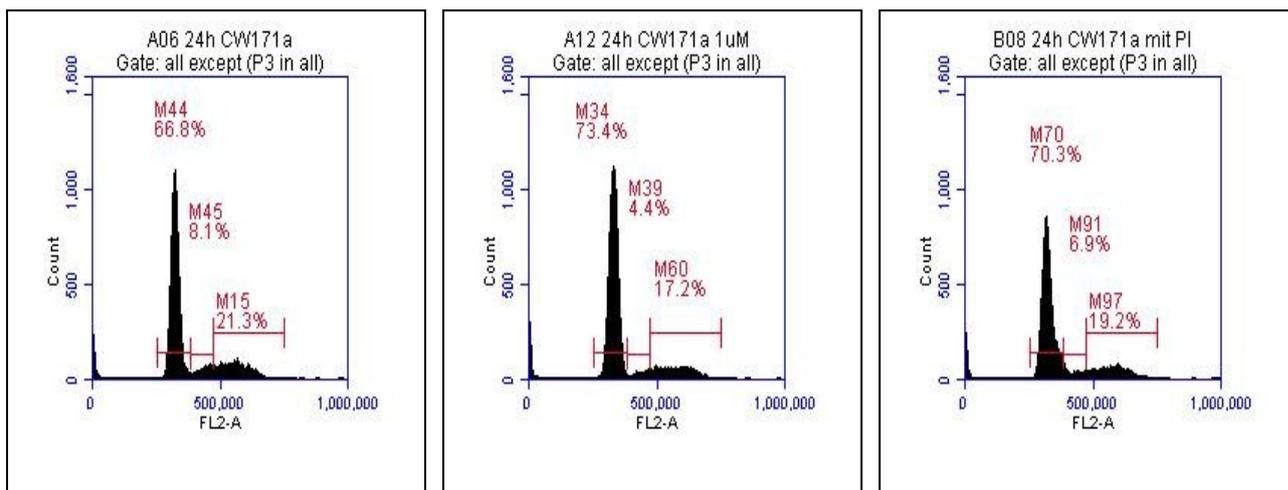
Nachweis radikaler Sauerstoffspezies mittels DCF-Assay, H4IIE-Zellen nach Inkubationen von 1h, angegeben sind die Fluoreszenzanstiege über die Zeit von 1h in relativen rfu (Abb. 37 und Abb. 70)

	Un-behandelt	DMSO	H2O2 0,5mM	H2O2 1mM	CW60 10µM	CW 171a 5µM	CW90 25µM	CW104 10µM	CW109 10µM	CW165 25µM
1	346375	364409	419481	615835	307451	359035	370354	259697	277838	219623
2	399337	425417	723775	930115	340105	369414	381736	365422	360625	310826
3	428977	361507	542086	762258	290812	302188	342324	309304	281583	311360

Zellzyklusanalyse mittels FACS-Analyse, H4IIE-Zellen nach 24h Inkubation, angegeben sind die Werte in Prozent der Zellen an den gezählten Gesamtzellen (Abb. 71)

Subst.	DMSO			CW60			CW109			CW104			CW171a		
Konz. (µM)	0			5			10			10			1		
ZZ-Phase	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
1	67,3	7,7	19,1	53,7	6,7	22,5	47,1	7,4	26,1	55,4	7,9	22,0	66,8	8,1	21,3
2	71,6	7,1	16,2	52,3	5,9	19,6	51,3	8,6	27,5	57,3	7,2	23,2	73,4	4,4	17,2
3	68,2	8,0	20,7	61,1	8,0	20,6	48,4	9,4	26,6	52,3	9,3	26,4	70,3	6,9	19,2

Zellzyklusanalyse mittels FACS-Analyse, H4IIE-Zellen nach 24h Inkubation CW171a, dargestellt sind die Histogramme (Abb. 71)

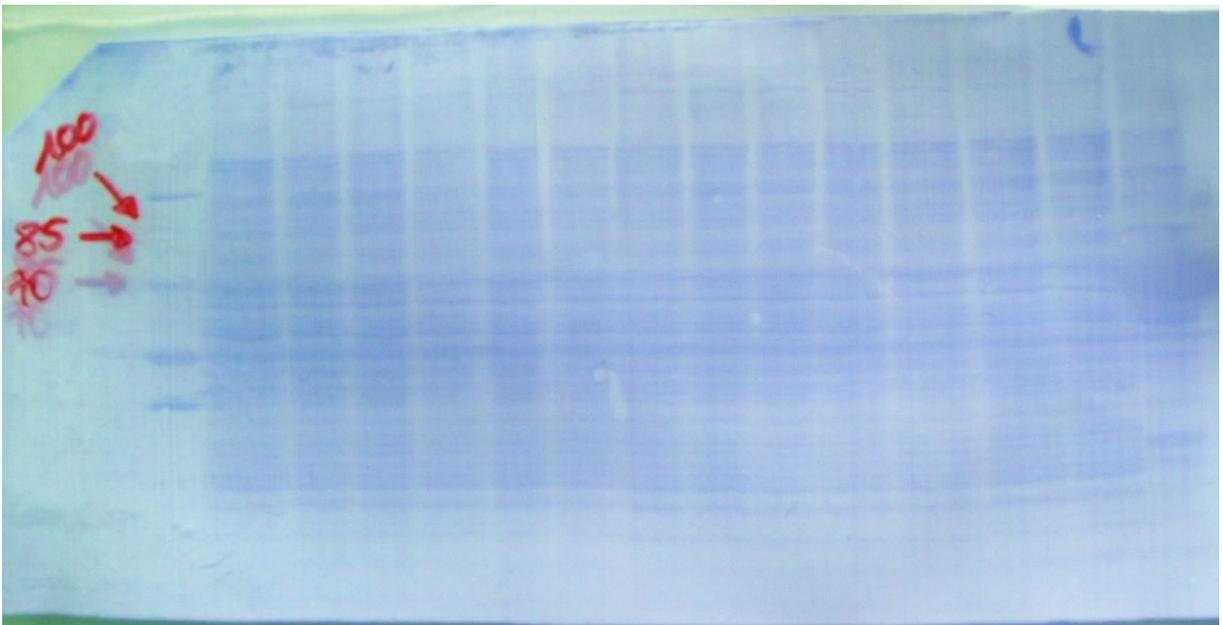


Untersuchung des PI3K-Akt-Signalweges:



Coomassie gefärbte Membran des pAkt-Blots Nr.1 (von links nach rechts: Marker-DMSO-CW60 1h- CW60 4h- CW60 24h- CW104 1h- CW104 4h- CW104 24h- CW109 1h- CW109 4h- CW109 24h- CW171a – CW90- Marker)

Untersuchung des Nrf2/ARE-Signalweges:



Coomassie gefärbte Membran des Blots Nr. 1 (von links nach rechts Marker- DMSO- CW60 1h- CW60 4h- CW60 24h- CW104 1h- CW104 4h- CW104 24h- CW109 1h- CW109 4h- CW109 24h- CW171a 6h- CW171a 24h- CW90 24h- tBHQ)

7.3 Posterpräsentation:

S. Josch¹, C. Wetzel², P. Böhler¹, S. Havermann¹, M. Schmuck¹, K. Dach¹, P. C. Kunz², W. Wätjen¹ (2011)

¹Institute of Toxicology, Heinrich-Heine University, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany,

²Institute of Inorganic Chemistry and Structural Chemistry, Inorganic Chemistry Department, Heinrich-Heine University, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany

Cytotoxic effects of gold complexes in different tumour cell lines

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Supplement 1, Vol. 383, March 2011, P452

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Frankfurt a. M., Deutschland

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mit zuerst bei Herrn Prof. Dr. Wim Wätjen bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit im Institut für Toxikologie an der Heinrich-Heine-Universität anzufertigen, und dessen Türe immer offen stand. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Fritz, der sich Zeit genommen hat für die Diskussion meines Posters sowie für Verbesserungsvorschläge und Anregungen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. P. C. Kunz und seiner Arbeitsgruppe bedanken, dass sie mir die Gold(I)-Komplexe zur Verfügung gestellt haben.

Mein Dank gilt allen, die mich in irgendeiner Weise während und bei meiner Arbeit unterstützt haben, ob durch gute Tipps, Verbesserungsvorschläge oder aufbauende Worte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner zweiten Betreuerin Susannah Havermann für die Einführung in die Methoden der Zellkultur, für die guten Ratschläge und beruhigenden Worte, die mich in so manch turbulenter Situation wieder auf den Boden der Tatsachen gebracht haben.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Philip Böhler bedanken, mit dessen Hilfe ich nicht nur die Methode der DNA-Leiter erlernt habe, sondern der mir sonst auch oft zur Seite stand und jede Frage geduldig beantwortet hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Ingrid Köhler, die mich in die Geheimnisse des Comet-Assays eingeweiht hat und bei Kerstin DeMezzo, die mir nicht nur im Labor bei Western Blots mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern mir auch mit Bestellungen und Telefonaten weitergeholfen hat. Ich bedanke mich auch bei Frau Dr. Yvonne Chovolou. Sie hat mir einige Male gute Ratschläge erteilt und bei der Auswertung der Zellzyklusanalyse am FACS geholfen. Daniela Ackermann danke ich für die lustigen Unterhaltungen im Labor und im Büro, die mich während der Inkubationszeiten aufheiterten.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen geduldigen Eltern, die mich immer unterstützt und in jeder Lebenslage zu mir gestanden haben. Vielen Dank für die Versorgung mit aufbauenden Worten und süßer Nervennahrung während meiner Zeit im Labor und des Verfassens der Dissertation zuhause!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Sonja Josch

Erkrath, den 17.5.2013