

**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl**

**Antioxidative Wirkung redoxaktiver Nanopartikel auf
dermale Fibroblasten – eine potentielle stromale Therapie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Kirsten Teuber-Hanselmann

2014

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brenneisen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Suschek

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, Reilly CM, Zanger K, Stahl W, Das S, Seal S, Brenneisen P. (2011): Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials*. 32(11):2918-29.

von Montfort C, Alili L, Teuber-Hanselmann S, Brenneisen P (2015): Redox-active cerium oxide nanoparticles protect human dermal fibroblasts from PQ-induced damage. *Redox Biology* 4(2015):1-5

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Tumor-Stroma-Interaktion	12
1.1.1 Funktion und Aufbau der menschlichen Haut	12
1.1.2 Mesenchymal-mesenchymale Transition: vom Fibroblasten zum Myofibroblasten	15
1.1.3 Signaltransduktion durch TGF β 1	16
1.1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Oxidativer Stress	19
1.1.5 Karzinogenese und Tumor-Stroma-Interaktion	22
1.2 Nanopartikel in Forschung und Medizin	26
1.2.1 Nanomedizin – Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie	26
1.2.2 Ceroxid und Ceroxid-Nanopartikel	28
1.3 Fragestellung	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Agenzien	31
2.1.2 Puffer und Lösungen	33
2.1.3 Primäre Antikörper	35
2.1.4 Sekundäre Antikörper	35
2.1.5 Kits	35
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	36
2.1.7 Zellen	36
2.1.8 Geräte	36
2.1.9 Software	37
2.2 Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln	38
2.3 Zellen und zellbiologische Methoden	39
2.3.1 Plattenepithelkarzinomzellen	39
2.3.2 HDF – Humane dermale Fibroblasten	39
2.3.3 Isolierung von Fibroblasten aus Biopsien	39

2.3.4	Kultivierung der Zellen	40
2.3.5	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	41
2.3.6	Mykoplasmentest	41
2.3.7	Allgemeine Versuchsbedingungen	42
2.3.8	Herstellung von konditioniertem Medium/Zellüberstand (CM)	42
2.3.9	Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)	43
2.3.10	Proteinbestimmung nach Lowry	44
2.3.11	Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.3.12	Zell-Proliferations-Assay (BrdU)	44
2.3.13	Populationsverdopplungszeit	45
2.3.14	Messung des oxidativen Status der Zelle (GSH-GSSG-Verhältnis)	46
2.3.15	Superoxid-Nachweis mittels Dihydroethidium (DHE)	47
2.3.16	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dichlorofluorescein	48
2.3.17	Aktivitätsmessung der Laktat-Dehydrogenase	48
2.3.18	Aktivität des Apoptoseenzym Caspase-3	49
2.3.19	Invasionsassay	50
2.3.20	Herstellung von Dermis- und Hautäquivalenten	52
2.4	Biochemische Verfahren	53
2.4.1	RNA-Isolierung und Reverse Transkription	53
2.4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
2.4.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.4.3	Western Blot (semi-dry) als immunologischer Proteinnachweis	56
2.4.4	Immunologischer Nachweis oxidierter Proteine (Oxyblot)	57
2.5	Statistik	58
2.6	Ethikkommission	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Charakterisierung der Ceroxid-Nanopartikel	59
3.1.1	Größe der Ceroxid-Nanopartikel	59
3.1.2	Aufnahme und Verteilung der CNP in Zellkultur und <i>in vivo</i>	61
3.1.3	Toxizität verschiedener Ceroxid-Nanopartikel	66
3.2	CNP und die Bildung des Myofibroblasten	68
3.2.1	CNP verhindern die Bildung des Myofibroblasten	68
3.2.2	CNP verhindern die MMT in Dermis- und Hautäquivalenten	71

3.3	Reaktive-Sauerstoffspezies- (ROS-)modulierende Wirkung der CNP	73
3.3.1	CNP vermindern den intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	74
3.3.2	Die CNP-vermittelte Verminderung des ROS-Levels führt zu einer Erhöhung des Verhältnisses GSH:GSSG	78
3.3.3	Carbonylierung von Proteinen durch TGFβ1-induzierte ROS und die Wirkung von CNP	84
3.3.4	CNP-vermittelte Reduzierung von Superoxid führt zu verminderter Zellnekrose	86
3.3.5	CNP-vermittelte Reduzierung von Superoxid und H ₂ O ₂ führt zu verminderter apoptotischer Aktivität der Zellen	88
3.4	Zellbiologische Charakterisierung und deren Auswirkungen auf die Tumor-Stroma Interaktion	93
3.4.1	CNP steigern die Zellproliferation	93
3.4.2	CNP vermindern die Aktivität der PKC	97
3.4.3	CNP vermindern die Adhäsionsfähigkeit von Fibroblasten	99
3.4.4	CNP vermindern die Tumordinvasion von SCL-1-Zellen	101
4	Diskussion	105
4.1	CNP und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	105
4.1.1	CNP wirken antioxidativ durch SOD- und Katalase-mimetische Aktivität	105
4.1.2	CNP verhindern den sowohl Apoptose als auch Nekrose	109
4.2	CNP und zellbiologische Parameter	111
4.2.1	Aufnahmemechanismen	111
4.2.2	CNP erhöhen die Proliferation von Fibroblasten	113
4.2.3	CNP vermindern die Expression von Adhäsionsmolekülen	114
4.2.4	CNP besitzen einen protektiven Effekt auf Fibroblasten bei gleichzeitiger Chemotherapie	115
4.3	CNP und Tumor-Stroma-Interaktion	118
4.3.1	CNP verhindern die Bildung des Myofibroblasten	118
4.3.2	CNP verhindern die Tumordinvasion	120
4.3.3	CNP wirken in vielerlei Hinsicht ähnlich wie Antioxidantien	121
5	Perspektiven	122

6 Zusammenfassung	124
7 Literaturverzeichnis	125
Danksagung	135
Eidesstattliche Erklärung	136

Abkürzungsverzeichnis

α SMA	α -smooth muscle actin
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
μ M	μ Mol/L
μ m	Mikrometer
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumine
BSO	Buthionin-Sulfoximin
cisPlatin	Diammindichloridoplatin
CNP	Ceroxid-Nanopartikel
Dex-CNP	mit Dextran gecoatete Nanopartikel
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Eagle's Medium, nach Dubblecco's Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-CNP	FITC-gekoppelte Nanopartikel
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
H ₂ DCF-DA	2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O-CNP	in Wasser gelöste Nanopartikel
HBSS	Hanks buffered saline solution
HCl	Salzsäure
HDF	Humane dermale Fibroblasten
HE	Hematoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IL-6	Interleukin 6
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogencarbonat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MeOH	Methanol
MF	Myofibroblast
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
mm	Millimeter
mM	mMol/l
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMT	Mesenchymal-mesenchymale Transition
MTT	Tetrazoliumsalz3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH/H ⁺	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
nM	nMol/L
OD	optische Dichte
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKC	Proteinkinase C
PQ ²⁺	Paraquat
RFU	relative fluorescence units
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
rTGF-β1	rekombinanter Transforming growth factor beta 1
SCL-1	Plattenepithelkarzinomzellen der Linie SCL-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
siRNA	small interference RNA
SOD	Superoxid-Dismutase
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) Triton X100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TIMP-1	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Tumor-Stroma-Interaktion

1.1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die menschliche Haut besitzt als unser größtes Organ vielfältige Funktionen. Sie ist wichtig für die Sinneswahrnehmung, die Temperaturregulation, die Synthese von Vitamin D, stellt den Schutz vor thermischen, mechanischen und chemisch-toxischen Einflüssen sowie vor UV-Strahlung dar und bildet eine Barriere für Erreger (z.B. Bakterien und Viren) aus der äußeren Umwelt. Neben dieser Schutzfunktion ist die Haut aber auch selbst anfällig für Krankheiten, so kann beispielsweise eine länger andauernde Strahlenexposition zur Ausbildung von Hauttumoren führen (Junqueira, 1991, Welsch, 2003, Terhorst, 2009).

Man unterscheidet zwei verschiedene Hauttypen, die Leistenhaut und die Felderhaut. Die Leistenhaut befindet sich an Handinnenfläche und Fußsohle. Die oberflächliche Struktur ist bei jedem Menschen individuell ausgeprägt, sodass ein Fingerabdruck immer einem Individuum zugeordnet werden kann. Die Felderhaut ist der Hauttyp, der den größten Teil des Körpers bedeckt. Die Haut ist unabhängig vom Hauttyp aus mehreren Schichten aufgebaut: Der Kutis, die aus Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Corium, Lederhaut) besteht, und der Subkutis (Junqueira, 1991, Welsch, 2003, Fritsch, 2009, Terhorst, 2009).

Die Epidermis ist die oberflächliche Schicht der Haut und besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel. Dieses setzt sich zur Oberfläche hin aus mehreren Schichten zusammen: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum. Dabei sind Stratum basale, Stratum spinosum (zusammengefasst als Stratum germinativum, der Regenerationsschicht) und Stratum granulosum aus lebenden Epithelzellen aufgebaut, während Stratum lucidum, welches sich nur in der Leistenhaut findet, und Stratum corneum aus toten Epithelzellen bestehen. Die Epithelzellen der Haut, die Keratinozyten, durchwandern innerhalb von 4 Wochen alle Schichten der Epidermis. Gebildet durch Teilung und Differenzierung aus den Stammzellen im Stratum basale, wandeln sie sich erst zu Zellen des Stratum spinosum um und beginnen dann ihre ‚Wanderung‘ durch die einzelnen Strati der Haut. In der obersten Schicht des Stratum corneum angekommen, werden sie abgeschilfert (Welsch, 2003). Die kubischen Keratinozyten des Stratum basale besitzen auf der basalen Seite schmale Fortsätze, mit denen sie sich in dem darunter liegenden

Bindegewebe verankern und damit die Epidermis mit der Dermis fest verbinden. Unter diesen sogenannten Basalzellen befinden sich die Stammzellen, die zur Teilung befähigt sind, und der immerwährenden Neubildung der Haut dienen. Die Basalschicht ist über Hemidesmosomen an der Basallamina, die Dermis und Epidermis strukturell trennt, befestigt. Das dreischichtige Stratum granulosum (Körnerzellschicht) besitzt abgeflachte Keratinozyten mit basophilen Granula, die Keratohyalin enthalten. Zusätzlich finden sich hier Lamellenkörper, die Proteine und verschiedene Lipide enthalten. Diese Lipide sind, nach Abgabe in den Interzellulärraum, zuständig für den wasserabweisenden Effekt der Haut, der sie und damit den Körper vor Austrocknung schützt. Das Stratum lucidum (Glanzschicht), das nur in der Leistenhaut vorkommt, stellt eine Übergangsschicht dar, in der die Keratinozyten rasch durch Apoptose zu Grunde gehen. Im daran anschließenden Stratum corneum (Hornschicht) finden sich keine lebenden Zellen mehr; es besteht aus mehreren Lagen abgestorbener Epithelzellen. Diese Schicht ist zuständig für die Aufrechterhaltung der Barriere gegenüber der Außenwelt und des inneren Milieus (Welsch, 2003, Terhorst, 2009).

Neben den Keratinozyten findet man auch eine recht große Anzahl an Melanozyten. Diese breiten sich im Interzellulärraum zwischen den Keratinozyten aus, sind untereinander aber nicht durch Zell-Zell-Kontakte verbunden. Sie produzieren in ihren Granula Melanin. Dieses kann von Keratinozyten nicht synthetisiert werden, ist aber wichtig für den Schutz der DNA vor Licht, sodass Melanin von den Melanozyten in den Intrazellulärraum sezerniert und in die Keratinozyten aufgenommen wird. Des Weiteren finden sich vor allem in den tieferen Schichten der Epidermis noch vereinzelt Lymphozyten (meist CD8⁺), die der ersten Abwehr von eingedrungenen Erregern dienen, und Merkel-Zellen, die als Mechanosensoren der Sinneswahrnehmung dienen. Im Stratum lucidum ist zusätzlich noch ein weiterer Zelltyp anzutreffen: Die Langerhans-Zellen, die der Phagozytose von eingedrungenen Erregern und der Antigen-Präsentation dienen (Junqueira, 1991, Welsch, 2003, Fritsch, 2009).

Die Basalmembran besteht (von außen nach innen) aus Lamina lucida, Lamina densa und Lamina fibroreticularis. Sie sind lichtmikroskopisch nicht voneinander zu unterscheiden, bilden zusammen aber eine so deutliche Schicht aus, so dass die Basalmembran als Ganzes im Lichtmikroskop sichtbar wird. Lamina lucida und Lamina densa bilden zusammen die Basallamina, die vornehmlich von dem Epithel selbst ausgebildet wird und vor allem aus Typ-IV-Kollagen und Laminin besteht. Das Bindegewebe direkt unterhalb der Basallamina wird als Lamina fibroreticularis bezeichnet und wird durch Typ-III- und Typ-VII-Kollagen gebildet. Sie verbindet die Basallamina mit der Dermis (Junqueira, 1991, Welsch, 2003).

Die Dermis stellt das Bindegewebe der Haut dar, dient damit der Speicherung von Wasser, dem Schutz vor Verletzungen und gibt der Haut Festigkeit und Elastizität. Die Dermis besteht aus zwei Schichten, dem Stratum papillare, das sich von unten an die Basalmembran und damit an die Epidermis anschließt, und dem Stratum reticulare. Das Stratum papillare besteht vor allem aus Kollagen Typ III und ist reich vaskularisiert. Diese Schicht bildet viele Bindegewebspapillen aus, die der Verankerung von Dermis und Epidermis dienen. Zudem finden sich hier Meißner-Tastkörperchen, die das Tastempfinden vermitteln (Welsch, 2003).

Im Stratum reticulare findet sich vor allem Typ-I-Kollagen und dicke elastische Fasern. Diese Schicht ist also für die Elastizität der Haut verantwortlich. Hier finden sich aber auch die typischen Bindegewebszellen, die Fibroblasten, die eine entscheidende Rolle bei Synthese und Abbau von Strukturproteinen der Dermis, wie z.B. Glykoproteine, Proteoglykane und Elastin, spielen (Junqueira, 1991, Welsch, 2003, Terhorst, 2009).

Die Subkutis, die sich unterhalb der Dermis befindet, besteht vornehmlich aus Fettgewebe, dessen Adipozyten durch schmale Bindegewebssepten unterteilt werden. Dieses Fettgewebe hat an verschiedenen Körperstellen verschiedene Funktionen: An der Fußsohle dient es z.B. als Druckpolster (Baufett), an anderen Stellen, z.B. der Hüfte, dient es als Wärmeisolator und Energiespeicher (Depotfett). Neben Blut- und Lymphgefäßen finden sich in der Subkutis zahlreiche Nervenendigungen und Vater-Pacini-Körperchen, die der Druck- und Vibrationswahrnehmung dienen (Junqueira, 1991, Welsch, 2003, Terhorst, 2009).

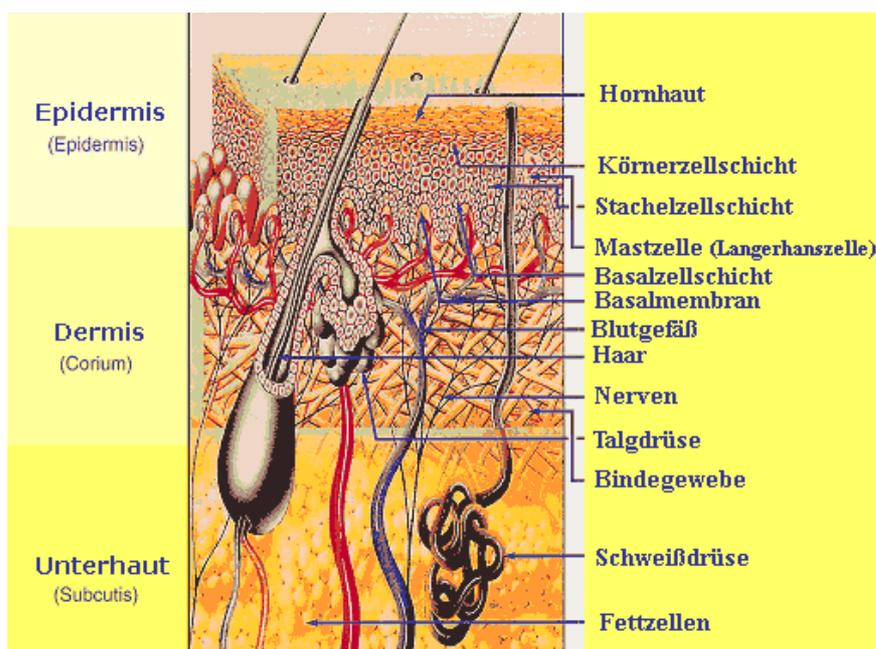


Abb. 1: Der Aufbau der menschlichen Haut

[Quelle: <http://www.hautstadt.de/hs/gfx/infocenter/haut/wissenswertes/hautschnitt.gif>]

1.1.2 Mesenchymal-mesenchymale Transition: vom Fibroblasten zum Myofibroblasten

Fibroblasten sind ortsständige Zellen des Bindegewebsstromas und kommen in allen Geweben vor. Da sie maßgeblich an der Synthese von Kollagen Typ I und Typ IV beteiligt sind, nehmen sie eine wichtige Rolle im Rahmen der Organisation und Strukturierung der extrazellulären Matrix (EZM) ein (Kunz-Schughart et Knuechel, 2002 [II]). Sie sind zuständig für den Auf- und Abbau von Strukturproteinen, wie z.B. Prokollagen und Elastinen, bzw. Interzellulärsubstanzen, deren wichtigstes Grundgerüst die Glukosaminoglykane darstellen. Die Strukturproteine werden an den Extrazellulärraum abgegeben, wo sie sich zu Mikrofibrillen zusammenlagern (Junqueira, 1991).

Andererseits sind Fibroblasten auch für den Abbau der Kollagenmatrix zuständig; sie produzieren Kollagenasen, die den Kollagenabbau induzieren. Diese Kollagenasen sind Matrix-Metalloproteinasen, deren Aktivität unter anderem durch Mitglieder der TIMP (,Tissue inhibitors of Matrix-Metalloproteinases')-Familie reguliert wird, die ihrerseits auch von Fibroblasten synthetisiert werden.

Zusätzlich sind die Fibroblasten für die Organisation und Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität von Epithelzellen verantwortlich, sind durch die Produktion der EZM in die Wundheilung integriert und fungieren als regulierende Zellen in Entwicklungsprozessen (Kunz-Schughart et Knuechel, 2002 [II]). Um diese Aufgaben koordinieren zu können, müssen Fibroblasten untereinander kommunizieren. Diese Kommunikation wird durch ,gap junctions' vermittelt und kann durch von Tumorzellen sezernierte lösliche Faktoren in Fibroblasten verhindert werden (Stuhlmann et al., 2003).

Fibroblasten können unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, wie dem ,transforming growth factor β 1' (TGF β 1), zu sogenannten Myofibroblasten transdifferenzieren. Dieser Vorgang wird als mesenchymal-mesenchymale Transition (MMT) bezeichnet. Myofibroblasten zeichnen sich durch eine Expression von , α -Smooth-Muscle-Actin' (α SMA) aus, einem Protein, das am Mikrofilamentsystem der Zelle durch Reorganisation des Aktins gebildet wird und dadurch zu einer Kontraktilität der Bindegewebszellen führt (Cat et al., 2006). Diese Eigenschaft ist essentiell im Rahmen der Wundheilung, da Myofibroblasten zu einer Wundkontraktion und somit schnelleren Abheilung führen. Zusätzlich bewirken sie eine Migration von Leukozyten, die im weiteren Verlauf eine (schlimmere) Infektion der Wunde verhindern sollen (Desmoulière et al., 2004). Nach dem primären Wundverschluss gehen

Myofibroblasten in die Apoptose oder werden in eine inaktive Form überführt. Findet dieser Prozess nicht statt, kommt es zu einer fibrotischen Umwandlung der betroffenen Region (Desmoulière et al., 2004). Unter physiologischen Bedingungen finden sich Myofibroblasten demnach bei der Bildung von Narbengewebe, bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen und Granulationsgewebe. Aufgrund dieser Tatsache werden verschiedene Subpopulationen von Myofibroblasten beschrieben, die sich anhand ihrer Zytoskelettfilamente unterscheiden lassen (Kunz-Schughart et Knuechel, 2002 [I], Desmoulière et al., 2004).

Myofibroblasten produzieren und sezernieren verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. ‚Transforming Growth Factor $\beta 1$ ‘ und α (TGF $\beta 1$, $-\alpha$), ‚Hepatocyte Growth Factor‘ (HGF), ‚Plateled Derived Growth Factor‘ (PDGF), ‚Vascular Endothelial Growth Factor‘ (VEGF), ‚Endothelial Growth Factor‘ (EGF) und GM-CSF, aber auch Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Proteine wie ‚Tissue factor‘ (TF) und führen über diese zu vermehrter Zellstimulation, erhöhter Koagulabilität und Angiogenese, die für die Wundheilung unabdingbar sind. Neben diesen physiologisch wichtigen Funktionen, besitzen sie aber auch weitere Eigenschaften, durch die sie in den Fokus von Therapieansätzen bei Krebserkrankungen gerückt sind. Myofibroblasten sind in die frühe Tumorentstehung involviert und durch Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren wesentlich an der Tumordinvasion beteiligt (Kunz-Schughart et Knuechel, 2002 [II], Cat et al., 2006). Einerseits sind sie in die Neoangiogenese, die essentiell für die Tumorentwicklung ist, involviert, andererseits führen sie durch Clusterbildung um den Tumor zur Abschirmung der entarteten Zellen vor Immunzellen wie T-Lymphozyten und Makrophagen (Kunz-Schughart et Knuechel, 2002 [II], Desmoulière et al., 2004). Weiterhin führt eine gesteigerte Synthese von MMP-2 der Myofibroblasten zu einem Abbau von Basalmembranen (Desmoulière et al., 2004), sowie die gesteigerte Synthese von Typ-IV-Kollagenase, Gelatinase-A und -B und TIMP-2 zu einem vermehrten Abbau der Tumor-umgebenden EZM, was wiederum die Tumordinvasion vereinfacht.

1.1.3 Signaltransduktion durch TGF β 1

Der 25 kDa große transformierende Wachstumsfaktor TGF β 1 stellt ein wichtiges Stimulans der MMT dar und wird durch Tumorzellen sezerniert. Hier soll nun ein vereinfachter Überblick über die TGF β -Familie, deren Synthese und Wirkmechanismus gegeben werden.

Die TGF β -Familie verfügt über eine Vielzahl von sich in ihrer Polypeptidstruktur ähnelnden Wachstumsfaktoren, die für eine Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Motilität oder Adhäsion verantwortlich sind. Das für die MMT verantwortliche TGF β 1 ist ein multifunktionelles Zytokin, das während zahlreicher Erkrankungen produziert wird und bei übermäßiger Aktivierung zu Vernarbungsprozessen führen kann (Desmoulière, 2004). Durch die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die für die Tumorinvasion essentiell sind, nimmt auch TGF β 1 in den Prozessen des Tumorwachstums und der Tumorausbreitung eine wichtige Rolle ein. Eine Sekretion von TGF β kann – je nach Zelltyp - durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel durch Steroide oder Wachstumsfaktoren wie EGF, erfolgen (Desmoulière, 2004).

TGF β 1 spielt neben den Transdifferenzierungsprozessen auch eine entscheidende Rolle bei der Transformation von dem den Tumor umgebenden stromalem Gewebe. Er wirkt schon in nanomolaren Konzentrationen chemotaktisch auf Fibroblasten (Desmoulière, 2004).

TGF β 1 tritt in fünf verschiedenen Isoformen auf. Die häufigste Isoform stellt die 390-AS-lange Form dar. Nach Transkription und Translation kommt es zu einer Dimerisierung zweier TGF β 1-Proteine, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Diese Dimere können mit einem spezifischen Protein, dem ‚latent TGF β binding protein-1‘ (LTBP-1), eine kovalente Bindung eingehen (Brunner et Blakytyn, 2004).

Biologisch inaktives TGF β wird als Homodimer mit LTBP-1 als latenter Komplex von einer Größe von 290 kDa sezerniert. Diese latenten TGF β 1-Komplexe können über nicht-kovalente Bindungen mit assoziierten Peptiden, den ‚Latency-associated-Peptides‘ (LAP), eine Bindung mit α v β 6-Intgerin eingehen, deren β 6-Untereinheit sich daraufhin mit dem Aktinfilamenten des Cytoskeletts verbinden kann. Dieser Komplex aus latentem TGF β 1, α v β 6-Integrin und dem Cytoskelett führt zu einer Konformationsänderung des latenten

Komplexes, so dass bioaktives TGF β 1 aus seiner kovalenten Bindung frei wird, um an TGF β -Rezeptoren zu binden.

Die TGF β -Rezeptoren werden in zwei Gruppen, Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, unterteilt. Es handelt sich um Glykoproteine mit einer Größe von 50 und 70 kDa mit einem 500 AS großen ‚Core-Peptid‘. Die extrazelluläre Region ist mit ihren 150 AS relativ kurz (Wrana et al., 1994). Bioaktives TGF β 1 führt zu einer Zusammenführung des Typ-I- und des Typ-II-Rezeptors durch Bildung eines heterotetrameren Rezeptor-Komplexes, wobei TGF β 1 spezifisch an Typ-II-Rezeptoren bindet und damit eine Rekrutierung des Typ-I-Rezeptors bedingt. Durch eine ligandenabhängige Phosphorylierung eines cytoplasmatischen Serinrestes (Ser165) des Typ-I-Rezeptors, die durch den Typ-II-Rezeptor induziert wird, wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die die Phosphorylierung verschiedener Smad-Proteine umfasst (Mathews und Vale, 1993).

Smad-Proteine, die unter anderem Substrate der Typ-I-Rezeptorkinasen darstellen, spielen eine entscheidende Rolle in der Transduktion von Signalen zu bestimmten Zielgenen im Zellkern. Dabei werden drei Gruppen unterschieden: R-Smads, die direkt mit den Rezeptorkinasen interagieren, wie beispielsweise Smad 2 und 3, Smads, die während der Signalkaskade mit den R-Smads interagieren, und I-Smads (beispielsweise Smad 6 und 7), die die Signaltransduktion der anderen beiden Gruppen und die TGF β 1-Wirkung verhindern (Dobaczewski et al., 2011).

Im inaktiven Zustand liegen Smads als Homo-Oligomere im Cytoplasma der Zelle vor; nach Assoziation mit dem Rezeptor kommt es zu einer Phosphorylierung der Serinreste am C-Terminus, was eine Dissoziation der R-Smads vom Rezeptor bewirkt. Phosphoryliertes Smad 2/3 assoziiert mit Smad 4, so dass ein heteromerer Komplex entsteht (Kretzschmar et al., 1997), was einen Transport in den Zellkern bewirkt, wo er durch Bindung an den Promotor die Transkription initiiert (Abb. 2).

De Wever und Mareel haben 2002 beschrieben, dass die Transdifferenzierung von Fibroblasten über den Smad-vermittelten Signalweg induziert wird. Infolge der Transkription kommt es zur Expression des Proteins α SMA am Cytoskelett der Zelle, was ihn zum Myofibroblasten macht.

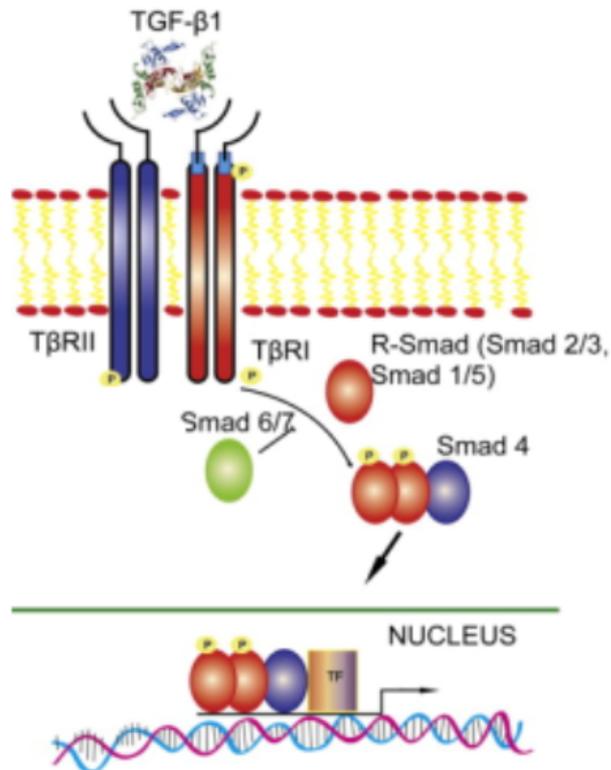


Abb. 2: Die von TGFβ1 ausgelösten Signalkaskaden. TGFβ1 bindet an die TGFβ-Rezeptoren I und II (TβRI/II), welche nach Dimerisierung und intrazellulärer Phosphorylierung unter anderem zur Aktivierung der Smad-Kaskade führt. Phosphorylierte und mit Smad4 assoziiertes Smad2/3 kann als heteromeres Komplex nach Transport in den Zellkern an die Promotorregion gebunden werden und eine Transkription initiieren.

[verändert nach: Dobaczewski et al., 2011]

1.1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Moleküle, die sich vom molekularen Sauerstoff ableiten, und die abhängig von ihrer Konzentration und durch ihre hohe Reaktivität zu Zellschäden führen oder als ‚second messenger‘ fungieren können. Sie sind damit einerseits ein natürlicher Abwehrmechanismus phagozytotischer Zellen, wie z.B. Makrophagen, gegenüber Pathogenen (‚respiratory burst‘), wie beispielsweise Bakterien (Forman et al., 2002), andererseits spielen sie aber auch eine wichtige Rolle in Signaltransduktionskaskaden und einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse (Chiarugi, 2005), wie dem Zellzyklus, der Apoptose oder der Zellalterung (Johann et al., 2005). Eine übermäßige Produktion von ROS

wird mit einer Vielzahl an Krankheiten wie neurodegenerativen Prozessen, kardiovaskulären Schädigungen wie Koronarer Herzkrankheit (KHK) und auch mit Krebs in Verbindung gebracht (Sies, 1991).

Während des aeroben Stoffwechsels in der Zelle entstehen ROS vornehmlich während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien als unerwünschte Nebenprodukte, wie zum Beispiel das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$).

ROS können in freie Radikale, wie beispielsweise das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (HO^{\cdot}), Peroxylradikale (ROO^{\cdot}) und Alkoxyradikale (RO^{\cdot}), sowie nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) und organische Peroxide ($ROOH$) eingeteilt werden (Sies 1993, Sies 1997, Brenneisen et al., 2002). Radikale sind hochreaktive Atome oder Moleküle, die mindestens ein ungepaartes Elektron auf ihrem äußeren Orbital besitzen. Sie sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität sehr kurzlebig. Der ROS-Gehalt in der Zelle kann auch durch Wachstumsfaktoren, wie TGF β 1, und Zytokine gesteigert werden. TGF β 1 führt in Fibroblasten über eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits die NAD(P)H-Oxidase aktiviert, zu einer gesteigerten Superoxidanion-Produktion (Cat und Brenneisen, 2009). Auch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine können über eine Hemmung der Expression antioxidativer Enzymsysteme zu einem gesteigerten ROS-Gehalt in der Zelle führen (Islam et al., 1997).

ROS entstehen dementsprechend endogen in allen aeroben Organismen als Nebenprodukt des Metabolismus. Deswegen verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen, die ROS eliminieren können, und unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Eliminierung von ROS (Gutteridge, 1993). Oxidativer Stress (Sies, 1986) entsteht in der Zelle durch Akkumulation von ROS. Neben dieser endogenen Produktion können ROS auch durch exogene Quellen verursacht werden, wie beispielsweise durch ultraviolette Strahlung, die mit intrazellulären Chromophoren interagiert (Brenneisen et al., 1998, 2000). Weitere exogene ROS-Quellen sind ionisierende Strahlung, Xenobiotika sowie virale und bakterielle Infektionen (Pagano et al., 2002). Folgen von oxidativem Stress können Schädigungen von Makromolekülen wie Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen sein. Lipide sind sehr sensitiv gegenüber ROS. ROS können Lipidradikale von Membranlipiden abspalten, was zu einer Anhäufung von Lipidhydroperoxiden in der Zelle führt und damit die Lipidperoxidation in der Zelle steigert (Morlière et al., 1991). Diese Lipidperoxidation kann zu einer veränderten Permeabilität von Membranen führen (Girotti et al., 1998). ROS-bedingte Schäden der DNA sind beispielsweise die Bildung von DNA-Addukten und

Strangbrüche, welche zu Mutationen und Deletionen führen können, die wiederum eine Tumorgenese initiieren können (Burkhardt et al., 2001). Weiterhin können reaktive Sauerstoffspezies zu einer Proteinoxidation führen, wie zum Beispiel der Oxidation von Thiolgruppen in Cystein oder zu einer Einführung einer Aldehyd- oder Ketogruppe (Carbonylierung) in die Seitenketten der Aminosäuren Lysin, Arginin, Prolin oder Threonin (Stadtman, 1993). Die Thioloxidation kann über eine Reduktion mit Glutathion (GSH) rückgängig gemacht werden, jedoch stellt die Carbonylierung von Proteinen eine irreversible Schädigung dar. Eine oxidative Schädigung von Proteinen kann zu einer veränderten Aktivität oder zum völligen Funktionsverlust des Proteins führen. Sind beispielsweise Strukturproteine von einer solchen Modifikation betroffen, kann dies zu einer verstärkten Aggregation der entsprechenden Proteine führen. Eine Ablagerung solcher Aggregate geschädigter Proteine ist Teil der Alzheimer-Pathologie (β -Amyloid-Plaques) (Choi et al., 2005).

Um oxidativem Stress entgegen zu wirken, besitzt die Zelle verschiedene Abwehrmechanismen, die ROS detoxifizieren können. Diese Mechanismen beinhalten alle die Bereitstellung von Antioxidantien, Substanzen, die die Oxidation durch das Oxidans verhindern oder signifikant inhibieren (Halliwell und Gutteridge, 1989). Antioxidantien liegen dabei in deutlich niedrigeren Konzentrationen als das Oxidans vor. Unterschieden werden enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien. Wichtige antioxidative Enzyme sind die Superoxid-Dismutasen (SOD), die O_2^- zu weniger reaktionsfreudigem H_2O_2 reduzieren, sowie die Katalasen und die Glutathion-Peroxidasen (GPx), die wiederum H_2O_2 in H_2O reduzieren. Es sind drei Isoformen der SOD bekannt. Sie sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert: Man unterscheidet die mitochondriale Mangan-SOD (Mn-SOD) und zwei Kupfer/Zink-SOD, von denen eine zytosolisch und die andere extrazellulär vorkommt (Choi et al., 2005). Ein Mangel an der Mn-SOD ist mit einem Überleben der Zelle nicht vereinbar, wie Versuche an ‚knock-out‘ Mäusen zeigten (Reaume et al., 1996).

Im Weiteren gibt es einige nicht-enzymatische Antioxidantien. Diese können weiter in hydrophile und hydrophobe Substanzen unterteilt werden. Hydrophobe Antioxidantien sind vor allem in Membranen oder Lipoproteinen lokalisiert, wie z.B. α -Tocopherol (Vitamin E) und Carotinoide. Hydrophile Antioxidantien finden sich vor allem im Zytosol, im Zellkern und in den Mitochondrien. Hierunter sind Glutathion, N-Acetyl-Cystein (NAC, eine Vorstufe des reduzierten Glutathions), und Ascorbinsäure (Vitamin C) einzuordnen (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999). Ein weiteres Protein mit indirekt antioxidativer Wirkungsweise ist Apocynin, ein NADH-Oxidase-Inhibitor, welcher die Superoxid-Produktion hemmt.

Glutathion stellt in der Zelle eines der wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien dar. Reduziertes Glutathion (GSH), ein Tripeptid mit einer freien Thiolgruppe, das aus Cystein, Glycin und Glutamat besteht, kann zum Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert werden und stellt damit ein Puffersystem für ROS dar. Diese Reaktion wird durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert. Durch die Glutathion-Reduktase wird das GSSG unter NAD(P)H-Verbrauch wieder zu zwei Molekülen GSH reduziert. Damit stellt Glutathion ein regeneratives System dar. Glutathion stellt auch das quantitativ am häufigsten vorkommende Antioxidans dar. Es spielt aufgrund seiner regenerativen Eigenschaften eine bedeutende Rolle bei der Detoxifizierung von elektrophilen und radikalischen Substanzen (Jacob et al., 2003).

1.1.5 Karzinogenese und Tumor-Stroma-Interaktion

Karzinogenese ist Ausdruck einer Fehlregulation von Wachstum und Differenzierung, wobei man Karzinome (von Epithelzellen ausgehend), von Sarkomen (Mesenchymzellen) und Leukämien (blutbildende Zellen) unterscheidet. Maligne Tumore wachsen im Gegensatz zu benignen infiltrierend und gewebserstörend und haben zusätzlich die Neigung zur Metastasierung. Bei der neoplastischen Transformation epidermaler Zellen handelt es sich um einen Mehrstufenprozess, dem epigenetische und genetische Veränderungen zu Grunde liegen und der maßgeblich zu der Entwicklung von Hauttumoren wie Basaliomen, Plattenepithelkarzinomen oder Melanomen beiträgt. Tumorentstehung folgt dabei einem Mechanismus, der aus 3 Schritten besteht: Initiation, Promotion und Progression (Yuspa, 1998).

Der erste Schritt, die Initiation, besteht in der Auslösung einer Mutation eines kodierenden DNA-Abschnittes. Solche Mutationen können spontan auftreten, wie durch Reaktionen mit Wasser oder Oxidantien, andererseits aber auch durch exogene Noxen induziert werden (Lindahl, 1993).

Reaktionen mit Wasser, die zu Spontanmutationen führen, sind die hydrolytische Desaminierung und die Depurinierung. Bei der hydrolytischen Desaminierung, die vor allem bei der Base Cytosin auftritt, wird Ammoniak von den Basen abgespalten, freigesetzt und durch eine Ketogruppe ersetzt. Dabei entsteht aus Cytosin die Base Uracil, aus Adenin entsteht Hypoxanthin und aus Guanin entsteht Xanthin. Bei der Depurinierung kommt es zu

einer Spaltung der N-glykosidischen Bindung von Purinbasen mit der Desoxyribose. Dadurch wird die Base freigesetzt, weshalb eine Wasserstoffbrückenbindung mit anderen Basen an dieser Stelle nicht mehr möglich ist.

Exogene Noxen sind zum Beispiel die UV-Strahlung (UV-A, UV-B) und Xenobiotika. Die UV-B-Strahlung wird von der DNA absorbiert und bewirkt, dass zwei aufeinanderfolgende Pyrimidinbasen miteinander zu einem Cyclobutanring verbunden werden. Es kommt zur Ausbildung von Thymin-dimeren (Lindahl, 1993, Barnes und Lindahl, 2004), welche zu einer Strukturänderung der DNA-Helix führen und die Replikation beeinträchtigen. Die DNA-Polymerase setzt an dieser Stelle kurzzeitig aus. Das führt dazu, dass der neu gebildete Tochterstrang weniger Basen besitzt als der Mutterstrang. Bei einer Transkription dieses Tochterstranges entsteht eine verkürzte mRNA, was eine Verschiebung des Leserasters zur Folge haben kann.

Auch reaktive Sauerstoffspezies können Strangbrüche der DNA initiieren oder über Oxidation einzelner Basen zu Mutationen der DNA führen. Dabei wird vor allem Guanin zu 8-Oxo-Guanin oxidiert und durch die sogenannte Transversion durch Adenin ersetzt (Burkhardt et al., 2001).

Diese DNA-Schäden können von spezifischen Reparatursystemen erkannt und behoben werden. Findet diese Reparatur nicht statt, wird bei der nächsten Replikation der DNA die Punktmutation manifestiert.

Findet die Mutation auf Genen statt, die für Proteine codieren, die die Proliferation, die Zelldifferenzierung, die Apoptose oder den Zellzyklus regulieren, kann dies zur Tumorentstehung kommen. Gene, die für solche Proteine kodieren, werden als Tumorsuppressor- oder Onkogene bezeichnet (Fritsch, 2009). Onkogene und Tumorsuppressorgene sind im nicht-mutierten Zustand an der Zellwachstumskontrolle beteiligt. „Durch Mutationen werden Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert. Beides kann zum Verlust oder zu einer Beeinflussung der Wachstumskontrolle führen und somit die Tumorentstehung fördern“ (Sack, 2012). Solche Tumorsuppressorgene sind z.B. das Retinoblastomgen (RB), oder das Gen p53. Das Tumorsuppressorprotein p53 verhindert bei DNA-Schäden den Übergang in die replikative Phase (S-Phase) (Wolfgang Hiddemann, Claus R. Bartram: Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. Springer, 2009). Durch vermehrte Synthese stimuliert p53 über eine vermehrte Expression (Macleod et al., 1995) von weiteren Tumorsuppressorgenen (p21 und p27), die sich wiederum hemmend auf die Phosphorylierung des Proteins (Rb) auswirken,

sowie von Signalmolekülen, die die Apoptose auslösen können. Typische Mutationen in Tumoren sind Deletionen von Rb und p53, wodurch die Kontrollelemente des Zellzyklus wegfallen, sowie vom Protoonkogen c-fos, das über erhöhte Aktivität von 'activator protein 1' (AP-1) Signalkaskaden induziert, die zur Sezernierung angiogenetischer und proteolytischer Faktoren führen (Yuspa, 1998).

Für den Übergang einer Phase des Zellzyklus in die nächste sind verschiedene Signalproteine nötig, die durch spezifische Proteinkinasen (Cyklin-abhängige Proteinkinasen, CDK) reguliert werden. Diese wiederum werden durch Cykline aktiviert. Cykline sind Proteine, die nur zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus exprimiert werden. Es werden Cykline der Gruppen A, B, C, D und E unterschieden. Cykline D und E fördern den Übergang von der G1- in die S-Phase, und sind somit für die Karzinogenese von besonderer Bedeutung (Futatsugi et al., 2012).

Durch die Bindung der D-Cykline an CDK 4 und 6 werden diese aktiviert und können nun eine Phosphorylierung des Komplexes Rb-E2F bewirken und damit den gebundenen Transkriptionsfaktor E2F freisetzen, welcher wiederum die Bildung von Cyclin E auslöst. Cyclin E bindet an CDK 2, die zu einer weiteren Phosphorylierung von Rb im Komplex Rb-E2F führt (Zarkowska und Mitnacht, 1997, Futatsugi et al., 2012, Coe et al., 2013). Transkriptionsfaktoren wie E2F regulieren den Zellzyklus. Dieser Vorgang soll nun am Beispiel des Transkriptionsfaktors Epithelial Growth Factor (EGF) demonstriert werden.

EGF bindet an den membranständigen Rezeptor, der eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne besitzt. Diese Bindung bewirkt eine Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase (RTK), die zu einer Autophosphorylierung führt. An diese so aktivierten RTKs können nun Moleküle wie das zytosolische Adapterprotein Grb2 binden, welches wiederum konstitutiv mit dem Ras-GEF SOS (Son Of Sevenless) assoziiert ist, und dadurch spezielle RAS-Proteine aktivieren kann. RAS-Proteine sind G-Proteine, die durch Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) weitere Proteinkinasen (z.B. Rho-Kinasen) über Phosphorylierung aktivieren (Bruce Alberts, Alexander Johnson, Peter Walter, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts: Molecular Biology of the Cell, 5. Auflage, Taylor & Francis 2007). Über diesen Weg wird auch eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) phosphoryliert und aktiviert. In der aktiven Form transloziert diese in den Zellkern und bewirkt dort die Transkription entsprechender Zielgene. Aus diesen Ereignissen resultieren Hyperproliferation und verspätete terminale Differenzierung, welche zelluläre Prozesse darstellen, die charakteristisch für die prämaligne Progression sind.

Durch die erhöhte Zellproliferation entsteht ein präneoplastischer Zellhaufen, der eine gutartige Krebsvorstufe darstellt, der sogenannte benigne Tumor. Dieser wächst zunächst nur begrenzt und metastasiert vorerst nicht. Charakteristika maligner Tumoren sind Hyperproliferation, Immortalität und Metastasierung. Der Verlust der Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) bei Basaliomen oder Plattenepithelkarzinomen der Haut steht mit einer fehlenden Expression der Connexine 26 und 43 und einem Verlust der Translokation der Connexine an die Membranoberfläche in Verbindung (Tada et Hashimoto, 1997).

Der letzte Schritt der Karzinogenese, die Progression, ist das weitere Wachstum des Tumors und die damit verbundene Verdrängung des gesunden Gewebes und die Metastasierung (Müller und Fusenig, 2002). Tumorzellen sind in der Lage ihre stromale Umgebung zu verändern, sodass diese dem Tumor eine unterstützende Funktion während der Invasion bieten. Desmoplasie und Synthese verschiedener Bestandteile der EZM sind Korrelate dieser stromalen Beteiligung. Desmoplastische Reaktionen führen zu einem vermehrten Wachstum von Fibroblasten und damit konsequenter Bildung von Kollagen um den Tumor (Kunz-Schughart et al., 2002 [II]). Innerhalb dieses Prozesses kommt es zur Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran, welche durch lokale Proteolyse mittels verschiedener Proteinasen, wie z.B. MMP-2 degradiert wird. Im Anschluss an diesen Prozess resultiert eine Adhäsion der Tumorzellen an Glykoproteine der EZM mit Hilfe von Integrinen, wodurch die neoplastischen Zellen migrieren können. Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die aus L- und B-Untereinheiten bestehen und die die EZM mit Komponenten des Cytoskeletts verbinden.

Weitere wichtige Glykoproteine im Rahmen der Invasion stellen die nicht zur EZM-gehörenden Cadherine und Catenine dar, die die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Ein Verlust von Cadherin kann zu einem Zusammenbruch zellulärer Verbände führen, was eine Migration durch das umgebende Gewebe erheblich erleichtert. Diese Migrationsvorgänge bewirken den Eintritt der Tumorzellen aus der Epidermis in die Dermis, wo sie Anschluss an das Gefäß- und Lymphsystem der Haut erhalten. Nach Transport der einzelnen Tumorzellcluster mit dem Blut- bzw. Lymphstrom, bleiben sie im schmalen Kapillarbett stecken und beginnen über weitere lokale Proteolyse mit der Involution in die umgebenden Gewebe.

1.2 Nanopartikel in Forschung und Medizin

Der Begriff Nanotechnologie umfasst die Anwendung von Nanopartikeln in Forschung und Industrie in einem ständig breiter werdenden Spektrum. Nanopartikel entstehen in industriellen Bereichen, wie z.B. der Reinigungsmittel- und Kleiderindustrie, können aber auch durch natürliche Phänomene, wie z.B. Vulkanausbrüche, entstehen. Auch Feinstaub, der zum Beispiel in Form von Autoabgasen in die Luft ausgestoßen wird, enthält Nanopartikel.

Nanopartikel haben aber auch zunehmend Bedeutung im Bereich medizinischer Forschung.

Nanopartikel stellen dabei Moleküle unterschiedlichster Zusammensetzung dar, deren gemeinsame Eigenschaft ihre geringe Größe ist. Aus dem Griechischen stammend („nanos“ = Zwerg), bezeichnet der Sammelbegriff Nanopartikel den Verbund weniger bis einiger Tausend Atome oder Moleküle mit einer Größe von ≤ 100 nm. Aufgrund eines günstigen Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen – je kleiner der Partikel, desto größer die Oberfläche bei geringem Volumen und Gewicht – nehmen die van-der-Waals-Kräfte, zu. Durch diese steigenden, aber schwachen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Atomen und Molekülen, die auf der elektrischen Anziehung kleiner Dipolmomente beruhen, sind selten singuläre Nanopartikel als vielmehr Agglomerate von Nanopartikeln zu finden. Um die singulären Nanopartikel zu stabilisieren, müssen diese van-der-Waals-Kräfte überwunden werden, was man mit dem sogenannten ‚Coating‘ (Kopplung, Beschichtung) erreicht. Es handelt sich hierbei um die Beschichtung von Nanopartikeln mit verschiedenen Stoffen, unter anderem Dextran-Polymere. Eine Beschichtung kann beispielsweise dazu führen, dass van-der-Waals-Kräfte zwischen Partikel und Flüssigkeit und nicht zwischen zwei Partikeln ausgebildet werden, was einer Agglomeration entgegen wirkt. Diese Stabilisierung des großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses hat starken Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Nanopartikel (Perez, 2007, Celardo et al., 2011).

1.2.1 Nanomedizin - Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie

Der Begriff Nanomedizin beschreibt die medizinische Anwendung der Nanotechnologie, welche in den verschiedensten Bereichen der Medizin zu finden ist. Die Nanomedizin kann

daher in unterschiedliche Fachgebiete wie Nanoonkologie und Nanoneurologie unterteilt werden (Jain, 2010). Bereits jetzt wurden verschiedene Ansätze im Bereich der Nanoonkologie entwickelt, die klinische Anwendung erfahren. Zu den wichtigsten dieser Ansätze zählen sowohl Nanodiagnostik, Nanopharmazie und Hyperthermieverfahren, als auch das ‚Drug Delivery‘.

Nanodiagnostik bezeichnet dabei eine Anwendung im Bereich der Radiologie, die zur Tumorsuche eingesetzt wird. Nanopartikel finden hierbei Einsatz als Kontrastmittel im Rahmen bildgebender Verfahren, wie die Magnet-Resonanz-Tomographien (MRT). Von besonderer Bedeutung sind die sogenannten ‚quantum dots‘, halbleitende, lichtemittierende Nanokristallstrukturen, die schon seit längerer Zeit ihre Anwendung als Bildsensor in digitalen Kameras finden und im Bereich der Nanomedizin zur Darstellung von Tumoren (‚Tumor Imaging‘) verwendet werden. Neben der reinen Diagnose wird im Bereich der Nanodiagnostik auch eine gezielte Wirkung von eingebrachten Nanostrukturen verfolgt, die daraus besteht, über die unter anderem magnetischen Eigenschaften bestimmter Partikel, zirkulierende Tumorzellen einzufangen (Ghalanza et al., 2009).

Nanopharmazie beschreibt die gezielte Therapie durch Entfaltung der Wirkung von Nanopartikeln. Hier rücken vor allem Nanostrukturen mit redox-aktiven Eigenschaften in den Vordergrund, von denen man sich eine antioxidative Wirkung in Zielzellen erhofft (Korsvik et al., 2007, Perez et al., 2008). In der Krebstherapie bereits eingesetzt wird das Hyperthermie-Verfahren, ein Ansatz, der dem Bereich der Nanopharmazie angehört. Dabei werden Nanopartikel mit magnetischen Eigenschaften gezielt in Tumoren eingeführt, die dort dann in Schwingung versetzt werden, was zur Wärmeproduktion führt. Diese Wärmeproduktion initiiert den Zelltod der betroffenen Tumorzellen, während andere Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben (Silva et al., 2011).

Beim ‚Drug Delivery‘-Verfahren werden Nanopartikel als Transportmedium für verschiedene Wirkstoffe eingesetzt. So werden u.a. gezielt mit Oberflächen-Antigenen von Tumoren (Epitopen) agierende Antikörper an Nanostrukturen gekoppelt, so dass für den Wirkstoff selbst unüberwindbare Hindernisse, wie zum Beispiel Zellmembranen oder die Blut-Hirn-Schranke passiert werden können. Das wird durch die geringe Größe der Nanopartikel ermöglicht. Zusätzlich kann durch Kopplung an oder Ummantelung des Wirkstoffes durch gezielt synthetisierte Nanostrukturen auch eine Veränderung der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Wirkstoffes, wie der Halbwertszeit oder Löslichkeit, herbeigeführt werden. Solche Wirkungsweisen ermöglichen eine ganz neue, viel gezieltere

Therapie, vor allem im Bereich der Hirnforschung – hier seien Erkrankungen wie Alzheimer oder Hirntumore erwähnt -, da eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bisher nur sehr eingeschränkt möglich war (Grobe et al., 2008).

Allerdings ist zu bedenken, dass Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage sind, tief in die verschiedenen Gewebe einzudringen – unter anderem bis tief in die Atemwege hinein. Unter diesem Aspekt zu sehen sind natürlich vor allem in der Umwelt frei vorhandene Nanopartikel, die zu bronchialen Reizungen und chronischen Atemwegserkrankungen und sogar bis zum bronchialen Tumor führen können (Müller et al., 2008). Obwohl solche unerwünschten Wirkungsweisen von Nanopartikeln noch nicht weitgehend genug erforscht sind, scheint die Nanotechnologie eine interessante und durchaus bedeutsame neue Therapieoption im Bereich der Krebstherapie darzustellen.

1.2.2 Ceroxid und Ceroxid-Nanopartikel

Das chemische Element Cer (engl. Cerium) ist ein Metall der Gruppe der Lanthanoide und gehört zu den ‚Seltenen Erden‘, welches im Jahr 1814 von J.J. Berzelius, W. von Hisinger und M. H. Klaproth entdeckt und nach dem Planeten Ceres benannt wurde. Cer ist das einzige Element der seltenen Erden, welches in zwei Oxidationsstufen (Ce^{3+} und Ce^{4+}) vorkommt. „In der Natur kommt Cer in Verbindung mit anderen Lanthanoiden als Ceriterde vor (Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1986)“ (Sack, 2012). Cer findet seit geraumer Zeit Anwendung in der Industrie, unter anderem in Brennstoffzellen oder als Katalysatoren für Dieselkraftstoffe (Lin et al., 2006, Korsvik et al., 2007, Xia et al., 2008, Eom et Choi, 2009, Niu et al., 2011). Seit kurzer Zeit findet Cer auch im Bereich der Nanotechnologien Anwendung. Diese auf Ceroxid-Basis synthetisierten Nanopartikel zeigen aufgrund der Eigenschaft des Cers, zwischen zwei Oxidationsstufen wechseln zu können, redox-aktive Wirkungen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Ceroxid-Nanopartikel (CNP) wurden an der University of Central Florida, Orlando (Advanced Materials Processing and Analyzing Centre, Nanoscience and Technologies Centre (NTSC), Mechanical, Materials Aerospace Engineering (MMAE), University of Central Florida, Orlando, Florida 32816, USA) von der Arbeitsgruppe von Prof. Sudipta Seal, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt. Es

handelt sich um im Durchmesser 3-5 nm große Nanopartikel aus Ceroxid, die mit einem Polymer beschichtet sind. Die Beschichtung besteht aus Dextran-Polymeren, die eine Agglomeration der Partikel in der Lösung verhindert (Alili et al., 2011). Das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} jeder Charge wurde photometrisch bestimmt (Ce^{3+} hat ein Absorptionsmaximum zwischen 250 und 350 nm; das von Ce^{4+} liegt bei Werten größer als 350 nm) und ausschließlich Chargen mit einem stabilen $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ -Verhältnis wurden für die hier durchgeführten Experimente verwendet. Aufgrund der Fähigkeit der CNP zwischen den Oxidationsstufen zu wechseln, zeigen CNP redox-aktive Eigenschaften. Außerdem besitzen sie an ihrer Oberfläche Sauerstoffvakanz, die durch den spontanen Verlust eines Sauerstoffatoms zustande kommen (Korsvik et al., 2007, Das et al., 2013). Je größer das Oberflächen-Volumen-Verhältnis, desto mehr Sauerstoffvakanz werden an der Oberfläche gebildet, und desto größer wird auch das redox-aktive Potential der CNP, welche eine katalytische Wirkung für Redox-Reaktionen ermöglicht (Das et al., 2013).

Dieses redox-aktive Potential hat CNP in den Fokus der nanomedizinischen Forschung gerückt. Trotz der vielen unterschiedlichen Studien ist die Wirkung von Ceroxid-Nanopartikeln noch nicht ausreichend untersucht. Auch die Effekte von CNP werden in den verschiedenen Studien kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen einen zytotoxischen, prooxidativen Effekt von CNP (Lin et al., 2006, Eom et Choi, 2009, Alili et al., 2011, Alili et al., 2013), andere Studien belegen einen antioxidativen Wirkungsmechanismus der Partikel (Tarnuzzer et al., 2005, Xia et al., 2008, Colon et al., 2009, Alili et al., 2011, Amin et al., 2011, Kong et al., 2011, Niu et al., 2011).

1.3 Fragestellung

Neue Ansätze in der Krebstherapie setzen sich mit der Verhinderung der Metastasierung des Primärtumors auseinander. Bei der Invasion und der Metastasierung spielen vielfältige Tumor-Stroma-Interaktionen eine wesentliche Rolle. Eine dieser Interaktionen beinhaltet die TGF β 1-vermittelte Transition von Fibroblasten zu Myofibroblasten (mesenchymal-mesenchymale Transition (MMT)).

Da humane dermale Fibroblasten im Vergleich zu Tumorzellen eine hohe genotypische Stabilität aufweisen, stellen sie einen guten Angriffspunkt für neue Therapiekonzepte dar. Aus diesem Grund befasst sich die hier vorliegende Arbeit mit dieser Zellpopulation und nicht mit Tumorzellen, die eine genotypisch instabile und heterogene Gruppe darstellen.

Eine erhöhte Sekretion des Wachstumsfaktors TGF β 1 durch die Tumorzellen führt zu einer gestörten Zell-Zell-Kommunikation stromaler Fibroblasten über gap junctions (Stuhlmann et al., 2003), welche über eine intrazelluläre Erhöhung des ROS-Gehalts in der Zelle generiert wird. Zudem führt TGF β 1 zu einer Transition von Fibroblasten in Myofibroblasten, die an der Invasionsfront von Tumoren verstärkt auftreten und maßgeblich die Invasionskapazität von Hauttumorzellen erhöhen (De Wever und Mareel, 2002). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Versuch der Verhinderung der Myofibroblastenformation mit Hilfe von Ceroxid-Nanopartikeln, was in einer geringeren Invasion und damit Metastasierung von Tumoren resultieren sollte.

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass Ceroxid-Nanopartikel antioxidative Eigenschaften besitzen. Die Arbeit beschäftigt sich zu einem großen Teil mit Untersuchungen ihrer Eigenschaften als SOD- und Katalase-mimetische, antioxidative Substanz.

Da herkömmliche Chemotherapien immer mit der Schädigung von gesunden Zellen einhergehen, sollte bei der Entwicklung von neuen chemotherapeutischen Ansätzen diese Nebenwirkung berücksichtigt bzw. im besten Fall vermieden werden. Einige Chemotherapeutika erzielen ihre Wirkung unter anderem auch über die Produktion von ROS, welche Tumorzellen abtöten, jedoch auch stromale Zellen schädigen. Untersucht wird, ob Ceroxid-Nanopartikel aufgrund ihrer bekannten antioxidativen Eigenschaften diese schädigenden Nebenwirkungen mindern und damit einen supportiven Therapieansatz bei einer Chemotherapie darstellen können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Agenzien

2,4–Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	Millipore, Schwalbach
Ac-DEVD-AMC	Calbiochem, Darmstadt
Aceton p.A.	Merck, Darmstadt
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt
APS analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA) 98%	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
Caspase Inhibitor III	Calbiochem, Darmstadt
CHAPS analytical grade	Sigma, Taufkirchen
CisPlatin	Sigma, Taufkirchen
Clostridium histolyticum	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau (R250)	Merck, Darmstadt
DAPI pro long	Invitrogen, Karlsruhe
Dispase II	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Entwicklerkonzentrat	Merck, Darmstadt
Eosin	Thermo Scientific, Waltham
Essigsäure (100 %) Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS superior	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fixiererkonzentrat	Merck, Darmstadt
Fluoromont C	Southern Biotech, Eching
Gentamycin solution	Sigma, Taufkirchen
Glutamax	Gibco
Glycerin p.A.	Roth, Karlsruhe

Glycin >99,9 % p.A.	Roth, Karlsruhe
H ₂ -DCF-DA	Sigma, Taufkirchen
Hämatoxylin	Thermo Scientific, Waltham
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen
Luminol / Verstärker-Lösung	Pierce, Rockfort, USA
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MTT (98 %) TLC	Sigma, Taufkirchen
Na ₂ HPO ₄ p.A.	Merck, Darmstadt
Na-EDTA p.A.	Sigma, Taufkirchen
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Paraquat	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
PenStrep	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Proteinassay-Agenzien A,B,S	BioRad, München
Proteinstandard Page Ruler	Fermantas, Deutschland
Rotiphorese Gel 40 (37,5;1)	Roth, Karlsruhe
SDS ultra pure ≥99 %	Roth, Karlsruhe
SFM-Keratinocytenmedium	Life technologies, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
TGFβ1, recombinant from human	R&D Systems, Wiesbaden
TRIS Pufferan ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30 Gew.&), stabilisiert	Riedel-de Häen

Western Blot Stripping Buffer
β-Mercaptoethanol

Thermoscientific
Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Puffer und Lösungen

10x SDS Laufpuffer

10 g SDS
30,3 g Tris
144,1 g Glycin
ad 1 l dH₂O

10x TBST

50 mM Tris
150 mM NaCl
0,1 % Tween-20

4x SDS Probenpuffer

40 % Glycerin
20 % β-Mercaptoethanol
12 % SDS
0,4 % Bromphenolblau

Anodenpuffer I

0,3 M Tris
10 % (v/v) Methanol
pH 10,4

Anodenpuffer II

25 mM Tris
10 % (v/v) Methanol
pH 10,4

Blockierlösung I

5 % Milchpulver in 1x TBST

Blockierlösung II

1 % BSA in PBST

Caspase-Assay-Buffer

20mM HEPES
0,1 % CHAPS
2 mM EDTA
5 mM DTT
ad 100 ml dH₂O

Caspase-Assay Lyse-Buffer

50 mM HEPES, pH 7,4
5 mM CHAPS
5 mM DTT
ad 100 ml dH₂O

Coomassie Blue Färbelösung	0,05 % Coomassie Brilliant Blue 20 % Methanol 7,5 % Essigsäure
Cytochrom-C- Fraktionierungslysepuffer	74,6 mg KCl 102 mg NaCl 476 mg HEPES 121 mg TRIS 8,55 g Saccharose 400 µl EDTA (500 mM) 25 mg Digitonin (frisch ansetzen) ad 100 ml dH ₂ O
Kathodenpuffer	25 mM TRIS 10 % (v/v) Methanol 40 mM Glycin pH 9,4
Luminol/Verstärker-Lösung	Pierce, Rockfort, USA
MTT-Inkubationslösung	MTT-Stocklösung 1:10 in serumfreiem DMEM verdünnt
MTT-Stocklösung	5 mg/ml MTT in PBS
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 0,05 % Tween-20
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S (w/v) 5 % (v/v) Essigsäure
SDS-Lyse-Puffer	1 % SDS Phosphatase Inhibitor cocktail I (1/1000) Phosphatase Inhibitor cocktail II (1/1000) Protease Inhibitor cocktail (1/1000)
TBST 10x	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween-20

Trypsin-EDTA	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l Na-EDTA
--------------	------------------------------------

2.1.3 Primäre Antikörper

Mouse-anti-human Cytochrome C (monoklonal)	Cell signalling, Frankfurt a.M.
Mouse-anti-human α -Tubulin (monoklonal)	Sigma, Taufkirchen
Rabbit-anti-human PARP (monoklonal)	Cell Signalling, Frankfurt a.M.
Rabbit-anti-human Phospho-PKC (pan $\alpha\beta\gamma$) (monoklonal)	Biomol, Hamburg
Mouse-anti-human α SMA (monoklonal)	Sigma, Taufkirchen
Mouse-anti-human N-Cadherin (monoklonal)	BD Bioscience, Heidelberg
Rabbit-anti-human β -Catenin (monoclonal)	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.4 Sekundäre Antikörper

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

2.1.5 Kits

Alle Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

BrdU Cell Proliferation Kit	Calbiochem, Darmstadt
GSH-GSSG-Ratio Assay Kit	Calbiochem, Darmstadt
Oxy-Blot Protein Oxidation Detection Kit	Millipore, Schwalbach
Proteinbestimmung	BioRad, München
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Einmal-Pipetten-Spitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nümbrecht
Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe
Kryotubes	Greiner Bio-One, Frickhausen
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
PVDF-Membran	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5 ; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare, Freiburg
Skalpelle	Feather, Japan
Tubes (50, 100 ml)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Whattman-Papier	Roth, Karlsruhe
Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturplatten (24- , 96-well-Platten)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturschalen (verschiedene Größen)	Greiner Bio-One, Frickhausen

2.1.7 Zellen

Humane dermale Fibroblasten (HDF)	Dr. Meyer, Praxis-Klinik Grevenbroich
Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	Dr. Fusenig, DKFZ Heidelberg

2.1.8 Geräte

Analysewaage AB 204-S	Mettler Toledo, Schweiz
CCD Digital Camera (Orca II)	Hamamatsu, Japan
Clean Air Sterilbank	Thermo Life Science, Egelsbach
Criterion Elektrophoresekammer	BioRad, München

Elektro-Blot-Apparatur	Roth, Karlsruhe
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 100TV	Carl Zeiss, Oberkochen
Gelkammer Novex Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Heizblock	Peqlab
Inkubator Heraeus	Kendro, Langenselbold
Light Cyclers 2.0	Roche
Magnetrührer	Janke&Kunkel IKAMAG©RCT,Staufen
Mikrotiter Plate Reader Fluostar Optima	BMG Labtech
Mikrotiter Plate Reader KC4	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikrotiter Plate Reader Victor 1420	Wallac, Freiburg
MilliQ-Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
pH-Meter HI221	Hanna Instruments, Kehl
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Powersupplier Power Pac Basic	BioRad, München
Rollschüttler RM-5 Assistant	Braun, Melsungen
Schüttelinkubator SM 25	Edmund Bühler, Tübingen
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	Janke&Kunkel IKAMAG©RCT,Staufen
Schüttler Rotomax 120	Heidolph Instruments, Schwalbach
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Ultraschall-Disintegrator Branson Sonifier W-250	Bandelin electronic, Berlin
UV/VIS Spectrophotometer Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer	Janke&Kunkel IKAMAG©RCT,Staufen
Wasserbad	Köttermann, Düsseldorf
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

2.1.9 Software

Image J
Open Office
Graph Pad Prism 3.0
PDF Creator

2.2 Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln

Die uns in Kooperation zur Verfügung gestellten Ceroxid-Nanopartikel wurden an der University of Central Florida, Orlando (Advanced Materials Processing and Analyzing Centre, Nanoscience and Technologies Centre (NTSC), Mechanical, Materials Aerospace Engineering (MMAE), University of Central Florida, Orlando, Florida 32816, USA) von der Arbeitsgruppe von Prof. Sudipta Seal nach der bereits beschriebenen Methode (Karakoti et al., 2007) hergestellt.

Nach der Synthese wurden die Ceroxid-Nanopartikel mit einem 1000 Da großen Dextran gekoppelt ('coating'). Dem in deionisiertem Wasser gelösten Dextran wurde Cernitratexahydrat unter ständigem Rühren hinzugefügt, wonach die Zugabe von Ammoniumhydroxid (30 % w/w) folgte. Der pH-Wert der Lösung wurde unter 9,5 gehalten, um die Präzipitation von Cerhydroxid zu verhindern. Nach der Synthese wurden die nun umhüllten Ceroxid-Nanopartikel mit Ultraviolett-Visible-Spectroscopy (UV/VIS) untersucht, um ihren Oxidationsstatus zu überprüfen. Per Transmissionen-Elektronen-Mikroskopie wurde die Größe der Partikel, die 3-5 nm betragen sollte, überprüft. Die uns zur Verfügung gestellte Ceroxid-Lösung wies eine Konzentration von 5 mM auf. Mittels MTT-Test wurde jede Charge von unserer Arbeitsgruppe auf Toxizität in Tumorzellen (SCL-1) und in stromalen Zellen (HDF) überprüft und zusätzlich jeweils ein Transmissionsspektrum aufgenommen, um das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} , die Konzentration und den charakteristischen Shift von Ce^{3+} zu Ce^{4+} nach Oxidation durch H_2O_2 zu überprüfen, um so die gleichbleibende Qualität der Chargen zu gewährleisten. Für die Untersuchung der Transmission wurde eine 1 mM Nanopartikel-Lösung nach Verdünnung in PBS hergestellt, und das Transmissionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 1100 nm aufgezeichnet. Bei einem ausgewogenen Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} absorbieren die Partikel Licht im Bereich von 210 bis ca. 350 nm. Nach der Einstellung einer Konzentration von 75 mM H_2O_2 wurde die Transmission erneut gemessen. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid wird Ce^{3+} zu Ce^{4+} oxidiert. Das äußert sich im Transmissionsspektrum als Änderung der Wellenlänge (Shift nach rechts). Weil Ce^{3+} gelbes Licht und Ce^{4+} rotes Licht absorbiert, zeigt diese Änderung der Wellenlänge, dass das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} durch Oxidation zugunsten von Ce^{4+} verschoben wird. Die Absorption fällt in diesem Verhältnis bei einer Wellenlänge von 450 nm ab; bei einer Wellenlänge von 550 nm wurde eine 25 prozentige Transmission beobachtet, die dann bei 1100 nm auf fast 100% anstieg. Ebenfalls über die Transmissionsspektroskopie ließ sich die Eigenschaft der Partikel autokatalytisch von Ce^{4+} zu Ce^{3+} wechseln zu können (Heckert et al.,

2008) nachweisen. Die Aufnahmen der Transmission zeigten mehrere Stunden später eine Verschiebung des Verhältnisses Ce^{3+} zu Ce^{4+} in Richtung Ce^{3+} , bis das Verhältnis wieder im Gleichgewicht war.

2.3 Zellen und zellbiologische Methoden

2.3.1 Plattenepithelkarzinomzellen

„Die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL-1 sind wenig differenzierte menschliche Plattenepithelkarzinomzellen der Haut, die ursprünglich aus dem Karzinom einer 74-jährigen Frau stammen (Boukamp et al., 1982). Die Zellen erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. Norbert Fusenig aus dem DKFZ in Heidelberg“ (Cat, 2007).

2.3.2 HDF – humane dermale Fibroblasten

HDF sind humane sekundäre Hautfibroblasten, die von durch Zirkumzisionen gewonnenen Vorhäuten gesunder 2 bis 12-jähriger Jungen stammen. Die verwendeten Biopsien zur Isolation der Zellen erhielten wir freundlicherweise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik Grevenbroich. In dieser Studie wurden nur isolierte Zellen eines Biopsates (Donor 26) und für die Experimente die Zellen zwischen den Passagen 2 bis 17 verwendet.

2.3.3 Isolierung von Fibroblasten aus Biopsien

Zunächst wurden die Biopsien in kaltem PBS gewaschen und daraufhin erneut 1 Min in PBS, das mit 20 μ g/ml Gentamycin versetzt war, gewaschen. Das Fettgewebe wurde großzügig mit einem Skalpell entfernt. Dabei war darauf zu achten, dass die Biopsie nicht austrocknet. Anschließend wurde die Biopsie in kleine Stücke (kleiner als 6 mm) zerteilt. In einer Petrischale wurden diese Stücke mit der Dermisseite nach unten platziert und 10 Min angetrocknet. Nachfolgend wurde die Petrischale mit DMEM, dem 20% FCS zugefügt wurde, aufgefüllt, bis die Hautstücke komplett mit Medium bedeckt waren. Um das Ablösen der Hautstücke zu vermeiden, wurden die Schalen möglichst wenig bewegt. Nach einigen Tagen

war zunächst die Proliferation epithelialer Zellen und einige Tage später die Proliferation der dermalen Fibroblasten zu beobachten. Nach Erreichen einen gewissen Konfluenzgrades konnten die Fibroblasten trypsiniert und im Folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert werden. Dieses stark serumhaltige Medium überleben nur Fibroblasten (Fleischmeyer et al., 1990; Bayreuther et al., 1992), so dass eine Kontamination mit anderen Zellarten ausgeschlossen werden kann.

2.3.4 Kultivierung der Zellen

Die Hautfibroblasten und die SCL-1-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde (Komplettmedium), in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert (Cat, 2007). Die Zellen wurden nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz erst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus Trypsin-EDTA und PBS von den Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach ca. 5 Min (lichtmikroskopische Sichtkontrolle) durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.

Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die kumulative Populationsdichte bestimmt (Abb. 3):

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

$$\rightarrow CPD = \sum PD$$

Abb. 3: Berechnung der kumulativen Populationsdichte [CPD]

Die Fibroblasten wurden bis zu einer CPD von 28 verwendet, sofern diese innerhalb der Passagen 2-17 erreicht wurde. Die SCL-1-Zellen wurden unabhängig von ihrer CPD verwendet. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Untersuchung auf die Kontamination mit Mykoplasmen.

2.3.5 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Alle Zellen wurden zunächst wie bei der Kultivierung beschrieben mit PBS gewaschen, anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS-Lösung abgelöst und die Trypsinaktivität nach etwa 5 Min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in Einfriermedium (DMEM, versetzt mit 20% FCS und 10% DMSO) überführt. Die Zellen wurden in speziellen Kryogefäßen (ca. 10^6 Zellen/ml) bei -80°C eingefroren.

Zur Revitalisierung wurden eingefrorene Zellen schnell aufgetaut und in eine Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Zur Reduktion des DMSO-Gehaltes des Mediums auf ein Minimum ($<1\%$), um einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde nach 4 h und nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.3.6 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Untersuchung auf Kontamination mit Mykoplasmen. Mykoplasmen sind zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, die parasitär Zellen befallen und das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern können. Lichtmikroskopisch sind sie nicht zu detektieren. „Die Zellkultur wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid (DAPI) kontrolliert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 1000 Zellen/ cm^2 auf einem Deckgläschen in einer $3,5$ cm Zellkulturschale für 2 Tage bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die subkonfluenten Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 10 Min in Carnoy's Fixativ fixiert und anschließend zwei mal mit McIlvaine-Puffer gewaschen, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation in DAPI-Lösung. Nach zweimaligem Waschen mit dH_2O wurde das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20 μl Fluoromount C fixiert. Die so gefärbten Zellen wurden innerhalb von 20 Min unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid wird selektiv DNA angefärbt. Nicht-kontaminierte Kulturen zeigten eine hellblaue Fluoreszenz ausschließlich des Zellkerns. Mit Mykoplasmen kontaminierte Kulturen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine zusätzliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran sowie zwischen den einzelnen Zellen. Die Mykoplasmen waren entweder gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilt

oder sie bildeten Aggregate aus, die auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen zu detektieren waren. Kontaminierte Zellen nach Autoklavierung entsorgt.

2.3.7 Allgemeine Versuchsbedingungen

Alle präsentierten Experimente des Ergebnisteiles wurden mindestens drei mal unabhängig voneinander durchgeführt. In den Experimenten wurden nur subkonfluent gewachsene Zellen verwendet. Bis zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung befanden sich die Zellen in Kompletmedium. Alle Behandlungen der Zellen mit einer Inkubationsdauer von bis zu 48 Stunden wurden in serumfreiem DMEM durchgeführt; waren die Inkubationszeiten länger als 48 Stunden, wurde dem Medium jeweils 5% FCS hinzugefügt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit destilliertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt.

2.3.8 Herstellung von konditioniertem Medium/Zellüberstand (CM)

In den Invasionsassays wurde konditioniertes Medium von SCL-1-Zellen (CM^{SCL}), humanen Hautfibroblasten (CM^{HDF}) und Myofibroblasten (CM^{MF}) benutzt. Für die Gewinnung wurden 1×10^6 SCL-1-Zellen bis zur Subkonfluenz (ca. 70%) und ca. $1,5 \times 10^5$ Fibroblasten bis zur Konfluenz in Zellkulturflaschen gezüchtet, um gleiche Zellzahlen zu gewährleisten. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, anschließend mit 15 ml serumfreiem Medium versetzt und der Überstand nach 48 h gesammelt.

Zur Gewinnung des Überstandes von Myofibroblasten wurden 3×10^4 Fibroblasten in Zellkulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser eingesät und bis zur Subkonfluenz (70%) gezüchtet. Die subkonfluenten Fibroblasten wurden in CM^{HDF} überführt und für 24 h mit 50 μ M oder 150 μ M CNP vorinkubiert. Sowohl 5 ng/ml rekombinantes TGF β 1 ($CM^{HDF, TGF}$) alleine als auch in Kombination mit den CNP ($CM^{HDF, TGF, CNP}$) wurde für weitere 48 h hinzugefügt. Anschließend wurde $CM^{HDF, TGF}$ und $CM^{HDF, TGF, CNP}$ gegen 1 ml serumfreies Medium ausgetauscht und der Überstand für 48 h gesammelt (CM^{MF}). Nach Zentrifugation zur Entfernung von Zelltrümmern, konnten die Überstände entweder direkt für Experimente weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

2.3.9 Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)

Der MTT-Test bestimmt die Vitalität von Zellen in der Zellkultur, so dass insbesondere nach der Applikation von chemischen Agenzien auf deren Zytotoxizität geschlossen werden kann. Wasserlösliches Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt. Die photometrisch bestimmte Absorption der blauen Farbe des Formazansalzes wird als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen.

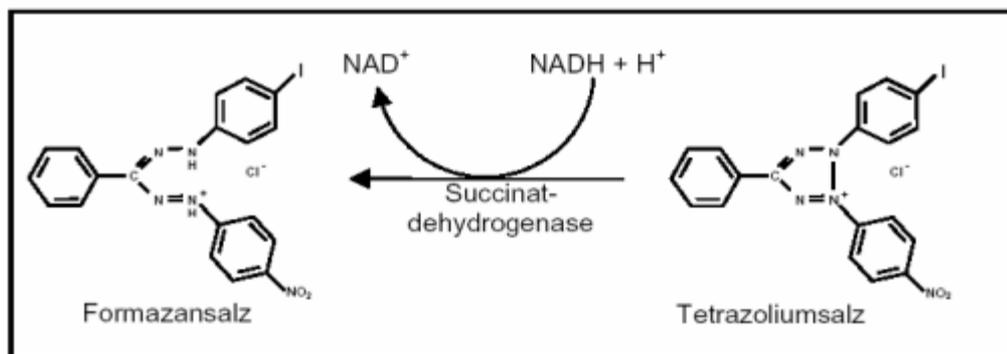


Abb. 4: Bildung von Formazansalz aus Tetrazoliumsalz durch die Succinat-Dehydrogenase als Parameter für die Vitalität von Zellen [Quelle: Cat, 2007]

In 24-Well-Platten bis zur Subkonfluenz kultivierte Zellen wurden mit einer 10%-igen MTT-Lösung in DMEM für 2 h bis zu einer deutlichen Blaufärbung inkubiert. Nach der Aufnahme des Tetrazoliumsalzes wird dieses von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert: Durch Übertragung von Wasserstoffionen von dem Enzym auf das Tetrazoliumsalz wird der Tetrazoliumring gespalten und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (Abb. 4). Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurde das MTT-haltige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellmembranen der Zellen durch DMSO-Solubilisierung zerstört. Das nun in DMSO gelöste Formazansalz wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei durch Messung von reinem DMSO. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität nach Inkubation mit einem Agens wurde als Quotient der Absorption der behandelten Zellen dividiert durch die Absorption unbehauelter Zellen bestimmt (Abb. 5):

$$\%Vitalit\ddot{a}t = \frac{OD \text{ (behandelte Zellen)}}{OD \text{ (unbehandelte Zellen)}} * 100$$

$$\% \text{ Zytotoxizit\ddot{a}t} = [1 - \frac{OD \text{ (behandelte Zellen)}}{OD \text{ (unbehandelte Zellen)}}] * 100$$

Abb. 5: Berechnung der Vitalit\ddot{a}t der Zellen und der Cytotoxizit\ddot{a}t von Agenzien

2.3.10 Proteinbestimmung nach Lowry

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis der Methode nach Lowry unter Einsatz kommerziell erh\ddot{a}ltlicher L\ddot{o}sungen gegen Standards aus Rinderserumalbumin (BSA). Zu 20µl einer Probe wurden 100 µl Reagenz A' gegeben und f\ddot{u}r 1 Min inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden anschlie\ddot{s}end 750 µl des Reagenz B pipettiert und f\ddot{u}r weitere 15 Min inkubiert. Danach wurde die optische Dichte (OD) photometrisch bei 750 nm gemessen. Aus den Daten des BSA-Proteinstandards konnte der Proteingehalt der Proben berechnet werden.

2.3.11 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Proteinbestimmung wurde eingesetzt, wenn in verwendetem Lysepuffer (z.B. Lysepuffer f\ddot{u}r den Adh\ddot{a}sions-WesternBlot) Substanzen vorzufinden waren, die einen St\ddot{o}rfaktor bei der Proteinbestimmung nach Lowry darstellten.

Nach dem Lysieren der Zellen wurden zu 6 µl einer Probe 1 ml Bradford Reagent zugegeben und f\ddot{u}r 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die OD wurde photometrisch bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt der Proben berechnete sich aus Daten f\ddot{u}r einen BSA-Standard.

2.3.12 Zell-Proliferations-Assay (BrdU)

Der Assay dient dem Nachweis neu synthetisierter DNA lebender Zellen mittels Bromodesoxyuridin (BrdU), einem Thymin-Analogen, das statt des Thymins in neu

synthetisierte DNA eingebaut wird. BrdU wird mittels Bindung von Antikörpern nachgewiesen.

Dermale Fibroblasten wurden zu je 5×10^4 Zellen in je 100 μl Medium in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt und nach 24 h für insgesamt 48 h mit 50 μM oder 150 μM CNP und nach weiteren 24 h für 24 h mit 5 mM NAC, 500 nM Na_2SeO_3 , 50 μM Vitamin-E-Derivat Trolox, 50 μM cisPlatin oder 2 mM Hydroxyharnstoff (HU) behandelt. Als technische Kontrolle wurden die Zellen für 24 h mit 500 μM H_2O_2 behandelt.

Sechsenddreißig h nach dem Aussäen wurde den Zellen jeweils 20 μl BrdU zugefügt und für weitere 12 h inkubiert. Nach 12 h Inkubation mit BrdU wurde das Medium der Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend in 200 μl Fixative/Denaturing Solution aufgenommen und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde entfernt. Einhundert μl einer 1:100 Anti-BrdU-AK:AK-Dilution-Buffer-Lösung wurden in jede Vertiefung pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen wurden anschließend dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen und auf Tüchern ausgeklopft. Eine 1:2000 Peroxidase-Goat-Anti-Mouse-IgG-HRP:Conjugate-Diluent-Lösung wurde hergestellt und jeweils 100 μl auf jede Vertiefung gegeben und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen erneut dreimal mit Waschpuffer und zusätzlich einmal mit dH_2O gewaschen. Einhundert μl Substrat-Solution wurde in jede Vertiefung gegeben und für 15 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Stop-Solution in jede Vertiefung pipettiert und die Absorption bei 450 nm innerhalb von 30 Min gemessen.

2.3.13 Populationsverdopplungszeit

Jeweils 15 000 Fibroblasten wurden in die Vertiefungen von 3 verschiedenen 24-Well-Platten überführt, eine Platte mit 50 μM CNP und eine zweite mit 150 μM CNP behandelt und im Inkubator inkubiert. Nach 24 h wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen und ein Mediumwechsel (5% FCS) durchgeführt. Jeden Tag wurden die Zellen von jeweils zwei Vertiefungen der Platten abtrypsiniert und in einer Zählkammer gezählt.

Um den Zellen genug Nährmedium zur Verfügung zu stellen wurde alle 3 Tage ein Mediumwechsel (5% FCS) durchgeführt. Aus den absoluten Werten der jeweiligen Zählungen wurde eine Wachstumskurve erstellt und die Populationsverdopplungszeit berechnet.

2.3.14 Messung des oxidativen Status der Zelle (GSH-GSSG-Verhältnis)

Dermale Fibroblasten wurden in Zellkulturschalen von 9 cm Durchmesser ausgesät und bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit 150 μM CNP für 48 h, mit 10 ng/ml rTGF β 1, 100 μM D,L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin (BSO) oder 75 μM cisPlatin für 24 h behandelt. Für die technische Kontrolle wurden die Zellen mit 250 μM H $_2$ O $_2$ für 1 h inkubiert. Die Proben wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 μl kaltem HCl (10 mM) auf Eis lysiert. Jeweils 100 μl Lysat einer Probe wurden in 2 verschiedene Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, ein Reaktionsgefäß davon wurde mit 10 μl M2VP (1-Methyl-2-Vinylpyridinium-Trifluoromethansulfonat) versetzt, so dass nach dem Lysieren entstandene Radikale, die den Gehalt an GSSG erhöhen würden, abgefangen wurden. Die mit M2VP versetzten Proben für die Messung des GSSG-Gehalts wurden 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert, die Proben ohne M2VP auf Eis belassen. Anschließend wurden die Proben für 10 Min bei 1000 rpm zentrifugiert und 20 Sek auf Eis sonifiziert. Jeweils 50 μl der Standards (0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.5, 3.0 μM) und der Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert, jeweils 50 μl Chromogen (Ellman's Reagent) und 50 μl Enzym (Glutathion-Reduktase) dazugegeben, die Platte für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 50 μl NADPH-Lösung versetzt. Die NADPH-Abnahme wurde photometrisch bei 412 nm für 15 Min im Plate Reader gemessen. Aus den gemessenen Werten der Standards wurde jeweils eine Standardkurve für GSH und GSSG (Abb. 7) aus der vorher berechneten Net Rate (Abb. 6) abgeleitet.

Berechnung der Steigung:

$$A_{412 \text{ nm}} = \frac{\text{MaxOD} - \text{MinOD}}{15 \text{ Min}} * 15 \text{ Min} + \text{MinOD}$$

Berechnung der Net Rate:

$$\text{Net Rate} = A_{412 \text{ nm}} \text{ Standard } x - A_{412 \text{ nm}} \text{ Standard } 0.0$$

Abb. 6: Berechnung der Steigung und der Net Rate

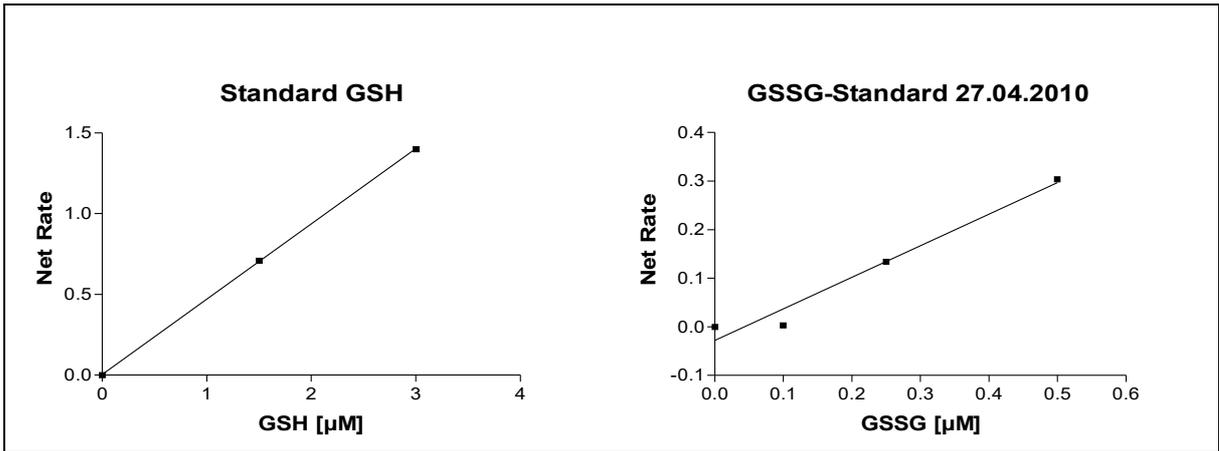


Abb. 7: Beispiele für Standardkurven

Aus der Steigung der Standard-Kurven und dem Y-Achsen-Abschnitt, bei dem die Standardkurve die Y-Achse schneidet, ließ sich dann die GSH- bzw. die GSSG-Konzentrationen der einzelnen Proben berechnen (Abb. 8):

$$\text{GSH } [\mu\text{M}] = \frac{(A_{412 \text{ nm}} \text{ Probe } x - A_{412 \text{ nm}} \text{ Standard } 0.0) - \text{Y-Achsen-Abschnitt}}{\text{Steigung}}$$

Abb. 8: Berechnung der reduzierten Glutathion[GSH]-Konzentration

Aus den Werten der GSH und GSSG-Konzentrationen der gleichen Proben wurde dann die GSH-GSSG-Ratio berechnet (Abb. 9):

$$\text{GSH-GSSG-Ratio} = \frac{\text{GSH}}{\text{GSSG}}$$

Abb. 9: Berechnung des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Glutathion in Form der GSH-GSSG-Ratio

2.3.15 Superoxid-Nachweis mittels Dihydroethidium (DHE)

Dihydroethidium, die reduzierte Form des Ethidiumbromids, kann Zellmembranen penetrieren und als oxidiertes Ethidium in die DNA interkalieren. Oxidiertes Ethidium fluoresziert rot bei einer Anregungswellenlänge von 518 nm und einer Emissionswellenlänge

von 605 nm. Es entsteht bei gleichzeitiger Reduktion von Superoxid und kann somit als qualitativer Nachweis von Superoxid angesehen werden.

Fibroblasten wurden auf Glasplättchen von 2,5 cm Durchmesser in Zellkulturschalen von 3,5 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und für 24 h mit 150 μM CNP und 2.5 mM PQ^{2+} koinkubiert, mit 10 ng/ml rTGF β 1 für 1 h bzw. 1 Min allein oder nach einer 24-stündigen Vorbehandlung mit 150 μM CNP behandelt. Die so behandelten Zellen wurden mit HBSS gewaschen, mit 1 ml einer 2.5 μM DHE:HBSS-Lösung für 1 h inkubiert und anschließend erneut mit HBSS gewaschen. Die Glasplättchen wurden in eine Attaflour cell chamber eingespannt und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

2.3.16 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dichlorofluorescein

Der intrazelluläre ROS-Gehalt in Hautfibroblasten wurde nach Zugabe von CNP und rekombinantem TGF β 1 mit Hilfe der Dichlorofluorescein-Messung untersucht. Die Methode wurde wie bereits beschrieben (Stuhlmann et al., 2004) durchgeführt. Das Diacetat des Farbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) wird in der Zelle durch Esterasen abgespalten. Hierdurch wird der Farbstoff membranimpermeabel und verbleibt in der Zelle. H_2DCF wird durch ROS zu DCF oxidiert, was photometrisch detektiert werden kann.

Dermale Fibroblasten wurden in einer 24-Well-Platte bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die Behandlung erfolgte mit 150 μM CNP und 2.5 mM PQ^{2+} über 24 h (Koinkubation). Die Vertiefungen wurden abgesaugt und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Behandlung mit rTGF β 1(5 ng/ml). Im Anschluss wurden die Zellen 100 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ in HBSS ausgesetzt und direkt anschließend die Fluoreszenz (Exzitation 488 nm, Emission 520 nm) gemessen. Die Fluoreszenz wurde insgesamt über 1,5 h gemessen, wobei die Fluoreszenz alle 5 Min detektiert wurde.

2.3.17 Aktivitätsmessung der Lactat-Dehydrogenase

Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) wird als Marker für Gewebsschädigung und Zelluntergang von den nekrotischen Zellen in das sie umgebende Medium abgegeben. Die Aktivität der

LDH kann photometrisch über den NADH-Verbrauch nachgewiesen werden und dient somit als Nachweis von Nekrose.

Fibroblasten wurden in Zellkulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser bis zur Subkonfluenz von 70-80% kultiviert. Es erfolgte eine Behandlung mit 150 μM CNP für 24 h, anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt, damit keine CNP im Überstand zu finden waren. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 2.5 mM PQ^{2+} und 250 μM H_2O_2 (Kontrolle) für weitere 24 h. Aus 10 ml LDH-Assay-Buffer und 297 μl einer NADH-Stock-Lösung (5 mg NADH/500 μl LDH-Assay-Buffer), sowie 187 μl einer Pyruvat-Stock-Lösung (5 mg Pyruvat/500 μl LDH-Assay-Buffer) wurde eine Reaktionslösung hergestellt.

Jeweils 56 μl der Überstände der Proben wurden in eine 96-Well-Platte überführt, 200 μl der Reaktionslösung zugefügt und die Absorption für 15 Min bei 412 nm photometrisch gemessen.

2.3.18 Aktivität des Apoptoseenzym Caspase-3

Caspase-3 ist ein Enzym, das DNA und spezifisch auch die Aminosäuren-Sequenz von PARP schneidet und somit maßgeblich in den Apoptosevorgang involviert ist (Boulares et al., 1999). Das Substrat Ac-DEVD-AMC enthält diese PARP-Sequenz und fluoresziert, sobald es von Caspase-3 an dieser Stelle geschnitten worden ist, und dient somit dem Nachweis von Caspase-3-Aktivität und Apoptose.

Fibroblasten wurden in Zellkulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und anschließend für 24 h mit 150 μM CNP und für 8 h mit 100 nM Staurosporin, einer Apoptose-induzierenden Substanz, behandelt. Die Zellen wurden auf Eis mit 200 μl Caspase-Lysis-Buffer lysiert, für 15 Min auf Eis stehen gelassen, dabei alle 5 Min gevortext und anschließend für 15 Min bei 13 000 g bei 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

20 μg Protein wurden mit 200 μl Caspase-Proben-Puffer und 2 μl Substrat (Ac-DEVD-AMC, 1 mM) gemischt und in eine 96-Well-Platte überführt. Für die Negativ-Kontrolle wurde 2 μl eines 2.5 μM Caspase-Inhibitor-III zugegeben. Die Fluoreszenz wurde bei 37°C nach jeweils 10 Min über einen Zeitraum von 60 Min bei einer Exzitation von 360 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

2.3.19 Invasionsassay

In diesem Assay kann die Invasion von SCL1-Zellen durch eine Membran in Richtung eines Chemoattraktands beobachtet werden. Dazu wurden 24-Well-Platten mit Zellkultureinsätzen, sogenannten Transwells, verwendet. Die Zellkultureinsätze besitzen an ihrer Unterseite eine 6,5 mm durchmessende Membran, die über Poren mit einer Größe von 8 μm verfügt. Die Innenseite der Zellkultureinsätze wurde mit Matrigel beschichtet, was dieselben Bestandteile wie die Basallamina der Haut beinhaltet. Durch die Beschichtung wird die Invasion von Zellen durch die Basalmembran simuliert (Abb. 10).

Das Matrigel wurde 1:30 in kaltem PBS verdünnt. Anschließend wurden je 50 μl dieser Lösung in die Zellkultureinsätze pipettiert. Um eine lückenlose Beschichtung der Membran zu gewährleisten, wurden die Einsätze vorsichtig geschwenkt. Die Membran wurde dann über Nacht bei RT mit 200 μl sterilem Wasser überschichtet. Es wurden je 5×10^5 SCL-1-Zellen in 400 μl serumfreiem Medium in die Zellkultureinsätze eingesät. 300 μl eines Chemoattraktands wurden in die Vertiefungen der Platte gegeben und der Zellkultureinsatz luftblasenfrei darin platziert. Als Chemoattraktand fungierten konditionierte Medien von Myofibroblasten (CM^{MF}) und Zellen, die vor Behandlung mit rTGF β 1 mit 50 bzw. 150 μM CNP vorinkubiert wurden ($\text{CM}^{\text{TGF+CNP}}$). Der Invasionsassay wurde für 72 h inkubiert.

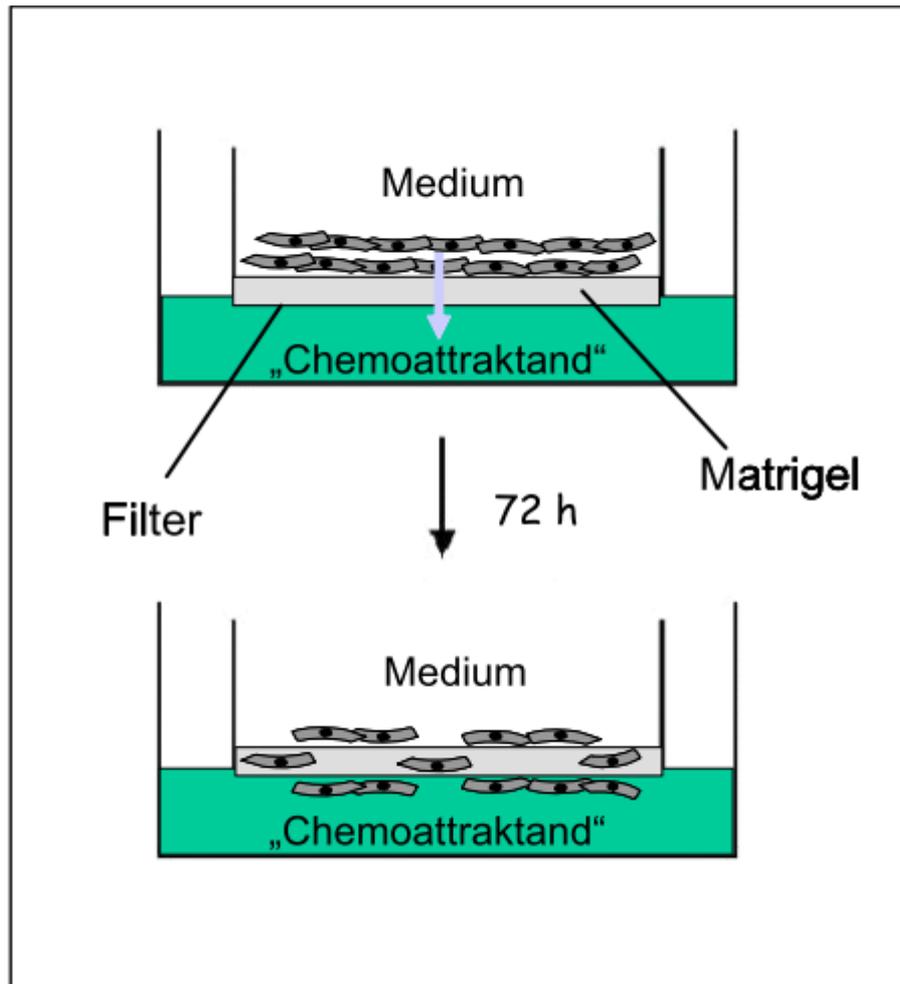


Abb. 10: Schematische Darstellung eines Invasionsassays. Gezeigt ist ein Zellkultureinsatz mit Membran in einer Zellkulturschale. Auf der Oberseite der Membran sind Zellen dargestellt, die durch die Membran in Richtung eines Chemoattraktands wandern können [Quelle: Cat, 2007].

Nach der 3tägigen Inkubation wurde das Medium der oberen Kammer abgesaugt und die Zellen auf dem Matrigel mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen auf der Unterseite des Zellkultureinsatzes wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann 15 Min mit kaltem Methanol auf der Membran fixiert. Anschließend wurden die Zellen zuerst mit PBS, dann mehrfach mit dH_2O gewaschen und schließlich für einige Minuten luftgetrocknet. Die invadierten Zellen auf der Unterseite der Membran wurden für 1 Min mit einer Coomassie-Blue-Färbelösung angefärbt. Zur Entfernung überschüssiger Färbelösung wurde die Unterseite der Membran erneut mit dH_2O gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Membranen wurden mit einem Skalpell aus den Zellkultureinsätzen herausgeschnitten und mit einem Tropfen Fluoromount C auf einem Objektträger fixiert. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.3.20 Herstellung von Dermis- und Hautäquivalenten

„Dreidimensionale Dermismodelle der Haut wurden wie bereits beschrieben (Mauch et al., 1988) mit geringfügigen Veränderungen hergestellt. Lyophilisiertes Rattenschwanz-Kollagen Typ I wurde in einer 0,2%-igen Essigsäure-Lösung aufgenommen und auf eine Konzentration von 3,2 mg/ml eingestellt. Humane Hautfibroblasten wurden mit einer Dichte von $1,2 \times 10^5$ Zellen in DMEM mit 5% FCS und 0,8 mg Kollagen/ml aufgenommen. Das Zell-Kollagen-Gemisch wurde anschließend für 24 h in unbeschichteten Petrischalen von 3,5 cm Durchmesser inkubiert, wodurch sind die Hautfibroblasten in den Modellen in der Lage, die Kollagenmatrix zu kontrahieren“ (Cat, 2007). Das Medium wurde durch serumfreies Medium oder serumfreies 150 μ M CNP beinhaltendes Medium ausgetauscht und für 24 h inkubiert. Nach einer folgenden 48-stündigen Behandlung mit rTGF β 1 (10 ng/ml) wurde jedes Kollagen-Dermismodell fotografiert, um die erfolgte Kontraktion durch die (Myo-)Fibroblasten mittels Vermessung des Dermismodell-Durchmessers zu bestimmen.

Um die Expression von α SMA als Marker für Myofibroblasten untersuchen zu können, mussten die HDF zunächst aus dem Kollagen isoliert werden. Dafür wurden die Dermismodelle mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 3 mg/ml Clostridium histolyticum Kollagenase/PBS-Lösung für 30 Min inkubiert. Dieses Gemisch wurde anschließend für 5 Min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen. Das Lysat wurde im Western Blot analysiert.

Die Hautäquivalente (Henkel KGaA, Düsseldorf) wurden nach Damour et al. (1994) und Schlotmann et al. (2001) hergestellt. Zwei $\times 10^5/\text{cm}^2$ HDF wurden auf ein Kollagen-Chitosanglykosaminoglykan (cc-GAG)-Biopolymer aufgesät, das zuvor in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte platziert wurde. „Das Dermisäquivalent wurde für 14 Tage in DMEM mit 10% FCS und 50 μ g/ml Ascorbinsäure submers kultiviert, wobei das Medium alle 24 h erneuert wurde. Humane epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ cm^2 auf das Dermisäquivalent gesät und für weitere 7 Tage in SFM-Keratinozytenmedium und 50 μ g/ml Ascorbinsäure kultiviert. Anschließend wurden die Hautäquivalente für weitere 14 Tage in einer Luft/Flüssigkeits-Phase (air-liquid interface) in Keratinozyten-SFM-Medium/50 μ g Ascorbinsäure/ml kultiviert. In dieser Phase können die Keratinozyten differenzieren und stratifizieren, bis sich eine Hornschicht bildet. Während dieser Phase wurde das Medium alle 24 h erneuert. Die Hautäquivalente wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 6 μ m angefertigt und anschließend mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt“ (Cat, 2007). Die

Hautäquivalente wurden für 3 Tage mit rTGFβ1 oder in Kombination mit 150 μM CNP inkubiert. Für die Lysat-Herstellung musste die Dermis von der Epidermis getrennt werden, wozu die Hautäquivalente mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit Dispase II (2.4 U/ml) inkubiert wurden. Die solitäre Dermis wurde dann für 30 Min in 3 mg/ml Clostridium histolyticum Kollagenase/PBS inkubiert. Das Zell-Kollagenase-Gemisch wurde 5 Min bei 3000 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen und das Lysat per Western Blot analysiert.

2.4 Biochemische Verfahren

2.4.1 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Dabei binden Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran, von der DNA, Proteinverunreinigungen und Salze in zwei Waschschritten entfernt werden. Anschließend wird die RNA mit sterilem H₂O von der Matrix eluiert. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch durch Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die RNA wurde unter Verwendung des Enzyms Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) eingesetzt. Dazu wurde 1 μg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 μl zusammen mit 1 μM Oligo(dT)15-Primer für 5 Min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden 10 μl des folgenden Reaktionsansatzes hinzugefügt:

4 μl 5-fach Reaktionspuffer (Invitrogen)
2 μl DTT (100 mM)
1 μl dNTP-Mix (je 10 mM)
2.5 μl Wasser
0.5 μl Reverse Transkriptase (200 U/μl, Invitrogen)

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 42°C und wurde darauf durch Denaturieren des Enzyms (5 Min, 65°C) beendet. Die so erhaltene cDNA wurde nach Verdünnung mit Wasser im Verhältnis 1:5 für die Real-Time PCR verwendet.

2.4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Real-Time PCR wurde in einem LightCycler unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 3 mM MgCl₂, je 0.5 µM forward und reverse Primer, 2 µl 10-fach Reaktionspuffer (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I) und 4 µl im Verhältnis 1:5 verdünnter cDNA (dies entspricht 40 ng revers transkribierter RNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die PCR wurde in Glaskapillaren im LightCycler mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil durchgeführt: initial wurde die DNA denaturiert, anschließend die Taq-DNA-Polymerase für 10 Min bei 95°C hitzeaktiviert, danach folgte eine zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung (10 Sek bei 95°C), Primer-Anlagerung (5 Sek bei einer primerspezifischen Temperatur) und Elongation (primerspezifische Elongationszeit bei 72°C). Die Sequenzen der für die Real-Time PCR verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2.1 gegeben. Der Zyklus aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wurde 50 Mal wiederholt. Um die Spezifität des Amplifikats zu überprüfen, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurve (60-95°C) aufgenommen.

Genes	Primer (5'-3')
αSMA	Forward: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT
	Reverse: TCATGATGCTGCTGTTGTAGGTGGT
HPRT1	Forward: ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT
	Reverse: CTTAGGCTTTGTATTTTGCTTTTC

Tabelle 1: Sequenzen der Primer für die Real-Time RT-PCR

2.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In diesem Experiment wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid. Durch den Zusatz des amphiphilen Detergens SDS, das sich an die Proteine anlagert, bilden sich Mizellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit, so dass eine Wanderung aller so modifizierten Proteine entlang des angelegten elektrischen Stroms durch das Acrylamid-Gel ermöglicht wird. Durch das unterschiedliche Molekulargewicht der Proteine können diese verschieden schnell durch das Gel wandern und es erfolgt eine Auftrennung. Bei der Probenvorbereitung wurden die

Proteine in SDS lysiert, um einen Überschuss zu erschaffen und damit die Mizellen-Bildung voranzutreiben, auf eine gleiche Proteinmenge normiert, mit SDS auf ein gleiches Volumen aufgefüllt und anschließend auf 95°C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zu zerstören (Denaturierung).

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden Gele gegossen, die aus zwei Gelkomponenten bestehen: Das größere Trenngel (pH 8,8), welches der Auftrennung der Proteine dient, und das darüber liegende weitporige Sammelgel (pH 6,8), welches ein zeitgleiches Einlaufen der Proteine in das Trenngel ermöglicht, wodurch eine präzisere Auftrennung der Proteinbanden erreicht wird (Zusammensetzung siehe Tabelle 2 und 3). Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die chemische Kopolymerisierung der Acrylamidmonomere gestartet. TEMED führt dabei zur Bildung freier Persulfatradikale.

Aqua dest.	3500 µl
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (40%)	720 µl
Tris, pH 6,8	650 µl
10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 2: Zusammensetzung eines 5 %igen Sammelgels

	10%	12%	15%
Aqua dest.	4800 µl	4300 µl	3550 µl
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (40%)	2500 µl	3000 µl	3750 µl
Tris, pH 6,8	2500 µl	2500 µl	2500 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschieden prozentigen Trenngele

Abhängig von der Konzentration der Acrylamidmoleküle entstehen in der Gelmatrix des Trenngels unterschiedlich große Poren. In diesen Experimenten wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von überwiegend 10%, aber auch von 12% und 15% verwendet. Die folgende Tabelle zeigt die Auftrennung der Proteine bei verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen:

Proteingröße [kDa]	Acrylamid-Konzentration [% (w/v)]
12 – 43	15
16 – 68	10
36 – 94	7,5
57 – 212	5

Tabelle 4: Auftrennung der Proteine bei verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen: Proteingröße [kDa] und Acrylamid-Konzentration (% (w/v))

Die Proben wurden in das Gel mit einer Hamilton-Pipette aufgetragen und elektrischer Strom (120 V, konstant) angelegt. Nach Auftrennung der Proteine ist das Gel für weitere Bearbeitungen verwendbar: Färbung, immunologische Nachweise (Blotting) oder, bei radioaktiven Proben, der Autoradiographie.

2.4.3 Western Blot (semi-dry) als immunologischer Proteinnachweis

Der Western Blot wurde für den Nachweis von Proteinen, wie z.B. α SMA, eingesetzt. Bei dieser Methode werden Proteine aufgrund eines elektrischen Feldes aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden ein diskontinuierliches Puffersystem und als Nachweis Horseradish-Peroxidase-(HRP-)gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Nach der Durchführung der SDS-PAGE wurden zu Beginn pro Gel sechs Filterpapiere und eine PVDF-Membran in Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und je zwei Blatt Filterpapier in Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkt. Die PVDF-Blotmembran wurde durch kurzes Schwenken (ca. 30 Sek) in Methanol aktiviert. Die Graphitelektroden (Anode und Kathode) der Blotkammer wurden befeuchtet. Auf die Anode wurden jeweils übereinander zwei Blatt Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer I, zwei Blatt Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II platziert, gefolgt von der PVDF-Membran und dem Trenngel und zwei Blatt Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer. Hierbei war darauf zu achten, dass sowohl Membran als auch Gel luftblasenfrei aufgelegt wurden. Nach Auflegen der Kathode wurde für 1 h ein Strom von konstanten 60 mA pro Gel angelegt. Die Membran wurde nach dem Blotten in Ponceau S-Lösung für 5 Min gefärbt, um sicherzustellen, dass die Proteinbanden vollständig von dem Trenngel übertragen wurden. Das Gel wurde entsorgt. Nach Entfärbung der Membran mit TBST wurde sie zur Absättigung in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver/TBST für 1 h geschüttelt (sog. Blockierung). Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper (in der jeweiligen etablierten Verdünnung in TBST mit 5%

(w/v) fettfreiem Milchpulver) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper von der Membran abgenommen und die Membran dreimal für je 15 Min mit TBST gewaschen, um nicht gebundene Antikörperrückstände vollständig zu entfernen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit dem jeweiligen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (in seiner jeweiligen ausgetesteten Verdünnung in TBST mit 5% Milchpulver) bei Raumtemperatur und erneutes dreimaliges Waschen mit TBST für je 15 Min. Die Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers an die korrespondierende Proteinbande auf der Membran wurde mittels Luminol nachgewiesen. Dazu wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung) im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membran für 5 Min bei RT inkubiert. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde über mehrere Minuten (die Länge der Exposition variierte je nach dem nachzuweisenden Protein) in Dunkelheit exponiert. Anschließend erfolgte in der Dunkelkammer die Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilms. Densitometrische Analysen der Proteinbanden wurden mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt.

2.4.4 Immunologischer Nachweis carbonylierter Proteine (Oxy-Blot)

Carbonylierte Proteine gelten als Marker für eine oxidative Schädigung der Zellen. Zum Nachweis wurden dermale Fibroblasten bis zur Subkonfluenz in Zellkulturschalen von 3,5 cm Durchmesser kultiviert. Es folgte eine 40-stündige Behandlung mit 150 μ M CNP und für weitere 8 h eine zusätzliche Inkubation mit 10 ng/ml rTGF β 1. Als technische Positivkontrolle wurden Fibroblasten mit 250 μ M H₂O₂ für 1 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer (1% SDS) aufgenommen. Der Nachweis oxidierter Proteine erfolgte mit Hilfe des Oxy-Blot TM Protein Oxidation Detection Kit. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Zunächst wurden 5 μ l des Lysats mit 5 μ l einer 12%-igen SDS-Lösung vermischt, um eine Endkonzentration von 6% SDS herzustellen. Zur so vorbereiteten Probe wurden 10 μ l 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (DNPH) zugegeben und diese für 15 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 7.5 μ l Neutralisations-Lösung hinzugegeben und eine weitere Derivatisierung damit gestoppt. Die derivatisierten Proben konnten auf ein 12%-iges Gel aufgetragen und wie beschrieben auf eine PVDF-Membran geblottet werden. Die PVDF-Membran wurde für 1 h in Blocking/Dilution-Puffer blockiert und bei 4°C schüttelnd über Nacht mit einem Rabbit-anti-DNP-Antikörper (Verdünnung 1:150 in Blocking/Dilution-

Puffer) inkubiert. Nach Abnahme des Antikörpers wurde die Membran dreimal für 15 Min mit PBS-T gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Goat-Anti-Rabbit-IgG, HRP-gekoppelt) für 2 h in Blocking/Dilution-Puffer (Verdünnung 1:300). Danach wurde erneut dreimal mit PBS-T für 15 Min gewaschen. Zum Nachweis der Bindung der Antikörper an die carbonylierten Proteine wurde die Luminol-Lösung mit der Verstärker-Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membran für 5 Min damit inkubiert. Es folgte die Exposition, Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilmes, wie beschrieben.

2.5 Statistik

Für die statistische Analyse der Signifikanz in den Auswertungen wurden der Student's T-Test und der ANOVA Dunnett's Test durchgeführt. Vor der Studie wurden $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ als Maß für die Signifikanz festgelegt. $\#p > 0,05$ deutete auf keine Signifikanz hin.

2.6 Ethikkommission

Alle Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer des Ethikvotums: 4196).

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Ceroxid-Nanopartikeln auf humane dermale Fibroblasten (HDF) untersucht. HDF wurden mit Ceroxid-Nanopartikeln behandelt und deren Verteilung in und deren Toxizität auf die Fibroblasten ermittelt. Der Einfluss von Ceroxid-Nanopartikeln auf die intrazelluläre, reaktive Sauerstoffspezies(ROS)-abhängige Transition von dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren Auswirkung auf die Invasion von Tumorzellen wurde ermittelt.

3.1 Charakterisierung der Ceroxid-Nanopartikel

Bevor mit der eigentlichen Arbeit angefangen werden konnte, mussten einige Charakteristika der Ceroxid-Nanopartikel, wie Größe, Aufnahme und Toxizität beurteilt werden. Es standen unterschiedliche Ceroxid-Nanopartikel zur Verfügung.

3.1.1 Größe der Ceroxid-Nanopartikel

Prof. Sudipta Seal (Orlando, Florida, USA) stellte der Arbeitsgruppe von Professor Brenneisen freundlicherweise verschiedene, von ihm synthetisierte Ceroxid-Nanopartikel zur Verfügung: In Wasser gelöste Ceroxid-Nanopartikel (H₂O-CNP) und mit Dextran gekoppelte Ceroxid-Nanopartikel (Dex-CNP), welche unterschiedlichen Eigenschaften aufweisen.

H₂O-CNP besitzen einen sauren pH-Wert im Bereich von 2.5 - 4.5. Obwohl die Partikelgröße selbst 3-5 nm beträgt, führt die Lösung in deionisiertem Wasser dazu, dass sie sich durch Agglomeration zu größeren primären (10 – 25 nm) und sekundären (25 – 50 nm) Partikeln zusammenschließen. Diese Verbindung ist allerdings nicht sehr stabil und kann durch Sonifizieren aufgebrochen werden (Das et al., 2013).

Dex-CNP sind mit einem 1000 Da großen Dextran gekoppelte Partikel. Diese Kopplung bewirkt eine Stabilisierung in alkalischem bis neutralem Medium. Der pH-Wert der Dex-CNP variiert von anfangs 8.0 – 10.0 (frisch synthetisierte Partikel) bis zu einem pH-Wert von 5.0 – 7.0 bei älteren Partikeln. Durch die Dextranhülle um die einzelnen Partikel kommt es nicht zu einer Zusammenlagerung zwischen den Partikeln und die Größe von 3 – 5 nm bleibt erhalten.

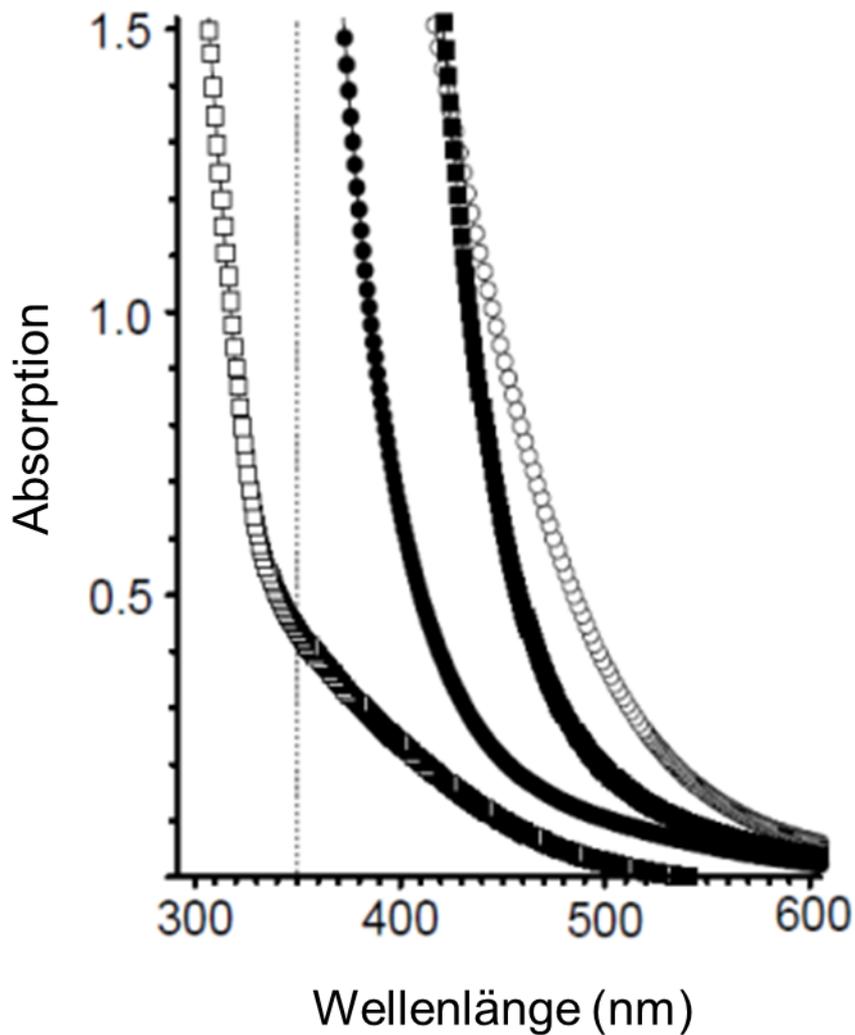


Abb. 11: UV-Spektrophotometrische Darstellung der Absorption von CNP. Verglichen werden die Absorptionskurven von Dex-CNP (ausgefüllte Kreise und Quadrate) und H₂O-CNP (leere Kreise und Quadrate), jeweils frisch synthetisiert (Kreise) und 7 Tage alt (Quadrate).

Cer kann in zwei verschiedenen Oxidationsstufen +III / +IV auftreten. Die Ceroxid-Nanopartikel bestehen aus einer Mischung von Ce³⁺ und Ce⁴⁺. Um darzustellen, welcher Status bei den beiden Nanopartikeln bevorzugt auftritt, wurde eine UV-Spektrophotometrie durchgeführt. Gleichzeitig wurde auch die Stabilität in neutralem pH der beiden CNP gemessen. Während frisch synthetisierte H₂O-CNP einen höheren Anteil an Ce⁴⁺-Oxidationsstatus aufweisen (Absorptionspeak > 350 nm, Abb. 11 (ausgefüllte Kreise)), führt eine Alterung der Partikel von 7 Tagen zu einer Abnahme des Absorptionsspektrums in den Bereich von 250 – 350 nm (Abb. 11 (ausgefüllte Quadrate)), was einem Oxidationsstatus von Ce³⁺ entspricht (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013).

Auch frisch synthetisierte Dex-CNP weisen einen Absorptionspeak bei > 350 nm auf, was einer Oxidationsstufe von Ce^{4+} entspricht (Abb. 11 (leere Kreise)). Eine Alterung der Dex-CNP führt dagegen in deutlich geringerem Ausmaß zu einer Abnahme des Absorptionsspektrums (Abb. 11 (leere Quadrate)), was zu der Aussage führt, dass eine Kopplung mit Dextran eine Stabilitätserhöhung des Oxidationsstatus der CNP bewirkt. Grundsätzlich kann man auch hier von einer Mischung aus Ce^{3+} - und Ce^{4+} -Status ausgehen; diese ist aber deutlich in Richtung Ce^{4+} verschoben (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013).

3.1.2 Aufnahme und Verteilung der CNP in Zellkultur und *in vivo*

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob humane dermale Fibroblasten (HDF) Ceroxid-Nanopartikel aufnehmen. Dafür wurden HDF bis zur Subkonfluenz kultiviert und mit Dex-CNP über verschiedene Zeiträume (8 – 48 h) behandelt. Nach 16 h konnte per Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM) eine Aufnahme in die behandelten Fibroblasten dargestellt werden (Abb. 12 (b)). Als Kontrolle dienten unbehandelte HDF (Abb. 12 (a)). Es konnte eine Partikelgröße von > 50 nm beobachtet werden, was für eine Aggregation einzelner Partikel spricht, die sich vermutlich in Endosomen befinden.

Zusätzlich sollte beurteilt werden, wo sich die Ceroxid-Nanopartikel in den Zellen anreichern. Dafür wurden HDF bis zur Subkonfluenz kultiviert und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten CNP behandelt. Eine grüne Fluoreszenz konnte im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden, die sich in den Fibroblasten ubiquitär im Zytosol darstellte (Abb. 12 (c)). Der Nukleus war dabei ausgespart, was die Vermutung zulässt, dass die CNP nicht in den Zellkern eindringen können und ihre Wirkung ausschließlich im Zytosol entfalten. Um sicher zu stellen, dass die Fluoreszenz durch internalisierte CNP hervorgerufen wird, wurden die Zellen mit FITC-CNP behandelt, mehrfach mit PBS gewaschen und passagiert. Diese passagierten Zellen wurden bis zur Subkonfluenz in 3-cm-Zellkulturschalen auf 2,5-cm-Glasplättchen kultiviert und mikroskopiert. Auch in diesen Zellen war eine Fluoreszenz nachweisbar, was einen Rückschluss auf die Internalisierung einerseits zulässt, und andererseits auch darstellt, dass CNP nicht von den Fibroblasten abgebaut werden.

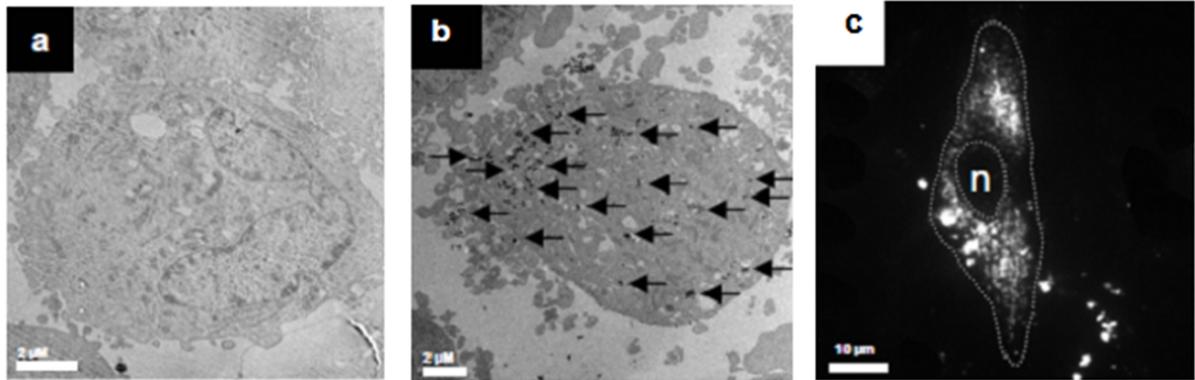


Abb. 12: Transmission-Elektronenmikroskopische (TEM) und fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Aufnahme von Dex-CNP in humanen dermalen Fibroblasten (HDF). HDF werden bis zur Subkonfluenz kultiviert und für 16 h mit 150 μM Dex-CNP inkubiert (b) und mittels TEM dargestellt. Die Pfeile weisen auf die CNP-Agglomerate im gesamten Cytosol der Zelle. Als Kontrolle dienten unbehandelte HDF (a). Weitere HDF werden mit 150 μM FITC-CNP für 24 h inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskop fotografiert (c), wo sich eine ubiquitäre Aufnahme der Dex-CNP im Cytosol darstellt. Die gestrichelte weiße äußere Linie rahmt einen Fibroblasten ein, die innere gestrichelte weiße Linie den Zellkern.

Nachdem eine Aufnahme der CNP in die Zellen gesichert war, stellte sich die Frage, ob die CNP über Endozytose aufgenommen werden oder über Diffusion in die Zelle gelangen können. Eine endozytotische Aufnahme scheint sehr wahrscheinlich, weil sich in den elektronenmikroskopischen Bildern die CNP-Agglomerate vesikelartig darstellten (Abb. 12 (b)). Zu diesem Zweck wurden Hautfibroblasten mit dem Endozytose-Hemmer Concanavalin A (20 μM) vorinkubiert, bevor sie mit FITC-CNP behandelt werden.

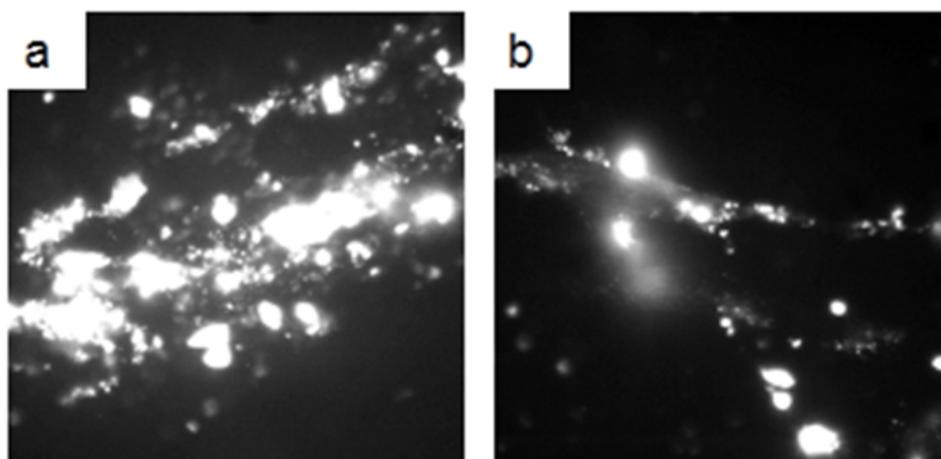


Abb. 13: Aufnahmemechanismen der Dex-CNP. Subkonfluente HDFs werden für 2 h mit 20 μM des Endozytosehemmers Concanavalin A (b) vorinkubiert und anschließend für weitere 24 h mit 150 μM FITC-CNP behandelt und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Im Fluoreszenzmikroskop konnte eine ubiquitäre Fluoreszenz der internalisierten Partikel im Cytosol bei den mit FITC-CNP behandelten HDF nachgewiesen werden (Abb. 13 (a)). Eine vorherige Behandlung mit Concanavalin A, einem Hemmstoff der klathrinabhängigen Endozytose, bewirkte eine geringere Fluoreszenz (Abb.13 (b)), was auf eine zum Teil Endozytose-vermittelte Aufnahme hinweist.

Es stellte sich die Frage, ob CNP intrazellulär vorliegen müssen, um ihre Wirkung zu entfalten. Dementsprechend müsste bei einer Verhinderung der endozytotischen Aufnahme der (später genauer beschriebene) antioxidative Effekt der Ceroxid-Nanopartikel vermindert sein. Zu diesem Zweck werden HDF mit Concanavalin A, sowie anschließend mit CNP behandelt und ein Laktat-Dehydrogenase-(LDH-)Assay durchgeführt.

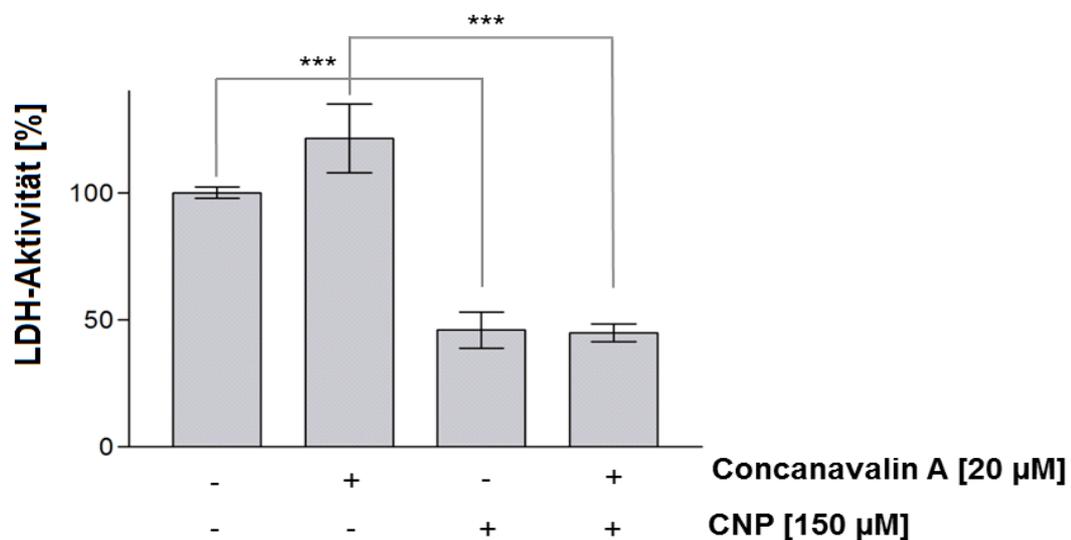


Abb.14: LDH-Aktivität im Überstand der HDF bei verminderter Aufnahme der CNP. Subkonfluente HDF werden für 2 h mit 20 µM Concanavalin A behandelt und anschließend für weitere 24 h mit 150 µM CNP inkubiert, der Überstand abgenommen und die NADH-Abnahme als Maß für die Aktivität der aus nekrotischen Zellen freigesetzte LDH photometrisch gemessen. Die in den Überstand freigesetzte LDH (mU) wird auf die Menge an Protein der kultivierten HDF bezogen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). *** p< 0.001

Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100% normiert (Abb. 14). Eine Behandlung mit Concanavalin A führte zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität auf 115,68%. Die Behandlung mit CNP führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der LDH-Aktivität auf 52,15%. Die Vorinkubation mit dem Endozytosehemmer vor der CNP-Inkubation führt zu einer Abnahme der LDH-Aktivität auf 45,39%. Dementsprechend führt eine Hemmung der endozytotischen Aufnahme der Ceroxid-Nanopartikel nicht zu einer Aufhebung der Wirkung von CNP. Da sich in der Mikroskopie allerdings nur zum Teil eine

über Endozytose vermittelte Aufnahme der CNP zeigte, stellte sich die Frage, ob die im Versuch veranschaulichte Wirkung auf die über andere Wege internalisierte CNP zurückführen lässt.

Um diesen Aspekt zu klären, wurden Fibroblasten mit FITC-gekoppelten CNP für 30 Minuten bzw. 1 h behandelt und anschließend mehrfach mit PBS gewaschen, um einen Effekt der extrazellulären, an der Zellmembran der HDF angelagerten CNP auszuschließen. Nach 1 h sind schon einige wenige internalisierte CNP im Fluoreszenz-Mikroskop nachweisbar, was einer sehr frühen und schnellen Aufnahme entspricht (Abb.15 (a)). Nach einer 30-minütigen Behandlung lassen sich unter dem Fluoreszenz-Mikroskop kaum internalisierte CNP darstellen (Abb. 15 (b)).

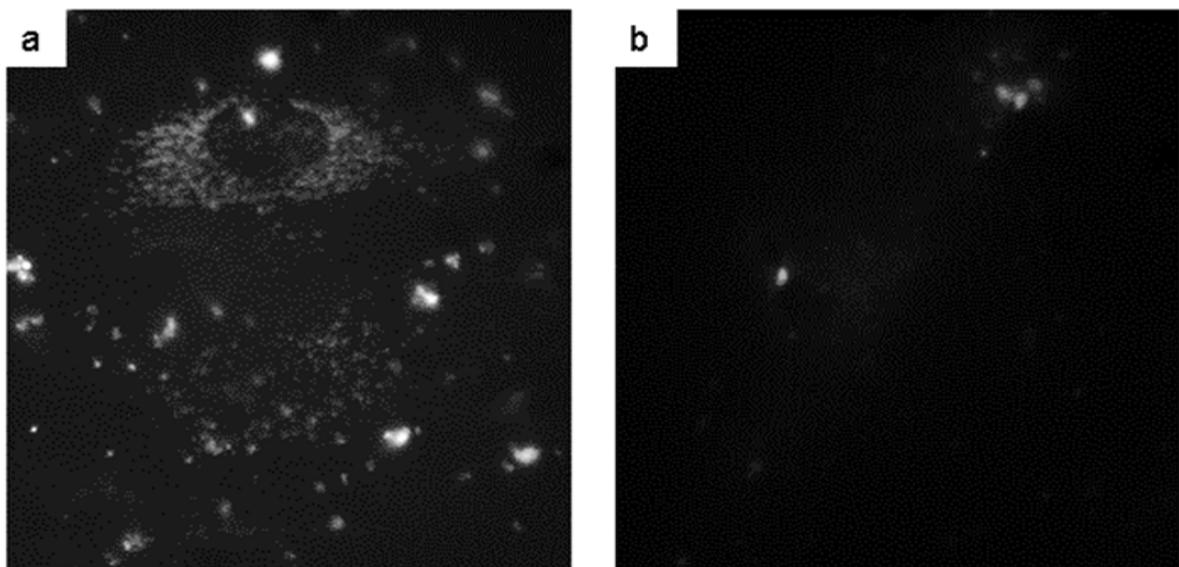


Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Darstellung internalisierter FITC-CNP in HDF nach einer Stunde bzw. 30 Minuten. Subkonfluente HDF werden mit 150 μ M FITC-markierten CNP für 30 Min bzw. 1 h inkubiert, mehrfach mit PBS gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch fotografiert. Vergrößerung: 40-fach.

Um die Wirkung von den geringen Mengen an internalisierten CNP nach kurzer Inkubation zu demonstrieren, wurde erneut ein LDH-Assay durchgeführt. HDF wurden für 1 h mit CNP vorinkubiert und für 24 h mit dem Superoxid-produzierenden Herbizid Paraquat (PQ^{2+}) behandelt. Um eine Wirkung der nicht internalisierten, im Medium gelösten CNP auszuschließen, wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

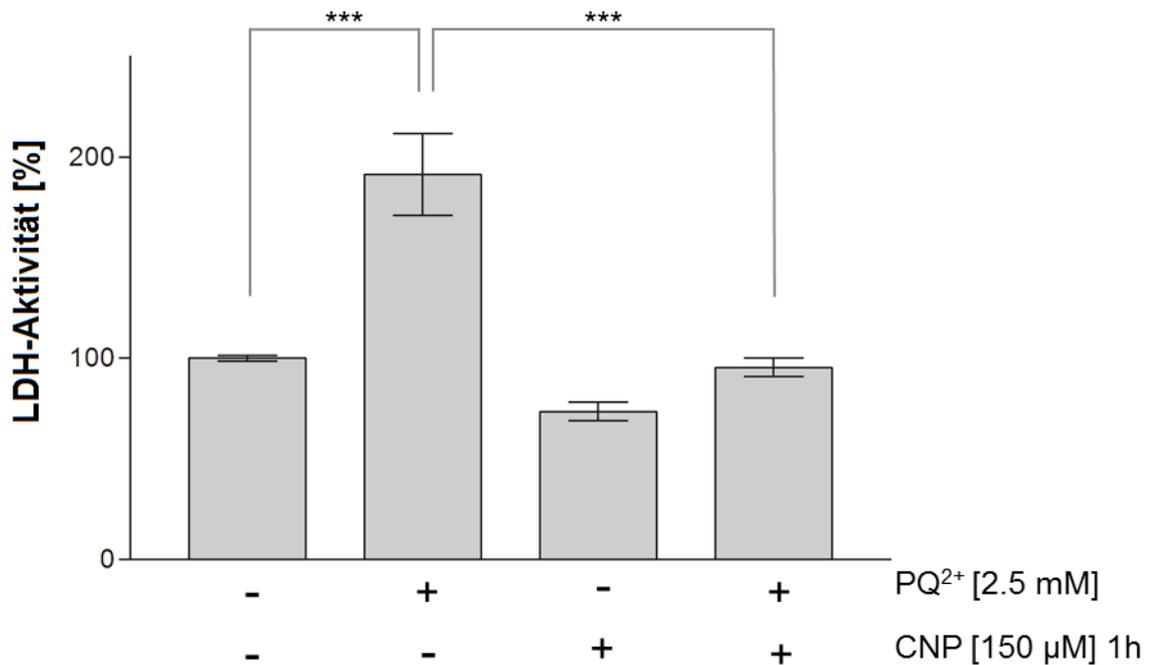


Abb. 16: Laktat-Dehydrogenase- (LDH-) Aktivität in HDF nach kurzer Inkubation mit CNP. Subkonfluente HDF wurden für eine Stunde mit 150 µM CNP vorinkubiert, mehrfach mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versorgt, für 24 h mit 2.5 mM Paraquat (PQ²⁺) behandelt und die LDH-Aktivität indirekt über den NADH-Verbrauch in den jeweiligen Überständen photometrisch gemessen. Die in den Überstand freigesetzte LDH (mU) wird auf den Proteingehalt der kultivierten HDF bezogen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). *** p<0.001

Die LDH-Aktivität der unbehandelten Kontrolle wurde auf 100% festgelegt (Abb. 16). Eine einstündige Behandlung mit CNP führte, im Gegensatz zu einer 24-stündigen Inkubation wie im vorhergehenden Versuch, zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der LDH-Aktivität gegenüber der Kontrolle (73,28% bei einstündiger Inkubation). Die Behandlung mit PQ²⁺ führte zu einer statistisch signifikanten Zunahme der LDH-Aktivität auf 191.32%. Eine Vorinkubation mit CNP vor der PQ²⁺-Inkubation bewirkte allerdings eine Normalisierung der LDH-Aktivität auf 73,38%.

In einem weiteren Experiment mit einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Christopher Reilly, Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA) sollte *in vivo* beurteilt werden, ob sich CNP nach intravenöser Gabe in der Haut anreichern. Zu diesem Zweck wurden acht Wochen alten Mäusen einmal pro Woche in PBS gelöste Dex-CNP intravenös gespritzt. Sie bekamen insgesamt fünf dieser nicht-toxischen Dosen. Als Kontrolle dienten drei Mäuse, die in den gleichen zeitlichen Abständen reines PBS intravenös gespritzt bekamen.

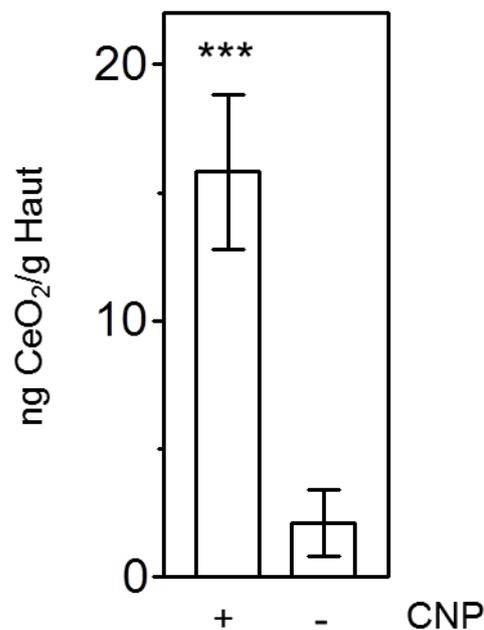


Abb. 17: Aufnahme von CNP *in vivo* (durchgeführt von Christopher Reilly, Blacksburg, Virginia, USA). Acht Wochen alten Mäusen wurde insgesamt fünfmal jeweils einmal pro Woche eine PBS-Lösung mit je 0.5 mg CNP/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse rasiert und Haut am Rücken exzidiert, die Haut lysiert (Aufbewahrung in 70%iger Stickoxid-haltiger Säure über Nacht, sowie weitere 40 Min Lysis mit Mikrowellenstrahlung bei 200°C) und mittels Massenspektroskopie untersucht. Die Abbildung zeigt die in die Haut aufgenommenen CNP [in ng] von 3 behandelten Mäusen. ***p <0.001

Die CNP-Spiegel wurden per Massenspektroskopie untersucht. Bei den behandelten Mäusen konnten 12 – 20 ng Ceroxid/g Haut nachgewiesen werden (Abb. 17), was einer 6 bis 10fachen Zunahme von Ceroxid gegenüber den unbehandelten Mäusen entspricht. Eine systemische Applikation von CNP führt demnach zu einer Akkumulation von CNP in der Haut der Maus (Alili et al., 2011).

3.1.3 Toxizität verschiedener Ceroxid-Nanopartikel

Um den Einfluss der verschiedenen Ceroxid-Nanopartikel auf die Vitalität der humanen dermalen Fibroblasten (HDF) zu untersuchen, wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen der Partikel (bis 250 µM) über 48 h behandelt. Mittels MTT-Test wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase als Maß der Vitalität gemessen.

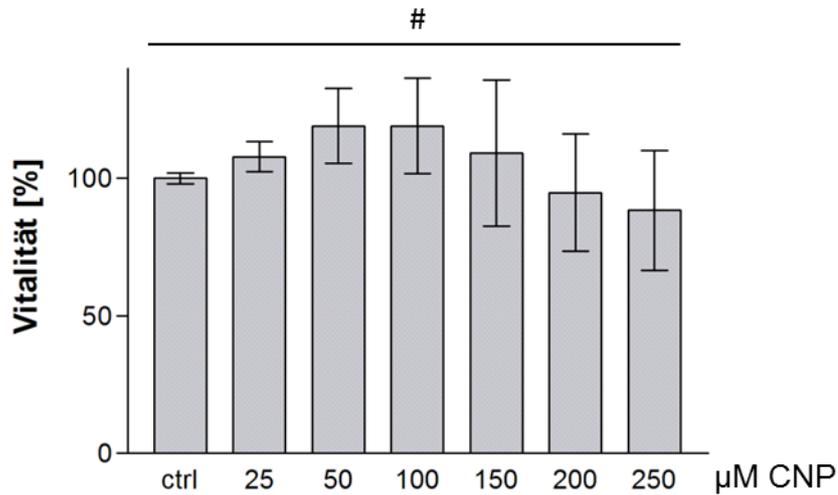


Abb. 18: Toxizität der in Wasser gelösten Nanopartikel (H₂O-CNP). In 24-Well-Platten bis zur Subkonfluenz kultivierte HDF wurden mit steigenden Konzentrationen von H₂O-CNP für 48 h inkubiert und anschließend deren Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase mittels MTT-Test gemessen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). # p>0.05

Die in Wasser gelösten Ceroxid-Nanopartikel (H₂O-CNP) führten in HDF zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Vitalität gegenüber der unbehandelten Kontrolle: 150 µM H₂O-CNP führen zu einer Überlebensrate von 109% (Abb. 18), 250 µM H₂O-CNP zu einer Überlebensrate von 88%. Daraus lässt sich schließen, dass H₂O-CNP mit Konzentrationen ≤ 250 µM keinen toxischen Effekt auf dermale Fibroblasten haben.

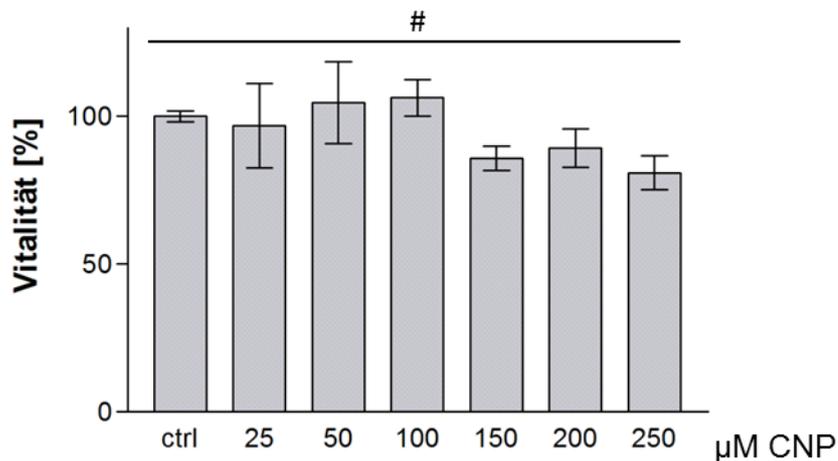


Abb. 19: Toxizität der mit Dextran gekoppelten Nanopartikel (Dex-CNP). In 24-Well-Platten bis zur Subkonfluenz kultivierte HDF wurden mit steigenden Konzentrationen von Dex-CNP für 48 h inkubiert und anschließend deren Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase mittels MTT-Test gemessen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). # p>0.05

Die mit Dextran gekoppelten Ceroxid-Nanopartikel (Dex-CNP) zeigten keine statistisch signifikante Toxizität auf dermale Fibroblasten: Die Behandlung mit 100 μM Dex-CNP führt zu einer Vitalität von 106%, 150 μM Dex-CNP zu einer Vitalität von 86% und Konzentrationen von 250 μM zu einer Vitalität von 81% (Abb.19).

In der Arbeitsgruppe von Professor Brenneisen wurde der toxische Effekt von H_2O - und Dex-CNP auf die Vitalität von Plattenepithelkarzinomzellen und Melanomzellen mittels MTT-Test untersucht (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Dex-CNP einen größeren biologischen Effekt auf Tumorzellen besitzen, als H_2O -CNP. Auch die Wirkung auf dermale Fibroblasten scheint bei den Dextran-gekoppelten CNP etwas stärker zu sein. Aus diesem Grund wurde im Verlauf der weiteren Arbeit nur noch mit Dex-CNP gearbeitet, die im Folgenden nur noch vereinfacht als CNP bezeichnet werden.

Die Konzentration der CNP, die im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzt wurde, ist auf 150 μM CNP festgelegt worden, da bei diesen Konzentrationen einerseits ein toxischer Effekt auf Tumorzellen festgestellt werden konnte, diese Konzentrationen bei HDF andererseits zu keiner Abnahme der Vitalität führte.

3.2 CNP und die Bildung von Myofibroblasten

In verschiedenen Arbeiten wurde ein toxischer Effekt auf verschiedenste Tumorzellreihen nach einer Behandlung mit CNP gezeigt, in anderen Arbeiten jedoch auch eine schützende Wirkung der Ceroxid-Nanopartikel auf normale Zellen. In diesem Zusammenhang ist es interessant herauszufinden, ob CNP einen Einfluss auf die mesenchymal-mesenchymale Transition von Hautfibroblasten haben, und damit die Bildung des Myofibroblasten - als einem Bindeglied zwischen gesunden Hautzellen und dermalen Tumorzellen in der Tumor-Stroma-Interaktion - verhindern können.

3.2.1 CNP verhindern die Bildung des Myofibroblasten

α -Smooth-Muscle-Actin (αSMA) ist ein Biomarker für Myofibroblasten, der durch den von Karzinomzellen sezernierten Transformierenden Wachstumsfaktor (TGF β 1) ROS-abhängig exprimiert wird (Cat et al., 2006). Der Gehalt an αSMA -mRNA wurde nach Behandlung mit

rTGFβ1 nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Eine 12-stündige Behandlung von HDF führte zu einer Zunahme des Gehalts der αSMA-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten (Cat et al., 2006). Diese Steigerung des mRNA-Levels ist ROS-abhängig; eine Vorinkubation mit verschiedenen antioxidativ wirkenden Substanzen wie N-Acetyl-Cystein (NAC) und Natriumselenit, die den ROS-Spiegel der HDF erniedrigen, bewirken eine signifikante Abnahme des αSMA-Levels (Alili et al., 2011).

Um die selbe Wirkung von CNP auf den α-SMA-Gehalt zu beweisen, wurde eine Realtime-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden Fibroblasten mit verschiedenen Konzentrationen von CNP vorinkubiert und mit rTGFβ1 behandelt und die isolierte mRNA per RT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle diente die mRNA der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT).

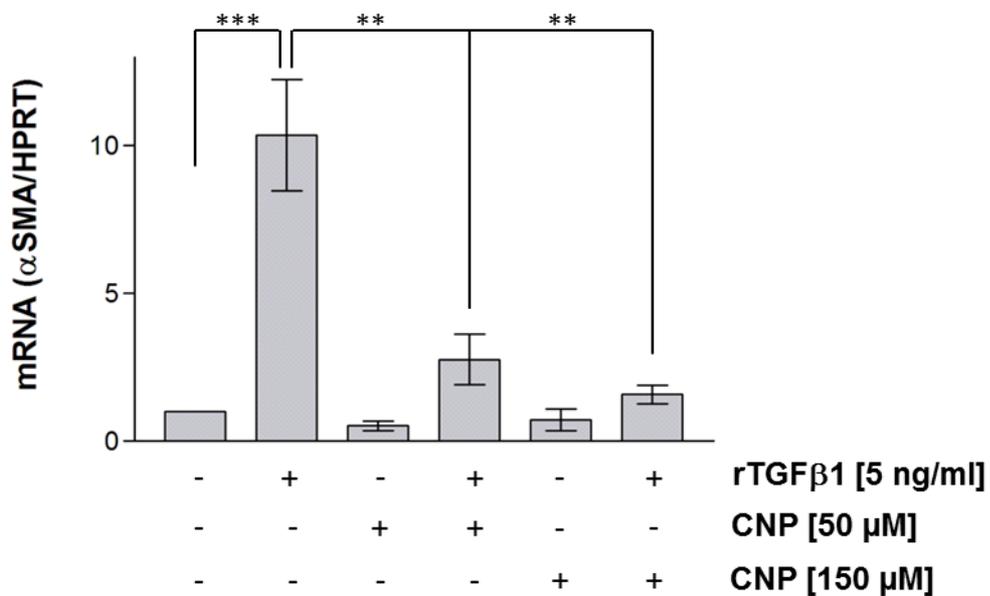


Abb. 20: Quantifizierung des αSMA-mRNA-Spiegels. Subkonfluente HDF wurden für insgesamt 96 h mit verschiedenen Konzentrationen von CNP (50 und 150 μM) und nach 48 h für weitere 48 h mit 5 ng/ml rTGFβ1 inkubiert, lysiert und die isolierte mRNA mittels Realtime-PCR (RT-PCR) quantifiziert. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). ** p<0.01 *** p<0.001

Der αSMA-mRNA-Spiegel der unbehandelten HDF wurde auf 1 festgelegt (Abb. 20). Eine 96-stündige Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen CNP führte zu einer Abnahme der mRNA-Spiegel gegenüber der Kontrolle um 30% (50 μM) und 20% (150 μM). Die Inkubation mit rTGFβ1 über 48 h bewirkte hingegen eine signifikante 10fache Steigerung des α-SMA-mRNA-Gehalts. Nach Vorinkubation mit CNP lässt sich eine

konzentrationsabhängige Abnahme der mRNA-Menge um 70% auf 3 (50 μ M) und um 80% auf 2 (150 μ M) gegenüber der rTGF β 1-Kontrolle verzeichnen.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren und die Wirkung von CNP auf die α SMA-Expression zu untersuchen, wurden HDF über verschiedene Zeiträume mit CNP behandelt, anschließend mit rTGF β 1 inkubiert und per Western Blot auf die Expression von α SMA untersucht. Als Kontrolle wurden HDF über den gleichen Zeitraum mit dem Dextran behandelt, mit dem die CNP gekoppelt sind, um auszuschließen, dass ein möglicher Effekt vom Dextran ausgeht.

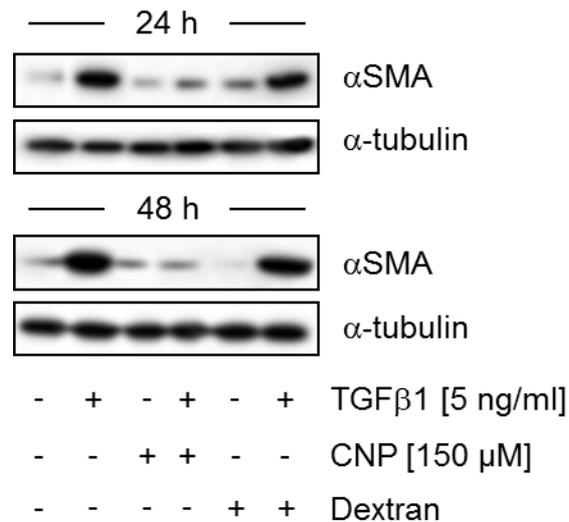


Abb. 21: Zeitabhängige α SMA-Expression von HDF nach Behandlung mit CNP. Subkonfluente HDF wurden für 24 bzw. 48 h mit 150 μ M CNP und anschließend für weitere 48 h mit 5 ng/ml rTGF β 1 behandelt, lysiert und die α SMA-Expression mittels Western Blot quantifiziert. Um einen Effekt durch das Dextran, mit dem die CNP gekoppelt sind, auszuschließen, wurden HDF mit dem Dextran über die gleichen Zeiträume behandelt. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3).

Der α SMA-Gehalt der unbehandelten Fibroblasten diente als Kontrollwert. Die Behandlung mit CNP und mit dem Dextran bewirkte weder nach 72 h, noch nach 96 h eine Abnahme der Expression gegenüber den unbehandelten Zellen (Abb. 21). Die α SMA-Expression stieg bei 48-stündiger Behandlung mit rTGF β 1 gegenüber der unbehandelten Kontrolle deutlich an. Die Vorinkubation mit Dextran zeigt keine Veränderung der α SMA-Expression gegenüber den nur mit rTGF β 1 behandelten HDF. Eine Vorinkubation mit CNP führte hingegen sowohl nach 72 h als auch nach 96 h zu einer signifikanten Abnahme der α SMA-Expression gegenüber den nur mit rTGF β 1 inkubierten Proben. Da hieraus geschlossen werden konnte, dass CNP ihre Wirkung schon innerhalb von 24 h fast vollständig entfalten, wurden die nachfolgenden Versuche mit einer 24-stündigen Vorinkubation mit CNP durchgeführt.

3.2.2 CNP verhindern die MMT in Dermis- und Hautäquivalenten

Ein Charakteristikum der Myofibroblasten ist ihre Fähigkeit Kollagengele aufgrund ihres Muskelproteins zu kontrahieren (Cat et al., 2006). Der Durchmesser der Kollagengele wird gemessen und als Maß für die Kontraktionsfähigkeit angesehen. Die Größe des Durchmessers ist dabei umgekehrt proportional zur Anzahl der Myofibroblasten (Arora et al. 1994; Ljinen et al. 2003). Da CNP in der Lage sind, die Expression von α SMA zu verhindern, sollte auch die Fähigkeit verschwinden, Kollagengele zu kontrahieren.

Zu diesem Zweck wurden mit CNP und anschließend mit rTGF β 1 behandelt, um für 2 Tage in die Kollagengele eingesät zu werden. Nach weiteren 48 h werden die Gele fotografiert und der Durchmesser gemessen.

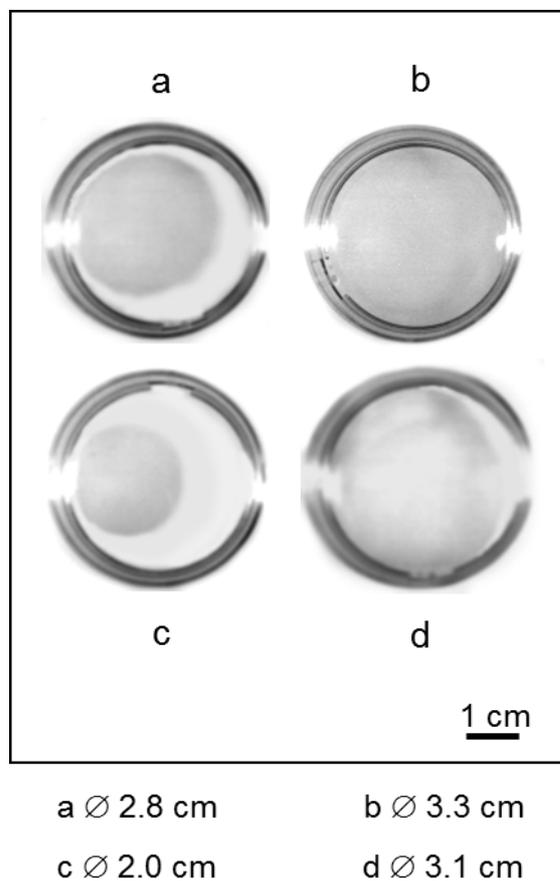


Abb. 22: Indirekte Darstellung von Myofibroblasten anhand der Kontraktion von Kollagengelen. HDF wurden in 3.5-cm-Zellkulturschalen mit $1.25 \cdot 10^5$ Zellen/ml in NaOH mit 0.8 mg Typ-I-Rattenskollagen/ml DMEM mit 5% FCS ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 24 h mit 150 μ M CNP vorinkubiert, für weitere 48 h mit 5 ng/ml rTGF β 1 inkubiert und in Kollagengele eingesät. Nach weiteren 48 h wurden die Kollagengele fotografiert und der Grad der Kontraktion mittels Quantifizierung des Durchmessers der Kollagengele gemessen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3).

In einer Fibroblastenkultur ist immer eine geringe Expression von α SMA zu messen, was darauf schließen lässt, dass auch eine geringe Anzahl an Myofibroblasten zu finden ist. Diese wenigen Myofibroblasten sind in der Lage, die Kollagengele ein wenig zu kontrahieren. Unbehandelte HDF bewirkten eine Kontraktion, die den Durchmesser von anfangs 3.5 cm auf 2.8 cm verkleinert (Abb. 22 (a)). Eine Behandlung von 72 h mit 150 μ M CNP führte aufgrund der Verhinderung der mesenchymal-mesenchymalen Transition zu einer deutlich geringeren Kontraktion (Durchmesser 3.3 cm, 118%; Abb. 22 (b)). Demgegenüber bewirkte eine rTGF β 1-Behandlung eine deutliche Steigerung sowohl der α SMA-Expression als auch der MMT und damit gleichzeitig auch der Kontraktionsfähigkeit der Zellen. Der Durchmesser verkleinerte sich um 29% auf 2.0 cm (Abb. 22 (c)). Eine Vorinkubation mit 150 μ M CNP verhinderte die α SMA-Expression und dementsprechend die Bildung des Myofibroblasten fast vollständig; die Kollagengele sind kaum kontrahiert (Durchmesser 3.1 cm, 111%; Abb. 22 (d)).

In einem weiteren Ansatz sollte die Verhinderung der Bildung von Myofibroblasten in einem Experiment dargestellt werden, in dem *in-vivo*-Bedingungen simuliert werden. Zu diesem Zweck wurden von der Firma Henkel zur Verfügung gestellte dreidimensionale Hautmodelle benutzt, in denen die eingesäten Fibroblasten mit CNP vorinkubiert wurden, bevor sie mit rTGF β 1 behandelt wurden. Die Hautmodelle wurden halbiert. Eine Hälfte wurde fixiert, geschnitten und mit HE angefärbt, die andere Hälfte mit bakterieller Kollagenase aufgelöst, die Zellen anschließend lysiert und per Western Blot auf die Expression von α SMA untersucht.

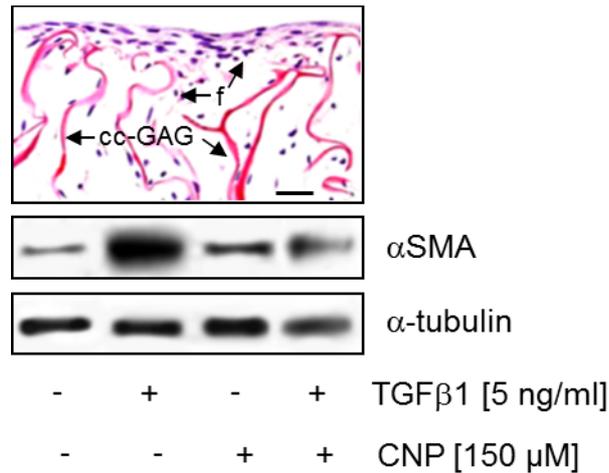


Abb. 23: Verhinderung der Transition zum Myofibroblasten im 3D-Hautmodell. HDF wurden in Hautmodelle eingesät, für 24 h mit 150 μM CNP vorinkubiert und anschließend für 48 h mit 5 ng/ml rTGF β1 behandelt. Die Hautmodelle wurden entweder fixiert, geschnitten und HE-gefärbt oder andererseits mit 3 mg Clostridium-histolyticum-Kollagenase/ml PBS für 30-45 Min bei 37°C aufgelöst, zentrifugiert, die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die αSMA-Expression untersucht. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. Im Vergleich zu den unbehandelten bzw. mit rTGFβ1 behandelten Kontrollen, verminderte sich die αSMA-Expression in den mit CNP behandelten HDF deutlich. Im Hautmodell mit Pfeilen markiert sind Fibroblasten (f) und Collagen-Chitosan-Glycosaminoglykan (cc-GAG)-Gerüste zu sehen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3).

Die Behandlung mit rTGFβ1 bewirkte einen deutlichen Anstieg der αSMA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten (Abb.23). Eine Vorinkubation mit 150 μM CNP vor der rTGFβ1-Behandlung führte zu einer Verminderung der αSMA-Expression um 60% im Vergleich mit den mit rTGFβ1 behandelten Zellen.

3.3 Reaktive-Sauerstoffspezies-(ROS-)modulierende Wirkung der CNP

Da CNP die Bildung von Myofibroblasten verhindern, stellte sich die Frage nach dem dazugehörigen Mechanismus. Dementsprechend wurde untersucht, ob und inwiefern eine Behandlung mit CNP eine Veränderung des ROS-Gehalts der Zelle bewirkt, da bereits durch die Arbeitsgruppe von Sudipta Seal (Orlando, Florida) gezeigt wurde, dass CNP im zellfreien System eine Superoxid-Dismutase-(SOD-)mimetische Aktivität zeigten (Korsvik et al., 2007, Heckert et al., 2008, Pirmohamed et al., 2010, Karakoti et al., 2009, Niu et al., 2011, Das et al., 2013).

3.3.1 CNP vermindern den intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Um die ROS-modulierende der CNP auf die Hautfibroblasten zu untersuchen, wurde zunächst der intrazelluläre ROS-Gehalt mittels Dichlorofluorescein (H₂DCF-DA)-Messung untersucht. Dazu wurden die Fibroblasten mit CNP oder Paraquat (PQ²⁺) inkubiert bzw. mit CNP und PQ²⁺ koinkubiert. Ein anderer Ansatz beinhaltet eine Inkubation von unbehandelten und mit CNP vorinkubierte Fibroblasten mit rTGFβ1 direkt vor der Messung.

Paraquat produziert intrazellulär Superoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies (Clejan et Cederbaum, 1988). PQ²⁺ wird durch Ein-Elektron-Reduktion selbst zum Paraquat-Radikal reduziert. Diese Redoxreaktion wird durch verschiedene Enzymsysteme vermittelt, z.B. NAD(P)H-Oxidase, NO-Synthase oder verschiedene Flavoenzyme. Das reaktionsfreudige PQ⁺-Radikal ist nun seinerseits in der Lage molekularen Sauerstoff zum Sauerstoffradikal, dem Superoxid, zu reduzieren (Abb. 24). Das Radikal selbst wird wieder zu PQ²⁺ oxidiert (Bonneh-Barkay et al., 2004).

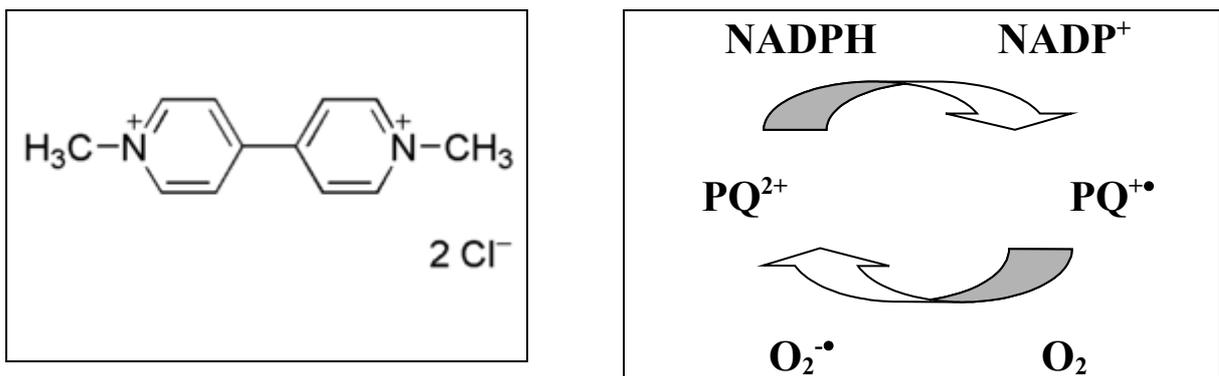


Abb. 24: Strukturformel und Redoxzyklus von Paraquat (PQ²⁺)

Die unbehandelten Fibroblasten besitzen einen ROS-Gehalt, der zu einer geringen Oxidation des Dichlorofluorescein führt. Die nach Oxidation messbare Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 wird als 100% definiert. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Ctrl) führt die Behandlung mit 150 μM CNP zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg der ROS, der mit einer RFU von 105% zum Zeitpunkt 0 Min definiert ist (Abb. 25). CNP führten somit nicht zu einer vermehrten Bildung von ROS in Fibroblasten im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen. Die Inkubation mit PQ²⁺ hingegen führte zu einer Akkumulation von intrazellulären ROS schon zum Zeitpunkt 0 (126%), während eine Koinkubation mit CNP zu einer deutlichen Verminderung der Oxidation des H₂DCF-DA als Maß für intrazelluläre ROS führte (77%). Eine Behandlung mit rTGFβ1 führte über

Aktivierung der NADH-Oxidase zu einem Anstieg des intrazellulär produzierten Superoxids (Cat et al., 2006). Diese Wirkung ist schon nach wenigen Minuten in der Zelle nachweisbar und mittels DCF-Messung darstellbar. Zum Zeitpunkt 0 lag die relative Fluoreszenz bei 143%. Eine Vorinkubation der Fibroblasten mit CNP vor der rTGF β 1-Behandlung führte zu einer RFU, deren Wert dem der unbehandelten Zellen nahezu entspricht (104% zum Zeitpunkt 0 Min). Während der Messung stieg die messbare Fluoreszenz durch weitere Oxidation des H₂DCF-DA in den unbehandelten Zellen bis auf 152% an (Abb. 25). Die Inkubation mit CNP führte im gleichen Zeitraum zu einem statistisch nicht signifikant abweichenden Wert von 168%. Das durch Paraquat vermehrt gebildete Superoxid führte im zeitlichen Verlauf der Messung zu einer deutlich gesteigerten Oxidationsrate des H₂DCF-DA mit einer gesteigerten relativen Fluoreszenz von 186%. Eine Koinkubation mit CNP zeigte eine antioxidative Wirkung mit einer Abnahme der relativen Fluoreszenz auf 111%. Eine gleichzeitige Behandlung mit CNP führte demnach zu einer Abnahme der RFU gegenüber der mit Paraquat behandelten Fibroblasten.

Auch die durch rTGF β 1-Behandlung gesteigerte Superoxid-Bildung führt im zeitlichen Verlauf der Messung zu einer Steigerung der RFU auf 247%, während eine Vorinkubation mit Ceroxid-Nanopartikeln zu einer signifikant geringeren Steigerung der RFU führt ($p < 0.001$).

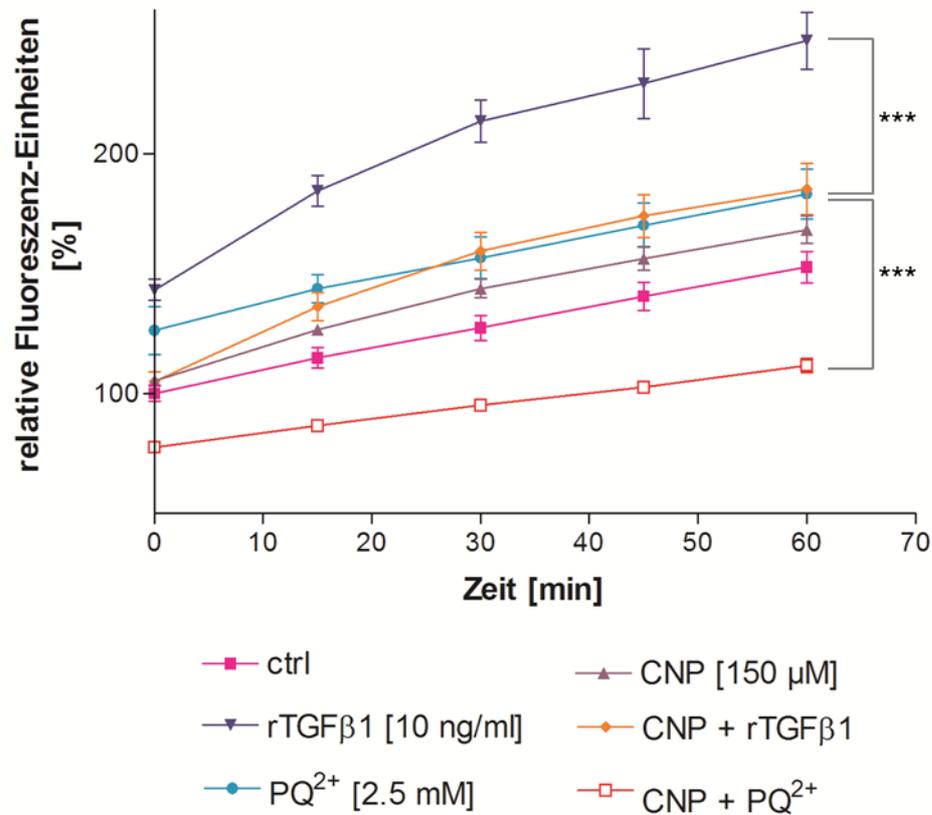


Abb. 25: Verminderter Reaktive-Sauerstoffspezies-(ROS-)Gehalt der Fibroblasten durch Behandlung mit CNP. In 24-Well-Platten bis zur Subkonfluenz kultivierte Fibroblasten wurden für 24 h mit 150 μ M CNP oder 2.5 mM PQ^{2+} , sowie mit CNP und PQ^{2+} koinkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte oder mit 150 μ M CNP vorinkubierte HDF direkt vor der Messung mit 10 ng/ml rTGF β 1 behandelt. Der ROS-Spiegel der HDF wurde mittels Dichlorofluorescein (H_2DCF -DA)-Messung über 60 Minuten quantifiziert. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). *** p<0.001

Diese Ergebnisse sind mit einem bereits beschriebenen antioxidativen Effekt der CNP vereinbar, der über eine Superoxid-Dismutase(SOD)-mimetische Aktivität erklärt wird (Korsvik et al., 2007, Heckert et al., 2008, Pirmohamed et al., 2010, Karakoti et al., 2009, Niu et al., 2011, Das et al., 2013). Um den Einfluss der CNP auf die Detoxifizierung von Superoxid zu untersuchen und damit indirekt die SO-mimetische Aktivität nachzuweisen, wurde eine Messung am Fluoreszenzmikroskop mittels Dihydroethidium durchgeführt.

Dihydroethidium ist eine Verbindung, die durch Superoxid oxidiert wird. In der oxidierten Form ist Ethidium ein fluoreszierendes Molekül, das über eine rote Fluoreszenz (Exzitation 518 nm, Emission 605 nm) nachgewiesen und aus diesem Grund als Detektor für Superoxid angesehen werden kann (Peshavariya et al., 2007). Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle können dabei zwischen die Basen der DNA bzw. RNA interkalieren. Dadurch wird das

Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und dessen Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht (M. Holtzhauer: Biochemische Labormethoden, S. 51, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2009).

Fibroblasten wurden mit CNP allein oder zusätzlich mit PQ^{2+} koinkubiert Ein weiterer Ansatz bestand in einer Behandlung mit rTGF β 1. TGF β 1 bewirkte eine erhöhte Aktivität der PKC, welche ihrerseits zu einer gesteigerten Aktivität der NADH-Oxidase führt. Der Effekt auf die PKC-Aktivität ist schon nach 1 Minute zu beobachten (Cat et al., 2006). Um einen geeigneten Zeitpunkt der durch die NADH-Oxidase gesteigerten Superoxid-Produktion zu beobachten, werden unbehandelte Fibroblasten, sowie mit CNP vorinkubierte Zellen entweder für 1 h oder für 1 Min mit rTGF β 1 behandelt.

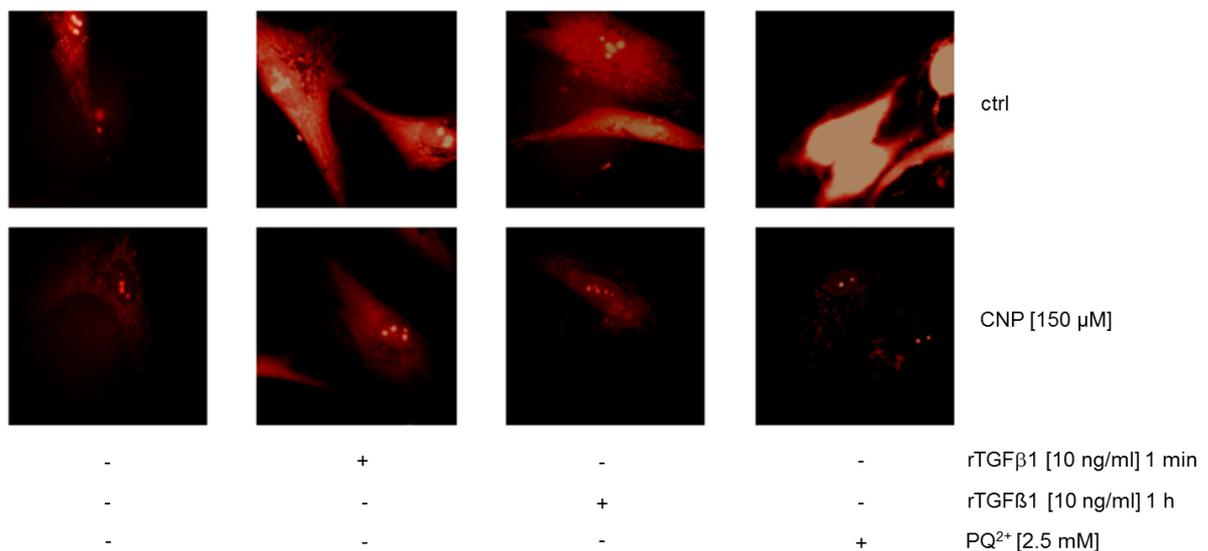


Abb. 26: CNP vermindern den Gehalt an Superoxid in Fibroblasten. Subkonfluente HDF werden für 24 h entweder mit 150 μ M CNP allein behandelt oder mit 2.5 mM PQ^{2+} koinkubiert. Zusätzlich werden unbehandelte und mit 150 μ M CNP vorinkubierte HDF 1 h (23 h Vorinkubation) bzw. 1 Min (24 h Vorinkubation) vor der Messung mit 10 ng/ml rTGF β 1 behandelt. Die Messung erfolgt nach 24 h. Die Darstellung des Superoxids erfolgt fluoreszenzmikroskopisch mittels Darstellung von oxidiertem Dihydroethidium. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3).

Bei den unbehandelten Kontrollzellen war eine geringe Fluoreszenz im Zellkern nachweisbar, die bei einer 24-stündigen Behandlung mit 150 μ M CNP geringfügig abnimmt. Eine Behandlung mit PQ^{2+} führte zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Eine Koinkubation mit CNP führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz, die der der unbehandelten Fibroblasten entspricht (Abb. 26).

Sowohl die 1-minütige als auch die 1-stündige Inkubation mit rTGFβ1 führte zu einer Zunahme des intrazellulären Superoxids und damit zu einer Zunahme der Fluoreszenz gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Eine Vorinkubation mit CNP über 23 h (rTGFβ1-Inkubation 1 h) bzw. 24 h (rTGFβ1-Inkubation 1 Minute) führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz bzw. zu einer Abnahme des intrazellulären Superoxids. Das lässt auf eine SO-mimetische Aktivität schließen.

3.3.2 Die CNP-vermittelte Verminderung des ROS-Gehalts führt zu einer Erhöhung des Verhältnisses GSH:GSSG

Um zu prüfen, ob die antioxidative Wirkung der CNP auf einer CNP-basierten Modulation des endogenen antioxidativen Systems beruht, wird zuerst das Verhältnis von reduziertem Glutathion zu oxidiertem Glutathion untersucht. Glutathion stellt in der Zelle eines der wichtigsten antioxidativen Systeme dar. Reduziertes Glutathion (GSH), ein Tripeptid aus Cystein, Glycin und Glutamat und mit einer freien Thiolgruppe. Wasserstoffperoxid oxidiert im katalytischen Zentrum die Glutathion-Peroxidase (GPx) und GSH wird zu GSSG oxidiert, welches aus 2 oxidierten Glutathionmolekülen besteht, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Durch die Glutathion-Reduktase wird das GSSG unter NAD(P)H-Verbrauch wieder zu zwei Molekülen GSH reduziert (Abb. 27). Damit stellt Glutathion ein regeneratives Zellsystem dar. Das Verhältnis der Mengen an GSH zu GSSG wird oft als Ausdruck des oxidativen Status der Zelle angegeben.

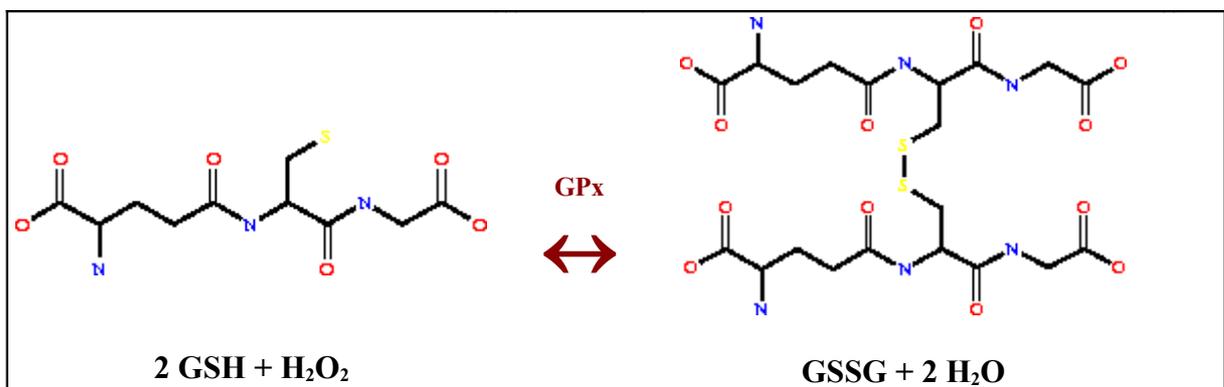


Abb. 27: Vereinfachtes Schema der Reaktion von Glutathion mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Zwei Moleküle Glutathion in reduzierter Form (GSH) reagieren mit H_2O_2 zu einem über eine Disulfidbrücke verbundenen Diglutathionmolekül (GSSG) und zwei Molekülen Wasser.

Unter der Annahme, dass Ceroxid-Nanopartikel antioxidativ wirken und sowohl SOD- als auch Katalase-mimetische Aktivität besitzen (Korsvik et al., 2007, Heckert et al., 2008, Pirmohamed et al., 2010, Karakoti et al., 2009, Niu et al., 2011, Das et al., 2013), sollte ein Anstieg des Verhältnisses GSH zu GSSG in der Zelle zugunsten von GSH zu messen sein. Bei alleinigem Nachweis von SOD-mimetischer Aktivität der CNP, würde es zu einer Akkumulation von H_2O_2 kommen, welches wiederum Glutathion oxidieren und das Verhältnis von GSH zu GSSG mehr in Richtung GSSG verschieben würde. Das Verhältnis würde sich somit gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht verändern.

Um das Verhältnis GSH:GSSG zu messen, wurden Hautfibroblasten mit CNP vorinkubiert und zusätzlich mit rTGF β 1 bzw. cisPlatin behandelt.

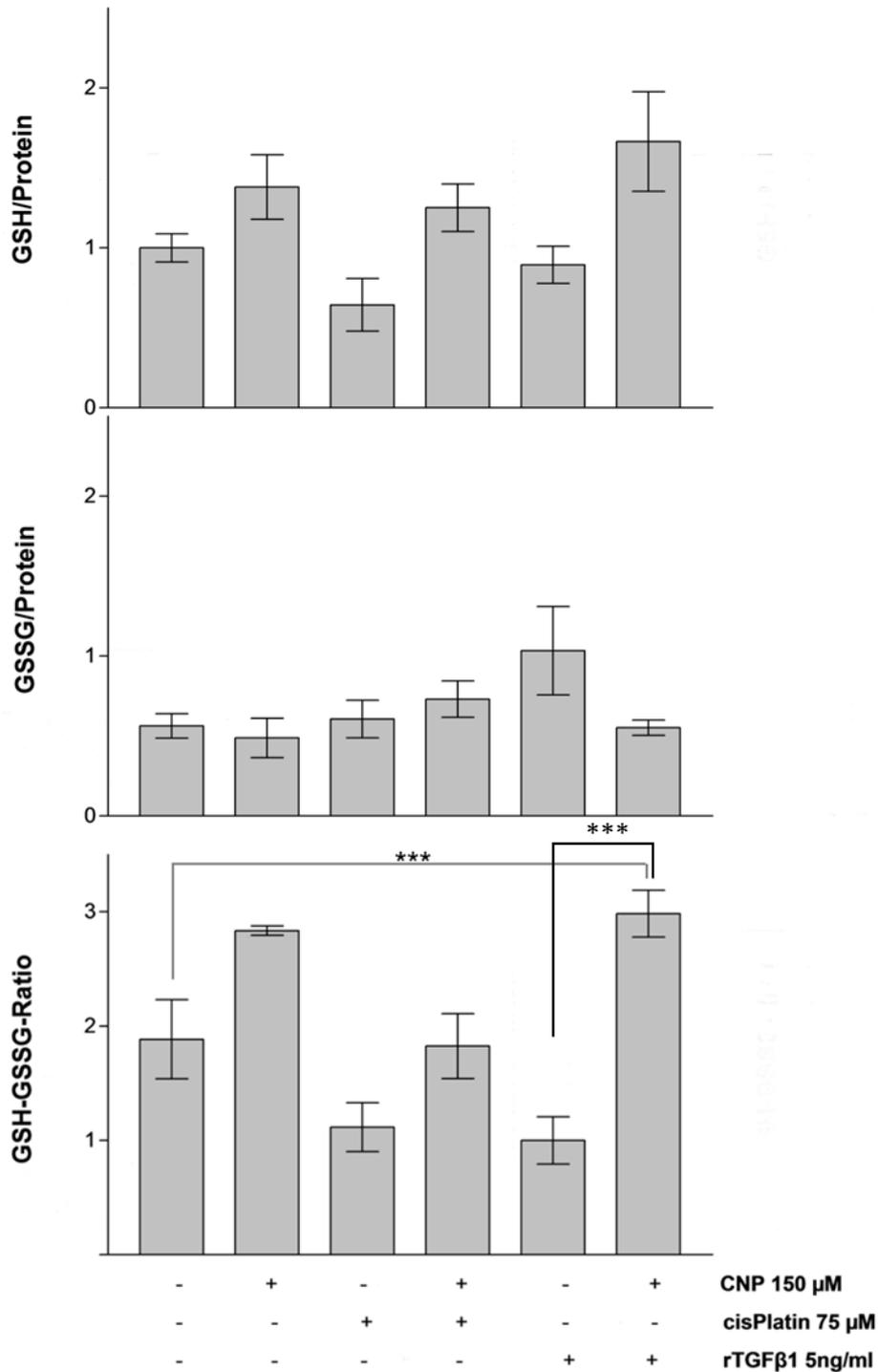


Abb. 28: Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion in Fibroblasten nach CNP-Behandlung. Subkonfluente HDF wurden für 24 h mit 150 μ M CNP vorinkubiert und anschließend für weitere 24 h mit 5 ng/ml rTGF β 1 oder 75 μ M cisdiammindichloroplatin II (cisPlatin) behandelt. Der Gehalt an reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion wurde indirekt über die NADH-Abnahme photometrisch quantifiziert. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). *** p<0.001

Das Verhältnis GSH:GSSG lag bei der unbehandelten Kontrolle bei 1.9. Demzufolge war etwa doppelt so viel Glutathion in seiner reduzierten Form in der Zelle zu messen als in seiner oxidierten Form. Eine Behandlung mit Ceroxid-Nanopartikeln über 48 h führte zu einer Verschiebung des Verhältnisses in Richtung des reduzierten Glutathion: eine Zunahme des Verhältnisses auf 2.8 wird gemessen (Abb. 28).

Die Behandlung mit 75 μ M cisdiammindichloroplatin II (cisPlatin) führte zu einer Abnahme des Verhältnisses von GSH zu GSSG um 42% auf 1.1, woraus sich ableiten lässt, dass cisPlatin den oxidativen Status der Zelle erhöht. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass cisPlatin durch einen hohen Glutathiongehalt der Zelle detoxifiziert wird, indem es über Disulfidbrücken an Glutathion gebunden wird (Bernareggi et al., 1995; Komiya et al., 1998). Platinderivate haben eine höhere Affinität zu dem Schwefelatom als zu DNA-Basen. Diese GSH-cisPlatin-Addukte können dann von der Zelle nicht mehr durch die Glutathion-Reduktase regeneriert werden. Um eine Akkumulation der Addukte zu vermeiden, werden sie durch die Glutathion-S-Transferase aus der Zelle transportiert, wo sie abgebaut werden (Skokrzadeh et al., 2006).

Demzufolge wird cisPlatin einerseits zwar von Glutathion detoxifiziert, allerdings steht der Zelle andererseits dann weniger Glutathion zum Abfangen von Sauerstoffradikalen zur Verfügung, was sich in einem erniedrigten Verhältnis GSH:GSSG äußert und die Zelle gegenüber anders generierten schädlichen Oxidantien empfindlicher macht. Eine 24-stündige Vorinkubation mit CNP vor der cisPlatin-Behandlung führte zu einer Zunahme des Verhältnisses von GSH zu GSSG auf 1.8, also zu einer Ratio, die dem Wert der unbehandelten Kontrolle entspricht. Die Behandlung mit rTGF β 1 führte zu einer Abnahme des Verhältnisses von GSH zu GSSG um 48% auf 1.0. Das durch die erhöhte Aktivität der NAD(P)H-Oxidase produzierte Superoxid wird durch reduziertes Glutathion reduziert, wobei die oxidierte Form GSSG entsteht. Die Ratio wird in Richtung GSSG verschoben. Eine Inkubation mit Ceroxid-Nanopartikeln über 24 h vor der rTGF β 1-Inkubation führte zu einer Zunahme der Ratio auf 2.98, einem Wert, der 57% über dem der unbehandelten Kontrolle liegt. Aus dem Ergebnis zum GSH-Gehalt wird ersichtlich, dass CNP eine antioxidative Aktivität besitzen.

Es stellte sich die Frage, ob CNP diesen Effekt auf das Glutathion-System ausüben, indem sie die Neusynthese von Glutathion beeinflussen. Um eine Aussage über die Neusynthese treffen zu können, wurden HDF über insgesamt 48 h mit CNP behandelt, nach 24 h erfolgt eine Zugabe von D,L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin (BSO), einem Hemmer der γ -Glutamyl-

Cystein-Synthetase über weitere 24 h. BSO bewirkt eine kompetitive Hemmung der Glutathionsynthese durch Bindung der S-Alkyl-Einheit im aktiven Zentrum, in der normalerweise die Akzeptoraminosäure Cystein bindet (Griffith und Meister, 1979). Es handelt sich um einen spezifischen Inhibitor der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (100mal stärkerer Effekt als durch Methioninsulfoximin), der zusätzlich keinen Effekt auf die Glutaminsynthetase oder die Synthese anderer Proteine hat (Griffith und Meister, 1979).

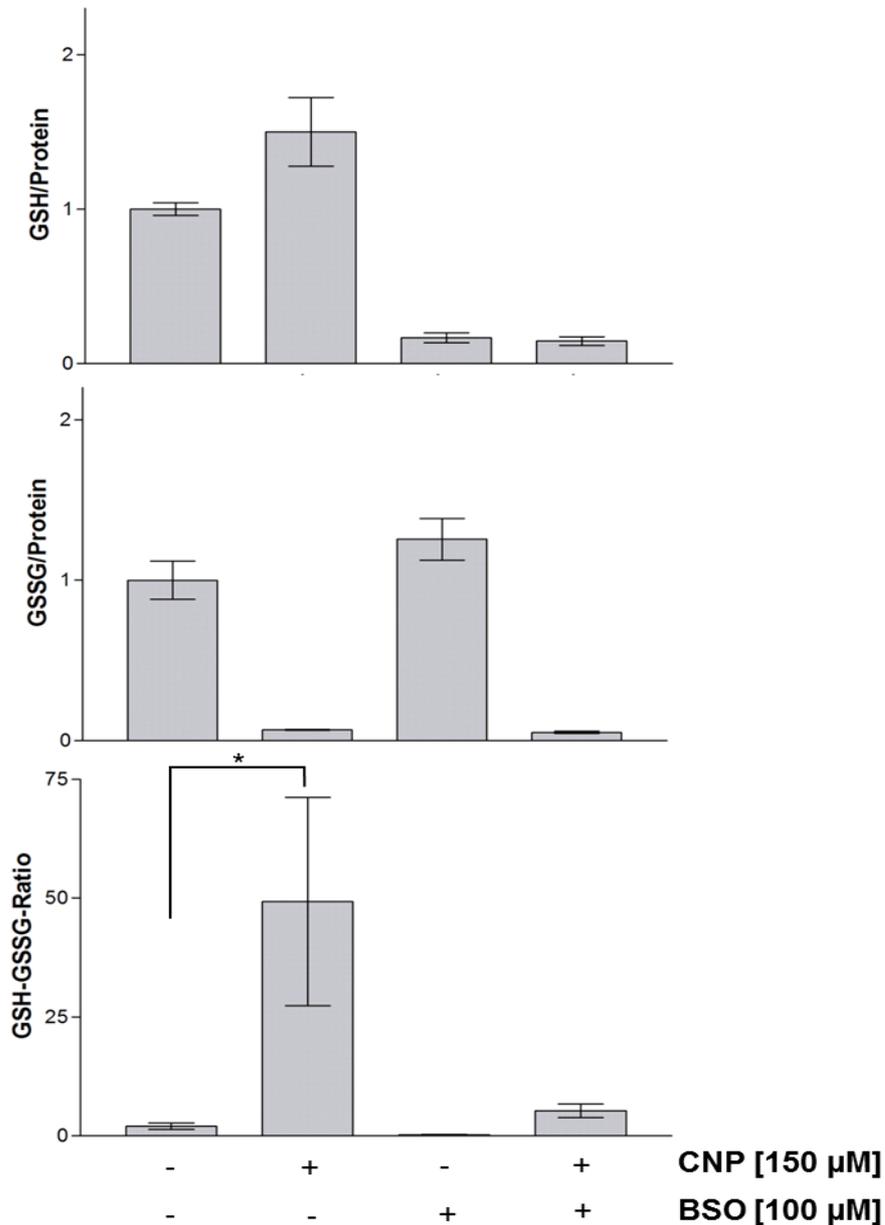


Abb. 29: CNP erhöhen das Verhältnis GSH:GSSG, nicht aber die Glutathion-Synthese. In 9-cm-Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz kultivierte Fibroblasten wurden für 24 h mit 150 μM CNP vorinkubiert, anschließend für weitere 24 h mit 100 μM D,L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin (BSO) behandelt. Die quantitative Auswertung des jeweiligen GSH- bzw. GSSG-Gehalts der Fibroblasten erfolgte photometrisch mittels NADH-Verbrauch. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). *** p<0.001

Das Verhältnis GSH:GSSG der unbehandelten Kontrollzellen lag bei diesem Versuch bei 1.98 (Abb. 29). Eine Behandlung mit H₂O-CNP führte zu einer Zunahme des GSH-GSSG-Verhältnisses von im Mittel 49.27, was den antioxidativen Effekt der CNP noch einmal bestätigt.

Eine Behandlung mit dem Hemmstoff BSO führte zu einer Abnahme des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Glutathion um 88% auf 0.23. Der GSH-Gehalt der Zelle (997 nmol/μg Protein) ist in diesen HDF deutlich geringer als in den unbehandelten Fibroblasten (6242 nmol/μg Protein). Das Glutathion, das sich in den Zellen befindet, wird von Sauerstoffradikalen, wie beispielsweise Superoxid, in die oxidierte Form GSSG überführt, so dass sich das Verhältnis stark in die Richtung des GSSG verschiebt. Eine 24-stündige Vorinkubation mit Ceroxid-Nanopartikeln erhöhte das Verhältnis GSH:GSSG auf 5.25. Setzt man die GSH-GSSG-Verhältnisse der BSO-behandelten und der BSO+CNP-behandelten HDF zueinander in Beziehung, ergibt sich ein Verhältnis von 1:22.8. Ein Vergleich der Verhältnisse zwischen unbehandelter Kontrolle und der mit CNP behandelten Fibroblasten (1 : 24.5) und der Verhältnisse zwischen BSO-behandelter und der BSO+CNP-behandelten Probe (1 : 22.8) lässt erkennen, dass die Verhältnisse im gleichen Bereich liegen.

Der GSH-Gehalt der mit CNP und BSO behandelten Zellen hat sich gegenüber dem der mit BSO behandelten Probe nicht erhöht. Eine Behandlung mit Ceroxid erhöht also das Verhältnis GSH:GSSG und verschiebt es in Richtung der reduzierten Form des Glutathions, aber führte nicht zu einer erhöhten Neusynthese des Tripeptids. Die Nanopartikel wirken antioxidativ auf die Zelle, indem sie über ihre SOD- sowie Katalase-mimetische Aktivität die intrazellulären ROS detoxifizieren. Durch diesen Effekt wird das Tripeptid selbst deutlich seltener oxidiert, wodurch es in größerer Menge als reduziertes GSH in der Zelle gemessen werden kann, was sich in einem erhöhten Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion äußert.

3.3.3 Carbonylierung von Proteinen durch TGF β 1-induzierte ROS und die Wirkung von CNP

Endogene reaktive Sauerstoffspezies führen zu einer Proteinoxidation, insbesondere zu einer Modifizierung der Seitenketten von Methionin, Histidin und Tyrosin mit Bildung einer Disulfidbrückenbindung mit Cystein (Stadtman, 1993) oder zu einer Einführung einer Aldehyd- oder Ketogruppe in die Seitenketten der Aminosäuren Lysin, Arginin, Prolin oder Threonin (Stadtman, 1993). Diese Carbonylierung der Proteine ist ein Ausdruck des oxidativen Status der Zelle und kann mittels Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und folgender Auftrennung per SDS-PAGE und Western Blotting nachgewiesen werden (Levine et al., 1994).

Der zur Ausbildung von Myofibroblasten führende Wachstumsfaktor TGF β 1 erhöht den Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies der Zelle und zeigt eine erhöhte Carbonylierungsrate (Cat et al., 2006). Die teilweise beschriebene Signalkaskade umfasst die Erhöhung der Aktivität der Proteinkinase C (PKC) durch Phosphorylierung einzelner Untereinheiten, wodurch die NAD(P)H-Oxidase ihrerseits aktiviert wird. Dieses Enzym produziert Superoxid, welches in der Zelle zu einer verstärkten Carbonylierung von Proteinen beitragen kann (Cat et al., 2006). Um zu untersuchen, ob die oben beschriebene Verhinderung der Bildung des Myofibroblasten durch Ceroxid-Nanopartikel über eine Verminderung des Effektes von TGF β 1 mittels Detoxifizierung des Superoxids zu erklären ist, wird eine Quantifizierung der Proteinoxidation per Oxyblot-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Fibroblasten für 40 h mit CNP vorbehandelt. Für weitere 8 h wird eine Inkubation mit rTGF β 1 durchgeführt.

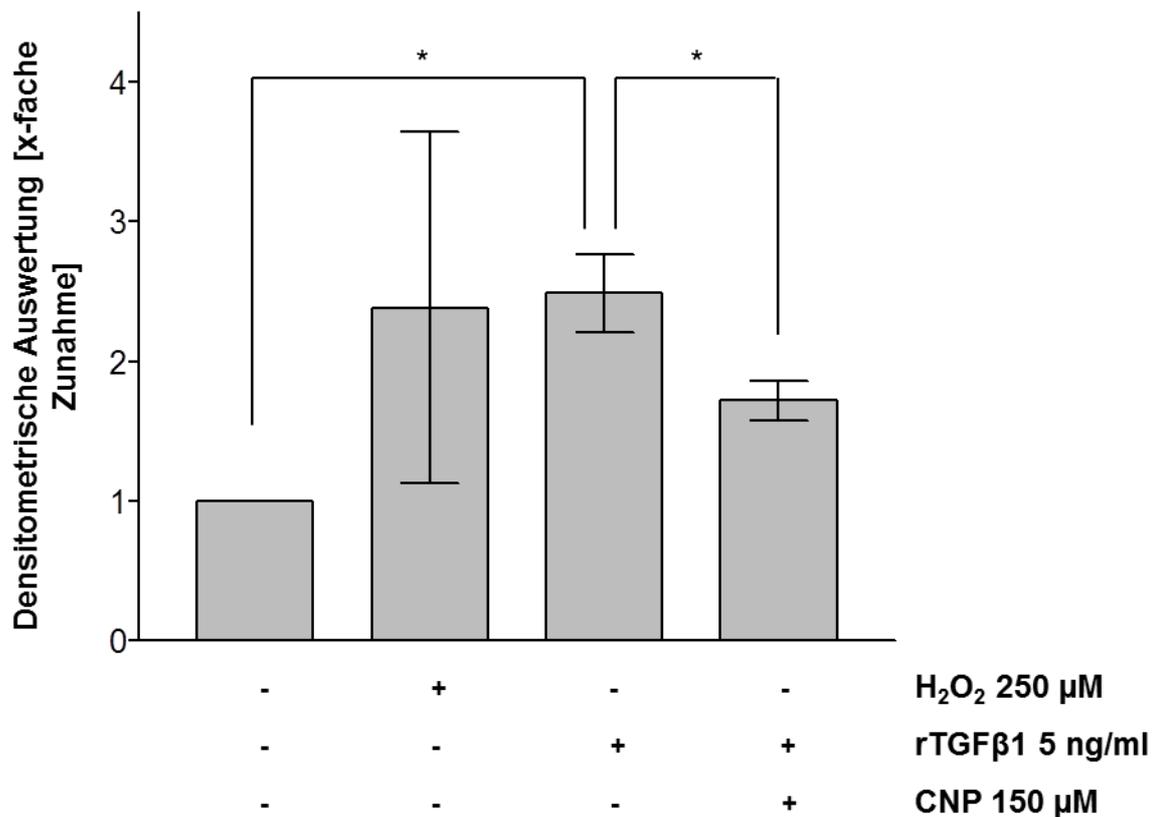
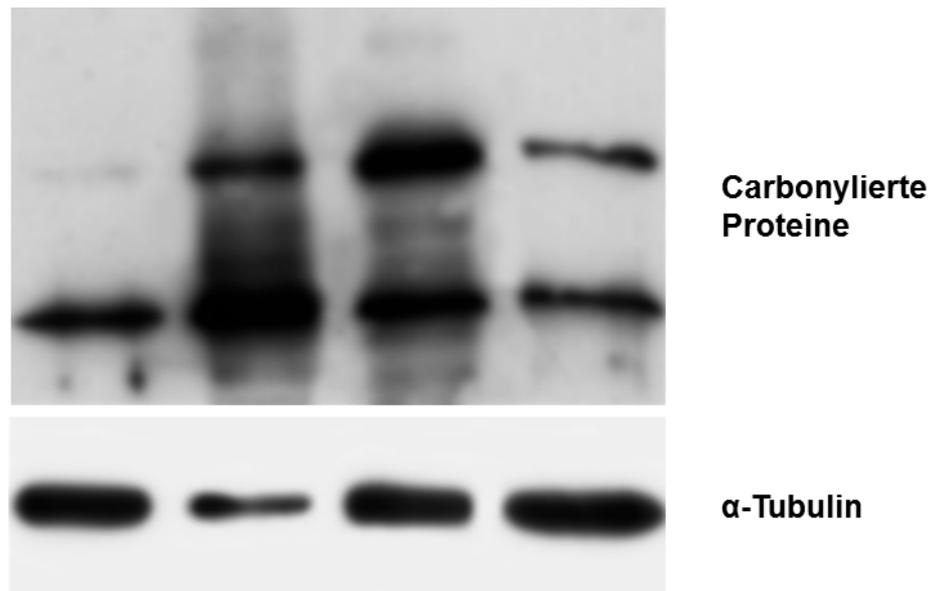


Abb. 30: CNP vermindern die Menge an carbonylierten Proteinen. Die subkonfluenten Fibroblasten wurden für 40 h mit 150 μ M CNP vorinkubiert und anschließend mit 5 ng/ml rTGF β 1 für weitere 8 h behandelt. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung von HDF mit 250 μ M H₂O₂. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Densitometrie. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). * p<0.05

Die nachgewiesene Menge der carbonylierten Proteine in den unbehandelten Fibroblasten wird auf 1 festgelegt (Abb. 30). Eine 48-stündige Inkubation mit CNP führte zu einer statistisch nicht signifikanten Erhöhung der Oxidationsrate auf 1.3 gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Als Positivkontrolle wird eine einstündige Behandlung mit H₂O₂ durchgeführt, die zu einer 2.4-fachen Erhöhung der Proteincarbonylierung führt.

Eine Behandlung mit rTGFβ1 erhöht die Carbonylierungsrate um den Faktor 2.5. Eine 40-stündige Vorinkubation mit 150 μM CNP führt zu einer Abnahme der Carbonylierungsrate um 32% auf 1.72 im Vergleich mit der mit rTGFβ1 behandelten Kontrolle.

3.3.4 CNP-vermittelte Reduzierung von Superoxid führt zu verminderter Nekrose

Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein im Zytoplasma vorkommendes Enzym, das aus Zellen in das sie umgebende Medium freigesetzt wird, sobald es zu einer Lyse der Plasmamembran kommt und kann deswegen als Marker für eine Zellnekrose angesehen werden. Die Aktivität der LDH wird als enzymatischer Test photometrisch bestimmt. Es kommt durch die LDH zu einer Reaktion von Laktat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH, was zu einer Zunahme der Absorption bei 412 nm führt (Weyermann et al., 2005).

HDF wurden für 24 h mit CNP inkubiert, ein Mediumwechsel durchgeführt und für weitere 24 h mit H₂O₂ behandelt. Die LDH-Aktivität wurde in den jeweiligen Überständen gemessen.

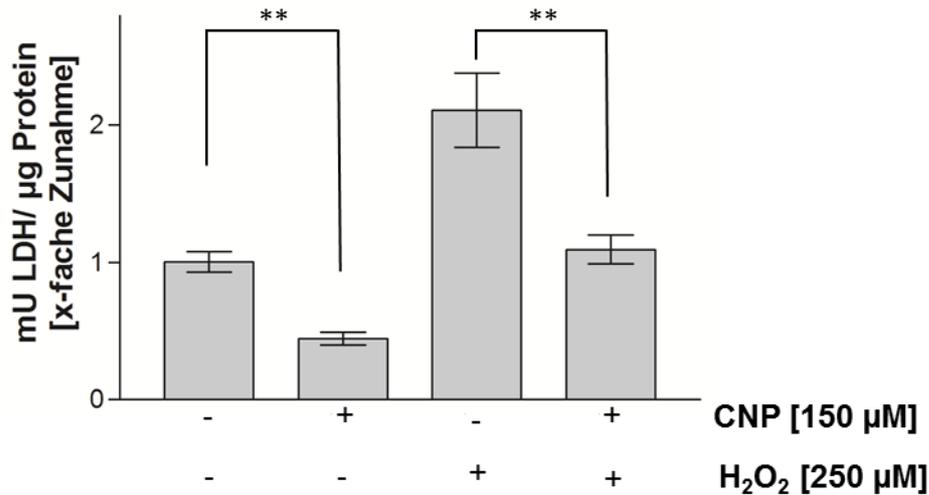


Abb. 31: Verminderte Laktat-Dehydrogenase-(LDH-)Aktivität nach Ceroxid-Behandlung. Die subkonfluenten Fibroblasten wurden für 24 h mit 150 µM CNP inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend für weitere 24 h mit 250 µM H₂O₂ behandelt. Die LDH-Aktivität wurde indirekt photometrisch gemessen über die Bildung von NADH in den jeweiligen Überständen. Die in den Überstand freigesetzte LDH (mU) wird auf die Menge an Protein der kultivierten HDF bezogen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). ** p<0.01

Die LDH-Aktivität im Überstand der unbehandelten Fibroblasten wird als 1.0 festgelegt (Abb. 31). Die Aktivität der LDH ist in dieser Kontrolle als gering einzustufen, beweist aber, dass eine geringe Anzahl an Zellen immer nekrotisch ist. Eine 48-stündige Behandlung mit CNP führte zu einer Abnahme der gemessenen LDH-Aktivität auf 44%. Ceroxid-Nanopartikel bewirken demzufolge eine Abnahme der Nekrose.

Eine Behandlung mit H₂O₂ führte zu einer Steigerung der LDH-Aktivität in den Überständen um den Faktor 2 auf 210%. H₂O₂ führte in dieser Konzentration zu einer Zytotoxizität, die sich in einer erhöhten Nekroserate äußert. Eine vorherige Behandlung mit CNP führte zu einer Verringerung der LDH-Aktivität auf Werte, die denen der unbehandelten Zellen entspricht. CNP bewirken durch ihre Katalase-mimetische Aktivität eine Abnahme der H₂O₂-Konzentration in der Zelle, wodurch der zytotoxische Effekt von Wasserstoffperoxid abnimmt. CNP schützen Fibroblasten vor Nekrose.

3.3.5 CNP-vermittelte Reduktion von Superoxid und H₂O₂ führt zu verminderter apoptotischer Aktivität der Zellen

Cytochrom-C ist ein aus 104 Aminosäuren bestehendes, wasserlösliches Enzym, das sich im Intermembranraum der Mitochondrien befindet und ein wichtiges System in der Atmungskette (Interaktion mit Komplex III und Komplex IV) darstellt. Es dient in der Atmungskette als Elektronenakzeptor, der Elektronen von Komplex III übernimmt und sie auf Komplex IV überträgt, und damit verhindert, dass Sauerstoffradikale entstehen, die zu Schäden der Mitochondrien und der Zelle führen (Bossy-Wetzel et al., 1998). Eine Translokation dieses Proteins aus den Mitochondrien in das Cytosol der Zelle kann als Marker von apoptotischer Aktivität (intrinsischer Weg) dieser Zellen angesehen werden, da nach der Translokation eine Zellatmung nicht mehr vollständig möglich ist, der Energiebedarf der Zelle folglich nicht mehr ausreichend gedeckt werden kann und sie daraufhin in die Apoptose geht (Bossy-Wetzel et al., 1998).

Wie Cytochrom-C in das Cytosol transloziert wird, ist noch ungeklärt. Es wird diskutiert, dass sich durch verschiedene Einflüsse, wie z.B. ROS, UV-Strahlung, Toxine, ein Permeabilitätstransitions-porenkomplex öffnet, durch den Cytochrom-C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol diffundieren kann. Durch Bindung an Apaf-1 (Apoptose-Protease-aktivierender Faktor-1) zusammen mit ATP, kommt es zur Bildung eines sogenannten Apoptosoms. Das Apoptosom führt zur Spaltung der Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9, welche nun ihrerseits weitere Procaspasen in ihre aktiven Formen überführt (Bossy-Wetzel et al., 1998).

Um Cytochrom-C in der Probe nachzuweisen, wurden Fibroblasten mit CNP über 24 h sowie für 0.5 h zusätzlich mit H₂O₂ behandelt. Die Zellen wurden mit Cytochrom-C-Fraktionierungspuffer lysiert und 10 Min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 20 000 x g bei 4°C für 10 Min. Mit den abgenommenen Überständen, die die cytosolische Fraktion des Cytochrom C enthalten, wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und jeweils 15 µg Protein auf ein 18%iges SDS-PAGE aufgetragen.

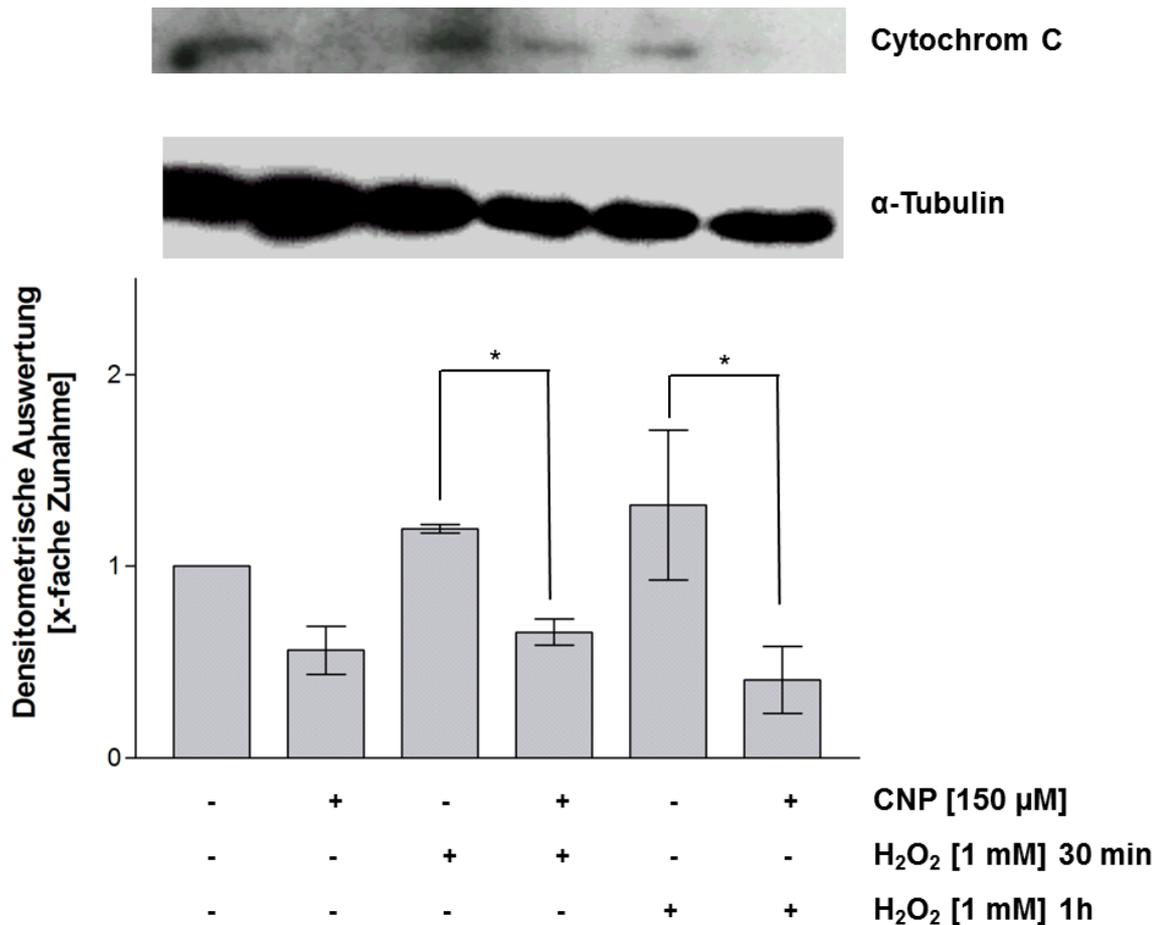


Abb. 32: Reduktion des translozierten Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol als Ausdruck von Apoptose nach Ceroxid-Behandlung in Fibroblasten. Subkonfluente Zellen wurden für 24 h mit 150 μM Ceroxid vorinkubiert und anschließend für 30 Min bzw. 1 h mit 1 mM H₂O₂ behandelt, lysiert, zentrifugiert und die Proteine aus dem Überstand (als Maß für die cytosolische Fraktion von Cytochrom C) per Western Blot gemessen. Die Quantifizierung erfolgt mittels Densitometrie. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). * p<0.05

Eine geringe apoptotische Aktivität der unbehandelten HDF kann nachgewiesen werden. Sie wird als 1.0 festgelegt (Abb. 32). Eine Behandlung mit CNP über 24 h führte zu einer 44-prozentigen Verringerung der Cytochrom-C-Translokation.

Eine Behandlung der Hautfibroblasten mit H₂O₂ über 0.5 h führte zu einer 29-prozentigen Zunahme der Cytochrom-C-Translokation in das Cytosol der Zellen. Die verwendete Konzentration und die Zeitspanne der Inkubation mit dem Peroxid ist vorher über eine Zeit- und Konzentrationsreihe ausgetestet worden (Daten nicht gezeigt). Eine Vorinkubation mit CNP über 23.5 h führt im Vergleich mit den mit Wasserstoffperoxid behandelten Fibroblasten zu einer 34-prozentigen Abnahme des translozierten Cytochrom C als Maß für Apoptose.

Die Aktivierung von Caspasen spielt bei der Apoptose eine entscheidende Rolle. Die Caspase-3 erkennt eine bestimmte Aminosäuresequenz in Proteinen, wie z.B. der Poly-Adenosin-Ribosyl-Polymerase (PARP), mittels ihres Cysteinrestes am aktiven Zentrum und schneidet am Carboxylende von Aspartat-Resten. Eine erhöhte Aktivität des Enzyms korreliert mit einer erhöhten Apoptoserate in den untersuchten Zellen (Boulares et al., 1999). Um die Aktivität der Caspase-3 zu messen, wurden Fibroblasten über 16 h mit CNP vor- und für weitere 8 h mit Staurosporin, einer die Apoptose fördernde Substanz (Boulares et al., 1999), behandelt.

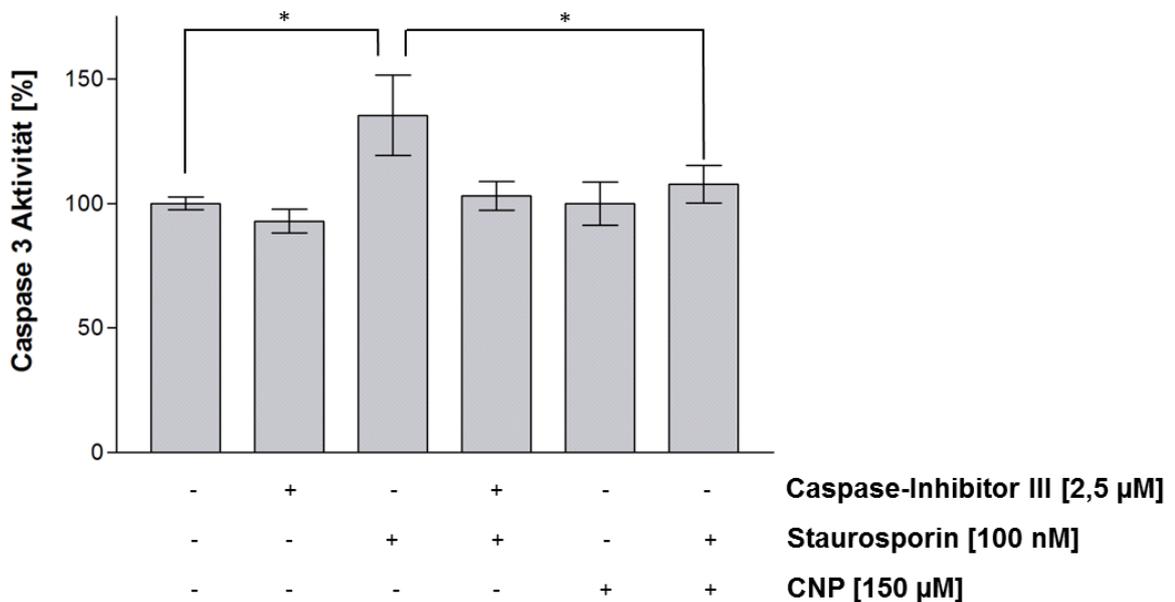


Abb. 33: Reduktion der Caspase-3-Aktivität als Ausdruck von Apoptose in subkonfluenten HDF nach CNP-Behandlung. Die Zellen wurden für 16 h mit 150 µM CNP vorinkubiert und für weitere 8 h mit 100 nM Staurosporin, einem Apoptose-Induktor, inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente eine Behandlung der HDF mit 2.5 µM Caspase-Inhibitor III (CI). Die Caspase-3-Aktivität wird nach 60 Min als Endzeitpunkt indirekt fluoreszenzphotometrisch bestimmt. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). * p<0.05

Eine geringe Caspase-3-Aktivität konnte auch in unbehandelten HDF nachgewiesen werden. Sie wurde als 100% festgelegt (Abb. 33). Eine Behandlung mit CNP über 24 h führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung der apoptotischen Aktivität der Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Eine Inkubation mit Staurosporin führte zu einer Zunahme der Caspase-3-Aktivität um 35% und damit zu einer Zunahme der Apoptose der Fibroblasten. Eine 16-stündige Vorinkubation mit CNP vor der Staurosporin-Behandlung führte hingegen zu einer Abnahme der Aktivität um 21% im Vergleich mit den nur mit Staurosporin behandelten Zellen.

Als Kontrolle diente die Zugabe von einem spezifischem Caspase-Inhibitor III (CI), welcher spezifisch Caspase-3 inhibiert und die Aktivität gegenüber der unbehandelten Kontrolle um 7% senken kann. Im Vergleich mit den nur mit Staurosporin behandelten Zellen führte eine Inkubation mit dem spezifischen Caspase-Inhibitor zusätzlich zur Behandlung mit Staurosporin zu einer Abnahme der Apoptose um 24% auf Werte, die denen der unbehandelten Kontrolle entsprechen. In einem Vergleich der mit CNP und Staurosporin behandelten und der mit dem Caspase-Inhibitor und Staurosporin behandelten Hautfibroblasten zeigte sich, dass eine Behandlung mit CNP zu einer Verringerung von Apoptose führt, die in der Ausprägung dem des spezifischen Caspase-Inhibitors entspricht.

Zusätzlich wurde eine Western-Blot-Analyse auf die Poly-(ADP-Ribose)Polymerase (PARP)-Cleavage durchgeführt, die aus einer erhöhten Aktivität der Caspase-3 resultiert. PARP ist ein Protein, das in viele verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist - unter anderem katalysiert es die NAD-abhängige Poly-ADP-Ribosylierung von vielen verschiedenen nukleären Proteinen - aber vor allem auch eine Rolle bei der DNA-Reparatur (Basenexzisionsreparatur bei Einzelstrangbrüchen) spielt und das nach der ‚PARP Cleavage‘ in Fragmente von 89 und 24 kDa zerteilt ist, die die DNA-bindende Domäne und das aktive Zentrum beinhalten (Boulares et al., 1998).

Dazu wurden HDF 24 h mit CNP und für weitere 24 h mit PQ^{2+} oder cisPlatin behandelt, lysiert und die PARP-Cleavage per Western Blot untersucht. Die geringe nachgewiesene Apoptose in den unbehandelten Zellen wird auf 1.0 normiert. Eine 48-stündige Behandlung mit CNP führte im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle zu einer geringen, nicht statistisch signifikanten Abnahme der apoptotischen Aktivität um 18% (Abb. 34).

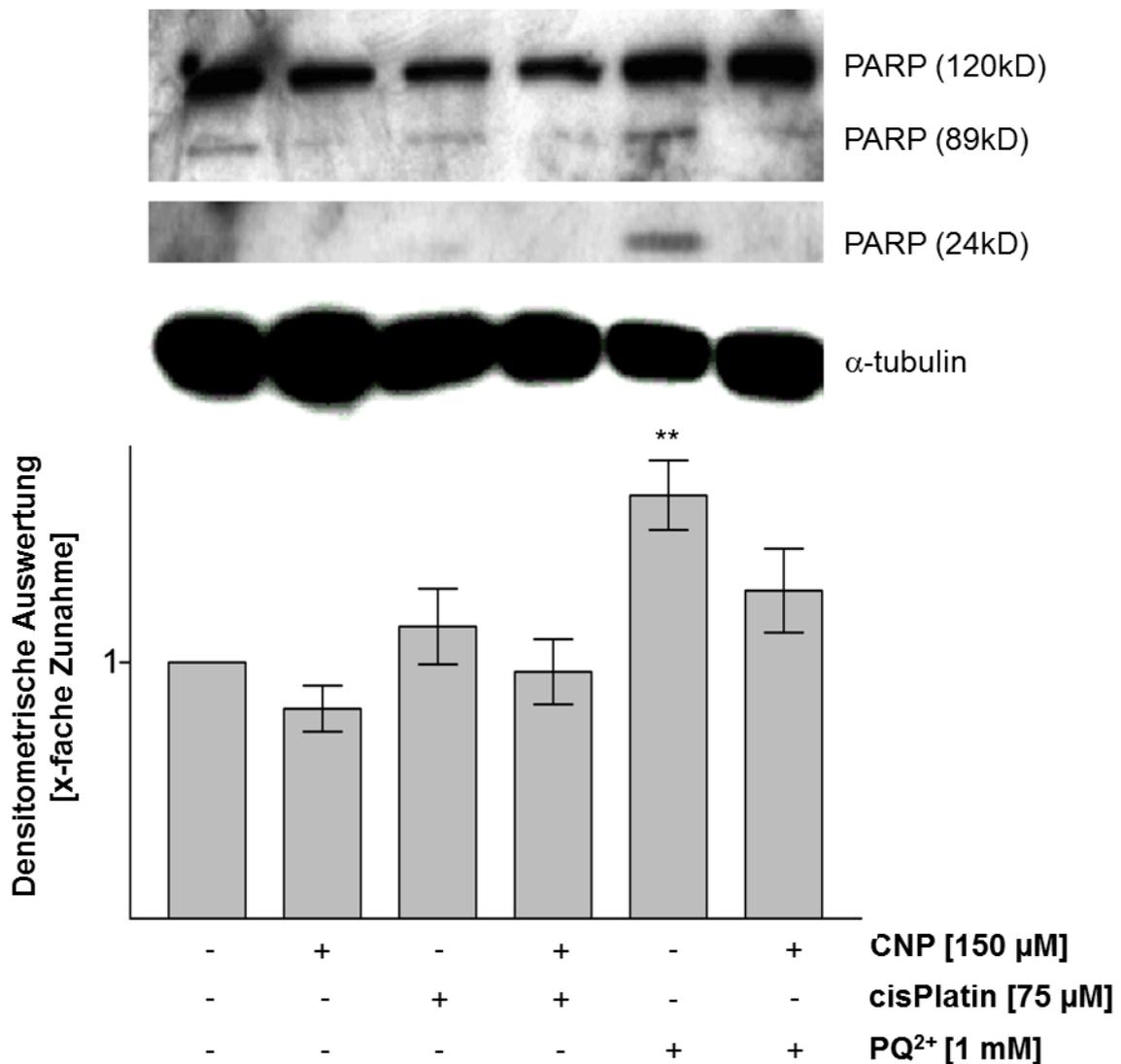


Abb. 34: Ceroxid vermindert die Apoptose in subkonfluenten Fibroblasten. Die Zellen wurden für 24 h mit 150 μ M CNP vorinkubiert und für weitere 24 h mit 1 mM PQ²⁺ oder 75 μ M cisPlatin behandelt, lysiert und per Western Blot auf die PARP-Cleavage analysiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometrie. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). ** p<0.01

Als Positiv-Kontrolle wurde eine Behandlung mit dem Superoxid-produzierenden PQ²⁺ über 24 h durchgeführt. Die Inkubation mit PQ²⁺ über 24 h führte zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate um 65% gegenüber der Kontrolle (Abb. 34). Hier fällt vor allem eine Akkumulation der kleinen Fragmente (24 kDa) auf. Bei einer Vorinkubation über 24 h mit CNP und einer weiteren 24-stündigen Behandlung mit PQ²⁺ fehlte diese Akkumulation. Auch der Nachweis von Fragmenten mit der Größe von 89 kDa war geringer. Durch die Vorbehandlung mit CNP nahm die Apoptoserate um 22% ab, gegenüber den nur mit PQ²⁺ behandelten Zellen. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle zeigte sich keine statistisch signifikante Erhöhung der Apoptoserate.

3.4 Zellbiologische Charakterisierung und deren Auswirkungen auf die Tumor-Stroma-Interaktion

In den vorherigen Experimenten zeigten die auf Ceroxid-basierten Nanopartikel eine antioxidative Wirkung. Im Weiteren stellte sich die Frage, welche biochemischen und zellbiologischen Parameter zusätzlich durch die antioxidative Wirkung der Nanopartikel beeinflusst werden.

3.4.1 CNP steigern die Zellproliferation

Die Proliferation der dermalen Fibroblasten wird nach einer Inkubation mit CNP untersucht. Zunächst wurde die Populationsverdopplungszeit bestimmt.

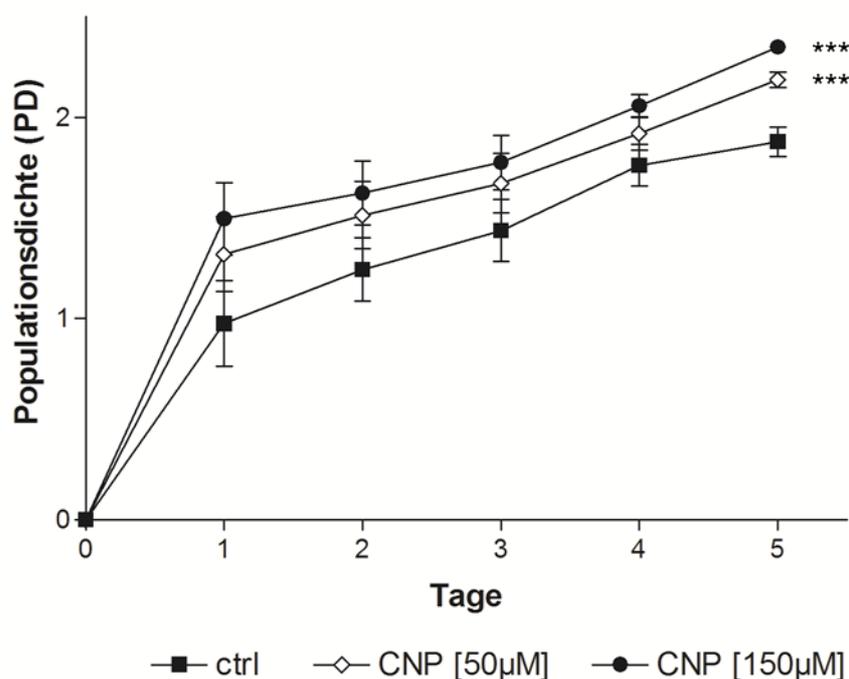


Abb. 35: Gesteigerte, konzentrationsabhängige Proliferation von Fibroblasten nach Behandlung mit Ceroxid. HDF wurden zu je $1.5 \cdot 10^4$ Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, mit 50 bzw. 150 μM CNP für 24 h inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und neuem Medium mit Wachstumsfaktoren (DMEM + 5% FCS) zugeführt. Anschließend wurden die Zellen über fünf Tage jeweils nach 24 h aus jeweils 2 Vertiefungen pro Probe abtrypsiniert und die Zellen ausgezählt. Die ausgezählten absoluten Zellzahlen von den jeweiligen Tagen wurden als Populationsdichte auf die ausgesäte Zellzahl von Tag 0 bezogen ausgewertet. An Tag 4 erfolgt ein weiterer Mediumwechsel (DMEM + 5% FCS). Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). *** $p < 0.001$

Schon nach 24 h ist ein Anstieg der absoluten Zellzahlen unter CNP-Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu messen. In der unbehandelten Kontrolle haben sich die Zellen verdreifacht, die Inkubation mit der niedrigeren Konzentration von CNP führte hingegen nach einem Tag schon zu einer Vervierfachung und eine Behandlung mit 150 μM CNP zu einer 4.8-fachen Vermehrung der Zellen (absolute Zellzahlen nicht gezeigt). An Tag 5 kann auch bei Vergleich der jeweiligen Populationsdichten (PD) ein statistisch signifikanter Anstieg der Proliferation bei den mit CNP behandelten Fibroblasten gegenüber den unbehandelten Zellen beobachtet werden: Die PD der unbehandelten HDF ist von 0 auf 1.87 gestiegen, die der mit 50 μM CNP behandelten Fibroblasten auf 2.19 und die der mit 150 μM CNP behandelten Zellen auf 2.35 (Abb. 35).

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wird die Proliferation mittels Einbau von Bromodesoxyuridin (BrdU) untersucht. BrdU wird anstelle von Thymin in neu synthetisierte DNA von proliferierenden Zellen eingebaut, welches über die Bindung an einen ersten Antikörper (AK) und anschließender Bindung eines zweiten, mit einem Farbstoff gekoppelten (Detektions-)AK photometrisch messbar wird.

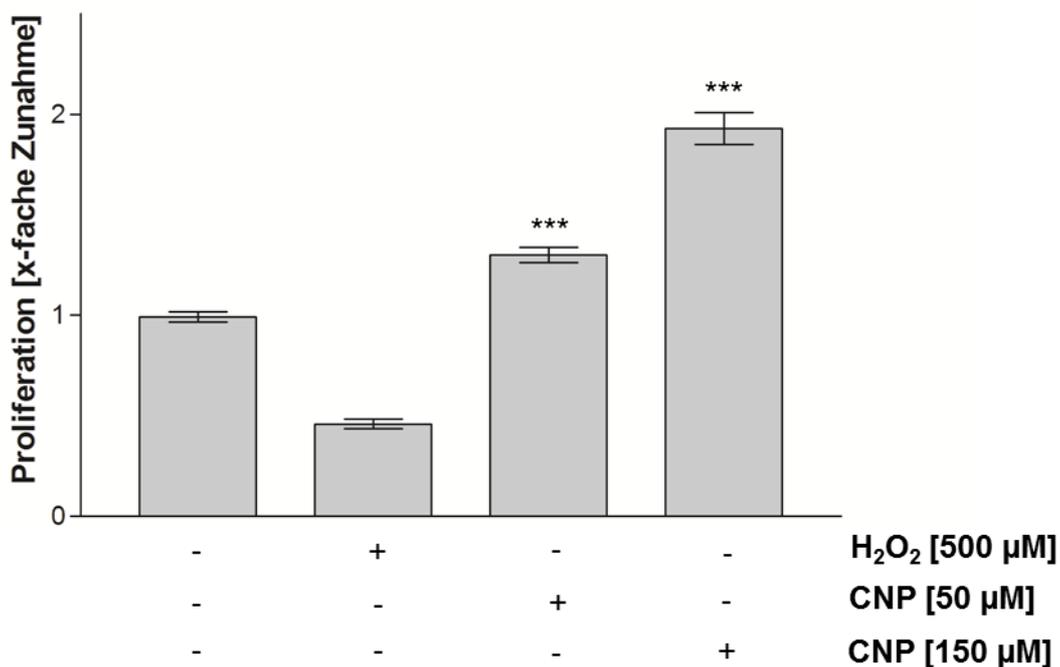


Abb. 36: Gesteigerte, konzentrationsabhängige DNA-Synthese von subkonfluenten Fibroblasten unter Ceroxid-Behandlung. Die Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ceroxid behandelt. Als Kontrolle diente eine 24-stündige Behandlung mit 500 μM H₂O₂. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit Antikörper (AK) gegen Bromdesoxyuridin (BrdU) versetzt, überschüssiger AK weg gewaschen und mit einem zweiten Detektions-AK, der mit einem Farbstoff gekoppelt ist, inkubiert. Der gebundene Detektions-AK wird photometrisch quantifiziert. Fünf unabhängige Versuche wurden durchgeführt (n=5). *** p<0.001

Die nachgewiesene DNA-Synthese der unbehandelten Hautfibroblasten wurde auf 100% festgelegt. Eine Inkubation mit der niedrigeren Konzentration von CNP über 48 h führte zu einer Zunahme der synthetisierten DNA auf 130%, eine Behandlung mit 150 μ M CNP für 48 h zu einer Zunahme auf 180% gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 36).

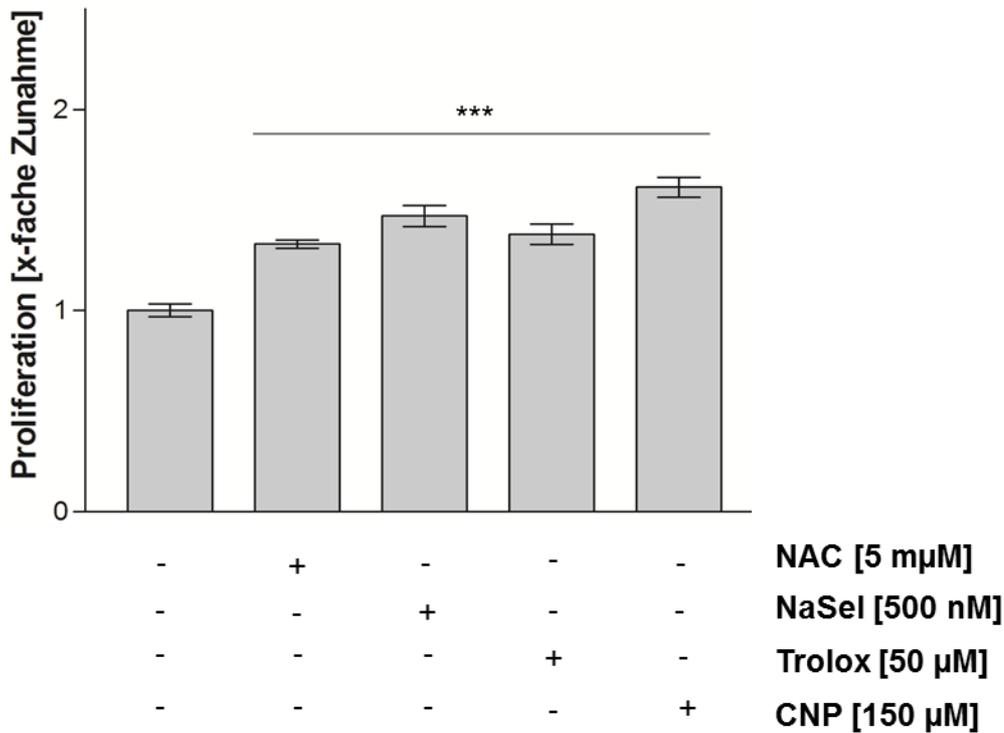


Abb. 37: Die gesteigerte Proliferation von Fibroblasten nach CNP-Behandlung liegt am antioxidativen Effekt. Die subkonfluenten HDF wurden für 48 h mit 150 μ M CNP oder für 24 h mit 5mM NAC, 500 nM NaSel oder 50 μ M Trolox behandelt und anschließend die DNA-Synthese mittels BrdU-Nachweis photometrisch bestimmt. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt (n=3). *** p<0.001

Um zu testen, ob die Steigerung der DNA-Synthese auf den antioxidativen Effekt der CNP zurückzuführen ist, wurden HDF mit unterschiedlichen antioxidativ wirkenden Substanzen für 24 h inkubiert. Eine Behandlung mit N-Acetyl-Cystein (NAC) führte zu einer Zunahme der Proliferation um 33%, eine Behandlung mit Natrium-Selenit (NaSel) zu einer Zunahme um 48% und Trolox (ein Vitamin-E-Derivat) um 38% (Abb. 37). Vergleichend wurde erneut eine 48-stündige Inkubation mit H₂O-CNP durchgeführt, die die DNA-Synthese um 61% steigerte.

In einem weiteren BrdU-Ansatz wurde der antioxidative, pro-proliferative Effekt der CNP auf Fibroblasten, die anschließend mit Zytostatika behandelt wurden, untersucht. Zu diesem Zweck wurden HDF 24 h mit CNP vorinkubiert und für weitere 24 h zusätzlich mit cis-diammindichloroplatin II (cisPlatin) oder Hydroxyharnstoff behandelt (Abb. 38).

Das Chemotherapeutikum CisPlatin führt in der DNA, ähnlich der Wirkung von Alkylantien, zu einer Vernetzung von DNA-Strängen. Durch die hohe Nukleophilie des Wasser-CisPlatin-Komplexes reagiert es vor allem mit dem Stickstoffatom von Guanin und Adenin, wodurch besonders Intrastrang-Quervernetzungen, aber seltener auch Interstrang-Quervernetzungen entstehen. Diese Intrastrang-Verbindungen führen zu Strangbrüchen, die dann im Rahmen der DNA-Reparatur in einem ersten Schritt nicht selten mit nicht-komplementären, „falschen“ Basen wieder verknüpft werden. In einem zweiten Schritt wird die „richtige“ Base aus dem komplementären Strang gegen die komplementäre Base der im ersten Schritt falsch verknüpften Base ersetzt, was zu Punktmutationen führen kann (Kleinwächter et al., 1976). Diese Veränderungen an der DNA führen zu einem gesteigerten Zelltod, vor allem bei Zellen, die schnell proliferieren, wie unter anderem Tumorzellen. Diese Wirkung auf Tumorzellen nutzt man im Rahmen einer Chemotherapie. Allerdings werden durch Zytostatikabehandlung auch nicht-tumoröse Zellen, die schnell proliferieren geschädigt.

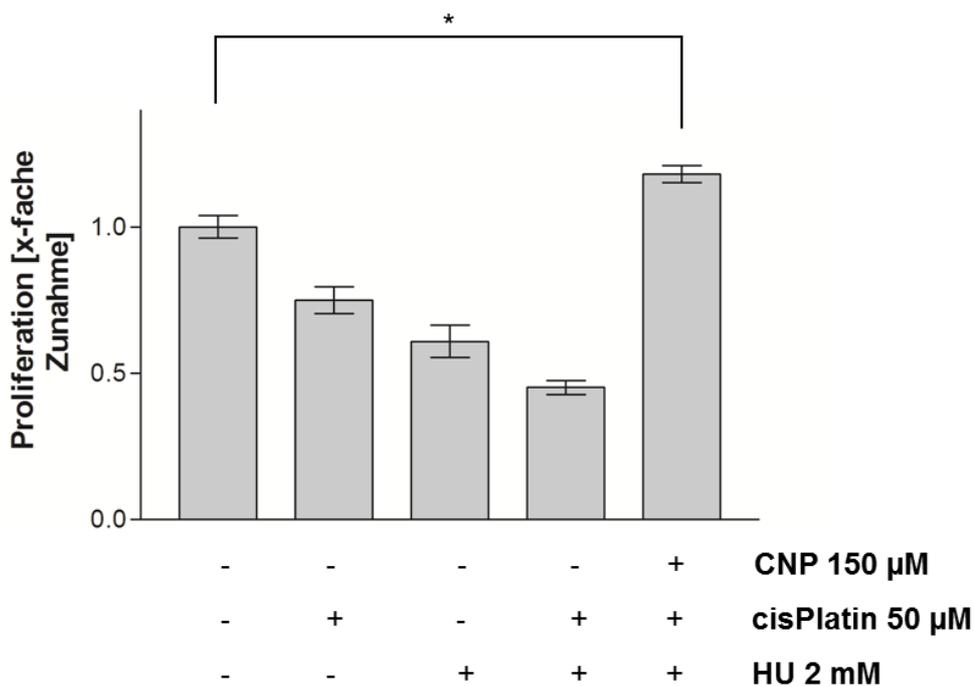


Abb. 38: CNP wirken dem zytotoxischen Effekt von Zytostatika entgegen. Subkonfluente HDF wurden für 24 h mit 150 µM CNP vorbehandelt und anschließend für weitere 24 h mit 50 µM cisPlatin und / oder 2 mM Hydroxyharnstoff (HU) behandelt. Anschließend wurde die DNA-Synthese mittels BrdU-Nachweis photometrisch bestimmt. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt (n=3). *p<0.05 *** p<0.001

Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100% normiert. Die Proliferation von mit CNP behandelten HDF zeigte einen zweifachen Anstieg gegenüber dem der unbehandelten Kontrolle. Eine Behandlung mit cisPlatin führte im Vergleich mit den unbehandelten

Fibroblasten zu einer 25-prozentigen Abnahme der Proliferation. Eine Vorinkubation mit Ceroxid-Nanopartikeln vor cisPlatin-Behandlung steigerte die Proliferation der Hautfibroblasten wieder auf Werte, die deutlich über denen der unbehandelten Kontrolle liegen (Daten nicht gezeigt).

Das Zytostatikum Hydroxyharnstoff (HU) ist ein Hemmstoff der Ribonukleotid-Reduktase, einem Enzym, das während der DNA-Synthese die Ribonukleotide an ihren jeweiligen Desoxyribonukleotiden reduziert. Eine 24-stündige Inkubation mit HU führte zu einer Abnahme der Proliferation auf 60% verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Mit CNP vorinkubierte und anschließend mit HU behandelte Fibroblasten zeigen eine Proliferationsrate von 140% (Daten nicht gezeigt).

Bei einer gleichzeitigen Behandlung der HDF mit cisPlatin und Hydroxyharnstoff nahm die DNA-Synthese auf 44% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle ab. Dieser Effekt auf humane dermale Fibroblasten konnte durch eine 24-stündige Vorinkubation mit 150 μ M CNP komplett aufgehoben werden. Es kam zu einer leichten Steigerung der Proliferation gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf 118%.

3.4.2 CNP vermindern die Aktivität der PKC

TGF β 1 bewirkt in Fibroblasten durch Phosphorylierung einer Untereinheit der Proteinkinase C (PKC) eine Aktivierung von PKC, welche ihrerseits die NAD(P)H-Oxidase aktiviert, die Superoxid-Radikale generiert. Die Bildung von Superoxid führt zur Bildung von Myofibroblasten (Cat et al., 2006). Da CNP, wie oben beschrieben, die Bildung des Myofibroblasten und die ROS-Generierung verhindern, stellte sich die Frage, ob CNP in der Lage sind, die Aktivität der PKC herabzusetzen und damit die TGF β 1-Wirkung vor der ROS-Produktion zu stoppen.

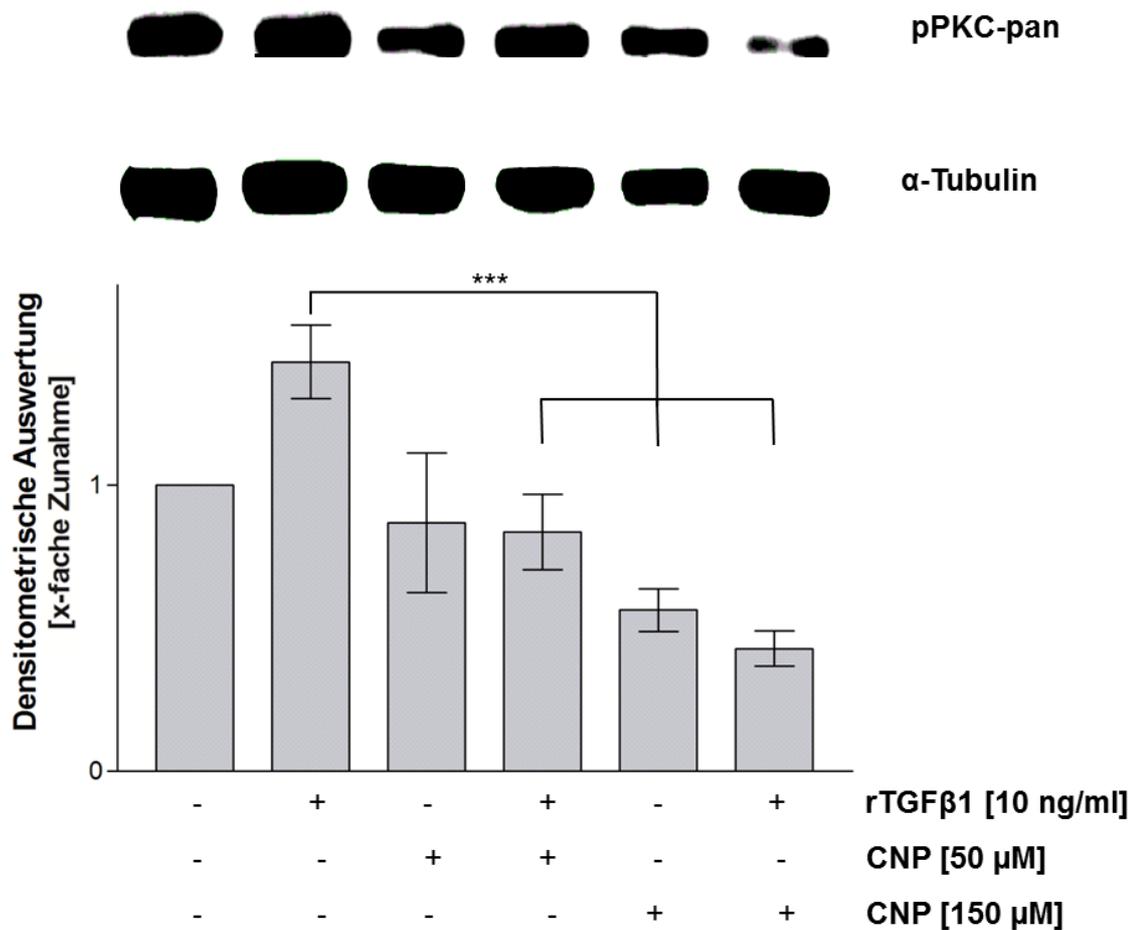


Abb. 39: Ceroxid vermindert konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von Proteinkinase C (PKC) in Fibroblasten. Subkonfluente Zellen wurden für 24 h mit 50 bzw. 150 μM CNP vorinkubiert, anschließend eine 1-minütige rTGF β 1-Inkubation (10 ng/ml) durchgeführt, die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Aktivität der PKC untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometrie. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt (n=3). ** p<0.01

Diese Phosphorylierung der PKC erfolgt innerhalb von 1 Min nach Inkubation (Cat et al., 2006) und kann mittels Western-Blot-Analyse dargestellt werden. Der Phosphorylierungsgrad der PKC in den unbehandelten Fibroblasten wird auf 1.0 gesetzt. Die Behandlung der Fibroblasten mit unterschiedlichen CNP-Konzentrationen bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung der PKC um 13% auf 0.87 (50 μM) bzw. um 44% auf 0.56 (150 μM) (Abb. 39).

Die Inkubation mit rTGF β 1 führte im Vergleich mit den unbehandelten HDF zu einer Zunahme der Phosphorylierung der PKC um 43%. Eine 24-stündige Vorinkubation mit 50 μM CNP bewirkte eine Abnahme um 16%, eine 24-stündige Vorinkubation mit 150 μM CNP eine Abnahme um 57%.

3.4.3 CNP vermindern die Adhäsionsfähigkeit von Fibroblasten

Cadherine und Catenine stellen wichtige Glykoproteine dar, die die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. N-Cadherine sind Adhäsionsproteine, die von Fibroblasten, aber auch von neuronalen Zellen exprimiert werden, und demnach in der Neuronen-Entwicklung und in der Zell-Zell-Kommunikation mit anderen Zelllinien eine bedeutende Rolle spielen (Matsuyoshi und Imamura, 1997).

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit CNP einen Effekt auf die Expression dieser Adhäsionsmoleküle aufweisen, wurde mittels Western Blot die Expression untersucht. Fibroblasten wurden in 3-cm-Zellkulturschalen kultiviert, für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von CNP und anschließend zusätzlich für 48 h mit rTGFβ1 behandelt. Die HDF wurden lysiert und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

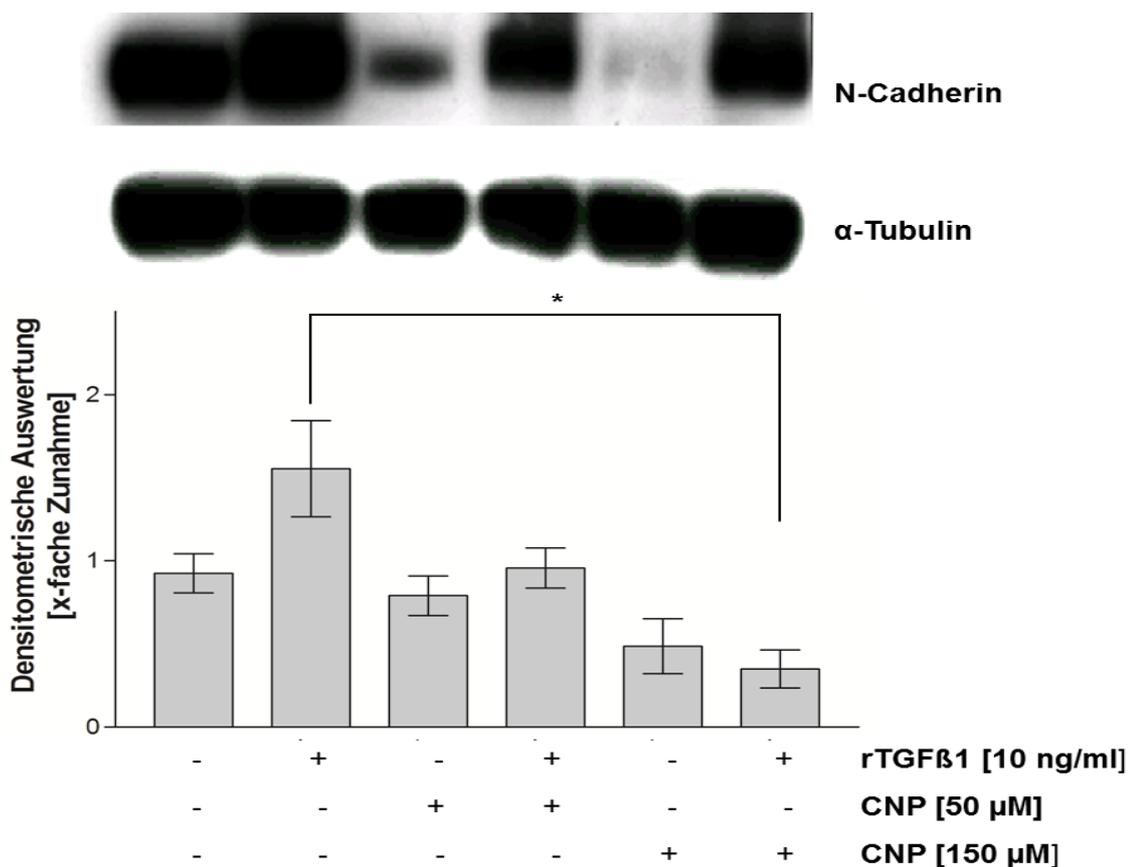


Abb. 40: Konzentrationsabhängige Abnahme der Expression von N-Cadherin in subkonfluenten Fibroblasten nach CNP-Inkubation. Die Zellen wurden für 24 h mit 50 bzw. 150 μM CNP vorinkubiert und anschließend für weitere 48 h mit 10 ng/ml rTGFβ1 behandelt, lysiert und mittels Western Blot auf die Expression von N-Cadherin untersucht. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgt mittels Densitometrie. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). * p<0.05

Die nachgewiesene Menge an N-Cadherin in unbehandelten HDF wurde als 1.0 festgelegt. Eine 72-stündige Behandlung mit CNP allein führte hingegen zu einer statistisch nicht signifikanten Abnahme der Expression des N-Cadherins auf 0.79 (50 μ M) bzw. 0.49 (150 μ M). Die Behandlung mit rTGF β 1 bewirkte eine 50%ige Steigerung der Expression von N-Cadherin (Abb. 40). Eine Vorbehandlung mit steigenden Konzentrationen von CNP führte zu einer Abnahme der Expression um 54% (50 μ M) bzw. 69% (150 μ M; $p < 0.05$) im Vergleich mit der mit rTGF β 1 behandelten Kontrolle.

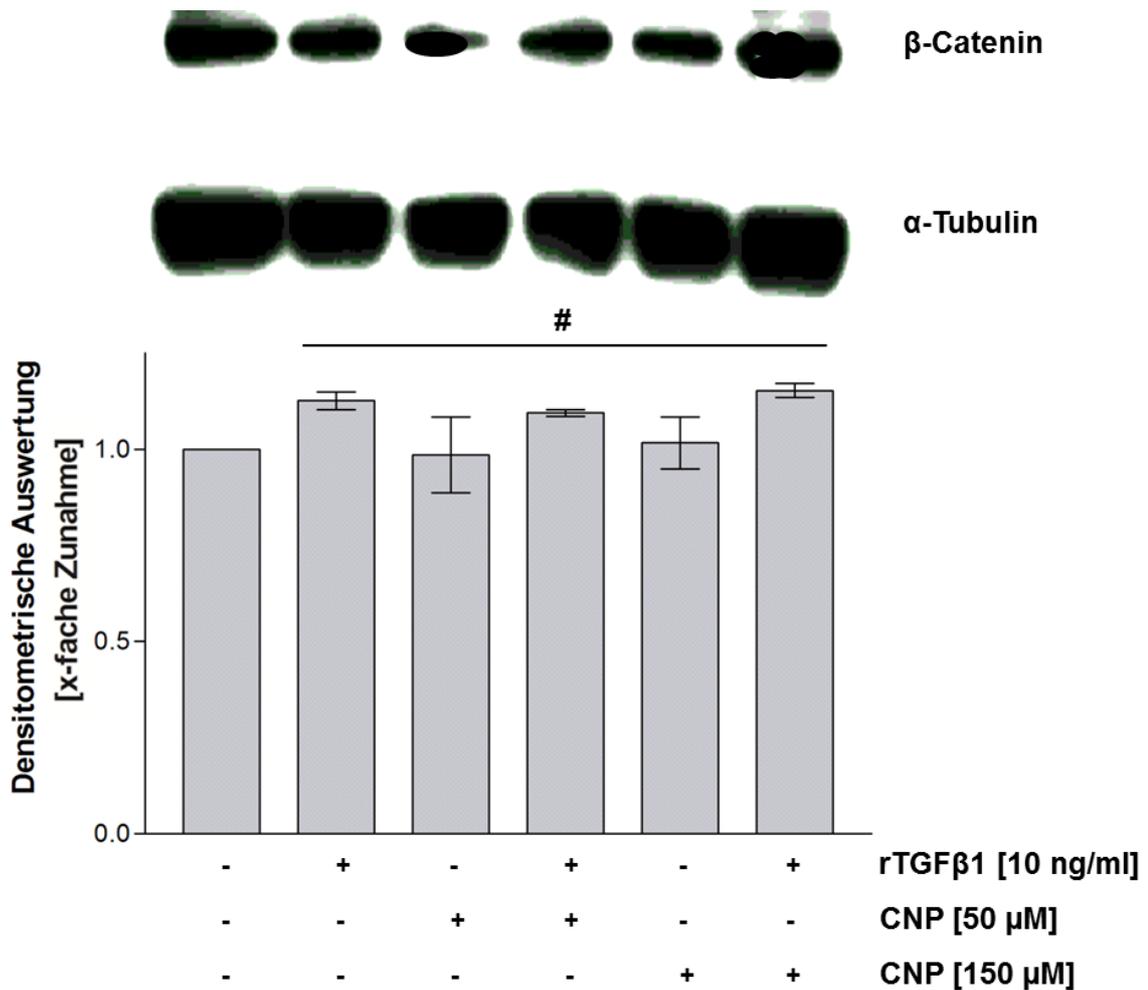


Abb. 41: Die Expression von β -Catenin ist von Ceroxid unabhängig. Die Fibroblasten wurden für 24 h mit 50 bzw. 150 μ M CNP vorinkubiert und anschließend für weitere 48 h mit 10 ng/ml rTGF β 1 behandelt, lysiert und mittels Western Blot auf die Expression von N-Cadherin untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometrie. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3).

Zusätzlich wurde die Expression von β -Catenin, einem weiteren Adhäsionsmolekül, untersucht (Abb. 42). Der Effekt durch eine Behandlung mit rTGF β 1 ist statistisch nicht signifikant, die Expression wurde um 12% auf 1.12 gesteigert ($p > 0.05$). Eine Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von CNP führte zu keiner Beeinflussung der Expression von β -Catenin (Abb. 41).

3.4.5 CNP vermindern die Tumorinvasion von SCL-1-Zellen

Einige Arbeiten zeigen, dass Myofibroblasten in den Prozess der Tumorinvasion involviert sind (De Wever und Mareel, 2002, Cat et al., 2006, Alili et al., 2011). Die Erhöhung der Invasion wird durch Zytokinfreisetzung des Myofibroblasten, wie z.B. Interleukin-6 (IL-6), Hepatocyte growth factor (HGF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF), verstärkt (Cat et al., 2006).

Ceroxid-Nanopartikel verhindern die Bildung des Myofibroblasten, welcher essentiell für die Tumorinvasion ist. Eine CNP-Behandlung der Fibroblasten sollte zu einer signifikant niedrigeren Invasionsrate führen. Um diese Wirkung zu bestätigen, wurde konditioniertes Medium (CM) von unterschiedlich behandelten Fibroblasten hergestellt (CM^{HDF} , $CM^{HDF+CNP}$, CM^{MF} , $CM^{HDF+rTGF\beta 1+CNP}$) und als Chemoattraktand verwendet. Die Tumorzellen bleiben in diesem Versuch unbehandelt.

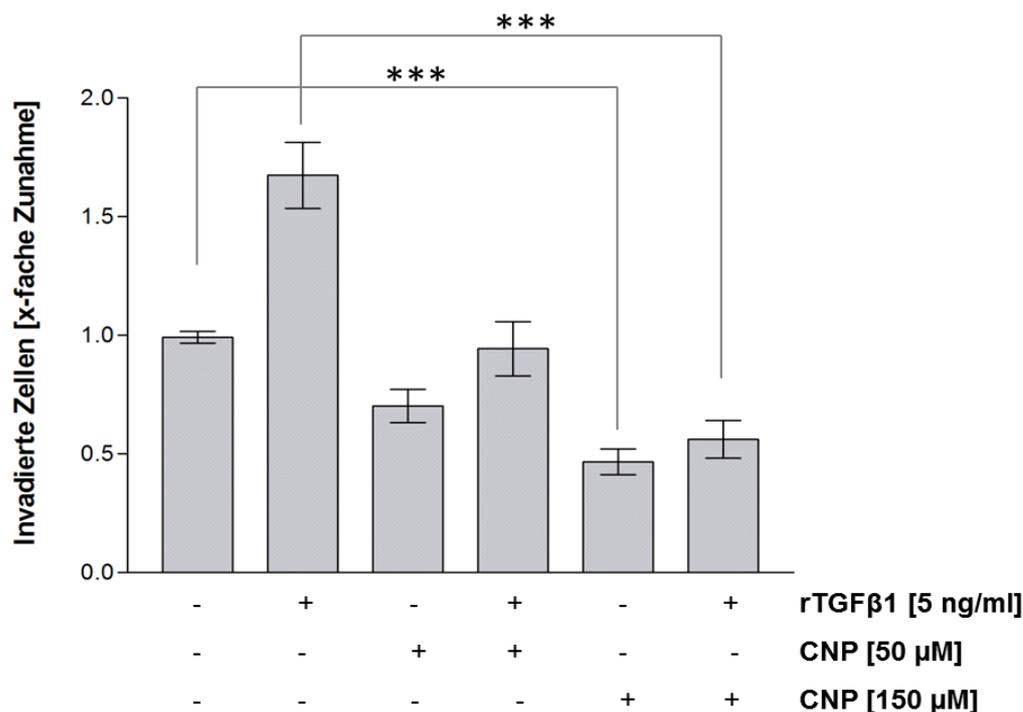


Abb. 42: Ceroxid verhindert konzentrationsabhängig die Tumorinvasion. Es wurden unterschiedliche konditionierte Medien (CM) hergestellt. Dazu wurden subkonfluente HDF unbehandelt (CM^{HDF}), für 48 h mit 5 ng/ml rTGFβ1 behandelt (CM^{MF}), mit 50 bzw. 150 μM CNP für 72 h inkubiert ($CM^{HDF+CNP}$), oder für 24 h mit CNP (50μM oder 150μM) vorinkubiert und anschließend für weitere 48 h mit 5 ng/ml rTGFβ1 behandelt ($CM^{HDF+rTGFβ1+CNP}$). Die jeweiligen CM wurden als Chemoattraktand in eine 24-Well-Platte überführt. In gecoatete Inserts wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ SCL-1-Zellen eingesät, die Inserts in die Medien überführt und für 48 h inkubiert, die Membranen aus den Inserts gelöst, die invadierten SCL-1 mit Coomassie gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). ** p<0.01

Die Zahl der invadierten, unbehandelten Zellen bei CM^{HDF} wird als 1.0 festgelegt. Nach erfolgter Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von CNP (50 bzw. 150 μM) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Invasion. Eine 72-stündige Behandlung mit 50 μM CNP bewirkte eine Abnahme der Invasion um 30% ($CM^{HDF+CNP}$), eine Behandlung mit 150 μM über den gleichen Zeitraum zu einer Abnahme um 54% (Abb. 42).

Die Behandlung mit rTGFβ1 führte zur Bildung des Myofibroblasten, in dessen konditioniertem Medium (CM^{MF}) sich Zytokine und Chemokine befinden, die eine stärkere Tumorinvasion bewirkten. Die Verwendung von CM^{MF} als Chemoattraktand führte zu einer Zunahme der Invasion auf um 68%. Durch 24-stündige Vorinkubation der Fibroblasten mit 50 bzw. 150 μM CNP vor der 48-stündigen Behandlung mit rTGFβ1 wurde die Bildung des Myofibroblasten verhindert und die Tumorinvasion nahm ab ($CM^{HDF+rTGFβ1+CNP}$). Die Behandlung mit 50 μM CNP bewirkte eine Abnahme der Invasion auf Werte, die denen der

unbehandelten Kontrolle (CM^{HDF}) entsprechen. Eine Inkubation mit 150 μM bewirkte eine Abnahme der Invasion um 37% und liegt damit auch noch statistisch signifikant unterhalb der Invasionsrate der unbehandelten Kontrolle (Abb. 42).

Da die Behandlung der Fibroblasten mit Verhinderung der mesenchymal-mesenchymalen Transition zu einer Verringerung der Tumorinvasion führte, stellte sich im Weiteren die Frage, ob eine Inkubation der Tumorzellen selbst auch eine Verminderung der Invasion bewirken kann. Zu diesem Zweck wurden SCL-1 für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von CNP behandelt, abtrypsiniert und in die Zellkultureinsätze eingesät. Als Chemoattraktand dienten CM^{HDF} und CM^{MF} (Abb. 43).

Die invadierten Zellen der unbehandelten Kontrolle (CM^{HDF}) wurden wieder als 1.0 festgelegt. Die Behandlung der SCL-1 mit den verschiedenen Konzentrationen führte konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Invasionsrate um 31% bzw. 59%.

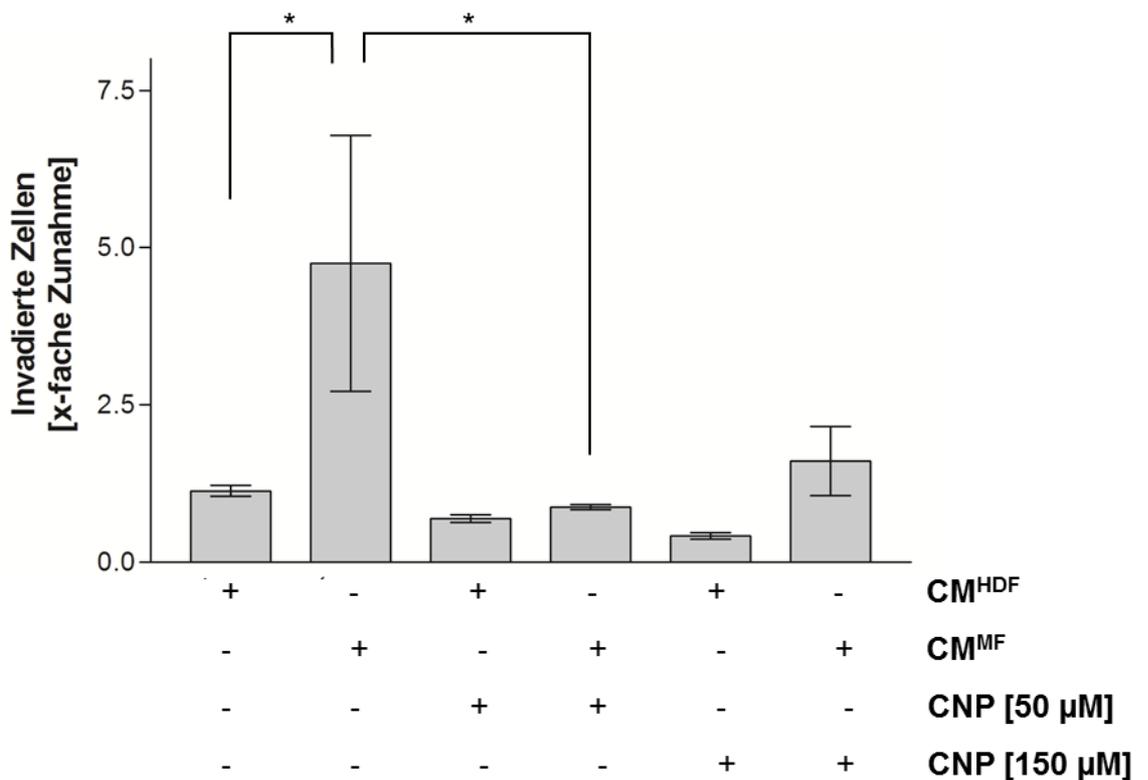


Abb. 43: CNP verhindern konzentrationsabhängig die Tumorinvasion bei Behandlung der Tumorzellen. Subkonfluente SCL-1-Zellen wurden 50 bzw. 150 μM CNP für 48 h behandelt, anschließend abtrypsiniert und zu je $5 \cdot 10^4$ Zellen in gecoatete Inserts gesplittet. CM^{HDF} und CM^{MF} dienten als Chemoattraktand. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Membranen aus den Inserts gelöst, die invadierten SCL-1 mit Coomassie gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (n=3). * $p < 0.05$

Eine deutliche Zunahme der Invasion war bei der Verwendung von CM^{MF} als Chemoattraktand zu verzeichnen. Der Überstand des Myofibroblasten bewirkt eine 4.7-fache Zunahme. Trotz Verwendung des für die Invasion essentiell wichtigen Überstandes des Myofibroblasten (CM^{MF}), führte eine Behandlung der SCL-1 mit CNP konzentrationsabhängig zu einer geringeren Invasion. Die Behandlung mit 50 μM CNP bewirkte eine Abnahme auf 86.5%, die Inkubation mit 150 μM CNP eine Abnahme auf 160% (Abb. 43).

4 Diskussion

Im Rahmen der Krebsforschung werden neue Ansätze der Tumorbehandlung zur Verhinderung der Metastasierung entwickelt, um die Lebenserwartung von Betroffenen zu verbessern. Einen Ansatz stellt dabei die Verhinderung der mesenchymal-mesenchymalen Transition von Hautfibroblasten im Sinne einer stromalen Therapie dar (Cat et al., 2006). Nach diesem Konzept wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Ceroxid-Nanopartikeln auf gesunde stromale Zellen (humane dermale Fibroblasten) untersucht.

4.1 CNP und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Neben der aus der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen verifizierten toxischen Wirkung von CNP auf dermale Tumorzellen (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013), sollte eine antioxidative Wirkung auf humane dermale Fibroblasten anhand zellbiologischer und biochemischer Parameter untersucht werden.

4.1.1 CNP wirken antioxidativ durch SOD- und Katalase-mimetische Aktivität

Eine antioxidative Wirkung von CNP auf gesunde stromale Zellen wurde schon mehrfach beschrieben (Korsvik et al., 2007; Heckert et al., 2008; Karakoti et al., 2008; Karakoti et al., 2009; Babu et al., 2010; Pirmohamed et al., 2010; Niu et al., 2011), allerdings wird auch eine pro-oxidative Wirkung auf Tumorzellen diskutiert (Lin et al., 2006; Eom et Choi, 2009; Alili et al., 2011; Alili et al., 2013). Eine Hypothese bezüglich der pro- und antioxidativen Wirkung von CNP ist mit einer möglichen pH-Abhängigkeit der Wirkung von CNP zu erklären (Alili et al., 2013, Das et al., 2013). Tumorzellen weisen einen leicht sauren pH auf, welcher im Durchschnitt um die Einheit 0.5 niedriger ist, als der pH von beispielsweise gesunden Fibroblasten, welcher bei 7.2 liegt (Astarie et al., 1992, Boyer et Tannock, 1992).

In den Versuchen dieser Arbeit konnte eine antioxidative Wirkung der CNP in gesunden Zellen (hier: dermale Fibroblasten) nachgewiesen werden. Eine ROS-abhängige Zunahme an carbonylierten Proteinen konnte durch Inkubation mit rTGF β -1 sowie direkt mit H₂O₂ generiert werden. Diese Zunahme an carbonylierten Proteinen konnte durch vorhergehende Inkubation mit CNP verhindert werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde in verschiedenen Ansätzen zur Messung des oxidativen Status der Zelle mittels des Verhältnisses von GSH zu

GSSG, des Superoxid-Nachweises mittels Dihydroethidium sowie dem direkten Nachweis von ROS mit Hilfe der DCF-Messung erzielt.

Die antioxidative Wirkung wird sowohl auf eine SOD-, als auch auf eine mögliche Katalase-mimetische Aktivität der CNP zurückgeführt (Korsvik et al., 2007; Heckert et al., 2008; Karakoti et al., 2009; Pirmohamed et al., 2010; Niu et al., 2011, Das et al., 2013). Die Superoxid-Dismutase katalysiert dabei in zwei Schritten die Reaktion des Superoxidradikals mit Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid (Abb. 45).

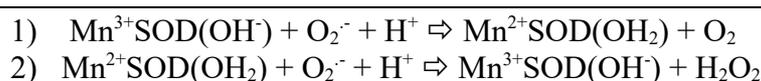


Abb. 45: Reaktionsschritte der Superoxid-Dismutase (SOD) anhand des Beispiels der manganhaltigen SOD (MnSOD). Das dreiwertige Mangan der oxidierten MnSOD wird durch die Reaktion mit Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) im ersten Schritt zum zweiwertigen Mangan reduziert. In einem zweiten Schritt wird unter Reaktion mit einem weiteren Superoxidanion unter Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Mn^{2+} wieder zu Mn^{3+} oxidiert (Miller, 2004, Wuerges et al., 2004).

Es wird angenommen, dass Ceroxid-Nanopartikel diese Reaktion der SOD in Tumorzellen ebenfalls in zwei Schritten simulieren (Abb. 46).

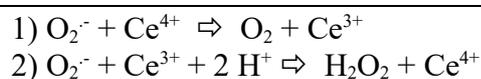


Abb. 46: Reaktionsschritte der Superoxid-Dismutase-(SOD-)mimetischen Aktivität von Ceroxid.

Eine SO-mimetische Aktivität der CNP wurde in den hier durchgeführten Versuchen indirekt bewiesen. Die Wirkung des Superoxid-produzierenden Redoxcyclers Paraquat konnte durch Vorinkubation mit CNP in den verschiedenen Ansätzen vermindert bzw. aufgehoben werden. So konnte eine Abnahme der Fluoreszenz von oxidiertem Ethidium durch die Koinkubation von CNP und Paraquat im Gegensatz zu einer alleinigen Paraquat-Inkubation nachgewiesen werden. Auch die Abnahme des H_2O_2 -Gehaltes (durch einen exogenen Stimulus, in diesem Fall durch rTGF β 1-Inkubation) in HDF konnte mittels Oxyblot durch die Vorinkubation mit CNP gezeigt werden. Dies legt eine Katalase-mimetische Aktivität des Ceroxids nahe (Abb. 47).

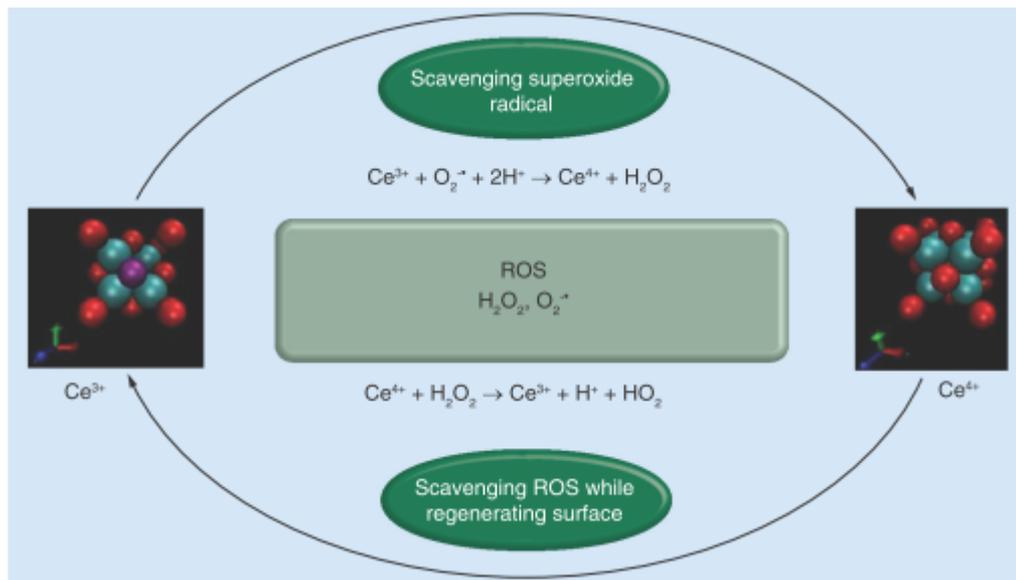


Abb. 47: Abhängigkeit der Reaktion von Ceroxid-Nanopartikeln mit ROS von der Oxidationsstufe des Cers. Ce^{3+} wird bei einer Reaktion mit einem Superoxidanion unter Produktion von Wasserstoffperoxid zu Ce^{4+} oxidiert. Ce^{4+} katalysiert unter Reduktion zu Ce^{3+} (Regeneration) die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasserstoffdioxid (HO_2), welches unter spontaner Reaktion mit Wasserstoffionen zu Wasser detoxifiziert wird. [Quelle: Das et al., 2013]

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die SOD- als auch die Katalase-mimetische Aktivität des Ceroxids pH-abhängig ist. Die SOD-Aktivität und eine mögliche pH-Abhängigkeit von CNP wurden über die Reduktion von Ferricytochrom C durch Superoxid in CNP-haltigen Reaktionslösungen spektrometrisch bestimmt. Dafür wurden in einem zellfreien System der pH der Reaktionslösung auf 3 bzw. 7 eingestellt. Darüber hinaus wurde eine mögliche pH-Abhängigkeit der Katalase-mimetischen Aktivität mit Hilfe des Amplex Red-Assays bestimmt, welcher physiologische Mengen von H_2O_2 nachweisen kann (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013). Bei pH 7 lies sich sowohl eine deutlich höhere SOD-mimetische Aktivität als auch eine erhöhte Katalase-mimetische Aktivität nachweisen als bei pH 3, was auf eine pH-Abhängigkeit hindeutet (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013). Daraus lassen sich folgende Möglichkeiten für den Wirkungsmechanismus der CNP in Fibroblasten ableiten: mittels der SOD-mimetischen Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel entsteht durch die Detoxifizierung von Superoxid Wasserstoffperoxid. Dieses wird durch die in neutralem pH (in Fibroblasten etwa 7.2) erhöhte Katalase-mimetische Aktivität entsorgt. Da allerdings bei neutralem pH weniger freie Wasserstoffionen vorhanden sind, ist es auch denkbar, dass nur der erste Teilschritt der SOD-mimetischen Reaktion (Abb. 46) stattfindet und dementsprechend gar kein H_2O_2 entsteht. In Tumorzellen hingegen, die einen leicht sauren pH aufweisen, ist die Katalase-mimetische Aktivität vermindert. Da aber mehr freie

Wasserstoffionen vorhanden sind, laufen beide Teilschritte der SOD-mimetischen Aktivität der CNP ab und es entsteht vermehrt Wasserstoffperoxid, welches in den Tumorzellen akkumuliert. Diese nachgewiesene pH-Abhängigkeit der pro- bzw. antioxidativen Eigenschaften des Ceroxid wiederum untermauert die Hypothese, dass je nach pH sowohl ein pro- als auch ein antioxidativer Effekt in verschiedenen Zellen ausgelöst werden kann.

Durch die CNP-Behandlung verschob sich das Verhältnis von GSH zu GSSG in Richtung des reduzierten Glutathions (GSH). Zwei Moleküle des Tripeptids Glutathion können bei gleichzeitiger Oxidation zu GSSG ein Molekül Wasserstoffperoxid zu zwei Molekülen H₂O detoxifizieren. Da CNP das in der Zelle anfallende H₂O₂ durch ihre Katalase-mimetische Aktivität detoxifizieren können, sinkt der ROS-Gehalt der Zelle. Dementsprechend wird das für die Zelle wichtige antioxidative Glutathion weniger beansprucht, was in einer Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des reduzierten Glutathions mündet.

In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob die Verschiebung zugunsten des GSH, allein darauf zurückzuführen ist, dass durch eine verringerte ROS-Akkumulation nach CNP-Behandlung die GSH-Vorräte weniger oxidiert wurden und somit mehr GSH vorliegt, oder ob Ceroxid über Signalkaskaden zu einer vermehrten Synthese von Glutathion führt. Zur Klärung dieser Frage wurde die Neusynthese von Glutathion durch einen spezifischen Hemmstoff der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase, dem D,L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin (BSO), inhibiert. Bei Betrachtung der Verhältnisse GSH:GSSG fiel auf, dass zwar das Verhältnis bei der Behandlung mit Ceroxid trotz verminderter Neusynthese deutlich in Richtung des reduzierten Glutathions verschoben war; allerdings konnte keine Neusynthese des Enzyms durch Ceroxid-Behandlung festgestellt werden. Dementsprechend ließ sich der Effekt einer CNP-Behandlung nur bei Betrachtung des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Glutathion feststellen; bei alleiniger Betrachtung des reduzierten Glutathions war kein signifikanter Effekt zu verzeichnen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Glutathion-Peroxidase (GPx), einem Enzym, das Glutathion bei der Detoxifizierung von H₂O₂ zu Wasser zum Diglutathion oxidiert, durch eine Behandlung mit CNP abnimmt (von Montfort et al., 2015). Dieses Resultat untermauert das hier erzielte Ergebnis, dass Glutathion auf zellulärer Ebene (Expression) nicht durch eine CNP-Behandlung reguliert ist, sondern, dass CNP direkt mit Paraquat-induzierten ROS interagieren und diese so detoxifizieren (von Montfort et al., 2015).

Zusammenfassend wirken CNP demnach antioxidativ über ihre pH-abhängigen, redox-aktiven Eigenschaften, die sich durch eine SOD- und Katalase-mimetische Aktivität

auszeichnen. Eine vermehrte Synthese von wichtigen antioxidativ wirkenden Redoxsystemen der Zelle konnte zum jetzigen Zeitpunkt nicht belegt werden (von Montfort et al., 2015).

4.1.2 CNP verhindern sowohl Apoptose als auch Nekrose

Abhängig vom ATP-Gehalt der Zelle, kommt es durch einen zu hohen Gehalt von ROS, Stress, Noxen oder DNA-Schäden zum Zelltod. Dieser lässt sich in zwei Formen einteilen, die Apoptose und die Nekrose. Die Nekrose beschreibt den toxischen Zelltod (Krohn et al., 1999). Die Apoptose ist der sogenannte programmierte Zelltod, welcher über zwei Wege eingeleitet werden kann, und bei der ein höherer ATP-Spiegel als bei Zellen, die nekrotisch werden, vorliegt (Krohn et al., 1999). Entweder findet eine Bindung von Liganden an ihre entsprechenden Rezeptoren statt (Rezeptor-vermittelter, extrinsischer Weg), wie z.B. CD95-Ligand (CD95L; FasL) an CD95 (Fas). Nach der Ligandenbindung folgt die Rezeptor-Trimerisierung, eine Bindung an die intrazelluläre Todesdomäne („Death domain“, DD) und anschließend die proteolytische Aktivierung von Caspase-8 sowie weiterer Effektor-Caspasen (u.a. Caspase-9, -3 und -7). Auf der anderen Seite kann es durch mitochondriale Signale (intrinsischer Weg) zu einer Freisetzung von Cytochrom C, einem wichtigen Komplex der Atmungskette, in das Zytosol (Cytochrom-C-Translokation) kommen. Cytochrom C führt im Zytosol zusammen mit Apaf-1 (Apoptose-Protease-aktivierender-Faktor-1) und ATP zu einer Dimerisierung von Procaspase-9, wodurch aktive Caspase-9-Dimere entstehen. In einem weiteren Schritt kommt es durch eine Caspase-9-vermittelte proteolytische Spaltung zu einer Aktivierung von Effektor-Caspasen (Caspase-3 und Caspase-7). Diese führen letztendlich durch Spaltung integraler Zellbestandteile, wie z.B. Proteine des Zytoskeletts (u.a. Aktin), sowie in einem späteren Stadium durch DNase-vermittelten DNA-Verdau zum Zelltod (Bossy-Wetzel et al., 1998, Krohn et al., 1999, McGinnis et al., 2003). Aktivierte Caspase-3 führt durch eine proteolytische Spaltung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) zur sogenannten PARP-Cleavage (Boulares et al., 1998).

In dieser Arbeit konnte sowohl durch Messung der Caspase-3-Aktivität als auch durch Darstellung der Cytochrom-C-Translokation und der PARP-Cleavage eine signifikante Absenkung der Apoptoserate in Fibroblasten durch die Inkubation mit CNP gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass bei geringerem ROS-Gehalt in der Zelle weniger Apoptose eingeleitet wird. Diese Aussage wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Wirkung des hier eingesetzten Apoptose-Induktors Staurosporin durch vorherige Inkubation mit CNP

deutlich vermindert werden kann (von Montfort et al., 2015). Staurosporin führt über eine Erhöhung von sowohl Caspase-1- als auch Caspase-3-mimetischer Aktivität. Diese erhöhte Caspase-mimetische Aktivität führte zu einer DNA-Fragmentierung und 'membrane leakage' in hippocampalen Neuronen von Ratten (Krohn et al., 1998). Krohn beschreibt, dass in vorhergehenden Studien gezeigt wurde, dass Apoptoseauslösung zu einer Ca^{2+} -abhängigen Erhöhung der intrazellulären Superoxid-Produktion führt (Krohn et al., 1998). In derselben Studie zeigte Krohn, dass eine Inhibition der Caspasen die Apoptose nicht verhindern konnte; eine Inkubation mit verschiedenen Antioxidantien (α -Tocopherol und Trolox), sowie eine Inkubation mit einem SOD-Mimetikum (Manganese tetrakis (4-benzoyl acid) porphyrin, Mn-TBP) führte hingegen trotz bereits aktivierter Caspasen zu einer Reduktion des neuronalen Zelltodes. Eine Verminderung des intrazellulären Superoxids, sowie des intrazellulären H_2O_2 durch die SOD- und Katalase-mimetische Aktivität der CNP lässt somit einen engen Zusammenhang mit der Apoptose-Verhinderung vermuten. Celardo et al. zeigten in ihrer Studie von 2011, dass ein anti-apoptotischer Effekt von CNP auf der Detoxifizierung von ROS beruht, sowie dass ein Redox-unabhängiger Weg der Apoptose-Induktion durch CNP nicht aufgehalten werden kann (Celardo et al., 2011). Diese Hypothese wird durch verschiedene Studien an anderen Zellen auch *in vivo* bestätigt. Nachweislich vermindern CNP durch Nikotin induzierte kardiovaskuläre Erkrankungen und Apoptose von Kardiomyozyten in Mäusen (Niu et al., 2007, Niu et al., 2011). Des Weiteren verlängerte eine CNP-Behandlung die Lebensspanne von retinalen Photorezeptoren in Mäusen (Kong et al., 2011) und wirkte in hippocampalen Strukturen nach ischämischen Schlaganfällen in Mäusen neuroprotektiv durch Reduktion von Superoxid und Peroxynitritradikalen (Estevez et al., 2011). Allen Studien gemeinsam ist die Hypothese, dass diese anti-apoptotischen Effekte über eine Reduktion des Oxidativen Stress vermittelt werden.

Zur Nekrose kommt es oft durch einen übermäßigen Anstieg des ROS-Gehalts in der Zelle. So können Substanzen, die in niedrigeren Konzentrationen eine Apoptose auslösen, in höheren Konzentrationen zu einem starken Calciumeinstrom in die Zelle führen, sodass durch Zellschwellung, Plasmamembranrisse und ATP-Ausschöpfung die Zelle eine apoptotische Aktivierung nicht mehr umsetzen kann und in die Nekrose geht (Tsujimoto, 1997). Paraquat (PQ^{2+}) ist eine solche Substanz, die in hohen Konzentrationen Nekrose auslöst. Zur Messung der Nekrose von Fibroblasten wurde als Parameter die Laktat-Dehydrogenase-(LDH-)Aktivität gemessen. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches bei Plasmamembranschädigung in den Überstand abgegeben wird und dort seine Aktivität weiterhin entfalten kann (Weyermann et al., 2005). Sowohl eine Inkubation mit rTGF β 1 und

PQ²⁺ als auch eine Inkubation mit H₂O₂ führten zu einer deutlichen Erhöhung der LDH-Aktivität und steigerten somit die Nekroserate der Fibroblasten. Eine Behandlung mit diesen Substanzen (rTGFβ1, PQ²⁺, H₂O₂) hatte eine Erhöhung des ROS-Gehalts der Fibroblasten zur Folge. Eine 24-stündige Vorinkubation mit CNP führt jeweils zu einer signifikanten Abnahme der Nekroserate, welche vergleichbar mit denen der unbehandelten Zellen war. Die Wirkung des Ceroxids ist auch hier – wie bei dem anti-apoptotischen Effekt - auf die SOD- und Katalase-mimetische Aktivität zurückzuführen, da durch weniger in der Zelle vorkommende ROS eine geringere Zell- bzw. DNA-Schädigung bewirkt wird (von Montfort et al., 2015).

4.2 CNP und zellbiologische Parameter

Um einen umfassenden Einblick in die Wirkungsweise der CNP zu bekommen, sollte in weiteren Schritten deren Auswirkungen auf andere zellbiologische Parameter, wie beispielsweise die Aufnahme, Proliferation und Adhäsion untersucht werden.

4.2.1 Aufnahmemechanismen

Durch licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen, die schon nach kurzer Zeit (nach ca. 30 Minuten im Lichtmikroskop) eine Akkumulation von Ceroxid-Nanopartikeln innerhalb der Zelle zeigen, kann von einer intrazellulären Aufnahme der CNP ausgegangen werden. Die CNP verteilen sich dabei im Cytosol der Zelle; im Nukleus sind sie nicht nachweisbar (Alili et al., 2011). Eine Aufnahme der Partikel wird in dieser Arbeit schon nach 30 Minuten in sehr geringer Menge, sowie deutlich stärker nach einer Stunde mittels FITC-gekoppelter CNP im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen. Um sicher zu gehen, dass die Fluoreszenz von internalisierten und nicht von außen anheftenden CNP ausging, wurden die Zellen mehrfach gewaschen. Auch nach dem Passagieren der Fibroblasten mit aufgenommenen FITC-gekoppelten CNP konnte diese Fluoreszenz im Cytosol nachgewiesen werden, was einerseits eine intrazelluläre Akkumulation beweist (Alili et al., 2011) und andererseits zeigt, dass CNP in den Zellen nicht abgebaut oder sezerniert werden. In nach 16 h durchgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen war eine Internalisierung von CNP nachweisbar

(Alili et al., 2011). Eine solche intrazelluläre Aufnahme lässt sich elektronenmikroskopisch auch bei anderen Zellreihen (SCL-1) darstellen (Alili et al., 2011; Alili et al., 2013).

Obwohl für andere Nanopartikel bisher keine Aufnahme beschrieben ist, und von extrazellulären, über Signalkaskaden ausgelösten Effekten ausgegangen wird (Albrecht et al., 2004; Weißenberg et al., 2010), erscheint eine Entfaltung der CNP-Wirkung über deren Internalisierung in Fibroblasten wahrscheinlich: Die Darstellung von Superoxid mittels Dihydroethidium erfordert eine intrazelluläre Produktion des Sauerstoffradikals im Zytosol. Im Zytosol der Zelle wird Dihydroethidium bei einer Reaktion mit Superoxid zu fluoreszierendem Ethidiumbromid reduziert, welches im Zellkern in die DNA interkalieren kann, was zu einer Veränderung des Anregungsspektrums von Ethidiumbromid führt und dessen rote Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht (Thannickal & Fanburg, 2000; M. Holtzhauer: Biochemische Labormethoden, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2009). Dieses reduzierte Ethidiumbromid kann biologische Membranen nicht passieren. Eine extrazelluläre Akkumulation von Superoxid ist in der Darstellung mit DHE dementsprechend nicht nachweisbar (Thannickal & Fanburg, 2000). Eine deutliche Verminderung dieser Fluoreszenz, also eine Verminderung des Gehaltes an intrazellulärem Superoxid, konnte durch Inkubation mit CNP nachgewiesen werden. Da CNP die Reaktion von Superoxid zu H_2O_2 über direkten Kontakt katalysieren, müssen sie zuvor internalisiert worden sein.

In diesem Zusammenhang stellte sich nun die Frage, wie CNP internalisiert werden. Eine Inhibition der caveolinabhängigen Endozytose durch Nystatin zeigte keinen Effekt. Eine Hemmung der Endozytose durch einen spezifischen Inhibitor der klathrinabhängigen Endozytose (Concanavalin A) führte zu einer geringen Abnahme der internalisierten FITC-gekoppelten CNP gegenüber der unbehandelten Kontrolle, was für eine zum Teil Endozytose-vermittelte Aufnahme spricht. Auch Ould-Moussa und Mitarbeiter zeigten eine Internalisierung von Ceroxid-Nanopartikeln in Mausfibroblasten. Die internalisierten CNP ließen sich dort allerdings nicht frei im Zytosol oder im Zellkern darstellen, sondern waren in Lipidmembranen wie Vesikeln oder Endosomen eingeschlossen (Ould-Moussa et al., 2014). In einem weiteren Versuch, in dem die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität als Korrelat von Nekrose untersucht wurde, führte die Hemmung der Endozytose allerdings trotz geringerer Internalisierung von CNP nicht zu einer geringeren Nekrose. Das unterstützt die Hypothese einer zusätzlich anderweitigen Internalisierung - wie zum Beispiel eine Aufnahme über Poren oder aktive Transporter, sowie ein direktes Passieren von biologischen

Membranen. Eine zusätzliche extrazelluläre Wirkung über Signalkaskaden kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 CNP erhöhen die Proliferation von Fibroblasten

Die Proliferation von verschiedenen Zellen unterliegt komplexen und unterschiedlichen Signalen. Im Rahmen dieser Signalkaskaden wird der Rolle von ROS in den verschiedenen Studien eine unterschiedliche Rolle zugewiesen. Zum Teil scheint sich der ROS-Gehalt in der Zelle zyklusabhängig zu erhöhen (Gamalei et al., 2001; Sgambato et al., 2001; Sarsour et al., 2014). Die verschiedenen Zellen der Studien verbleiben in der G0 und G1-Phase; eine Abnahme des prozentualen Anteils von Zellen in der G2/M-Phase, der in die Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus übergeht, konnte festgestellt werden (Sgambato et al., 2001). Gamalei et al. beschreiben in ihrer Studie von 2001, dass der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus mit einer Erhöhung intrazellulärer ROS einhergeht. Eine Behandlung der Zellen in dieser Phase des Zellzyklus mit Antioxidantien führte über eine Verminderung des ROS-Gehalts zu einer antiproliferativen Wirkung, genauso wie die Erhöhung der Expression antioxidativer Enzyme (Gamalei et al., 2001). In den Untersuchungen von Sarsour et al. aus 2014 wird insbesondere der Mangan-abhängigen SOD (MnSOD) eine besondere Stellung aufgrund der antioxidativen Wirkung im Rahmen der Proliferation zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der MnSOD in der G0 bzw. G1-Phase erhöht ist, während die Aktivität in der G2-, S- und M-Phase vermindert ist. Dazu umgekehrt proportional erhöht sich der Gehalt an Superoxid in der Zelle, sowie auch der Glucose- und Sauerstoffverbrauch in den proliferativen Phasen (Sarsour et al., 2014).

In anderen Studien wird Antioxidantien eine pro-proliferative bzw. ROS eine antiproliferative Wirkung zugesprochen (Taillé et al., 2005; Vizio et al., 2005; Vargo et al., 2006; Hsiao et al., 2010; Yen et al., 2012; Felipe et al., 2013).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde durch Messung des BrdU-Einbaus und Bestimmung der Populationsverdopplungszeit eine konzentrationsabhängige, verstärkte Proliferation der HDF nach Inkubation mit CNP nachgewiesen. Eine Behandlung der dermalen Fibroblasten mit verschiedenen antioxidativ wirkenden Reagenzien, wie beispielsweise N-Acetyl-Cystein (NAC), Natriumselenit und dem Vitamin-E-Derivat Trolox, führte ebenso zu einer vermehrten Proliferation, jedoch war dieser pro-proliferative Effekt nach Antioxidantien-

Behandlung im Vergleich zu mit CNP-behandelten Zellen geringer ausgeprägt. Dementsprechend deutete das Ergebnis darauf hin, dass CNP ihre pro-proliferative Wirkung durch ihre antioxidativen Eigenschaften entfalten (von Montfort et al., 2015).

Diese Erhöhung der Proliferation von HDF könnte in diesem Zusammenhang eine zusätzliche Bedeutung im Rahmen der Wundheilung haben. Dermale Fibroblasten sind an der Wundheilung in hohem Maße beteiligt. Allerdings wird vor allem Myofibroblasten in diesem Zusammenhang eine Bedeutung bei der Wundkontraktion beigemessen. Da CNP die Bildung von Myofibroblasten verhindern (Alili et al., 2011), ist von einer verstärkten Wundkontraktion in diesem Fall nicht auszugehen. Ein Problem der Erhöhung der Proliferation von dermalen Fibroblasten durch Behandlung mit CNP könnte darin begründet liegen, dass es zu einer zum Teil unkontrollierten Proliferation kommen könnte. CNP bewirken, wie im Rahmen dieser Arbeit eindeutig dargestellt werden konnte, durch ihre antioxidative Wirkung eine Verminderung von Apoptose und Nekrose in HDF. Zusätzlich wird die Vitalität im MTT durch eine Inkubation mit CNP nicht vermindert. Eine unkontrollierbare Proliferation von Fibroblasten könnte zu verschiedenen Folgekrankheitsbildern – unter anderem der Lungenfibrose (Desmoulière et al., 2004) – führen. In folgenden und weiterführenden Studien sollte auch die (Langzeit-)Auswirkung einer Behandlung mit CNP im Hinblick auf dieses Krankheitsbild untersucht werden.

4.2.3 CNP vermindern die Expression von Adhäsionsmolekülen

Die Zelladhäsion ist ein essentieller Bestandteil bei dem Aufbau einer Gewebearchitektur; sie ist dabei an Zell-Zell-Kontakten sowie dem Kontakt zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix beteiligt. Verantwortlich für die Zelladhäsion sind verschiedene Proteine, unter anderem Cadherine und Catenine. Cadherine stellen dabei transmembrane Glykoproteine dar, deren intrazellulärer Teil mit verschiedenen Proteinen, vornehmlich Cateninen interagieren. Eine solche Interaktion mit β -Catenin ist wichtig für die Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett (über α -Catenin). Diese Verbindung mit Aktin wird für die vollständige Adhäsion benötigt (Nieman et al., 1999).

Das in Fibroblasten exprimierte N-Cadherin (Matsuyoshi und Imamura, 1997) ist ein Cadherin, das auch in verschiedenen Tumorzelllinien, wie z.B. bei den Brustkrebszellen MDA-MB-435 und -436 und SUM 159 sowie in Melanomzellen, vorkommt. In diesen

Tumorzellen lässt sich eine erhöhte Motilität und Invasivität nachweisen (Nieman et al., 1999).

Zur Darstellung der Adhäsionskapazität der HDF wurde eine Western-Blot-Analyse zur Expression von N-Cadherin durchgeführt. Eine Inkubation mit rTGF β 1 führte zu einer deutlichen Steigerung der Expression von N-Cadherin um 50%. Eine Vorinkubation mit CNP vor der rTGF β 1-Behandlung führte dagegen zu einer signifikanten Abnahme der N-Cadherin-Expression gegenüber den nur mit rTGF β 1-behandelten Zellen. Das Niveau war vergleichbar mit dem der unbehandelten Zellen. Eine alleinige Inkubation der HDF mit CNP hingegen führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung der N-Cadherin-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Sowohl rTGF β 1 als auch CNP haben keinen Einfluss auf die Expression von β -Catenin. Dementsprechend ist der Effekt von rTGF β 1 auf die Expression der Cadherine beschränkt. Das lässt die Vermutung zu, dass das von Tumorzellen sezernierte TGF β 1 über eine Steigerung der N-Cadherin-Expression in Fibroblasten zu einer verstärkten Adhäsionsfähigkeit führt. Diese könnte durch eine Behandlung mit Ceroxid unterbunden werden. Rudini et al. sowie Labelle et al. zeigten in ihren Studien, dass VE-Cadherine ein verstärktes TGF β -signaling über SMAD-Proteine bewirken (Labelle et al., 2008, Rudini et al., 2008). In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob CNP auch die Expression von N-Cadherin bei verschiedenen Tumorzellreihen, wie beispielsweise Melanomzellen, vermindern und damit eine verminderte Invasivität und Motilität bewirken können.

4.2.4 CNP besitzen einen protektiven Effekt bei gleichzeitiger Chemotherapie

Cis-diammindichloroplatin II (cisPlatin) hat als Zytostatikum einen großen Stellenwert in der Chemotherapie verschiedenster Krebsarten, wie zum Beispiel den Hoden-, Ovarial-, Bronchial-, Zervixkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Es wirkt dabei vor allem über DNA-Interkalierung durch Bindung an DNA-Basen. Vorzugsweise findet die Bindung mit einem Stickstoffatom von Guanin (N-7) und Adenin statt. Vor allem das cis-Isomer der Platinverbindungen kann mit zwei Adeninen reagieren. Solche Bindungen führen zu Intra- und sehr viel seltener auch Interstrang-Quervernetzungen (Kleinwächter et al., 1977). Eine Lösung dieser Vernetzungen ist nur schwer möglich, da es sich um eine kovalente Bindung zwischen den Basen der komplementären Stränge handelt Die Folge ist eine Hemmung der DNA-Synthese (Kleinwächter et al., 1977). Diese Vernetzungen sowie

zusätzliche Punktmutationen durch cisPlatin führen vor allem zur Apoptose von sich schnell teilenden Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen. Eine weitere Wirkungsweise von cisPlatin ist die Generierung von ROS und anderen pro-oxidativen Substanzen, unter anderem Lipidperoxide und Superoxid (Skokrzadeh et al., 2006; Ahmed et al., 2011).

Eine Möglichkeit von Zellen, der Apoptose durch cisPlatin entgegen zu wirken, stellt Glutathion dar, dessen Schwefelatom der Thiolgruppe eine höhere Affinität zu Platinverbindungen aufweist als zu Basen der DNA. Aus einem Molekül Glutathion und zwei Molekülen cisPlatin formt sich ein GSH-Platin-Komplex, der ATP-abhängig aus der Zelle entfernt wird (Bernareggi et al., 1995; Skokrzadeh et al., 2006). Dieser ATP-abhängige Transport erfolgt über einen spezifischen ATP-binding-cassete- (ABC-)Transporter, das Multi-Drug-Resistance (MDR)-assoziierte Protein 2 (MRP-2) (Liu, 2009).

In der Untersuchung von Komiya et al. konnte festgestellt werden, dass vor allem die über Disulfidbrückenbindung entstandenen GSH-Platin-Komplexe eine zellprotektive Wirkung zeigen, indem cisPlatin inhibierend gebunden, damit detoxifiziert und schließlich aus der Zelle entfernt wird (sog. Chemoresistenz). Dieser zellprotektive Effekt ist aber nicht auf die antioxidative Wirkung des Glutathions zurückzuführen. Es konnte in der Studie gezeigt werden, dass eine Detoxifizierung von H_2O_2 durch exogen zugeführte Katalase keine zellprotektive Wirkung aufwies (Komiya et al., 1998). Zusätzlich zeigten schon Bernareggi et al., dass exogen zugeführtes Glutathion durch seine Unfähigkeit, Zellmembranen zu passieren, keine zellprotektive Wirkung im Zusammenhang mit einer cisPlatin-Behandlung hat (Bernareggi et al., 1995). Daraus lässt sich schließen, dass eine zellprotektive Wirkung des endogenen Glutathions auf die Komplexbildung mit cisPlatin zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation der Fibroblasten mit CNP vor der der Behandlung mit cisPlatin zu einem protektiven Effekt. Mittels PARP Cleavage konnte gezeigt werden, dass Apoptose verhindert werden kann. Da in den früheren Studien (Bernareggi et al., 1995, Komiya et al., 1998) gezeigt wurde, dass ein zellprotektiver Effekt durch die Bildung von Glutathion-Platin-Komplexen zurückzuführen ist, nicht allerdings auf die antioxidative Wirkung des Glutathions, lässt sich die folgende Hypothese aufstellen: Glutathion und cisPlatin bilden wie oben beschrieben die Glutathion-Platin-Komplexe aus, die ATP-abhängig aus der Zelle entfernt werden. Damit ist Glutathion nicht mehr antioxidativ wirksam und es tritt eine für die Zelle nicht mehr händelbare Akkumulation von ROS auf. Diese ROS-Akkumulation führt zur Apoptose, da das wichtigste antioxidative Enzymsystem der Zelle, das Glutathion, fehlt. Hier greifen nun die Ceroxid-Nanopartikel ein. Diese detoxifizieren die

zusätzlich anfallenden ROS und führen zur Verhinderung der Apoptose. Diese Hypothese lässt sich mit dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GSH-Assay bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von HDF mit CNP vor einer Behandlung mit cisPlatin zu einem GSH:GSSG-Verhältnis führt, das in Richtung GSH verschoben ist. Diese Hypothese wird zusätzlich untermauert durch eine von Ahmed et al. im Jahr 2011 veröffentlichte Studie. Es konnte gezeigt werden, dass die Injektionen mit cisPlatin in Ratten zu verminderten Aktivität der SOD und Katalase führten. Diese Wirkung wird durch die sowohl SOD- als auch Katalase-mimetische Aktivität von CNP vermindert. Weiterführende Untersuchungen dieser Studie zeigten, dass diese verminderte Aktivität durch die Gabe von antioxidativ wirkenden Substanzen, wie Vitamin C, relativiert werden konnte (Ahmed et al., 2011). Mittels PARP-Cleavage konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Hauttumorzellen mit cisPlatin zu einer vermehrten Apoptose der Zellen führte (Alili et al., 2013). Gemäß der Hypothese, dass Ceroxid-Nanopartikel in einem etwas sauren pH pro-oxidativ wirken, konnte eine additive, dosisabhängige, pro-apoptische Wirkung nach einer Vorinkubation mit CNP auf diese Tumorzellen gezeigt werden (Alili et al., 2013). Diese bifunktionale Wirkung der Nanopartikel auf die verschiedenen Zellarten kann während einer chemotherapeutischen Therapie genutzt werden: Tumorzellen sterben durch gesteigerte Apoptose vermehrt ab und ‚gesunde‘ stromale Zellen werden vor der toxischen Wirkung der Zytostatika geschützt (Abb. 48).

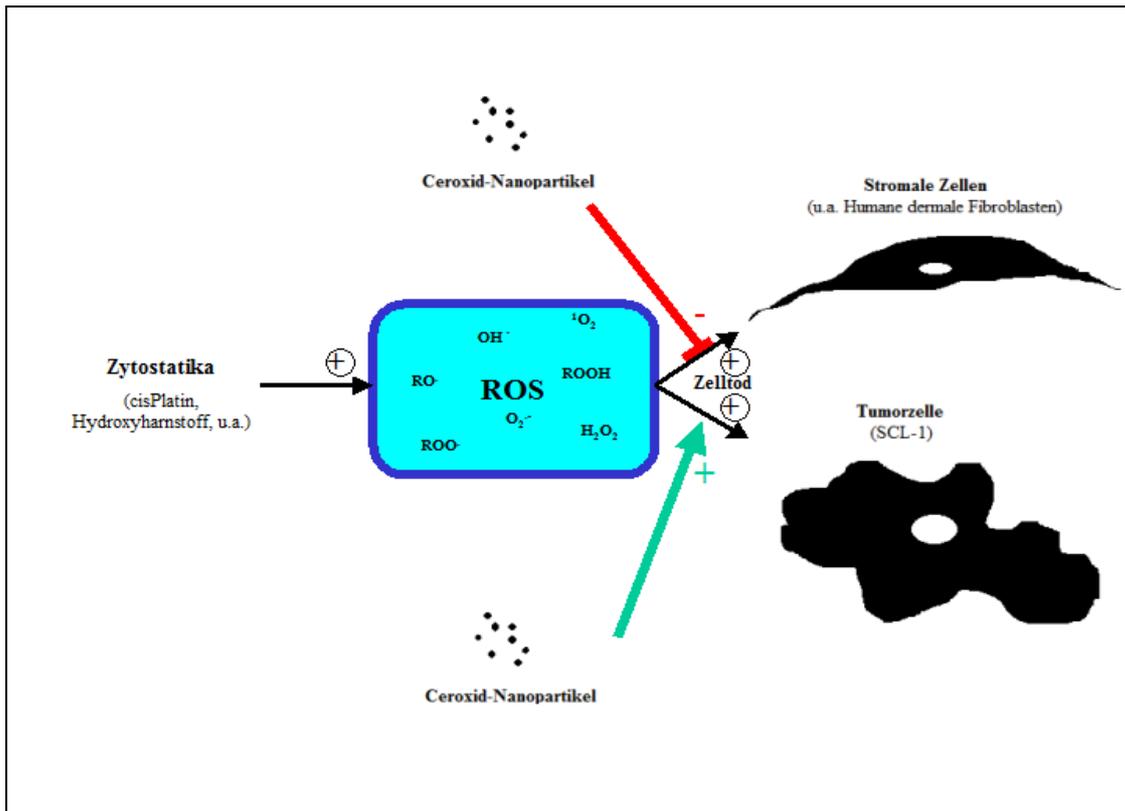


Abb. 48: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von CNP auf Fibroblasten (A) und Tumorzellen (B) unter gleichzeitiger Behandlung mit einem Zytostatikum. Zytostatika wie cisPlatin und Anthracycline entfalten ihre toxische Wirkung unter anderem durch Erhöhung des ROS-Gehalts in den Zellen. Eine Vorinkubation mit CNP führt in Fibroblasten (A) zu einer verminderten Toxizität durch Neutralisierung der ROS über SOD- und Katalase-mimetische Aktivität. In Tumorzellen mit einem leicht sauren pH (B) führen CNP über ihre pH-abhängigen pro-oxidativen Eigenschaften zusammen mit dem Zytostatikum zu einer erhöhten Zytotoxizität.

4.3 CNP und Tumor-Stroma-Interaktion

Nachdem ein antioxidativer Effekt von CNP gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob eine Behandlung mit Ceroxid-Nanopartikeln zu einer verminderten Bildung der Myofibroblastenformation und in einem weiteren Schritt in einer Verhinderung der Tumordinvasion führt.

4.3.1 CNP verhindern die Bildung des Myofibroblasten

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass CNP eine antioxidative Wirkung besitzen, sollte überprüft werden, ob CNP auch die durch TGF β 1 generierten ROS detoxifizieren und damit vermindern können. TGF β 1 führt über Aktivierung

der NAD(P)H-Oxidase zu einer Erhöhung von Superoxid-Radikalen, welche zu einer Carbonylierung von Proteinen in der Zelle führen (Cat et al., 2006, Alili et al., 2014). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass im Oxyblot, bei dem sich mittels Western-Blot-Analyse diese durch ROS carbonylierten Proteine darstellen lassen, eine Inkubation mit rTGF β 1 zu einer signifikanten Erhöhung der Proteine führt. Eine Vorinkubation mit CNP zeigte konzentrationsabhängig eine Abnahme der carbonylierten Proteine und damit der ROS auf das Niveau unbehandelter Zellen.

Nachdem nun dargestellt werden konnte, dass CNP die Wirkung von rTGF β 1 deutlich vermindern können, sollte untersucht werden, ob die nachfolgende mesenchymal-mesenchymale Transition (MMT) von HDF zum MF verhindert werden kann. Die MMT ist von rTGF β 1 generierten ROS abhängig (Cat et al., 2006). Da α -SMA ein Marker für Myofibroblasten ist, wurde in der Studie von Cat et al. gezeigt, dass eine Inkubation mit rTGF β 1 zu einer Erhöhung der α -SMA-Expression in Fibroblasten führt, was mit einer Vermehrung der Myofibroblasten gleichzusetzen ist. In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, dass eine Vorinkubation der Fibroblasten mit CNP vor der Inkubation mit rTGF β 1 konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der α -SMA-Expression führt. Eine Verminderung der α -SMA-Expression zeigt, dass deutlich weniger Myofibroblasten vorliegen, als bei einer Behandlung mit rTGF β 1 zu erwarten wären. Um diese Hypothese zu verifizieren, sollte die Kontraktion von Kollagengelen durch Fibroblasten untersucht werden, einem Charakteristikum der Myofibroblasten (Cat et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Vorinkubation mit CNP vor der Inkubation mit rTGF β 1 konzentrationsabhängig zu einer verminderten Kontraktion der Kollagengele führt, gegenüber einer alleinigen Inkubation mit dem Wachstumsfaktor.

Auch im Rahmen eines *in vivo*-Experiments – durch Herstellung von Hautäquivalenten mit eingesäten Fibroblasten – wurde von Cat et al. zweifelsfrei dargestellt, dass eine Inkubation mit Antioxidantien zu einer Abnahme der α -SMA-Konzentration in den Hautäquivalenten führt (Cat et al., 2006). Ein in dieser Arbeit durchgeführtes entsprechendes *in vivo*-Experiment zeigte, dass eine Inkubation mit CNP ebenfalls zu einer Abnahme der α -SMA-Konzentration in den Hautäquivalenten führt. Dementsprechend konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass eine Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten im Rahmen der MMT nicht statt findet.

4.3.2 CNP verhindern die Tumorinvasion

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten an der Tumorinvasion beteiligt sind (Kunz-Schughart et Knuechel, 2002, Desmoulière et al., 2004, Cat et al., 2006). Eine Verhinderung der MMT führt zu einer geringeren Tumorinvasion (Cat et al., 2006). Da eine Inkubation von dermalen Fibroblasten mit Antioxidantien zu einer geringeren MMT führt, nimmt die Tumorinvasion nach antioxidativer Behandlung ab (Alili et al., 2011). Da in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit CNP ebenfalls zu einer Verhinderung der MMT führt, sollte in einem nächsten Schritt gezeigt werden, dass durch eine solche Inkubation auch die Tumorinvasion verhindert werden kann. In dem durchgeführten Invasionsassay wurde gezeigt, dass sowohl eine Behandlung von HDF mit rTGFβ1 nach einer Vorinkubation mit CNP konzentrationsabhängig zu einer verminderten Invasionsrate von Plattenepithelkarzinomzellen, als nach einer alleinigen Inkubation mit rTGFβ1, führt. Diese Verminderung der Invasion beruht auf der Verhinderung der Bildung des Myofibroblasten über die antioxidativen Eigenschaften von CNP.

Auch eine direkte Behandlung der Tumorzellen mit CNP führte zu einer verminderten Invasion (Alili et al., 2011). Das lässt die Hypothese zu, dass die Invasion abhängig vom ROS-Gehalt der verschiedenen Zellen ist. Da CNP im neutralen pH, der in gesunden stromalen Zellen vorliegt, antioxidativ wirken, nimmt bei einer Inkubation mit Ceroxid-Nanopartikeln der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies ab. Ein verminderter ROS-Gehalt führt seinerseits wieder zu einer geringeren MMT, was wiederum in einer verminderten Ausschüttung pro-invasiver Zytokine, wie VEGF, IL-6 und HGF und damit einer verminderten Tumorinvasion mündet. In Tumorzellen liegt dagegen ein leicht saurer pH vor. In saurem pH wirken CNP pro-oxidativ. Durch eine Behandlung von Tumorzellen mit CNP akkumulieren ROS in den Tumorzellen, da insbesondere die Katalase-mimetische Aktivität vermindert ist. Die entstehenden ROS sind vornehmlich Wasserstoffperoxid und Superoxid (Sack, 2012). Ein erhöhter Gehalt an H₂O₂ führt über eine Überexpression von Selenoprotein S (Sels) zu einer verminderten Expression von Caveolin-1 (Zhao et al., 2013), einem membranständigen Protein, dass mit einer erhöhten Tumorprogression und Aggressivität von Tumorzellen assoziiert ist (Campbell et al., 2013). Eine verminderte Tumorinvasion bei Behandlung von Tumorzellen mit CNP ist über eine verminderte Caveolin-1-Expression zu erklären.

4.3.4 CNP wirken in vielerlei Hinsicht ähnlich wie Antioxidantien

CNP werden durch ihre antioxidativen Eigenschaften oftmals mit weithin bekannten Antioxidantien wie Vitamin C und E gleichgesetzt. Unter einigen Gesichtspunkten scheint dieser Vergleich auch richtig. In verschiedenen Studien wurden für Antioxidantien Eigenschaften beschrieben, die während dieser Arbeit auch für CNP nachgewiesen werden konnten. Neben der ROS-detoxifizierenden Wirkung von Vitamin C und E sorgen diese Antioxidantien für eine Erhöhung des GSH-Gehalts in der Zelle (Skokrzadeh et al., 2006). Ein ähnliches Ergebnis konnte in dieser Arbeit mit CNP erzielt werden, wobei die Erhöhung des GSH-Spiegels in der Zelle nicht durch eine vermehrte GSH-Synthese, sondern am ehesten durch die antioxidative Wirkung der Partikel selbst bedingt wurde (von Montfort et al., 2015). Krohn und Mitarbeiter zeigten, dass Antioxidantien einer Staurosporin-induzierten Apoptose in Neuronen von Ratten entgegenwirkten (Krohn et al., 1998). In einer Studie von Ahmed et al. ließ sich eine Abschwächung der Wirkung von cisPlatin unter Behandlung mit verschiedenen Antioxidantien verzeichnen (Ahmed et al., 2011). Auch in dieser Arbeit führte eine Inkubation mit CNP zu ähnlichen Ergebnissen.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Fibroblasten mit Antioxidantien zu einer verminderten TGF β 1-vermittelten Bildung von Myofibroblasten führt (Alili et al., 2011), was in einer verminderten Invasion von SCL-1-Tumorzellen mündet, ebenso wie auch eine Behandlung mit CNP (Alili et al., 2011). Interessanterweise führte eine Behandlung der Tumorzellen mit den Antioxidantien zu einer deutlich gesteigerten Tumordinvasion (Alili et al., 2011). Dagegen führt eine Behandlung der Tumorzellen mit CNP – wie zuvor beschrieben – zu einer verminderten Tumordinvasion (Alili et al., 2011; Alili et al., 2013). Diese Wirkung ist ein entscheidender Vorteil der CNP gegenüber Antioxidantien. Während Antioxidantien schon einen Einsatz in der supportiven zytostatischen Therapie erfahren, könnte eine Verwendung der CNP in dieser Hinsicht einen großen Fortschritt bedeuten.

5 Perspektiven

Tumorinvasion und Metastasierung sind die lebenslimitierenden Faktoren im fortgeschrittenen Tumorstadium. Anhand der 5-Jahres-Überlebensrate wird deutlich, dass Patienten mit metastasierten Tumoren ein Überleben der nächsten 5 Jahre von weniger als 20% zeigen. Ein hoffnungsvoller Ansatz in der Therapie von Tumoren ist die Verhinderung der Kommunikation von Tumorzellen mit den sie umgebenden stromalen Zellen, die stromale Therapie.

Ceroxid-Nanopartikel zeigten im Rahmen dieser Untersuchungen gute Voraussetzungen für eine Anwendung in einer stromalen Therapie. Es ist *in vitro* gezeigt worden, dass CNP in stromalen Zellen antioxidativ über Superoxid-Dismutase-(SOD-) und Katalase-mimetische Aktivität wirken. Da die Transition vom Fibroblasten zum Myofibroblasten im Rahmen der mesenchymal-mesenchymalen Transition (MMT) ROS-abhängig ist, konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Myofibroblasten unter Ceroxid-Behandlung signifikant verringert ist. Myofibroblasten sind ihrerseits wichtige Mediatoren der Tumorinvasion (Cat et al., 2006). In diesem Rahmen konnten auch anti-invasive Effekte auf Hauttumorzellen (SCL-1) festgestellt werden (Abb. 49).

In anderen Studien unter der Leitung von Prof. Brenneisen wurde derzeit gezeigt, dass eine Behandlung von verschiedenen Hauttumorzellen (SCL-1 und Melanomzellen) mit CNP anti-invasive Effekte hervorruft und zudem in Konzentrationen zytotoxisch wirkt, die für Fibroblasten im nicht-toxischen Bereich liegen (Alili et al., 2011). Dieser Effekt ist auf eine pro-oxidative Wirkung im Tumorzellen zurückzuführen (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013). Die unterschiedliche Wirkungsweise auf die verschiedenen Zellen wird bisher mit einer pH-Abhängigkeit der SOD- und Katalase-mimetischen Aktivität erklärt. Eine eindeutige Verifizierung dieser Hypothese steht noch aus (Alili et al., 2013).

Weitergehende Studien müssen ihren Fokus auch auf Langzeitwirkungen der Behandlung von Fibroblasten in allen menschlichen Geweben mit CNP legen. In dieser Studie konnte eine signifikant gesteigerte Proliferation bei geringerer Mortalität (Verringerung von Apoptose und Nekrose) von Hautfibroblasten nachgewiesen werden. Es ist nicht sicher, ob und welche Langzeitfolgen das hervorruft. Die Entwicklung einer Fibrose in verschiedenen Geweben, zum Beispiel der Lunge, wäre denkbar. Zusätzlich wird die Bildung des Myofibroblasten verhindert, der zwar einerseits ein wichtiger Mediator an der Invasionsfront ist, andererseits aber auch eine *in vivo* physiologisch vorkommende Zelle, die an der Wundheilung und Wundkontraktion beteiligt ist. Die möglichen Auswirkungen auf die Wundheilung müssen

untersucht werden, um die Ausbildung von chronisch nicht heilenden Wunden, ähnlich dem diabetischen Fußsyndrom, zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein zellprotektiver Effekt bei Behandlung von Fibroblasten mit CNP und folgender zytostatischer Therapie festgestellt werden. In anderen Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen wurde ein unterstützender zytotoxischer Effekt auf Tumorzellen (SCL-1 und Melanomzellen) gezeigt (Alili et al., 2011, Alili et al., 2013). Eine supportive Anwendung im Rahmen einer zytostatischen Therapie ist somit gut vorstellbar. Dieser Therapieansatz müsste *in vivo* an Mäusen und im Hautmodell, dass in der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen weiterentwickelt wird, weiterführend untersucht werden.

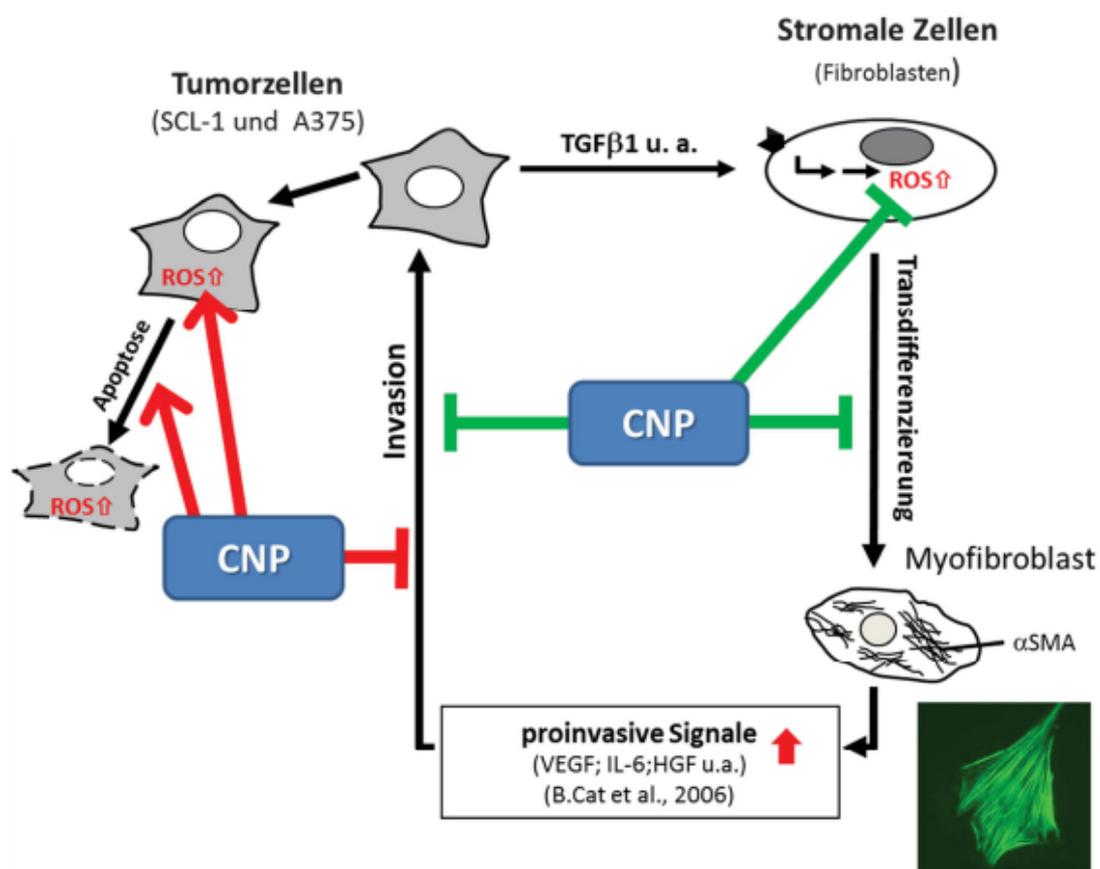


Abb. 49: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Ceroxid-Nanopartikeln auf die mesenchymal-mesenchymale Transition (MMT) von Fibroblasten und die Tumorinvasion von SCL-1-Zellen. Über eine durch TGFβ1 ausgelöste Signalkaskade werden ROS in Fibroblasten generiert, welche zur Bildung des Myofibroblasten (MF) führen. Durch vom MF ausgeschüttete pro-invasive Zytokine wie vascular endothelial growth factor (VEGF), Interleukin-6 (IL-6) und hepatocyte growth factor (HGF) kommt es zu einer gesteigerten Tumorinvasion. Die im Mittelpunkt dieser Kaskade stehenden ROS können durch CNP über ihre SOD- und Katalase-mimetische Aktivität detoxifiziert werden, womit der Tumorinvasion entgegengewirkt werden kann. [Quelle: Sack, 2012]

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Ceroxid-Nanopartikel (CNP) sich für die Therapie von Tumorerkrankungen durch die Verhinderung der Stromalen Differenzierung vom Fibroblasten zum Myofibroblasten (mesenchymal-mesenchymale Transition, MMT) eignen. Es konnte gezeigt werden, dass CNP in einer Konzentration, die für Tumorzellen zytotoxisch ist (Alili et al., 2011), auf gesunde Stromale Zellen, in diesem Fall humane dermale Fibroblasten, keinerlei Einfluss auf die Zytotoxizität haben. In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass eine Inkubation mit CNP zu einer Abnahme von Apoptose und Nekrose sowie zu einer vermehrten Proliferation von Fibroblasten führt. In weiterführenden Experimenten konnte dargelegt werden, dass diese Effekte durch die antioxidative Wirkung, die CNP über ihre sowohl SOD- als auch Katalase-mimetische Aktivität entfalten können, bewirkt werden. Sowohl bei der Messung intrazellulären Wasserstoffperoxids, bei der Darstellung intrazellulären Superoxids sowie bei der Darstellung carbonylierter Proteine als auch bei der Messung des Verhältnisses von oxidiertem zu reduziertem Glutathion konnte durch CNP-Inkubation indirekt eine Abnahme des intrazellulären ROS-Gehaltes gezeigt werden. Da auch die MMT ROS-abhängig ist (durch den Wachstumsfaktor TGF β 1 wird die Aktivität der NADH-Oxidase erhöht), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung von Fibroblasten mit CNP zu einer Verhinderung der Myofibroblastenformation (gekennzeichnet durch verminderte Expression von α SMA, einem Marker für Myofibroblasten) führt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Myofibroblasten über die Tumor-Stroma-Interaktion, die wiederum unter anderem mit TGF β 1 assoziiert ist, eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion einnehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Behandlung von dermalen Fibroblasten mit CNP durch die verminderte Bildung des Myofibroblasten zu einer Abnahme der Tumordinvasion führt.

Weiterführend wurde der Effekt von CNP auf Stromale Zellen unter nachfolgender Inkubation mit Zytostatika (cisPlatin, Hydroxyharnstoff) untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass CNP der toxischen Wirkung der Zytostatika entgegen wirkt: sowohl die Apoptose als auch die Nekrose konnte verhindert werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint eine Stromale Therapie mit CNP - insbesondere auch als Supportivum - im Rahmen einer Krebstherapie sinnvoll.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed EA, Omar HM, Elghaffar SKh, Ragb SM, Nasser AY.: The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2011 May;49(5):1115-21.
- Albrecht C, Borm PJ, Unfried K.: Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat Res.* 2004 Sep 3;553(1-2):23-35. Review.
- Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, Reilly CM, Zanger K, Stahl W, Das S, Seal S, Brenneisen P.: Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(11):2918-29.
- Alili L, Sack M, von Montfort C, Giri S, Das S, Carroll KS, Zanger K, Seal S, Brenneisen P.: Downregulation of Tumor Growth and Invasion by Redox-Active Nanoparticles. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Sep 10;19(8):765-78 .
- Alili L, Sack M, Puschmann K, Brenneisen P.: Fibroblast-to-myofibroblast switch is mediated by NAD(P)H oxidase generated reactive oxygen species. *Biosci Rep.* 2013 Dec 3.
- Amin KA, Hassan MS, Awad el-ST, Hashem KS.: The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J Nanomedicine.* 2011 Jan 17;6:143-9.
- Arora PD, McCulloch CA.: Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1994 Apr;159(1):161-75.
- Astarié C, David-Duflho M, Millanvoye-Van Brussel E, Freyss-Béguin M, Devynck MA.: Cytosolic pH in cultured cardiac myocytes and fibroblasts from newborn spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1992 May;5(5 Pt 1):281-7.
- Babu S, Cho JH, Dowding JM, Heckert E, Komanski C, Das S, Colon J, Baker CH, Bass M, Self WT, Seal S.: Multicolored redox active upconverter cerium oxide nanoparticle for bio-imaging and therapeutics. *Chem Commun (Camb).* 2010 Oct 7;46(37):6915-7.
- Barnes, DE and Lindahl, T: Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.*,2004, 38, 445 -76.
- Bayreuther K, Francz PI, Gogol J, Kontermann K.: Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Nov 21;663:167-79.
- Bernareggi A, Torti L, Facino RM, Carini M, Depta G, Casetta B, Farrell N, Spadacini S, Ceserani R, Tognella S.: Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry. Evidence for their formation in vitro but not in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995 Jul 21;669(2):247-63.

- Bonneh-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA.: Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Mar 24;134(1):52-6.
- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR.: Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J*. 1998 Jan 2;17(1):37-49.
- Boukamp P, Tilgen W, Dzarlieva RT, Breitkreutz D, Haag D, Riehl RK, Bohnert A, Fusenig NE.: Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J Natl Cancer Inst*. 1982 Mar;68(3):415-27.
- Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M.: Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):22932-40.
- Boyer MJ, Tannock IF.: Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res*. 1992 Aug 15;52(16):4441-7.
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K.: Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;973:31-43. Review.
- Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-Kochanek K.: Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5279-87.
- Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K.: Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000 Feb 11;275(6):4336-44.
- Brunner G, Blakytyn R.: Extracellular regulation of TGF-beta activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thromb Haemost*. 2004 Aug;92(2):253-61. Review.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M.: DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Aug;33(8):775-83.
- Campbell L, Al-Jayyousi G, Gutteridge R, Gumbleton N, Griffiths R, Gumbleton S, Smith MW, Griffiths DF, Gumbleton M.: Caveolin-1 in renal cell carcinoma promotes tumour cell invasion, and in co-operation with pERK predicts metastases in patients with clinically confined disease. *J Transl Med*. 2013 Oct 11;11:255

- Cat, B: Mesenchymal-mesenchymale Transition: oxidativer Stress und Tumorinvasion. Inaugural-Dissertation, HHU Düsseldorf, Oktober 2007.
- Cat B und Brenneisen P: Oxidative stress in tumour progression: intervention by selenium. *Cell Biol Toxicol* 01/2009; 25: 204-208
- Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkötter O, Sies H, Brenneisen P.: Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 2006 Jul 1;119(Pt 13):2727-38.
- Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L.: Ce³⁺ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano.* 2011 Jun 28;5(6):4537-49.
- Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L.: Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale.* 2011 Apr;3(4):1411-20
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R.: Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 1999 Sep-Oct;37(9-10):949-62.
- Chiarugi P.: PTPs versus PTKs: the redox side of the coin. *Free Radic Res.* 2005 Apr;39(4):353-64.
- Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L: Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11648-55.
- Clejan L, Cederbaum AI.: Synergistic interactions between NADPH-cytochrome P-450 reductase, paraquat, and iron in the generation of active oxygen radicals. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jun 1;38(11):1779-86.
- Coe BP, Thu KL, Aviel-Ronen S, Vucic EA, Gazdar AF, Lam S, Tsao MS, Lam WL.: Genomic deregulation of the E2F/Rb pathway leads to activation of the oncogene EZH2 in small cell lung cancer. *PLoS One.* 2013 Aug 15;8(8):e71670.
- Colon J, Herrera L, Smith J, Patil S, Komanski C, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW, Baker CH.: Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine.* 2009 Jun;5(2):225-31.
- Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit M, Rousselle P, Berthod F, Sahuc F, Collombel C.: A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin Mater.* 1994;15(4):273-6.
- Das S, Dowding JM, Klump KE, McGinnis JF, Self W, Seal S.: Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 2013 Sep;8(9):1483-508.
- De Wever O, Mareel M: Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem.* 2002 Jan;383(1):55-67. Review.

- Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G.: The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):509-17
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis N.: Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Oct;51(4):600-6.
- Eom HJ, Choi J.: Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol Lett.* 2009 Jun 1;187(2):77-83.
- Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, Ludington JS, Chatani P, Mosenthal WP, Leiter JC, Andreescu S, Erlichman JS.: Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2011 Sep 15;51(6):1155-63.
- Felipe KB, Benites J, Glorieux C, Sid B, Valenzuela M, Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Valderrama JA, Levêque P, Gallez B, Verrax J, Buc Calderon P.: Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Apr 19;433(4):573-8.
- Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R.: Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;580:161-75.
- Forman HJ and Torres M: Reactive oxygen species and cell signalling: respiratory burst in macrophage signalling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Dec 15;166(12 Pt 2):S4-8.
- Fritsch P: *Dermatologie & Venerologie für das Studium*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2009
- Futatsugi A, Utreras E, Rudrabhatla P, Jaffe H, Pant HC, Kulkarni AB.: Cyclin-dependent kinase 5 regulates E2F transcription factor through phosphorylation of Rb protein in neurons. *Cell Cycle.* 2012 Apr 15;11(8):1603-10.
- Galanzha EI, Shashkov EV, Kelly T, Kim JW, Yang L, Zharov VP.: In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nat Nanotechnol.* 2009 Dec;4(12):855-60.
- Gamaleï IA, Polozov IuS, Kirpichnikova KM, Aksenov ND, Tararova ND, Pospelova TV.: Distribution of rat embryonal fibroblasts through cell cycle phases in the presence of inhibitors of active oxygen species formation and N-acetylcysteine. *Tsitologiya.* 2001;43(7):633-8.
- Girotti AW: Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998 Aug;39(8):1529-42.
- Griffith OW, Meister A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem.* 1979 Aug 25;254(16):7558-60.
- Grobe A, Schneider C, Redic M, Schetula V: *Nanomedizin – Chancen und Risiken. Gutachten im Auftrag der Friedrich-Ebert-Stiftung (2008).*

- Gutteridge JM: Biological origin of free radicals, and mechanism of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* 1994 Jun;91(2-3):133-40.
- Halliwell B and Gutteridge JM: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 1;246(2):501-14.
- Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT.: The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanocerium. *Biomaterials.* 2008 Jun;29(18):2705-9.
- Hsiao YP, Huang HL, Lai WW, Chung JG, Yang JH.: Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Dermatol Sci.* 2009 Jun;54(3):175-84.
- Islam KN, Kayanoki Y, Kaneto H, Suzuki K, Asahi M, Fujii J, Taniguchi N.: TGF-beta1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(6):1007-17.
- Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H.: Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003 Oct 13;42(39):4742-58.
- Jain KK.: Advances in the field of nanooncology. *BMC Med.* 2010 Dec 13;8:83.
- Johann AM, von Knethen A, Lindemann D, Brüne B.: Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. *Cell Death Differ.* 2006 Sep;13(9):1533-40.
- Junqueira, Carneiro: *Histologie*, Springer Verlag, 3. Auflage, 1991.
- Karakoti AS, Monteiro-Riviere NA, Aggarwal R, Davis JP, Narayan RJ, Self WT, McGinnis J, Seal S.: Nanocerium as Antioxidant: Synthesis and Biomedical Applications. *JOM* (1989). 2008 Mar 1;60(3):33-37.
- Karakoti AS, Singh S, Kumar A, Malinska M, Kuchibhatla SV, Wozniak K, Self WT, Seal S.: PEGylated nanocerium as radical scavenger with tunable redox chemistry. *J Am Chem Soc.* 2009 Oct 14;131(40):14144-5.
- Kleinwächter V, Zaludová R.: Reaction of cis and trans isomers of platinum(II) diamminedichloride with purine, adenosine and its derivatives in dilute solutions. *Chem Biol Interact.* 1977 Feb;16(2):207-22.
- Komiya S, Gebhardt MC, Mangham DC, Inoue A.: Role of glutathione in cisplatin resistance in osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res.* 1998 Jan;16(1):15-22.
- Kong L, Cai X, Zhou X, Wong LL, Karakoti AS, Seal S, McGinnis JF.: Nanocerium extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways. *Neurobiol Dis.* 2011 Jun;42(3):514-23.
- Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT.: Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb).* 2007 Mar 14;(10):1056-8.

- Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massagué J.: The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 1997 Apr 15;11(8):984-95.
- Krohn AJ, Preis E, Prehn JH.: Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci.* 1998 Oct 15;18(20):8186-97.
- Krohn AJ, Wahlbrink T, Prehn JH.: Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 1999 Sep 1;19(17):7394-404.
- Kunz-Schughart LA, Knuechel R. (I): Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histology and Histopathology*, 2002 Apr;17(2):599-621
- Kunz-Schughart LA, Knuechel R. (II): Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histology and Histopathology*, 2002 Apr;17(2):623-37
- Labelle M, Schnittler HJ, Aust DE, Friedrich K, Baretton G, Vestweber D, Breier G.: Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 2008 Mar 1;68(5):1388-97.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E.: Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-57.
- Lijnen P, Petrov V, Rumilla K, Fagard R.: Transforming growth factor-beta 1 promotes contraction of collagen gel by cardiac fibroblasts through their differentiation into myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003 Mar;25(2):79-86.
- Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y.: Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol.* 2006 Nov-Dec;25(6):451-7.
- Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993 Apr 22;362(6422):709-15. Review.
- Liu FS.: Mechanisms of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy—A Quick Review. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2009 Sep;48(3):239-44. Review.
- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T.: p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 1995 Apr 15;9(8):935-44.
- Mathews L.S., Vale W.W.: Characterization of type II activin receptors, Binding, processing and phosphorylation. *J Biol Chem.* 1993 Sep 5;268(25):19013-8.
- Matsuyoshi N, Imamura S.: Multiple cadherins are expressed in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 18;235(2):355-8.
- Mauch C., Hatamochi A., Scharfetter K. und Krieg T.: Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp. Cell Res.* 1988 Oct;178(2):493-503.

- McGinnis KM, Gnegy ME, Falk N, Nath R, Wang KK.: Cytochrome c translocation does not lead to caspase activation in maitotoxin-treated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2003 May;42(6):517-23.
- Miller A-F: Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology* 2004 Apr;8(2):162–168.
- Morlière P, Moysan A, Santus R, Hüppe G, Mazière JC, Dubertret L.: UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Jul 30;1084(3):261-8.
- Mueller MM, Fusenig NE.: Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation.* 2002 Dec;70(9-10):486-97.
- Müller M, Fritz M, Buchter A.: Nanotoxikologie. *Zbl Arbeitsmed* 58 (2008) 238–252
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ.: N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 1999 Nov 1;147(3):631-44.
- Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE.: Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2007 Feb 1;73(3):549-59.
- Niu J, Wang K, Kolattukudy PE.: Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Jul;338(1):53-61.
- Ould-Moussa N, Safi M, Guedeau-Boudeville MA, Montero D, Conjeaud H, Berret JF.: In vitro toxicity of nanoceria: effect of coating and stability in biofluids. *Nanotoxicology* 2014 Nov;8(7):799-811.
- Pagano G: Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? *Human and experimental toxicol.* 2002 Feb; 21(2): 77-81.
- Perez JM, Asati A, Nath S, Kaittanis C.: Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small.* 2008 May;4(5):552-6
- Perez JM.: Iron oxide nanoparticles: hidden talent. *Nat Nanotechnol.* 2007 Sep;2(9):535-6.
- Peshavariya HM, Dusting GJ, Selemidis S.: Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic Res.* 2007 Jun;41(6):699-712.
- Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, King JE, Seal S, Self WT.: Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun (Camb).* 2010 Apr 28;46(16):2736-8.

- Reaume AG¹, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD.: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 1996 May;13(1):43-7.
- Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirsding K, Garrè M, Liebner S, Letarte M, ten Dijke P, Dejana E.: VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J.* 2008 Apr 9;27(7):993-1004.
- Sack, M: Wirkung von redox-aktiven Ceroxid-Nanopartikeln bei Hautkrebs. Inaugural-Dissertation, HHU Düsseldorf, Mai 2012
- Sarsour EH, Kalen AL, Goswami PC.: Manganese Superoxide Dismutase Regulates a Redox Cycle Within the Cell Cycle. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Apr 1;20(10):1618-27.
- Schlotmann K, Kaeten M, Black AF, Damour O, Waldmann-Laue M, Förster T.: Cosmetic efficacy claims in vitro using a three-dimensional human skin model. *Int J Cosmet Sci.* 2001 Oct;23(5):309-18.
- Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A.: Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 2001 Sep 20;496(1-2):171-80.
- Sies H.: Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* December 1986: Volume 25, Issue 12:1058–1071.
- Sies H.: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 Mar;82(2):291-5. Review.
- Silva AC, Oliveira TR, Mamani JB, Malheiros SM, Malavolta L, Pavon LF, Sibov TT, Amaro E Jr, Tannús A, Vidoto EL, Martins MJ, Santos RS, Gamarra LF.: Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:591-603.
- Skokrzadeh M, Shirazi FH , Abdollahi M , Ebadi AG and Asgarirad H.: Relationship of Glutathion Concentrations with Cytotoxicity of Cisplatin in Different Cell Lines after Confront Vitamin C and E. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2006; 9(15):2734-2742.
- Stadtman ER.: Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:797-821. Review.
- Stuhlmann D, Ale-Agha N, Reinehr R, Steinbrenner H, Ramos MC, Sies H, Brenneisen P.: Modulation of homologous gap junctional intercellular communication of human dermal fibroblasts via a paracrine factor(s) generated by squamous tumor cells. *Carcinogenesis.* 2003 Nov;24(11):1737-48
- Stuhlmann D, Steinbrenner H, Wendlandt B, Mitic D, Sies H, Brenneisen P.: Paracrine effect of TGFβ1 on downregulation of gap junctional communication between human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 25;319(2):321-6.

- Tada J, Hashimoto K.: Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 1997 Nov;24(10):628-35.
- Thannickal VJ, Fanburg BL.: Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;279(6):L1005-28. Review.
- Tsujimoto Y.: Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ.* 1997 Aug;4(6):429-34.
- Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewo
- Taillé C, El-Benna J, Lanone S, Boczkowski J, Motterlini R.: Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25350-60.
- Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S.: Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett.* 2005 Dec;5(12):2573-7.
- Terhorst D, BASICS Dermatologie, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2009
- Id E, Doseff AI.: Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC δ and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 2006 Sep 14;72(6):681-92.
- Vizio B, Poli G, Chiarpotto E, Biasi F.: 4-hydroxynonenal and TGF-beta1 concur in inducing antiproliferative effects on the CaCo-2 human colon adenocarcinoma cell line. *Biofactors.* 2005;24(1-4):237-46.
- von Montfort C, Alili L, Teuber-Hanselmann S, Brenneisen P: Redox-active cerium oxide nanoparticles protect human dermal fibroblasts from PQ-induced damage. *Redox Biology* 4(2015):1-5
- Weissenberg A, Sydlik U, Peuschel H, Schroeder P, Schneider M, Schins RP, Abel J, Unfried K.: Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med.* 2010 Aug 15;49(4):597-605.
- Welsch U, Sobotta Lehrbuch Histologie, Urban & Fischer, 2003
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A.: A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005 Jan 20;288(2):369-76.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994 Aug 4;370(6488):341-7.
- Wuerges J, Lee J-W, Yim Y-I, Yim H-S, Kang S-O, Djinovic Carugo KD: Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 8;101(23):8569-74.
- Xia T, Kovoichich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI, Nel AE.: Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano.* 2008 Oct 28;2(10):2121-34.

Yen CY, Chiu CC, Haung RW, Yeh CC, Huang KJ, Chang KF, Hseu YC, Chang FR, Chang HW, Wu YC.: Antiproliferative effects of goniothalamine on Ca9-22 oral cancer cells through apoptosis, DNA damage and ROS induction. *Mutat Res.* 2012 Sep 18;747(2):253-8.

Yuspa SH.: The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J Dermatol Sci.* 1998 May;17(1):1-7. Review.

Zarkowska T, Mittnacht S.: Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19):12738-46.

Zhao Y, Li H, Men LL, Huang RC, Zhou HC, Xing Q, Yao JJ, Shi CH, Du JL1.: Effects of selenoprotein S on oxidative injury in human endothelial cells. *J Transl Med.* 2013 Nov 14;11:287.

Danksagung

Großer Dank geht an Prof. Dr. Peter Brenneisen für ein wirklich interessantes Thema und die sehr gute Betreuung während der Arbeit, die ganze Geduld und die vielen nützlichen Tipps für das wissenschaftliche Arbeiten. Vielen Dank!

Ich danke Prof. Dr. Reichert und Prof. Dr. Stahl als vorherigen kommissarischen Leiter, dass ich diese Arbeit an diesem Institut durchführen durfte.

Für die freundliche Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Suschek.

Für die großartige technische Unterstützung danke ich Claudia Wyrich und Vanessa Pützer. Was hätte ich ohne euch gemacht?

Ich danke euch beiden Frau Dr. Lirija Alili und Frau Dr. Maren Sack für eure große Unterstützung, zum Teil wirklich nötige Engelsgeduld, eure tollen nützlichen Tipps und jegliche Motivation. Ohne euch hätte ich das niemals geschafft! Lirija, du hast wirklich ganze Arbeit geleistet!

Lirija, Maren, Vanessa, Johanna Diekmann und Martina Justen vielen Dank für den ganzen Spaß beim Arbeiten und vor allem für jegliche Weihnachtsmärkte, Käsefondues (und das von mir!), Sit-ins und Partys. Ihr seid mir so dermaßen ans Herz gewachsen, meine Besten!!!

Laura Witsch, danke für das viele geteilte Leid, die geteilten Erfolge, den geteilten Frust, sämtliche Abend- und nächtliche Laborbesuche und jegliche freien Abende zusammen. Wir hatten eine tolle Zeit.

Prof. Dr. Holger Steinbrenner und Dr. Silke DeSpirt – vielen Dank für die sehr guten wissenschaftlichen Ratschläge und Unterstützung bei Problemen!

Claus – ich liebe dich und unser Marlenchen unendlich. Ihr seid die großartigste kleine Familie der Welt. Danke, dass es euch gibt. Wie hätte ich es ohne euch schaffen sollen?

Größter Dank gilt auch meinen Eltern, Walter und Veronika Teuber sowie meiner Schwester Tina Sträter und meinen Großeltern. Danke für all eure Unterstützung und euren Glauben an mich. Ihr seid die Besten!

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.

Düsseldorf, Juni 2014

Düsseldorf, April 2015 (Korrektur)

S. Teuber-Hanselmann