

**Untersuchungen zum molekularen
Wirkmechanismus von redox-aktiven Ceroxid-
Nanopartikeln in Melanomzellen und normalen
Hautzellen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Elif Aplak
(geb. Karaman)

aus Erkelenz

Düsseldorf, Februar 2018

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen
2. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2018

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Aufbau und Funktion der Haut	11
1.2 Krebserkrankungen der Haut	16
1.2.1 Das maligne Melanom	16
1.3 Mechanismen der Krebsentstehung	20
1.3.1 Die „aerobe Glykolyse“ - eine metabolische Veränderung in Tumorzellen....	22
1.4 Tumor-Stroma Interaktion	26
1.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	28
1.5.1 Oxidativer Stress	31
1.5.2 Das antioxidative Schutzsystem.....	32
1.5.3 Bedeutung von ROS in Tumorzellen	34
1.6 Konventionelle Chemotherapie von Krebserkrankungen	36
1.7 Nanomedizin – eine Alternative in der Krebstherapie.....	37
1.7.1 Ceroxid-Nanopartikel.....	38
1.8 Ziel der Arbeit	42
2 Material & Methoden	43
2.1 Material	43
2.1.1 Zelllinien	43
2.1.2 Nanopartikel.....	43
2.1.3 Chemikalien	44
2.1.4 Kits	46
2.1.5 Lösungen und Puffer	46
2.1.6 Antikörper	48
2.1.7 Molekulargewichtsstandard	49
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	49
2.1.9 Geräte	50
2.1.10 Software	52
2.2 Methoden.....	52
2.2.1 Zellfreie Methoden zur Charakterisierung der Nanopartikel	52
2.2.1.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	52
2.2.1.2 UV/VIS Spektroskopie.....	53
2.2.1.3 Superoxid-Dismutase (SOD)-Assay.....	53
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	55
2.2.2.1 Kultivierung der Zellen	55
2.2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	56
2.2.2.3 Mycoplasmentest.....	56
2.2.2.4 Viabilitätstest (MTT-Assay).....	57

2.2.2.5	Proliferationstest (BrdU-Assay)	58
2.2.2.6	Langzeitexperiment mit CNP	59
2.2.3	Biochemische und molekularbiologische Methoden	60
2.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	60
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinmenge (nach Lowry)	60
2.2.3.3	Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
2.2.3.4	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	62
2.2.3.5	Western Blot („semi-dry“-Methode).....	65
2.2.3.6	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine.....	65
2.2.3.7	Immunologischer Nachweis von Sulfensäuren	66
2.2.3.8	„Stripping“ der PVDF-Membran	67
2.2.3.9	Coomassie-Färbung.....	68
2.2.3.10	Untersuchungen zur Apoptose	68
2.2.3.11	Fluorimetrischer Nachweis von intrazellulärem ROS (DCF-Assay)	68
2.2.3.12	Nachweis von MDA zur Indikation von Lipidperoxidation.....	69
2.2.3.13	Bestimmung der spezifischen GAPDH-Aktivität	70
2.2.3.14	Messung des Laktatgehalts.....	71
2.2.4	Massenspektrometrische Methoden	72
2.2.4.1	ICP-MS.....	72
2.2.4.2	Analyse der Proteinexpression („Proteomics“).	72
2.2.4.3	Analyse von reversiblen Cystein/Thiol-Modifikationen in Proteinen mit BIAM- Switch Assay („Redox-Proteomics“).	73
2.3	Allgemeine Versuchsbedingungen.....	74
2.4	Statistik.....	74
3	Ergebnisse.....	75
3.1	Charakterisierung der verwendeten CNP	75
3.1.1	Bestimmung der Größe von CNP mittels DLS	76
3.1.2	Analyse der Transmission von CNP zur Bestimmung des Oxidationsstatus... 78	
3.1.3	Untersuchungen zur SOD-mimetischen Aktivität von CNP.....	80
3.2	Einfluss von CNP auf Zellviabilität und -proliferation.....	83
3.2.1	Cytotoxizität von CNP	84
3.2.2	Effekt von CNP auf die Zellproliferation.....	86
3.3	Aufnahme von CNP in die Zellen.....	88
3.4	CNP-bedingte Modulation der Apoptose in Tumorzellen	90
3.5	Analyse der Proteinexpression in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP („Proteomics“)	94
3.6	Redox-Aktivität von CNP	99
3.6.1	Einfluss von CNP auf den intrazellulären ROS-Gehalt.....	99
3.6.2	Einfluss von CNP auf oxidative Lipidschädigung	101
3.6.3	Einfluss von CNP auf oxidative Proteinmodifikation.....	104
3.6.4	Identifizierung von posttranslational modifizierten Proteinen nach CNP-Behandlung („Redox-Proteomics“).	108

3.6.5	GAPDH als Modellenzym für CNP-induzierte posttranslationale Modifikationen von Proteinen.....	112
3.7	Therapieansätze mit CNP.....	121
3.7.1	Einfluss von ROS auf die Zellviabilität von Tumorzellen und normalen Hautzellen	121
3.7.2	Langzeituntersuchung von CNP in Tumorzellen und normalen Hautzellen .	123
4	Diskussion.....	129
4.1	Ideale Eigenschaften von CNP im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung gegen Krebs.....	129
4.2	Selektiv cytotoxische und proliferationshemmende Wirkung von CNP auf Tumorzellen	132
4.3	Identische Menge an CNP in Tumorzellen und normalen Hautzellen.....	135
4.4	Kein Einfluss von CNP auf die Proteinexpression in Tumorzellen.....	137
4.5	Effekte von CNP sind ROS-abhängig.....	138
4.6	CNP-bedingte posttranslationale Modifikationen von Proteinen in Tumorzellen	144
4.7	Auswirkungen von CNP auf den Warburg-Effekt – eine Hypothese	149
4.8	CNP als alternativer Therapieansatz ausgehend von Langzeitstudien.....	150
4.9	Schlussfolgerung.....	153
5	Perspektiven.....	155
6	Zusammenfassung	156
7	Summary.....	157
	Literaturverzeichnis	158
	Publikationen.....	183
	Danksagung.....	184
	Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation	186

Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CNP	Ceroxid-Nanopartikel
DCF	Dichlorofluorescein
DDB2	<i>DNA damage binding protein 2</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dimedon	5,5-Dimethylcyclohexane-1,3-dione
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOX	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FeCl ₂	Eisen(II)-chlorid
FDXR	<i>Ferredoxin reductase</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion (Disulfid)
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ -DFC-DA	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-Diacetat
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
M	mol/L
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MGM	<i>Melanocyte Growth Medium</i>
min	Minute
mM	mMol/L
Mp	Milchpulver
MS	Massenspektrometrie

MTT	Tetrazoliumsalsz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHDF	Normale Humane Dermale Fibroblasten
NHEM	Normale Humane Epidermale Melanozyten
O ₂ ^{·-}	Superoxidanionradikal
OH [·]	Hydroxylradikal
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SOD	Superoxid-Dismutase
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
Tab.	Tabelle
TBA	Thiobarbitursäure
TBP	Tributylphosphat
TBS-T	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ1	<i>Transforming growth factor β1</i>
TMP	1,1,3,3-Tetramethoxypropan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
u.a.	unter anderem
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
v.a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel
μM	μMol/L

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut (Cutis) ist mit einer Gesamtfläche von 1.5-2 m², mit einem Gewicht von 3-10 kg und einer Dicke von 1.5-4 mm das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers. Sie stellt als Hüllorgan des Menschen die Grenzfläche bzw. Barriere zur Umwelt dar. Die Funktionen der Haut sind vielfältig und können in passive und aktive Funktionen unterteilt werden (Abb. 1.1) (Moll, 2016; Terhorst, 2016; Mühlstädt, 2014; Sterry, 2011). Zu den wichtigsten passiven Funktionen der Haut zählen der Schutz vor Kälte, Hitze, UV-Strahlung und Austrocknung, vor mechanischen Traumen, vor dem Eindringen von Fremdstoffen biologischer sowie chemischer Art. Zu den wichtigsten aktiven Funktionen gehören die Abwehr eingedrungener Fremdstoffe, die Sinneswahrnehmung und die Regulation der Körpertemperatur sowie des Elektrolyt- und Wasserhaushalts (Mühlstädt, 2014; Sterry, 2011; Fritsch, 2009).

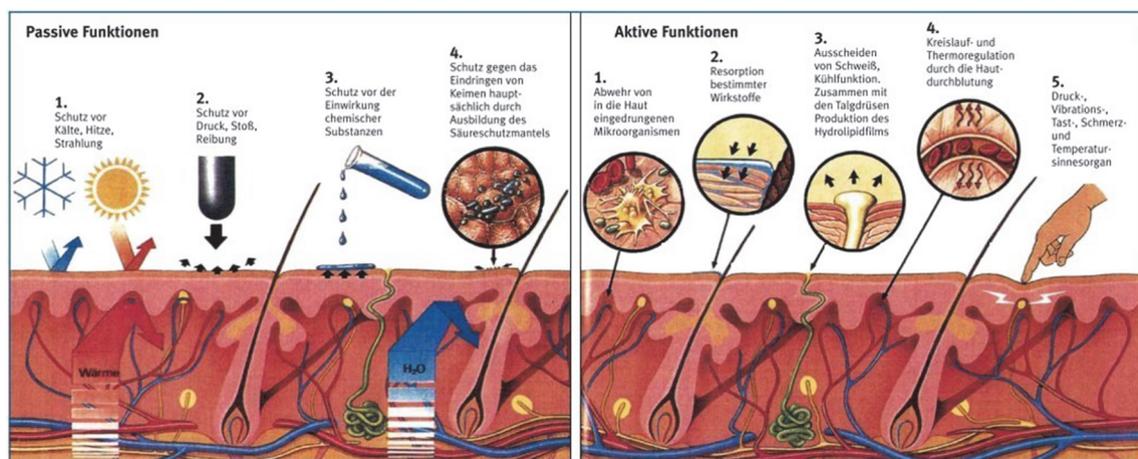


Abb. 1.1: Passive und aktive Funktionen der Haut
(https://www.umweltonline.de/recht/arbeits/uvv/bgi8000/8559_ges.htm).

Die Haut besteht aus drei Schichten, welche sich durch einen unterschiedlichen Aufbau und verschiedene Zelltypen voneinander abgrenzen (Abb. 1.2). Von außen nach innen besteht die dreilagige Struktur der Haut aus Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Diese sind fest miteinander verbunden und erfüllen verschiedene Funktionen (Moll, 2016; Sterry, 2011). Die oberste Schicht, die Epidermis, besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel mit einer Dicke von 30-300 µm, das als Proliferationsgewebe einer ständigen Erneuerung unterliegt (Terhorst,

2016). Je nach Alter, Geschlecht und Körperareal variiert belastungsabhängig die Dicke der Epidermis (Moll, 2016; Mühlstädt, 2014). Keratinozyten bilden den Hauptanteil der Epidermis (> 90%), in geringerer Anzahl kommen Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkelzellen vor (Fritsch, 2009). Zudem besitzt die Epidermis viele Nerven, jedoch keine eigenen Blutgefäße. Die Versorgung erfolgt durch Diffusion aus der darunterliegenden, gefäßreichen Dermis (Moll, 2016; Terhorst, 2016). Weiterhin lässt sich die Epidermis in fünf Schichten unterteilen. Von innen nach außen finden sich folgende Schichten: *Stratum basale* (Basalschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), *Stratum lucidum* (Glanzschicht) und *Stratum corneum* (Hornschicht). *Stratum basale* und *Stratum lucidum* bestehen im Gegensatz zu den anderen Schichten der Epidermis nur aus einer Zellschicht (Terhorst, 2016).

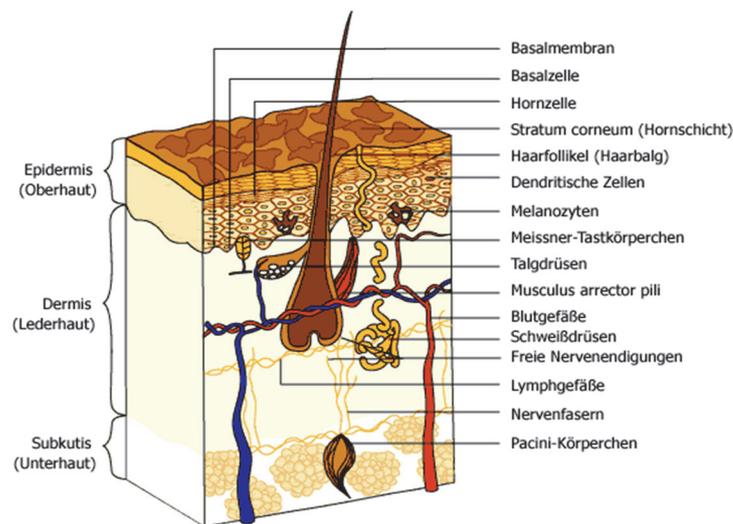


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des menschlichen Hautaufbaus
 (http://skincare.dermis.net/content/e01aufbau/e660/e661/index_ger.html)

Die Keratinozyten bilden die Grundstruktur der Epidermis und sind für die regelmäßige Erneuerung und Regeneration verantwortlich. Sie wandern unter Veränderung ihrer Struktur durch die verschiedenen Schichten der Epidermis (Terhorst, 2016; Sterry, 2011; Fritsch, 2009). So befinden sich im einzelligen *Stratum basale*, das sich als letzte Zellschicht der Epidermis direkt über der Dermis befindet und durch die Basalmembran von dieser abgetrennt ist, die mitotisch aktiven Basalzellen (basale Keratinozyten), welche durch Zellteilung die Stachelzellen des mehrschichtigen *Stratum spinosum* bilden. Die Stachelzellen wiederum differenzieren zu Körnerzellen des *Stratum granulosum* und weiter zu verhornten Korneozyten (Hornzellen), welche dann den kernlosen Zelltyp des *Stratum lucidum* und *Stratum corneum* bilden (Goebeler und Hamm, 2017; Terhorst,

2016; Sterry, 2011). Die Korneozyten sind abgestorbene Keratinozyten, welche an der inneren Seite der Zellmembran eine Proteinakkumulation zeigen und somit die sogenannte wasserabweisende, undurchlässige Schutzschicht des *Stratum corneums*, den *Cornified Envelope*, bilden. Dem *Cornified Envelope* außen angelagert ist außerdem eine ceramidreiche Lipidschicht, welche zusätzlich als Barriere gegen Austrocknung und Schutz vor Absorption und Einwirken fremder Substanzen dient (Fritsch, 2009; Kerscher, 2009). Somit bildet die Epidermis, genauer das *Stratum basale*, ein klassisches Proliferationsgewebe, das einer ständigen Erneuerung unterliegt, welche durch zunehmende Differenzierung der Keratinozyten (Basalzelle → Stachelzelle → Körnerzelle → Hornzelle) von der Basalschicht (*Stratum basale*) zur Hautoberfläche (*Stratum corneum*) erfolgt (Terhorst, 2016). Durch Zellteilung und Aufwärtswanderung der Keratinozyten wird ein fließendes Gleichgewicht (Homöostase) zwischen den Schichten der Epidermis gewährleistet. Diese Vorgänge werden auch als terminale epidermale Differenzierung bezeichnet, wobei die Erneuerungszeit oder der sogenannte *Turnover* der Epidermis ca. 28 Tage beträgt (Moll, 2016; Fritsch, 2009). Im *Stratum basale* befinden sich neben den Keratinozyten auch Melanozyten (Terhorst, 2016; Fritsch, 2009). Bei diesen Zellen handelt es sich um dendritische und pigmentbildende Zellen, welche für die Synthese des Hautpigments Melanin zuständig sind. Melanin wird in speziellen Organellen der Melanozyten, den sogenannten Melanosomen, synthetisiert und gespeichert. Die Hauptfunktion von Melanin ist der Schutz der Haut vor UV-Einstrahlung und somit vor Entartung der Zellen. Außerdem ist das Melanin für die Eigenfarbe von Haut und Haaren verantwortlich (Goebeler und Hamm, 2017; Fritsch, 2009). Über dendritische Fortsätze werden „gereifte“ Melanosomen, welche mit Melanin angereichert sind, in die benachbarten Keratinozyten übertragen. Diese ordnen sich über dem oberen Kernpol der Keratinozyten kappenartig wie ein Schutzschild an und schützen Zellkern und DNA vor UV-Strahlung durch Absorption von Photonen und Umwandlung in Wärme (Uong und Zon, 2010; Esser und Krutmann, 2010; Fritsch, 2009). Dabei bildet ein Melanozyt mit 30-40 Keratinozyten die sogenannte epidermale Melanineinheit und beliefert mehrere Keratinozyten gleichzeitig mit Melanosomen (Cichorek et al., 2013; Fritsch, 2009). Die Biosynthese von Melanin erfolgt aus Tyrosin als Grundbaustein über die Tyrosinase und andere Enzyme in einem Hauptsyntheseweg zu schwarzbraunem Eumelanin und in einem Nebensyntheseweg zu rötlichem Pheomelanin (Fritsch, 2009). Die menschliche Haut enthält eine Mischung aus Eu- und Pheomelanin, wobei die Menge an Eumelanin die Pigmentierung der Haut bestimmt. Zudem hat das Eumelanin im

Gegensatz zum Pheomelanin bessere Eigenschaften bezüglich einer UV-Protektion. Als Konsequenz ist das Risiko an Hautkrebs zu erkranken bei heller Haut um das 30-40-fache höher als bei dunklerer Haut (Cichorek et al., 2013). Das Pigmentsystem bei heller Haut ist jedoch auch auf eine rasche und adaptive UV-Antwort programmiert. So werden als Reaktion auf eine UV-Exposition ruhende Melanozyten aktiviert und über eine verstärkte Tyrosinaseaktivität die Melaninsynthese verstärkt, wodurch der Pigmenttransfer intensiviert wird (Fritsch, 2009). So kann sich der Mensch bis zu einem gewissen Grad auf unterschiedlich starke UV-Expositionen einstellen. Je nach genetischem Hintergrund sind die Möglichkeiten des endogenen UV-Schutzes allerdings beschränkt. Die Menge des Melanins bestimmt den Hautpigmentierungstyp. Hierbei werden zwischen sechs verschiedenen Hauttypen unterschieden (Sterry, 2011). So erhalten Menschen mit Hauttyp I und II Schädigungen durch UV-Exposition schon bei geringeren UV-Dosen als Menschen mit einem Hauttyp höherer Klassifizierung (Goebeler und Hamm, 2017; Sterry, 2011). Weitere wichtige Zelltypen der Epidermis sind die Merkel-Zellen und die Langerhans-Zellen. Die Merkel-Zellen, welche innervierte Rezeptorzellen darstellen, sind für die Vermittlung der Tastempfindung verantwortlich, wobei die dendritischen Langerhans-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen der Epidermis bei der Einleitung der primären Immunantwort eine wichtige Rolle spielen (Terhorst, 2016; Mühlstädt, 2014; Fritsch, 2009).

Unterhalb der Epidermis befindet sich die Dermis (Lederhaut), auch Corium genannt, welche durch die Basalmembran von der Epidermis abgegrenzt wird. Dieser Grenzbereich wird auch als dermoepidermale Junctionszone bezeichnet. Hierin besitzt die Basalmembran eine Stützfunktion und kontrolliert als Grenzmembran den Austausch von Zellen und Molekülen (Terhorst, 2016; Sterry, 2011). Die Basalmembran besteht aus zwei Laminae (*Lamina lucida* und *Lamina densa*), Fibrillen, dermalen Kollagenfasern und der Matrix. Die obere *Lamina lucida* ist durch Verankerungsfilamente mit der Plasmamembran der Basalzellen der Epidermis verbunden, wobei die untere *Lamina densa* durch Verankerungsfibrillen- und Mikrofibrillenbündel mit der Dermis verbunden ist (Moll, 2016; Terhorst, 2016). Die Dermis (2-4 mm) besteht aus einem elastischen Bindegewebe und besitzt im Gegensatz zu der Epidermis viele Nerven sowie Lymph- und Blutgefäße, weshalb eine Schädigung und Schmerzempfindung immer mit einer Schädigung der Dermis einhergeht (Zilles und Tillmann, 2010). Prinzipiell wird die Dermis in zwei Schichten unterteilt: *Stratum papillare* (Papillarschicht) und *Stratum reticulare* (Geflechschicht). Das *Stratum papillare* ist die oberste Schicht der Dermis mit

einem lockeren Fasergeflecht, welches den zell- und gefäßreichen Teil der Dermis bildet. Das *Stratum reticulare* besteht aus einem dichten sowie zell- und gefäßarmen Fasergeflecht, welches unmittelbar in die tiefergelegene Subcutis übergeht (Sterry, 2011; Fritsch, 2009). Die wichtigsten Fasern der Dermis sind die Kollagenfasern, welche sich aus Kollagenfibrillen zusammensetzen. Sie verleihen der Haut ihre mechanische Stabilität und Dehnbarkeit (Terhorst, 2016). Es gibt verschiedene Kollagentypen, wobei das hauptsächliche Kollagen in der Dermis Typ I Kollagen ist (80-90% des gesamten Kollagens), gefolgt von Typ III und VI (Goldsmith et al., 2012; Fritsch, 2009). Neben Kollagenfasern gibt es auch die wichtigen elastischen Fasern aus Elastin und Fibrillin, welche für die Reißfestigkeit und Elastizität der Haut verantwortlich sind (Goebeler und Hamm, 2017; Fritsch, 2009). In der Dermis kommen verschiedene Zelltypen vor, wobei die Fibroblasten den Hauptanteil bilden (Terhorst, 2016; Sterry, 2011). Fibroblasten spielen für Prozesse der Haut, wie Zellwachstum und Wundheilung, eine wichtige Rolle und bilden das Bindegewebe der Dermis zusammen mit der extrazellulären Matrix, welche aus einer protein- und polysaccharidhaltigen Flüssigkeit (Interzellulärsubstanz) und den oben beschriebenen Kollagen- und elastischen Fasern besteht (Goebeler und Hamm, 2017; Terhorst, 2016; Fritsch, 2009). Die Interzellulärsubstanz füllt den Raum zwischen den Zellen und den Fasern der Dermis, in der sich die Zellen auch bewegen und miteinander interagieren können (Goebeler und Hamm, 2017; Watt und Fujiwara, 2011; Fritsch, 2009). Zudem sind Fibroblasten in der Lage, die in der extrazellulären Matrix vorkommenden Kollagen- und Elastinfasern sowie strukturelle Glykoproteine zu synthetisieren und in den extrazellulären Raum zu sezernieren. Diese verleihen der Matrix ihre Struktur und Festigkeit. Glykoproteine (Glykosaminglykane und Proteoglykane) finden sich zwischen den Kollagenfasern. Sie dienen als Wasserspeicher und halten zudem das Gleichgewicht zwischen Wasser- und Salzhaushalt aufrecht. Außerdem sind sie wichtig für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion (Fritsch, 2009). Neben der aufbauenden Funktion können Fibroblasten auch den Abbau von geschädigtem oder abgestorbenem Bindegewebe einleiten, indem sie Enzyme der Familie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) synthetisieren. Der Abbau erfolgt durch Inhibitoren der MMPs (TIMPs, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) in kontrollierter Weise, sodass ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Auf- und Abbau für die Erhaltung der Funktion des Bindegewebes der Haut herrscht (Fritsch, 2009; Brenneisen et al., 1996). Zusätzlich befinden sich in der Dermis Makrophagen (Histiozyten), welche immunologisch aktiv sind, und Mastzellen, welche allergische Reaktionen vermitteln können. Vereinzelt

kommen auch Melanozyten und Lymphozyten vor (Terhorst, 2016). Neben vielen Nervenfasern, die z.B. Schmerz, Juckreiz, Temperatur und Druck vermitteln, sind auch Sinnesrezeptoren, wie Meißner-Tastkörperchen und Vater-Pacini-Körperchen, in der Dermis lokalisiert. Auch Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen sind als eigenständige Strukturen in das Bindegewebe der Dermis, genauer des *Stratum reticulare*, eingebettet (Moll, 2016; Mühlstädt, 2014; Sterry, 2011).

Die Subcutis, auch Unterhautfettgewebe genannt, ist der unterste Teil der Haut. Sie besteht aus Bindegewebe und Fettzellen und dient primär der Isolation und dem mechanischen Schutz. Weiterhin kann das in der Dermis eingelagerte Fettgewebe als Energiespeicher für den Organismus dienen (Moll, 2016; Sterry, 2011).

1.2 Krebserkrankungen der Haut

Die Haut ist das Organ des menschlichen Körpers mit der höchsten Inzidenz und Vielfalt von Neoplasien, bedingt durch ihre Größe und die ständige Exposition gegenüber Umwelttoxinen, wie chemischen Kanzerogenen und UV-Licht. Die Inzidenz von Hautkrebserkrankungen ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Die Zuwachsraten liegen dabei zwischen 3-7% pro Jahr (Schadendorf et al., 2015; Fritsch, 2009). Obwohl die Mehrzahl der Neoplasien benignen Art ist, wie z.B. die Seborrhoische Warze, gibt es auch einige maligne Formen, die zu den aggressivsten Neoplasien des Menschen gehören (Fritsch, 2009). Beispiele hierfür sind das Merkelzellkarzinom, das Basalzellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom und das maligne Melanom. Das maligne Melanom stellt dabei die bedrohlichste und gefährlichste Neoplasie der Haut dar und wird im Folgenden näher beschrieben.

1.2.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom („schwarzer Hautkrebs“) ist ein hochgradig maligner Tumor, der aus pigmentproduzierenden Zellen, den Melanozyten, hervorgeht (Goebeler und Hamm, 2017; McCourt et al., 2014). Aufgrund des invasiven Wachstums und der Neigung zur frühzeitigen Metastasierung (lymphogen und hämatogen) stellt das maligne Melanom die aggressivste und tödlichste Form aller Hautkrebserkrankungen dar (Sterry, 2011). Das maligne Melanom macht etwa 90% der Todesfälle durch Hautkrebs aus (Moll, 2016;

Terhorst, 2016). Vor allem in der hellhäutigen Bevölkerung hat die Inzidenz des Melanoms in den letzten Jahren stark zugenommen und verdoppelt sich alle 10–15 Jahre. Der jährliche Zuwachs beträgt 4-8% (Fritsch, 2009). Außerdem korreliert die Inzidenz mit der UV-Exposition des Wohnortes. In Europa beträgt die Inzidenz 15/100000 Einwohner/Jahr. Australien hingegen hat mit mehr als 40/10000 Einwohner/Jahr eine deutlich höhere Inzidenzrate (Terhorst, 2016; Sterry, 2011; Fritsch, 2009). Zudem treten bei Asiaten und Afrikanern seltener Melanome auf als bei helleren Hauttypen (Terhorst, 2016). Die meisten Melanome werden im mittleren Lebensalter (zwischen dem 30. und 70. Lebensjahr) diagnostiziert. Frauen sind etwa 1.5 bis 2-mal häufiger betroffen als Männer. Melanome können an der gesamten Haut auftreten. Während Melanome bei Frauen vorwiegend an der unteren Extremität (v.a. Unterschenkel) entstehen, sind sie bei Männern am Stamm (v.a. Rücken) lokalisiert (Moll, 2016; Terhorst, 2016; Sterry, 2011). Die meisten Melanome entwickeln sich auf gesunder, unauffälliger Haut. Nur 20-50% entstehen aus vorbestehenden Vorläuferläsionen (Moll, 2016). Verschiedene exogene und konstitutionelle Faktoren spielen in der Ätiologie eine wichtige Rolle, wobei die UV-Strahlung (v.a. das kurzwellige UV-Licht) bei weitem als wichtigster Risikofaktor zu nennen ist (Schadendorf et al., 2015; Fritsch, 2009). Eine intensive UV-Belastung aufgrund von geänderten Freizeitgewohnheiten in den letzten Jahren bedingt den Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms. Die Entstehung des malignen Melanoms korreliert mit der Anzahl einzelner schwerer Sonnenbrände, besonders in der Kindheit, und ist wenig auf die Akkumulation von UV-Schäden über die Jahre zurückzuführen (chronische UV-Belastung), wie es beim Plattenepithelkarzinom der Fall ist (Fritsch, 2009). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung des malignen Melanoms sind, neben der ethnischen Zugehörigkeit (Hauttyp I und II) und dem weiblichen Geschlecht, der Albinismus, DNA-Reparaturstörungen (wie z.B. bei Xeroderma pigmentosum) und eine positive Familienanamnese (genetische Prädisposition) (Moll, 2016; Terhorst, 2016). Klinisch und histologisch lassen sich vier Subtypen des malignen Melanoms unterscheiden: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM) (Moll, 2016; Terhorst, 2016; Sterry, 2011). Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die Subtypen des malignen Melanoms mit Angaben über Häufigkeit, mittleres Erkrankungsalter und betroffene Hautregionen. Weitere, eher seltenere, Subtypen des malignen Melanoms sind das amelanotische (pigmentfreie) Melanom (AMM), das Schleimhautmelanom, das Aderhautmelanom und das meningeale Melanom (Sterry, 2011).

Subtyp	Relative Häufigkeit	Mittleres Erkrankungsalter	Betroffene Hautareale	Wachstum
Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)	55-65%	50 Jahre	Sonnenexponierte Regionen	Primär horizontal
Noduläres Melanom (NM)	15-20%	55 Jahre	Sonnenexponierte Regionen	Primär vertikal
Lentigo-maligna-Melanom (LMM)	5-10%	68 Jahre	Gesicht und Handrücken	Primär horizontal
Akrolentiginöses Melanom (ALM)	5%	63 Jahre	Akren und Nagelbett	Primär horizontal

Tab. 1.1: Subtypen des malignen Melanoms Aufgeführt sind die relative Häufigkeit, das mittlere Erkrankungsalter, die betroffenen Hautareale und das Wachstum (verändert nach Sterry, 2011; Terhorst, 2016).

Das SSM kommt bei der hellhäutigen Bevölkerung am häufigsten vor, bei der schwarzhäutigen Bevölkerung dominiert dagegen das ALM (Sterry, 2011). Das NM und das AMM zählen zu den aggressivsten Subtypen des Melanoms, da diese aufgrund des primär vertikalen Wachstums zur frühen Metastasierung neigen. Andere Subtypen hingegen haben aufgrund des horizontalen Wachstums über mehrere Jahre hinweg eine sehr geringe Metastasierungstendenz. Neben dem Wachstumstyp korreliert auch die Tumordicke mit dem Metastasierungsrisiko, sodass mit zunehmender Tumordicke das Metastasierungsrisiko steigt (Moll, 2016; Sterry, 2011). Im Krankheitsverlauf des Melanoms erfolgt die Metastasierung zunächst lymphogen und später meist hämatogen, v.a. in Haut, Lungen, Leber, Gehirn oder Knochen (Sterry, 2011). Bei Verdacht auf ein Melanom werden verdächtige Läsionen zunächst mit der sogenannten ABCDE-Regel (**A**symmetrie, **B**egrenzung, **C**olor, **D**urchmesser und **E**levation) mit bloßem Auge oder Dermatoskop überprüft (Moll, 2016; Terhorst, 2016; Sterry, 2011). Verdächtige Hautareale werden zur Diagnosesicherung mit einem entsprechenden Sicherheitsabstand vollständig entfernt (Stanzbiopsie). Es wird vorher keine Probebiopsie entnommen, da die Gefahr einer frühen Metastasierung zu groß ist. Die endgültige Diagnose erfolgt nach histopathologischer Untersuchung (Schadendorf et al., 2015). Die Diagnose des amelanotischen Melanoms stellt sich hierbei als besonders schwierig dar, weil diesem das Hautpigment Melanin fehlt. Bei der Diagnosestellung werden der Melanomtyp, die Tumordicke nach Breslow, der Invasionslevel nach Clark und eine eventuelle

Metastasierung bestimmt (Abb. 1.3). Ebenso wird das Vorhandensein von Ulzerationen überprüft (Sterry, 2011).

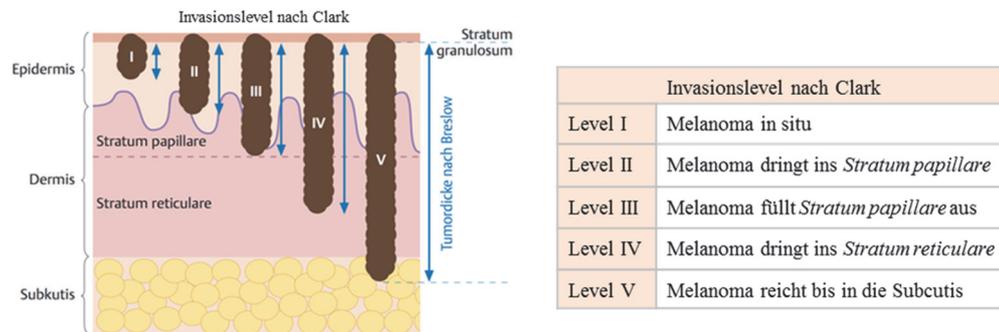


Abb. 1.3: Tumordicke nach Breslow und Invasionslevel nach Clark (verändert nach Sterry, 2011).

Somit können verschiedene Stadien unterschieden werden, die in Tabelle 1.2 erläutert sind. Je höher das Stadium des Melanoms ist, desto geringer ist die 10-Jahres-Überlebensrate (Terhorst, 2016). Das primäre Ziel in der Therapie des malignen Melanoms ist die vollständige Entfernung des Primärtumors. Bei Befall von Lymphknoten wird eine Lymphknotenresektion empfohlen. Bei Knochen- und Hirnmetastasen, sowie bei inoperablen Melanomen oder bei anderen vorliegenden Kontraindikationen wird eine Radiotherapie empfohlen. Im Falle einer Metastasierung des Tumors werden systematische Chemotherapeutika eingesetzt. In erster Linie wird eine Monotherapie mit z.B. Dacarbazin vorgenommen (Moll, 2016; Terhorst, 2016; Fritsch, 2009). Jedoch zeichnen sich Melanome durch eine hohe Resistenz gegen herkömmliche Chemotherapeutika aus (Helmbach et al., 2001). Daher ist die Wirksamkeit von herkömmlichen Chemotherapeutika oft sehr begrenzt und auch von kurzer Dauer. So beträgt die Ansprechraten von Dacarbazin ca. 20%, wobei die Ansprechraten von beispielsweise Platinverbindungen und Taxanen noch geringer sind (Terhorst, 2016; Helmbach et al., 2001). Die Resistenz ist im Wesentlichen mit einer Steigerung der DNA-Reparatur und Dysregulation der Apoptose zu erklären. Jedoch spielen andere Prozesse, wie die gesteigerte Detoxifikation von Wirkstoffen in Melanomzellen, auch eine Rolle (Helmbach et al., 2001). Durch Kombinationstherapien mit verschiedenen Chemotherapeutika wird versucht, eine effiziente Behandlung zu erreichen. Allerdings bewirkt dies keine Verlängerung der Überlebensraten, sondern eher ein signifikant erhöhtes Nebenwirkungsprofil (Terhorst, 2016; Moll, 2016). Über alternative Therapien mit Interferonen (z.B. Interferon- α) und Kinase-Inhibitoren (z.B. BRAF-Inhibitoren) können höhere Ansprechraten erreicht werden (Schadendorf et al.,

2015). BRAF kodiert für eine Kinase und ist ein Onkogen, das in ca. 60% aller Melanome mutiert ist (Libra et al., 2005). Die Inhibierung des mutierten BRAF (BRAF-V600-Mutation) führt zur Hemmung der unkontrollierten Zellteilung von Melanomzellen. So sind als zielgerichtete Therapie spezifische BRAF-Inhibitoren, Vemurafenib und Debrafenib, zugelassen. Jedoch hat sich erwiesen, dass diese Therapien keinen gesicherten Vorteil für das Gesamtüberleben bieten (Terhorst, 2016; Schadendorf et al., 2015). So stehen in den letzten Jahren zusätzlich Immuntherapien mit monoklonalen Antikörpern zur Verfügung, welche vielversprechende Ergebnisse zeigen, jedoch mit hohen Kosten verbunden und zudem auch nicht komplett nebenwirkungsfrei sind (Alatrash et al., 2013; Kroschinsky et al., 2017). Eine frühzeitige Diagnose und adäquate Behandlung begünstigt daher die Prognose beim malignen Melanom, welche bei Auftreten von Metastasen aufgrund begrenzter Therapiemöglichkeiten verschlechtert wird (Moll, 2016; Terhorst, 2016).

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

Tab. 1.2: Stadien und Prognosen des malignen Melanoms (verändert nach Terhorst, 2016).

1.3 Mechanismen der Krebsentstehung

Die Entstehung von Krebs, auch Karzinogenese oder Kanzerogenese genannt, ist ein mehrstufiger Prozess, welcher in Initiation, Promotion und Progression eingeteilt wird (Pitot, 1993). Dieses Mehrstufenmodell der Kanzerogenese umfasst sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen (Choi und Lee, 2013; Pitot, 1993). Im ersten Schritt der Krebsentstehung, bei der Initiation, tritt eine irreversible Mutation in Genen auf, die mit Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose assoziiert sind. Solche Gene werden auch als Tumorsuppressor- und Onkogene bezeichnet (Fritsch, 2009; Rassow et al., 2006). In nicht-entarteten, teilungsfähigen Zellen wird die

Proliferation über diese Gene kontrolliert. Protoonkogene fördern die Teilungsaktivität der Zellen, während Tumorsuppressorgene die Teilungsaktivität hemmen. Durch Mutationen werden Onkogene aktiviert (aus Protoonkogenen) und Tumorsuppressorgene inaktiviert, wodurch die Wachstumskontrolle der Zelle gestört und die Tumorentstehung gefördert wird (Heinrich et al., 2014; Rassow et al., 2006). Heutzutage sind mehrere dieser Gene bekannt. Ein prominentes Beispiel für ein Onkogen ist RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*). RAF ist eine Kinase, die im RAS/RAF- und im MAP-Kinase-Signalweg involviert ist. Die Aktivierung dieser Signalwege fördert die Proliferation und das Überleben der Zelle (Heinrich et al., 2014). B-RAF ist eine Isoform von RAF und ist in ca. 65% aller Melanome mutiert (Uong und Zon, 2010; Brose et al., 2002). Tumorsuppressorgene sind beispielsweise an der DNA-Reparatur beteiligt. Das bekannteste Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist p53, ein Protein, das an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist und im Falle einer irreversiblen DNA-Schädigung die Apoptose einleitet. Bei allen Krebserkrankungen ist p53 das am häufigsten mutierte Gen (Mutationen bei ca. 50%) (Fritsch, 2009; Vogelstein et al., 2000). Als Resultat einer erhöhten UV-Exposition sind Mutationen in p53 typisch für Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome (Cui, 2012; Yuspa et al., 1994). Mutationen können spontan entstehen oder vererbt werden. In vielen Fällen entstehen Mutationen durch kanzerogene Noxen im Genom der Zellen. Diese unterscheiden sich in chemische, physikalische oder biologische Noxen (Knasmüller, 2014; Vohr, 2010). Beispiele für kanzerogene Noxen sind verschiedene chemische Verbindungen, wie polycyclische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine oder Nitrosamine, Strahlung, Viren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Vohr, 2010; Pitot, 1993). Bei den meisten Krebserkrankungen der Haut ist jedoch UV-Licht das bedeutendste Kanzerogen. Biologische oder chemische Kanzerogene der Haut sind dagegen weniger bekannt (Leischner, 2017). UV-Licht verursacht Chromosomenbrüche, Translokationen und Punktmutationen. Außerdem verursacht UV-Strahlung die Entstehung von ROS, welche in hohen Mengen eine schädigende Wirkung auf Zellen haben (Leischner, 2017; Waris und Ahsan, 2006).

Die nächste Stufe der Kanzerogenese ist die Promotion, bei welcher weitere mutagene und mitogene Reize auf wachstumsrelevante Gene in initiierten Zellen wirken und somit Proliferation und Wachstum steigern (Fritsch, 2009). Dadurch entstehen nun entartete Zellen und ein präneoplastischer Klon (benigner Tumor). Dieser Klon hat einen bestimmten maximalen Durchmesser und kann ab dieser Größe aufgrund fehlender Nährstoffe und Sauerstoff nicht weiter wachsen (Semenza, 2008). Im weiteren Verlauf

führen neuerliche mutagene Reize zur Entstehung weiterer Klone und zur Bildung neuer Blutgefäße (Neoangiogenese). Das weitere unkontrollierte Wachstum führt zur Selektion der aggressiveren Zellklone, die weiter zu malignen Neoplasien transformieren und invasive Tumore bilden (Progression) (Fritsch, 2009; Pitot, 1993). Heute wird davon ausgegangen, dass während dieser Entwicklung insgesamt 3-7 Änderungen erforderlich sind, damit aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle entsteht (Vohr, 2010).

Krebs ist eine sehr heterogene Erkrankung. Je nach Entstehungsort und Herkunft der Zellen werden unterschiedliche Eigenschaften und Verhaltensweisen beobachtet. Dennoch gibt es Gemeinsamkeiten in den Veränderungen zwischen Tumorzellen und normalen, nicht-entarteten Zellen. Hanahan & Weinberg (2000) beschreiben sechs grundlegende Eigenschaften („*Hallmarks of Cancer*“) von Tumorzellen, welche das maligne Wachstum fördern. Die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, die verringerte Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Umgehung bzw. Resistenz gegenüber der Apoptose, das unbegrenzte replikative Potenzial (Unsterblichkeit), die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) und die Eigenschaften zu invadieren bzw. zu metastasieren (Hanahan und Weinberg, 2000). Zu diesen, seit längerer Zeit bekannten, Eigenschaften von Tumorzellen werden in den letzten Jahren auch weitere Veränderungen im Rahmen der Krebsforschung beschrieben. So sind Veränderungen im Redox-Status und im Metabolismus von Tumorzellen neuere Aspekte in der Krebsforschung (Jorgenson et al., 2013; Hanahan und Weinberg, 2011). Eine metabolische Veränderung, die in vielen Tumorzellen beobachtet wurde, ist das Phänomen der „aeroben Glykolyse“ (Warburg, 1956), welche im Folgenden näher erläutert wird.

1.3.1 Die „aerobe Glykolyse“ - eine metabolische Veränderung in Tumorzellen

Der deutsche Arzt und Biochemiker Otto Heinrich Warburg entdeckte das Phänomen der „aeroben Glykolyse“ erstmals in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts, welches daher auch als der Warburg-Effekt bezeichnet wird (Warburg, 1956; Bertout et al., 2008). Warburg beobachtete, dass Tumorzellen Glukose auf eine andere Art und Weise verstoffwechseln als normale, nicht-entartete Zellen und eine erhöhte Glykolyserate mit einem erhöhten Glukoseverbrauch sowie eine erhöhte Laktatproduktion zeigen (Liberti und Locasale, 2016; Vander Heiden et al., 2009) In Anwesenheit von Sauerstoff wird

Glukose in normalen Zellen über die Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert, das im Anschluss in den Mitochondrien während der oxidativen Phosphorylierung zu CO₂ oxidiert wird. Sauerstoff dient hierbei als finaler Elektronenakzeptor und ist essentiell bei der Produktion von ATP (Heinrich et al., 2014; Rassow et al., 2006). In hypoxischen Zuständen, wenn die Sauerstoffversorgung nicht mehr ausreichend gewährleistet ist, kann die benötigte Energie über oxidative Phosphorylierung nicht mehr bereitgestellt werden. In Tumoren ab einer bestimmten Größe (über 0.5–1 mm) ist die Blutversorgung (Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen), nicht mehr gewährleistet, sodass es zu hypoxischen Zuständen in den Tumorzellen kommt (Vaupel, 2004). Tumorzellen haben einen erhöhten Energiebedarf. Daher wird die benötigte Energie in Form von ATP vermehrt über Glykolyse gewonnen, welche auch unter hypoxischen Bedingungen ablaufen kann (anaerobe Glykolyse) (Vander Heiden et al., 2009). Diese Veränderung wird u.a. über den Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) vermittelt (Semenza, 2008). Unter normoxischen Bedingungen bleibt HIF-1 inaktiv und wird erst bei Hypoxie aktiviert. HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten (α und β), welche von Zellen konstitutiv exprimiert werden. Wenn die Zelle genug Sauerstoff hat, wird die Untereinheit α von spezifischen Prolylhydroxylasen hydroxyliert, welche in Folge vom Von-Hippel-Lindau-E3-Ligase-Komplex erkannt und ubiquitiniert wird. Die Ubiquitinierung bewirkt dann den proteasomalen Abbau vom gesamten HIF-1. Unter hypoxischen Bedingungen werden Prolylhydroxylasen inaktiviert, sodass HIF-1 α nicht degradiert wird und HIF-1 somit stabil bleibt (Semenza, 2008; Vaupel, 2004). HIF-1 als Transkriptionsfaktor bindet im Zellkern an die sogenannten „*hypoxia response elements*“, die sich in der Promotorregion vieler Enzyme der Glykolyse, dem Glukosetransporter GLUT1 sowie dem Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) befinden. HIF-1 vermittelt somit die Expression von wichtigen glykolytischen Enzymen und Glukosetransportern, was zur Erhöhung der Glykolyserate führt (Masoud und Li, 2015). Als Resultat entstehen mehr Pyruvat und Laktat in den Zellen, was zur leichten Senkung des intrazellulären pH-Werts führt (Griffiths, 1991). Die Reduktion von Pyruvat zu Laktat ist notwendig, um NADH in oxidierter Form, als NAD⁺, zu erhalten, was für den Ablauf der Glykolyse notwendig ist (Heinrich et al., 2014; Rassow et al., 2006). Laktat wird über Transportproteine aus den Zellen heraustransportiert, wodurch es auch zur Senkung des extrazellulären pH-Werts kommt (Bertout et al., 2008; Vaupel, 2004; Gatenby und Gillies, 2004). Zusätzlich fördert HIF-1 die Neoangiogenese, indem Wachstumsfaktoren, wie VEGF, verstärkt exprimiert werden. Dadurch kommt es zur

Bildung neuer Blutgefäße und der Tumor wird wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, sodass es zum weiteren Wachstum und auch zur Metastasierung kommt (Masoud und Li, 2015; Vaupel, 2004). Auch ein erhöhter ROS-Gehalt kann zur Aktivierung bzw. Stabilisierung von HIF-1 führen, da erhöhte ROS-Mengen einer Hypoxie gleich kommen (Bonello et al., 2007). Warburg beobachtete, dass Tumorzellen den Großteil der aufgenommenen Glukose zu Pyruvat und Laktat umwandeln, obwohl genug Sauerstoff vorhanden ist. Er beschrieb, dass Tumorzellen nicht nur unter hypoxischen Bedingungen diesen veränderten Glukosemetabolismus zeigen, sondern auch unter normoxischen Bedingungen diesen Phänotyp beibehalten, weshalb dieses Phänomen auch als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet wurde (Abb. 1.4) (Vander Heiden et al., 2009; Gatenby und Gillies, 2004; Warburg, 1956).

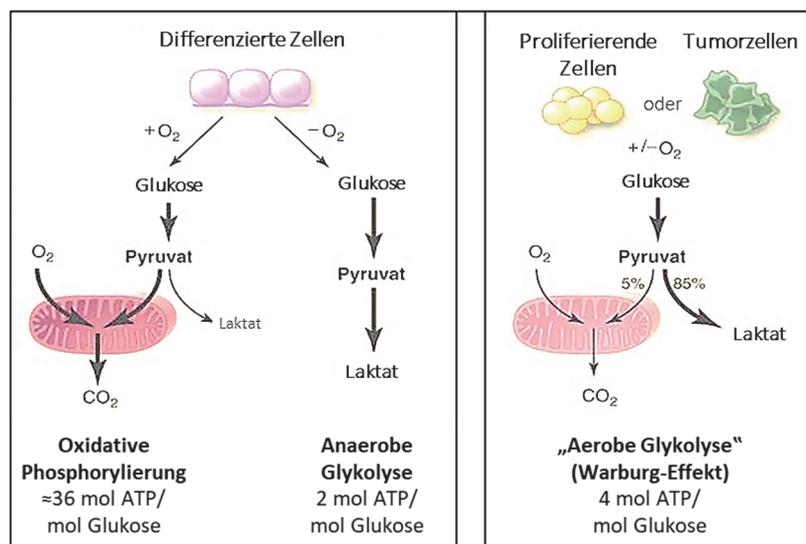


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung, der anaeroben Glykolyse und der „aeroben Glykolyse“ (Warburg-Effekt) (verändert nach Vander Heiden et al., 2009).

Heute ist bekannt, dass viele humane und tierische Tumorzelllinien diese metabolische Adaptation der „aeroben Glykolyse“ aufrechterhalten (Brown und Bicknell, 2001). Der Warburg-Effekt wurde in der Krebsforschung lange Zeit nicht beachtet. Heutzutage gewinnt er immer mehr an Bedeutung, sodass basierend auf dem Warburg-Effekte neue Diagnoseverfahren und Therapien entwickelt werden (Liberti und Locasale, 2016; Bensinger und Christofk, 2012). So ist eines der wichtigsten Diagnoseverfahren bei Krebserkrankungen die FDG-PET (Fluorodesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomografie), bei welcher durch Bildgebung Tumorzellen erfasst und quantifiziert werden können (Gatenby und Gillies, 2004). Die Abhängigkeit der Tumorzellen von der Glykolyse und infolgedessen der erhöhte glykolytische Flux wird im Rahmen der

Entwicklung alternativer Krebsmedikamente genutzt um therapeutisch wirksame Mittel herzustellen. So werden Inhibitoren an verschiedenen Stellen der Glykolyse entwickelt und als besonders wirksam gegen Tumorzellen gesehen, welche Resistenzen gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika zeigen (Pelicano et al., 2006). Ein Beispiel für eine unkonventionelle, antiglykolytische Krebstherapie stellt das Glukose-Analogen 2- Deoxy-D-Glukose (2-DG) dar, welche durch die Hexokinase phosphoryliert, jedoch nicht weiter metabolisiert werden kann und somit die Glykolyse zum Erliegen kommt (Zhang et al., 2006). Nicht nur mit pharmakologischen Inhibitoren, sondern auch mit einer ketogenen Ernährungsweise von Krebspatienten, wird versucht basierend auf dem Warburg-Effekt das Wachstum von Tumorzellen zu limitieren (Allen et al., 2014).

Die Ursachen für das Auftreten des Warburg-Effekts werden kontrovers diskutiert. Warburg postulierte, dass defekte Mitochondrien zur Störung der Respiration und somit zur Abhängigkeit der Zellen von der „aeroben Glykolyse“ führten (Srinivasan et al., 2016; Warburg, 1956). Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Ursachen konnten diese Hypothese weder bestätigen noch widerlegen. So gibt es Studien, die Mutationen in den mitochondrialen Genen der Tumorzellen zeigen, was die Hypothese von Warburg bestätigen würde (Gasparre et al., 2013; Taylor und Turnbull, 2005). Andere Studien hingegen zeigen, dass Tumorzellen eine erhöhte oxidative Phosphorylierung zeigen, wenn die Glykolyse inhibiert wird, was wiederum gegen die Hypothese von Warburg sprechen würde (Zheng, 2012). Aus diesen Studien ist erkennbar, dass ein Defekt in den Mitochondrien nicht die alleinige Erklärung für den Warburg-Effekt ist. Ebenso ist nicht vollständig aufgeklärt, warum Tumorzellen von einem effizienteren Stoffwechselweg zu einem weniger effizienten übergehen. Denn die oxidative Phosphorylierung liefert pro Molekül Glukose 32 ATP, während bei der Glykolyse nur 2 ATP-Moleküle entstehen (Abb. 1.4) (Vander Heiden et al., 2009). Heutzutage wird spekuliert, dass sich für die Tumorzellen eine Reihe von Vorteilen durch den Warburg-Effekt ergibt. Es ist bekannt, dass schnell proliferierende Zellen neben einem hohen Energiebedarf und einer schnellen ATP-Produktion auch eine gesteigerte Synthese und schnelle Bereitstellung von Makromolekülen benötigen (Keibler et al., 2016). Daher wird spekuliert, dass Tumorzellen über den Warburg-Effekt zum einen eine schnellere ATP-Synthese trotz geringerer Ausbeute erhalten und zum anderen Biomasse (Nukleotide, Aminosäuren, Lipide) bilden, indem sie zahlreiche Intermediate der Glykolyse als Kohlenstoffquelle über verzweigte Stoffwechselwege verwerten (Liberti und Locasale, 2016; Vander Heiden et al., 2009). Zudem kann Laktat unter anaeroben Bedingungen zur

Energiegewinnung genutzt werden und auch von umgebenden Zellen des Tumors als Energiequelle verwertet und den Tumorzellen bereitgestellt werden, was auch als der „reverse Warburg-Effekt“ bezeichnet wird (Guido et al., 2012; Pavlides et al., 2009).

1.4 Tumor-Stroma Interaktion

Tumor- und Stromazellen sind in der Lage miteinander zu kommunizieren und sich gegenseitig über Zell-Zell-Kontakte sowie die Sekretion von löslichen Faktoren (Wachstumsfaktoren und Cytokine), Chemokinen und Proteinen der extrazellulären Matrix zu beeinflussen (Santi et al., 2017; Stuhlmann et al., 2003). Diese Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und stromalen Komponenten, auch Tumor-Stroma Interaktion genannt, spielt eine zentrale Rolle in der Metastasierung und Tumorprogression (Cat et al., 2006; Werth et al., 2008; Bhowmick et al., 2004). Das Stroma ist das den Tumor umgebende Gewebe und besteht beispielsweise beim malignen Melanom aus Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen bzw. Immunzellen sowie extrazellulärer Matrix (Brandner und Haass, 2013). So wird beispielsweise die Invasion von Tumorzellen im Bindegewebe der Haut durch Fibroblasten bzw. Myofibroblasten beeinflusst. Myofibroblasten, auch als CAFs (*cancer associated fibroblasts*) bekannt, sind transdifferenzierte Fibroblasten, die eigentlich an Prozessen wie Wachstum, Entwicklung und Wundheilung des Gewebes beteiligt sind (Santi et al., 2017; Alili et al., 2014). Bei Verletzungen des Gewebes wandern die Myofibroblasten zusammen mit Immunzellen in das Wundgebiet ein und tragen zur Wundheilung und Narbenbildung bei (physiologische Invasion) (Darby et al., 2014; Li und Wang, 2011; De Wever und Mareel, 2002). Sie sind aber auch an pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen und Fibrosen beteiligt (Klingberg et al., 2013; Willis et al., 2005). Über die Sekretion von proinvasiven Wachstumsfaktoren sind sie auch in der Lage die Invasion bzw. die Metastasierung und so auch die Progression von Tumoren zu fördern (Cat und Brenneisen, 2009; Cat et al., 2006). Die Invasion von Tumorzellen stellt einen komplexen Vorgang dar, welcher ab einer bestimmten Größe des Primärtumors bei herrschendem Sauerstoff- und Nährstoffmangel initiiert wird. Hierbei sind Tumorzellen in der Lage, über einen parakrinen Mechanismus Einfluss auf die umliegenden tumornahen Fibroblasten zu nehmen und die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch die Bindung von TGF β 1 (*transforming growth factor β 1*) an Oberflächenrezeptoren von Fibroblasten zu vermitteln (Klemm und Joyce,

2015; Cat et al., 2006). TGF β 1 ist ein Zytokin, das von den Tumorzellen in das umliegende Gewebe sezerniert wird. Die Bindung von TGF β 1 an die Oberflächenrezeptoren von Fibroblasten aktiviert die NAD(P)H-Oxidase und es kommt zur Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts der Fibroblasten. Dies bedingt letztendlich die Transdifferenzierung zum Myofibroblasten (Alili et al., 2014). Die Myofibroblasten haben eine hohe endogene Produktion von Kollagen und bestehen zum Großteil aus Aktin- und Myosin-Filamenten, welche den Myofibroblasten die Eigenschaft der hohen Kontraktilität verleihen. Aufgrund der hohen Expression von kontraktilen Aktin- und Myosin-Filamenten ähneln Myofibroblasten auch den glatten Muskelzellen, welche sich ebenfalls durch eine hohe Kontraktilität auszeichnen (Mar et al., 2001). Diese prominenten Mikrofilamentbündel, die auch *stress fibers* genannt werden, zeigen einen hohen Anteil des Proteins α SMA (*α -smooth muscle actin*), welches ein charakteristisches Merkmal von Myofibroblasten ist und als Biomarker für die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten herangezogen werden kann (Alili et al., 2014; Cat et al., 2006). Myofibroblasten sind in der Lage große Mengen an Wachstumsfaktoren, wie HGF (*hepatocyte growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und IL-6 (Interleukin-6) in die Umgebung zu sekretieren, welche dann in der Erhöhung der invasiven Kapazität der Tumorzellen resultieren können (Otranto et al., 2012; Cat et al., 2006). Die Ausschüttung vom proangiogenen VEGF führt zur Rekrutierung von Endothelzellen und stimuliert deren Proliferation und Differenzierung (Yadav et al., 2015). Auch andere Wachstumsfaktoren sind an der Tumor-induzierten Neoangiogenese beteiligt. Durch die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche sowohl von den Tumorzellen als auch von stromalen Zellen wie Fibroblasten produziert und sezerniert werden, werden Basalmembran und extrazelluläre Matrix abgebaut und dadurch die Migration und letztendlich die Formation von neuen Blutgefäßen ermöglicht, sodass der Tumor wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird und weiter wachsen bzw. metastasieren kann (Fregnani et al., 2009; Ramos et al., 2004).

Der Eingriff in die Tumor-Stroma Interaktion bietet einen Ansatzpunkt für neuartige Krebstherapien. Durch die Hemmung der ROS-bedingten Transdifferenzierung zum Myofibroblasten wird die Ausschüttung der proinvasiven Signale gehemmt und somit die Invasion der Tumorzellen vermindert (Sampson et al., 2014). So wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Brenneisen Effekte von verschiedenen Antioxidantien in Hinsicht auf die Invasion von Tumorzellen untersucht. Hierbei wurden Fibroblasten mit Antioxidantien, wie N-Acetylcystein (NAC), behandelt um den ROS-Gehalt zu

minimieren und so die ROS-abhängige Transdifferenzierung zum Myofibroblasten zu verhindern. Infolgedessen wurde die Bildung und Sekretion von proinvasiven Signalen unterdrückt, sodass indirekt die Invasion der Tumorzellen vermindert wurde (Cat und Brenneisen, 2009; Cat et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die direkte Behandlung der Tumorzellen mit Antioxidantien zu einer Erhöhung der invasiven Kapazität führt (Alili et al., 2011). Aufgrund ihrer proinvasiven Effekte auf Tumorzellen eignen sich die eingesetzten Antioxidantien daher nicht für einen therapeutischen Ansatz bei Krebserkrankungen. In therapeutischen Ansätzen sollte neben den Erkenntnissen über den Einfluss auf Tumor-Stroma Interaktion auch die Auswirkung auf andere Zelltypen im Körper bedacht werden, da von einer systemischen Therapie neben Tumorzellen auch andere Zellen des Körpers betroffen sind und diese unterschiedlich auf jene reagieren können (Mendelsohn und Larrick, 2014; Alili et al., 2011).

1.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies, oft als ROS abgekürzt, sind Metabolite des molekularen Sauerstoffs und zeichnen sich durch radikalische und nicht-radikalische Eigenschaften aus. Radikale sind hochreaktive Atome oder Moleküle, die mindestens ein freies, ungepaartes Elektron in ihrem äußeren Orbital besitzen und wegen ihrer hohen Reaktivität sehr kurzlebig sind (Sies et al., 2017; Sies, 1997, 1993; Sies und Cadenas, 1985). Zu den radikalischen Formen des Sauerstoffs, welche hochreaktiv sind, gehören das Hydroxyl- ($\text{HO}\cdot$) und das Superoxidradikal ($\text{O}_2\cdot^-$), zu den nicht radikalischen Sauerstoffverbindungen, die eine höhere Stabilität aufweisen, das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Peroxynitrit ($\text{ONOO}\cdot$) und Lipidperoxide (LOOH). Moleküle, wie der Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), werden ebenfalls zu den ROS gezählt (Sies et al., 2017; Sies, 1993). In allen aeroben Organismen entstehen ROS als Neben- oder Zwischenprodukte des zellulären Metabolismus. Es gibt sowohl endogene als auch exogene Quellen von ROS in Zellen. Endogen entstehen ROS primär während der Atmungskette in den Mitochondrien, aber auch im Cytosol, in Peroxisomen und durch extramitochondriale, mit der Plasmamembran assoziierte Oxidasen (Fuchs-Tarlovsky, 2013; Gough und Cotter, 2011). In den Mitochondrien erfolgt die Synthese von ATP, dem Hauptenergieträger der Zelle, über oxidative Phosphorylierung. Dabei werden innerhalb der Atmungskette zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei ein

Protonengradient aufgebaut wird und neben ATP auch Wasser gebildet wird (Heinrich et al., 2014; Rassow et al., 2006). 1-3% des verbrauchten Sauerstoffs können währenddessen zu unerwünschten ROS umgesetzt werden (Valko et al., 2007). Dieser Prozentsatz kann durch Schädigung der Mitochondrien und einer fehlerhaft ablaufenden Atmungskette weiter gesteigert werden (Yaar und Gilchrest, 2007; Fosslie, 2001). Als Neben- oder Zwischenprodukte der Atmungskette können primär O_2^- und H_2O_2 und sekundär HO-Radikale freigesetzt werden, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität und abhängig von ihrer Konzentration und Lokalisation mit anderen zellulären Bestandteilen reagieren können (Turrens, 2003). Die hochreaktiven Hydroxylradikale können auch in Anwesenheit von freien Eisen (II)-Ionen durch die Reduktion von H_2O_2 in der sogenannten Fenton-Reaktion entstehen (Winterbourn, 1995). Andere endogene ROS-Quellen sind enzymatisch katalysierte Reaktionen. So wird beispielsweise H_2O_2 als Nebenprodukt von verschiedenen Oxidasen in den Peroxisomen gebildet (Del Rio und Lopez-Huertas, 2016) und Superoxidanionradikale durch die Reaktion von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (CYPs) des Fremdstoffmetabolismus und die Xanthin-Oxidase entstehen (Hrycay und Bandiera, 2015; Galbusera et al., 2006; Sapone et al., 2003). Auch die Superoxid-Dismutase (SOD), welche meist als ein antioxidatives Enzym betrachtet wird, trägt gewissermaßen zur Bildung von ROS bei, da sie die Reaktion von O_2^- zu H_2O_2 katalysiert. Nur in Verbindung mit dem Enzym Catalase kann H_2O_2 zu molekularem Sauerstoff und Wasser detoxifiziert werden (Wakamatsu et al., 2008). Im aeroben Organismus entstehen ROS nicht nur als Neben- oder Zwischenprodukt, sondern werden auch absichtlich gebildet, um beispielsweise im Rahmen der angeborenen Immunantwort, Bakterien zu bekämpfen (*respiratory burst*). In phagozytischen Zellen, wie z.B. Makrophagen, katalysiert das Enzym NAD(P)H-Oxidase, unter Verbrauch von NAD(P)H, die Bildung von Superoxid aus molekularem Sauerstoff. Aus dem Superoxid können weitere ROS gebildet werden, die u.a. zelluläre Bestandteile von phagozytierten Erregern angreifen und diese zerstören (Forman und Torres, 2002). Auch in anderen Zellen, wie Fibroblasten werden ROS in Form von Superoxid als Antwort auf verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren (z.B. TGF β 1) oder Interleukine (IL-6) über die NAD(P)H-Oxidase gebildet (Cat und Brenneisen, 2009; Cat et al., 2006). Exogen können ROS u.a. durch UV- oder ionisierende Strahlung, Xenobiotika sowie bakterielle und virale Infektionen verursacht und gebildet werden (Ahmad et al., 2017; Jesenak et al., 2017; Sies, 1993).

ROS können abhängig von ihrer Konzentration und Lokalisation mit zellulären Bestandteilen wie DNA, Lipiden und Proteinseitenketten reagieren und zu verschiedenartigen Schäden führen (Reczek und Chandel, 2015; Valko et al., 2006; Laval, 1996). Bei der oxidativen Schädigung der DNA durch ROS entstehen Einzel- sowie Doppelstrangbrüche und DNA-Addukte wie z.B. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin (8-OHdG). ROS zählen daher zu potentiellen Kanzerogenen, weil die induzierten Schäden zu Mutationen führen können, welche im Weiteren die Tumorentstehung fördern (Manda et al., 2009; Pitot, 1993). Lipide reagieren sehr sensitiv gegenüber ROS mit radikalischen Eigenschaften, sodass die Reaktion von ROS mit Lipiden über die Auslösung einer Kettenreaktion zu Lipidperoxidation führen kann, welche u.a. den oxidativen Abbau von Phospholipiden und Cholesterol verursacht (Ganten und Ruckpaul, 2006). Durch die Lipidperoxidation kann es zu einer veränderten Permeabilität und zur Deformation der Membran kommen. Außerdem entstehen bei der Lipidperoxidation weitere reaktive Produkte, wie z.B. Malondialdehyd (MDA), welche wiederum zu anderen Schäden führen können (Manda et al., 2009). Die Folgen einer Lipidperoxidation stehen in engem Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedener Herzkreislauferkrankungen (Rivera et al., 2006; Lucas und Szweda, 1998). In Proteinen verursachen ROS spezifische, reversible sowie irreversible oxidative Schäden bzw. Modifikationen, welche deren Aktivität und Funktion beeinflussen (Reczek und Chandel, 2015; Birben et al., 2012). In Proteinen kann nahezu jede Aminosäure durch ROS oxidiert werden (Dunlop et al., 2009). Besonders empfindlich für Oxidations- (und auch Reduktions-) Reaktionen sind Thiole in Cysteinresten, welche neben der Bildung von z.B. Disulfidbrücken zu Sulfen (RSOH)-, Sulfin (RSO₂H)- oder Sulfon (RSO₃H)-säuren oxidiert werden können. Sulfensäuren entstehen als Resultat einer H₂O₂-vermittelten Oxidation der Thiolgruppen in Cysteinen (Gupta und Carroll, 2014; Paulsen und Carroll, 2013; Lo Conte und Carroll, 2013). Die Bildung von Sulfensäuren ist reversibel, besteht jedoch fortdauernd oxidativer Stress in der Zelle, kommt es zu einer „Überoxidation“ und die Sulfensäure wird weiter zu Sulfin- bzw. Sulfonsäure oxidiert. Letztere sind, wie die Einführung von Carbonylgruppen an Seitenketten von Proteinen, eine irreversible Schädigung und können im proteasomalen Abbau von Proteinen resultieren (Cai und Yan, 2013).

Neuerlich wird bezüglich der oxidativen Regulation von Proteinen und Metaboliten vom sogenannten *Redox-Code* gesprochen. Dieser von P. Jones und H. Sies (2015) beschriebene Code basiert auf bioenergetisch-metabolischen, regulatorischen, raumzeitlichen und adaptiven Grundsätzen. ROS, wie das Superoxidanionradikal und

Wasserstoffperoxid, spielen im *Redox-Code* als das modulierende System von metabolischen Redoxsystemen eine bedeutende Rolle. Der Redoxmetabolismus hat maßgeblichen Einfluss auf die Struktur und die damit verbundene regulatorische Funktion des Thiolsystems der Zelle, was zum einen aus dem GSH/GSSG-Pool und zum anderen hauptsächlich aus dem Cystein (Cys)-Proteom besteht. Es wird angenommen, dass unter physiologischen Bedingungen das Cys-Proteom ein spezifisches Muster an reduzierten und oxidierten Thiolen zur Aufrechterhaltung der zellulären (Redox-) Homöostase und Regulation von wichtigen zellulären Prozessen aufweist. Kippt das System aufgrund von oxidativem Stress, kann es zu pathophysiologischen Zuständen kommen (Jones und Sies, 2015).

1.5.1 Oxidativer Stress

Als Resultat einer gesteigerten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entsteht in der Zelle oxidativer Stress, welcher zu Schäden an zellulären Strukturen führen kann (Sies et al., 2017; Sies, 1997, 1993; Sies und Cadenas, 1985). So gilt oxidativer Stress als Ursache einer ganzen Reihe von Krankheiten wie Krebs, Diabetes sowie neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen und ist auch mit dem Alterungsprozess assoziiert (Waris und Ahsan, 2006). Die Regulation und Kontrolle der Bildung von ROS in Zellen und die daraus resultierende Aufrechterhaltung der ROS-abhängigen Homöostase ist entscheidend für das Schicksal einer Zelle (Collins et al., 2012). So wird der oxidative Stress neuerlich auch unterschieden in oxidativen Eustress (Redoxregulation) und oxidativen Distress (oxidative Schädigung) (Sies et al., 2017). Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Entstehung und Eliminierung von ROS. In nicht schädlichen Konzentrationen sind ROS als Mediatoren bzw. sekundäre Botenstoffe in zelluläre Signaltransduktionswege involviert, die wichtige biochemische und physiologische Prozesse wie Inflammation, Proliferation und Zelltod beeinflussen. Heutzutage werden die Prozesse, an denen ROS beteiligt sind, auch unter dem Begriff *redox signaling* zusammengefasst (Sies, 2017; Jones und Sies, 2015; Sies, 2014). Wird jedoch dieses Gleichgewicht gestört und zugunsten der Bildung von ROS verschoben, akkumulieren ROS in der Zelle und es entsteht oxidativer Stress. Daher ist oxidativer Stress auch als ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und der Eliminierung dieser durch protektive Mechanismen des antioxidativen Systems definiert (Sies, 1997, 1993). Die konzentrationsabhängige Wirkung von ROS

folgt somit dem sogenannten Hormesis-Prinzip (Ludovico und Burhans, 2014). Der Begriff Hormesis kommt aus dem Bereich der Toxikologie und beschreibt im weitesten Sinn eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Ein Hormesis-Effekt liegt vor, wenn eine Behandlung mit einem Stressor, der chemischer oder biologischer Art sein kann, in geringen Konzentrationen eine positive Wirkung auf den Organismen hat, während hohe Konzentrationen dieses Stressors in schädlichen Effekten resultieren (Gems und Partridge, 2008). Entsprechend dem Hormesis-Effekt ist beschrieben, dass ROS in physiologischen Konzentrationen adaptive Stressantworten der Zelle stimulieren und so die antioxidative Schutzkapazität erhöhen, um gegen nachfolgende oxidative Schäden zu schützen. ROS in pathologischen Konzentrationen können hingegen den Schwellenwert der maximalen Reparaturkapazität der Zelle überschreiten und zu irreversiblen Schäden führen (Calabrese et al., 2011). Der Erhalt des Redoxgleichgewichts wird als „das goldene Mittel des gesunden Lebens“ bezeichnet und wird vorwiegend durch Prävention, Eliminierung von ROS sowie Reparatur von oxidativen Schäden aufrechterhalten (Sies et al., 2017).

1.5.2 Das antioxidative Schutzsystem

Zum Schutz vor Schädigung durch ROS bzw. oxidativem Stress verfügt die Zelle über ein antioxidatives Schutzsystem. Über sogenannte Antioxidantien können ROS abgefangen werden, bevor oxidativer Stress entsteht und es zur Schädigung bzw. Modifikation von Makromolekülen kommt. Als Antioxidantien werden Substanzen bezeichnet, die im Vergleich zu den Oxidantien in niedrigen Konzentrationen vorliegen und die Oxidation zellulärer Moleküle durch Oxidantien verhindern oder signifikant inhibieren (Gutteridge und Halliwell, 2010; Halliwell und Gutteridge, 1995). Dafür können sie direkt oder indirekt mit ROS reagieren, sodass die Oxidation anderer Zellkomponenten verhindert wird. Antioxidantien können in enzymatische und niedermolekulare, nicht enzymatische unterteilt werden (Mironczuk-Chodakowska et al., 2017). Nicht enzymatische Antioxidantien werden unterschieden in hydrophile und hydrophobe Substanzen. α -Tocopherol (Vitamin E), Carotinoide und Ubiquinol sind Beispiele für hydrophobe, nicht enzymatische Antioxidantien, die hauptsächlich in Membranen und Lipoproteinen vorkommen. Zu den hydrophilen, nicht enzymatischen Antioxidantien gehören Glutathion (GSH) und Ascorbat (Vitamin C), die v.a. im Cytosol, in den Mitochondrien und im Zellkern wirken (Zhou et al., 2014; Sies, 1993). Das

Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin) ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin und eines der am häufigsten vorkommenden Antioxidantien in der Zelle. Es dient als Redoxpuffer gegen ROS und schützt zelluläre Moleküle vor ROS, indem es selber oxidiert wird. Zwei oxidierte GSH-Moleküle bilden unter der Wirkung von z.B. Glutathion-Peroxidasen das Glutathiondisulfid (GSSG). Aus dem Disulfid werden über die GSH-Reduktase unter Verbrauch von NADPH wieder zwei Moleküle GSH, die wiederum bei der Detoxifikation von radikalischen sowie elektrophilen Substanzen eine Rolle spielen (Forman, 2016; Arteel und Sies, 2001). Außerdem können ROS-vermittelt oxidierte Thiole in Cysteinen von Proteinseitenketten durch GSH reduziert werden. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen der Thiolgruppe des Cysteins und dem GSH. Diese sogenannte Glutathionylierung dient dem Schutz der Proteine vor irreversibler Überoxidation der Cysteine, welche bei bestehendem oxidativem Stress schädliche Auswirkungen auf Zellen haben. Glutathionylierte Proteine können im Weiteren wieder deglutathionyliert werden (Gallogly und Mieyal, 2007). Zu den wichtigsten, enzymatischen Antioxidantien gehören Superoxid-Dismutasen, Catalasen, die Glutathionperoxidasen (GPx) und Glutathion-S-Transferasen (GST). Superoxid-Dismutasen (SOD) katalysieren die Disproportionierung des Superoxidanionradikals zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (Wakamatsu et al., 2008; Sies, 1993). Im Säuger gibt es drei Isoformen der SOD, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen: die induzierbare mitochondriale Mangan-SOD und zwei Kupfer/Zink-SOD, von denen eine cytosolisch und die andere extrazellulär vorkommt. Das gebildete Wasserstoffperoxid wird dann in einem weiteren Schritt über das Enzym Catalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut (Fukai und Ushio-Fukai, 2011). Auch durch die GSH-abhängige GPx kann das gebildete Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert werden (Lubos et al., 2011) (Abb. 1.5).

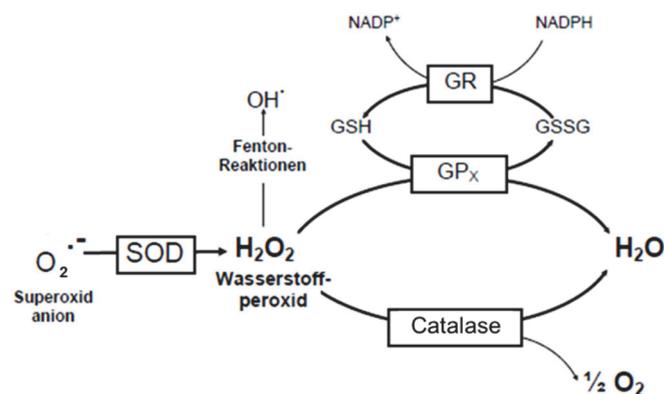


Abb. 1.5 Teil des zellulären antioxidativen Schutzsystems (verändert nach Wakamatsu et al., 2008).

1.5.3 Bedeutung von ROS in Tumorzellen

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen, nicht-entarteten Zellen in vielen Aspekten. Einige der Unterschiede sind gut bekannt, während andere erst kürzlich entdeckt wurden und weniger gut verstanden sind. Zu den bekannten gehören neben dem unkontrollierten Wachstum, Veränderungen der Zell-Zell-Kommunikation, des Metabolismus und der Zelladhäsion (Gogvadze et al., 2008; Hanahan und Weinberg, 2000, 2011). Heutzutage ist bekannt, dass auch der Redox-Status von Tumorzellen verändert ist, sodass Tumorzellen basal einen höheren ROS-Gehalt aufweisen als normale Zellen und infolgedessen auch vermehrt ROS-bedingte Oxidationsprodukte akkumulieren (Liou und Storz, 2010; Verschoor et al., 2010; Pelicano et al., 2004). Bedingt durch den höheren ROS-Gehalt ist auch das antioxidative Schutzsystem in Tumorzellen stark überlastet. Es ist beschrieben, dass viele Enzyme des antioxidativen Systems überexprimiert sind, um ROS zu entgiften, was nahe legt, dass ein empfindliches Gleichgewicht der intrazellulären ROS-Spiegel für die Krebszellfunktion erforderlich ist (Peiris-Pages et al., 2015; Liou und Storz, 2010). So zeigen Tumorzellen eine erhöhte Aktivität von antioxidativen Enzymen, wie etwa der Superoxid-Dismutasen (SODs) und Catalasen (Castaldo et al., 2016; Oberley und Oberley, 1997). Trotz des verstärkten antioxidativen Schutzsystems ist das Redoxgleichgewicht der Tumorzellen zugunsten der Oxidantien verschoben, welches sich im Verhältnis von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) widerspiegelt. Unter physiologischen Bedingungen der Zelle beträgt das Verhältnis im Cytoplasma zwischen 100:1 und 1000:1, während in Tumorzellen das Verhältnis zugunsten von GSSG verschoben ist (Hermann et al., 2014). In *in vitro* Studien konnte auch gezeigt werden, dass nahezu alle Tumorarten hohe ROS-Mengen beinhalten, indem sie u.a. konstitutiv hohe Mengen an O_2^- und H_2O_2 produzieren (Lennicke et al., 2015; Liou und Storz, 2010). Hohe ROS-Mengen liegen in Tumorzellen mittels des enzymatischen und nicht enzymatischen antioxidativen Systems unterhalb einer cytotoxischen Schwelle, haben jedoch verschiedene Auswirkungen für die Tumorzellen. So wird durch Mutationen die genomische Instabilität erhöht und damit die Tumorpromotion gefördert (Pelicano et al., 2004). Zudem können ROS proliferationsregulierende Signalwege modulieren, z.B. über die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges oder über mehrere redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B, HIF-1 und AP-1, sodass die Proliferation der Tumorzellen gesteigert werden kann (epigenetischer Mechanismus) (Afanas'ev, 2014, 2011; Waris und Ahsan, 2006). Des Weiteren können ROS das invasive Verhalten der Tumorzellen

steigern und die Metastasierung fördern (Tse et al., 2012; Manda et al., 2009). ROS spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Progression von Krebs, besonders von Hautkrebs, da UV-Strahlung als wichtigster Risikofaktor bei der Pathogenese die Bildung von ROS verursacht (Leischner, 2017; Waris und Ahsan, 2006). Es gibt verschiedene endogene ROS-Quellen in Tumorzellen, von denen die Mitochondrien als primäre ROS-Quelle gelten (Manda et al., 2009). Da in Tumorzellen Mutationen häufiger in der mitochondrialen DNA beobachtet werden und diese für Komponenten der Atmungskette kodiert, läuft die Atmungskette in den Tumorzellen oft fehlerhaft ab, was zur vermehrten Bildung von ROS führt (Sullivan und Chandel, 2014; Manda et al., 2009; Pelicano et al., 2004). Eine weitere endogene ROS-Quelle in Tumorzellen ist die NAD(P)H-Oxidase, die das Superoxidanionradikal produziert (Alili et al., 2011; Manda et al., 2009). Melanomzellen zählen zu den Tumorarten mit einem hohen intrazellulären ROS-Gehalt, welcher neben den erwähnten ROS-Quellen auch in Folge der erhöhten Melaninsynthese entsteht. Für die Melaninsynthese, genauer für die Synthese des Pheomelanins, wird Cystein benötigt, welches auch ein Bestandteil von GSH ist. Als Resultat einer erhöhten Melaninsynthese in Melanomzellen kann GSH nicht mehr ausreichend gebildet werden, sodass ROS durch GSH weniger gut abgefangen werden können und es dadurch zu einer weiteren Erhöhung des ROS-Gehalts kommt (Jenkins und Grossman, 2013; Wittgen und van Kempen, 2007). Der veränderte Redox-Status von Tumorzellen stellt einen Ansatzpunkt für neuartige Krebstherapien dar. Bei redox-modulierenden Therapieansätzen werden grundsätzlich zwei gegenläufige Ansätze unterschieden (Wondrak, 2009). Zum einen wird über antioxidativ wirkende Substanzen versucht, den ROS-Gehalt der Tumorzellen zu verringern, um so einen Zellzyklusarrest mit anschließender Induktion der Apoptose zu erreichen. Zum anderen wird in prooxidativen Therapieansätzen der ROS-Gehalt stärker erhöht, weil Tumorzellen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber weiteren Erhöhungen des ROS-Gehalts zeigen (Wondrak, 2009; Schumacker, 2006). Eine weitere Erhöhung des ROS-Gehalts kann zum Absterben der Tumorzellen führen, während nicht-entartete Zellen über eine Adaptation des endogenen antioxidativen Systems, welche in den Tumorzellen nicht mehr möglich ist, die Erhöhung kompensieren und nicht absterben (Panieri und Santoro, 2016; Sullivan und Chandel, 2014). Konventionelle Chemotherapeutika wurden lange Zeit wegen zellteilungshemmender Eigenschaften eingesetzt, wobei mittlerweile auch gezeigt wurde, dass diese ebenfalls redox-aktiv sein können und ihre cytotoxische Aktivität teilweise über die Generierung von oxidativem Stress ausüben (Manda et al., 2009).

1.6 Konventionelle Chemotherapie von Krebserkrankungen

Als Chemotherapie wird die Behandlung von Krebszellen mit Substanzen bezeichnet, die gezielt das unkontrollierte Wachstum bzw. die Proliferation von Tumorzellen hemmen. Diese Substanzen werden auch als Cytostatika bezeichnet (Leischner, 2017; Zitvogel et al., 2013). Cytostatika greifen in den Zellzyklus der Zellen ein oder hemmen Prozesse, die mit der Zellteilung assoziiert sind und führen letztendlich zur Induktion von Apoptose in (Tumor-)zellen (Leischner, 2017; Kaufmann und Earnshaw, 2000). Cytostatika haben unterschiedliche Wirkmechanismen und greifen in verschiedene Stadien des Zellzyklus ein, weshalb sie auch in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Neben Alkylantien, Platinverbindungen, Taxanen, usw., gibt es die Stoffgruppe der Anthracyclin-Derivate, die eine große Klasse von Antibiotika mit cytostatischen Eigenschaften repräsentieren. Ein in der Krebstherapie häufig verwendetes Anthracyclin ist Doxorubicin, das ein breites Wirkspektrum hat (Beretta und Zunino, 2008; Minotti et al., 2004a). Doxorubicin wirkt sowohl als interkalierende Substanz in die DNA als auch als ein sogenannter Redox-Cycler. Die NADPH-abhängige Ein-Elektron-Reduktion von Doxorubicin resultiert in der Bildung eines Semichinon-Radikals, welches weitere Radikalreaktionen auslöst und primär das Superoxidanionradikal produziert (Keizer et al., 1990). Die konventionelle Chemotherapie von Krebserkrankungen ist meist mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden, da neben den Tumorzellen auch normale (gesunde) Zellen, insbesondere schnell proliferierende Zellen, wie die der Haarwurzel, Magenschleimhaut und des blutbildenden Systems, von der Therapie beeinflusst und zerstört werden. Daher ist eine Chemotherapie oft mit vielen unerwünschten Nebenwirkungen wie Haarausfall, Übelkeit und Immunsuppression verbunden (Leischner, 2017; Graefe et al., 2011). Neben diesen als „klassisch“ bezeichneten Nebenwirkungen treten im Rahmen einer Chemotherapie abhängig von der eingesetzten Substanz auch organspezifische Nebenwirkungen, wie die Kardiotoxizität nach klinischer Anwendung von Doxorubicin, auf (Tokarska-Schlattner et al., 2006; Minotti et al., 2004a; Keizer et al., 1990). In den meisten Fällen kommt es aufgrund dieser Nebenwirkungen zur Unterbrechung der Therapie. Auch die Bildung einer Chemoresistenz geht mit einer ineffizienten Therapie einher (Alfarouk et al., 2015). In Melanomzellen beispielsweise führt die übermäßige Bildung von Transportproteinen, wie die der Gruppe der *Multidrug Resistance-Related Proteins* (MRP), auf ihrer Oberfläche, die den Transport des chemotherapeutischen Mittels aus den Zellen ermöglichen, zur Herabsetzung der Wirkung (Helmbach et al., 2001; Grossman und

Altieri, 2001). Zur Verbesserung der Therapie und Erhöhung der Heilungschancen wird oft eine Polychemotherapie empfohlen, die jedoch auch stark mit Nebenwirkungen verbunden ist. Aufgrund der genotoxischen Wirkung von nahezu allen chemotherapeutischen Mitteln besteht bei einer Mono- und Polychemotherapie die Gefahr der Bildung von sogenanntem *secondary cancer*, da Cytostatika auch als potentiell kanzerogen eingestuft werden und Mutationen die Initiation sowie Progression von Tumoren anderen Ursprungs verursachen können (Dong und Chen, 2014; Boffetta und Kaldor, 1994). Die Entwicklung von alternativen Ansätzen in der Krebstherapie ist von großer Bedeutung.

1.7 Nanomedizin – eine Alternative in der Krebstherapie

Der Begriff Nanomedizin beschreibt den Einsatz von Nanotechnologien in der Medizin. Nanotechnologien werden als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts betrachtet (Venugopal und Ramakrishna, 2016). Die Anwendung der Nanotechnologie kann in jedem Bereich der Medizin stattfinden, sodass die Nanomedizin in weitere Fachgebiete, wie beispielsweise die Nanoonkologie, Nanoneurologie oder Nanokardiologie, unterteilt werden kann (Jain, 2008). In der Nanotechnologie kommen Strukturen zum Einsatz, die einen Durchmesser von kleiner als 100 nm haben. Definitionsgemäß beschreibt der Begriff Nanopartikel (nano = Zwerg, griechisch) den Verbund von wenigen bis tausenden Atomen oder Molekülen. Aufgrund ihrer geringen Größe haben Nanopartikel ein großes Oberflächen-Volumen Verhältnis, was den Partikeln eine hohe chemische Reaktivität verleiht und sie maßgeblich von ihren Feststoffen unterscheidet (Zink, 2010). Die Größe von Partikeln beeinflusst demnach ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften und damit auch ihre Wirkung. Bei gleicher Zusammensetzung aber unterschiedlicher Größe können sich die Wirkungen der Partikel stark unterscheiden (Albanese et al., 2012; Murdock et al., 2008). Obwohl die Anwendung von Nanomedizin noch in den Anfängen ist, wurden bereits verschiedene, vielversprechende Ansätze im Bereich der Nanomedizin entwickelt, von denen sich einige auch in der klinischen Anwendung befinden (Schroeder et al., 2011). Zu den wichtigsten Anwendungen gehören *Drug Delivery* in der Nanoonkologie, ein Verfahren bei dem Nanopartikel für den Transport von Wirkstoffen im menschlichen Körper eingesetzt werden und *Nanodiagnosics*, der Einsatz von Nanopartikeln, um die medizinische Diagnostik zu verbessern. Auch sogenannte *Nanopharmaceuticals*, Nanoformulatore von bereits erprobten Wirkstoffen oder

Nanopartikel selbst als pharmakologische Wirkstoffe, finden Anwendung im medizinischen Bereich (Berkner et al., 2016; Horstkotte und Odoerfer, 2012). Der Einsatz von Nanopartikeln im Bereich der Onkologie bietet neue therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung von Krebserkrankungen, welche weltweit die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen sind (Global Burden of Disease Cancer et al., 2015; Jain, 2010). Die Entwicklung neuer Strategien, wie einer frühzeitigen Diagnostik und einer verbesserten Therapie, sind von enormer Wichtigkeit, da die Inzidenz von Krebserkrankungen immer mehr zunimmt und die Behandlungsmöglichkeiten immer noch stark begrenzt sind (Jabir et al., 2012). Allerdings benötigt die Anwendung von Nanopartikeln eine gründliche Aufklärung über die Wirkung im menschlichen Körper, damit schädliche Wechselwirkungen mit dem Organismus vermieden werden und ein sicherer Einsatz gewährleistet werden kann (Asati et al., 2010; Hristozov und Malsch, 2009).

1.7.1 Ceroxid-Nanopartikel

Das chemische Element Cer (Ce, Ordnungszahl 58), auch Cerium genannt, ist ein Metall der Gruppe der Lanthanoide und gehört zu den „Seltene Erden“. Das Metall wurde im Jahre 1814 von J. J. Berzélius, W. Hisinger und M. H. Klaproth entdeckt und nach dem Kleinplaneten Ceres benannt. Cer ist das einzige Element der „Seltene Erden“, das in zwei Oxidationsstufen vorkommt. Es kommt in den Oxidationsstufen III (Ce^{3+}) und IV (Ce^{4+}) vor. In der Natur kommt Cer zusammen mit anderen Lanthanoiden in sogenannten Ceriterden vor (Reinhardt und Winkler, 2000). Industriell wird Cer bzw. das Oxid von Cer vielseitig eingesetzt, wie z.B. in Katalysatoren für Kraftfahrzeuge sowie als UV-Absorber in der Glas- und Farbindustrie (Das et al., 2013; Korsvik et al., 2007). Seit kurzer Zeit wird Cer auch in der Nanotechnologie verwendet. Unter anderem werden aus Ceroxid ($\text{CeO}_2/\text{Ce}_2\text{O}_3$) Nanopartikel, die Ceroxid-Nanopartikel (CNP), synthetisiert. Aufgrund der Fähigkeit, zwischen den Oxidationsstufen III und IV wechseln zu können, verfügen CNP über redox-aktive Eigenschaften. Des Weiteren besitzen sie an ihrer Oberfläche Sauerstoffdefekte, auch Sauerstoffvakanz genannt, die durch den spontanen Verlust eines Sauerstoffatoms oder seiner Elektronen zustande kommen (Pesic et al., 2015; Das et al., 2013; Karakoti et al., 2010; Korsvik et al., 2007; Das et al., 2007) (Abb. 1.6).

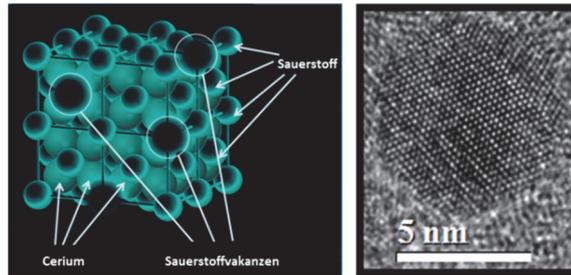


Abb. 1.6: Ceroxid-Nanopartikel (CNP) Struktur und HRTM (High Resolution Transmission Microscopy)-Aufnahme von CNP.

Die hohe Anzahl der Sauerstoffvakanz und das große Verhältnis der Oberfläche zum Volumen begünstigen die Redox-Aktivität der Partikel und ermöglichen eine katalytische Wirkung für Redox-Reaktionen (Korsvik et al., 2007). Durch seine autokatalytische Eigenschaft kann oxidiertes Cer (Ce^{4+}) wieder in den reduzierten Zustand (Ce^{3+}) gelangen und die Redox-Aktivität aufrechterhalten werden (Karakoti et al., 2010; Das et al., 2007). Es gibt zahlreiche Studien zur Aufklärung der Eigenschaften und Wirkungen der CNP *in vitro* und *in vivo*. *In vitro* wurden je nach Größe und Zelltyp unterschiedliche Effekte beobachtet. Auch andere Eigenschaften, wie Oberfläche, Aggregation sowie Form und Struktur, beeinflussen intrazelluläre Wirkungen von CNP (Sack-Zschauer et al., 2017b; Das et al., 2013; Dowding et al., 2013; Karakoti et al., 2012). So wurden in einigen *in vitro* Studien antioxidative und protektive Wirkungen gezeigt. Antioxidative Effekte von CNP konnten zum Beispiel in humanen Fibroblasten, Brustepithelzellen und murinen Makrophagen festgestellt werden, was sich an einer Abnahme des intrazellulären ROS-Gehalts zeigte (von Montfort et al., 2015; Alili et al., 2011; Hirst et al., 2009; Tarnuzzer et al., 2005). Durch die antioxidative Wirkung der Partikel wurden die Zellen vor Apoptose, Inflammation und weiteren ROS-bedingten Schädigungen geschützt (Das et al., 2013). So wurde beispielsweise in Epithelzellen durch CNP die Expression von antioxidativen Enzymen signifikant erhöht und Epithelzellen vor strahlungsinduzierter Zellschädigung geschützt (Colon et al., 2010). Jedoch wurden in anderen *in vitro* Studien auch prooxidative Effekte festgestellt. Der ROS-Gehalt und ROS-vermittelte oxidative Schädigungen waren in einigen humanen Krebszelllinien, wie Lungenkarzinom-, Plattenepithelkarzinom- und Melanomzellen signifikant erhöht, sodass infolgedessen Apoptose in den Tumorzellen eingeleitet wurde (Alili et al., 2013; Alili et al., 2011; Lin et al., 2006). Neben der prooxidativen und cytotoxischen Wirkung zeigten CNP auch antiinvasive und antiangiogene Effekte auf Tumorzellen. Die invasive Kapazität von Tumorzellen wurde durch CNP direkt und indirekt über die Hemmung der ROS-

abhängigen Transition von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die Sekretion von proinvasiven Signalen vermindert (Alili et al., 2013; Alili et al., 2011). So konnte auch gezeigt werden, dass CNP die Sekretion pro-invasiver und angiogener Signale wie VEGF verringern (Sack-Zschauer et al., 2017b). Der Einfluss von CNP auf Prozesse der Tumor-Stroma Interaktion ist in Abb. 1.7 gezeigt. In einem weiteren Ansatz wurde gezeigt, dass CNP im Rahmen einer Kombinationstherapie mit Doxorubicin, einem häufig verwendeten Cytostatikum aus der Gruppe der Anthracycline, eine synergistische Toxizität in Tumorzellen des malignen Melanoms zeigen, wohingegen in stromalen Fibroblasten eine protektive Wirkung gegenüber der cytotoxischen Substanz beobachtet werden kann. Zudem wurde gezeigt, dass CNP im Gegensatz zu konventionellen Chemotherapeutika nicht genotoxisch, aber dennoch antitumoral wirken (Sack et al., 2014).

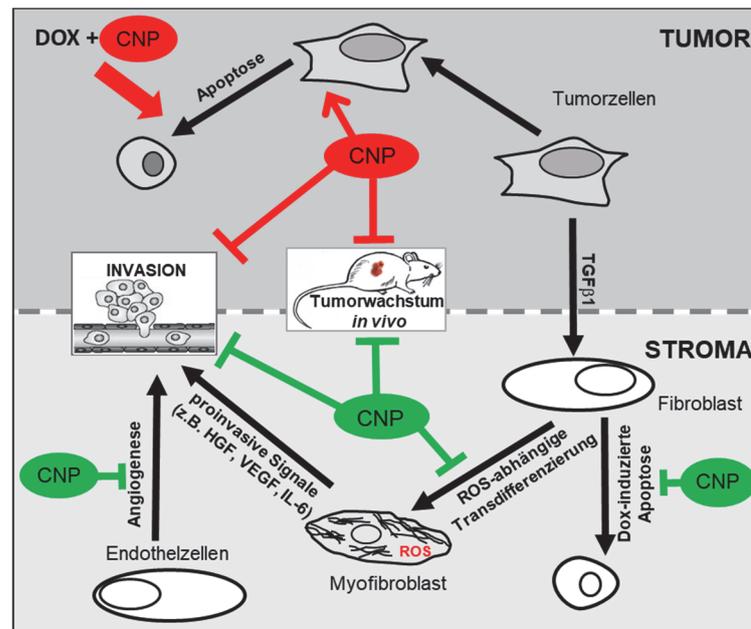


Abb. 1.7: Effekte von CNP auf Tumorzellen und stromale Zellen CNP zeigen in Tumorzellen prooxidative, cytotoxische und antiinvasive Effekte *in vitro* und *in vivo* (rot), in stromalen Zellen hingegen antioxidative, protektive und antiangiogene Effekte (grün). Der intrazelluläre Anstieg von ROS in Tumorzellen führt zur Induktion von Apoptose und Hemmung der Invasion. In Fibroblasten wird durch CNP die ROS-abhängige Transdifferenzierung zu Myofibroblasten gehemmt und somit indirekt die Invasion von Tumorzellen inhibiert, da weniger proinvasive Signale ausgeschüttet werden. CNP verstärken auch den cytotoxischen Effekt von Doxorubicin (DOX), während Fibroblasten vor DOX-induzierter Cytotoxizität geschützt werden. Außerdem hemmen CNP die Neoangiogenese (TGF β 1=transforming growth factor β 1; HGF=hepatocyte growth factor; VEGF=vascular endothelial growth factor; IL-6=Interleukin-6) (verändert nach Alili et al., 2013).

In *in vivo* Untersuchungen wurden ebenfalls antitumorale Aktivitäten von CNP beobachtet. Die Behandlung mit CNP führt zu einer signifikanten Abnahme des Tumorgewichts in einem Mausmodell mit Ovarialkarzinom (Giri et al., 2013) sowie auch

in einem Xenograft-Modell mit humanen Melanomzellen (Alili et al., 2013). Durch CNP treten keine adversen Effekte in gesunden Geweben bzw. Organen auf (Hirst et al., 2009; Colon et al., 2009). Darüber hinaus wurden durch *in vivo* Untersuchungen Erkenntnisse über die systemische Bioverfügbarkeit der Partikel gewonnen. So wurde festgestellt, dass CNP, welche Mäusen intraperitoneal injiziert wurden, in der Haut der Mäuse (12-20 ng CNP/g Hautgewebe) nachgewiesen werden konnten (Hirst et al., 2013; Alili et al., 2011). Mechanistische Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von CNP ergaben, dass diese über Enzym-mimetische Eigenschaften verfügen. In zellfreien Systemen zeigen CNP eine Superoxid-Dismutase (SOD)- und Catalase-mimetische Aktivität (Alili et al., 2011; Pirmohamed et al., 2010; Korsvik et al., 2007). Wie die Catalase-mimetische Aktivität der CNP abläuft, ist bisher nicht genau aufgeklärt. Für die SOD-mimetische Aktivität von CNP wird ähnlich der zellulären SOD eine zweistufige Reaktion angenommen, die in Abb. 1.8 dargestellt ist. Es wird vermutet, dass in der ersten Teilreaktion Ce^{4+} durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu Ce^{3+} reduziert wird, wobei molekularer Sauerstoff entsteht. In der zweiten Teilreaktion reagiert Ce^{3+} mit einem weiteren $\text{O}_2^{\cdot-}$ und zwei Protonen (H^+) zu H_2O_2 . Hierbei wird Ce^{3+} wieder zu Ce^{4+} oxidiert (Korsvik et al., 2007). Des Weiteren wurde eine pH-Abhängigkeit der SOD-mimetischen Wirkung von CNP festgestellt (Alili et al., 2011). Bei einem sauren pH-Wert war die SOD-mimetische Aktivität höher als bei neutralem pH-Wert. Aufgrund ihrer redox-aktiven Eigenschaften und der spezifischen Wirkungsweise bieten CNP ein hohes Potenzial hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung bei Krankheiten, die mit ROS und oxidativem Stress assoziiert sind (Das et al., 2013). Um eine sichere Anwendung zu gewährleisten, bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen.

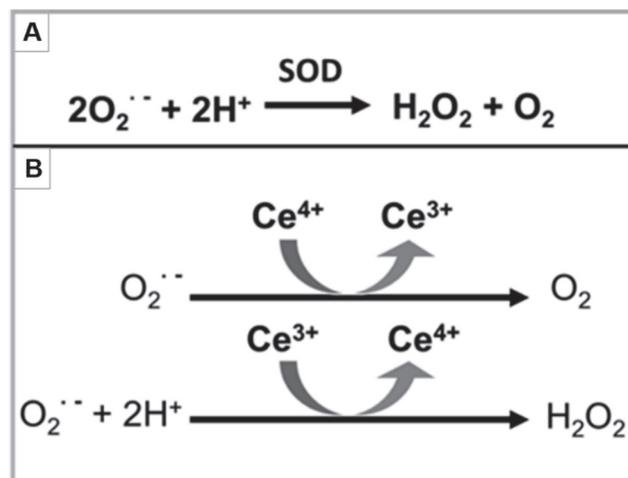


Abb. 1.8: Putatives Reaktionsschema von CNP Dargestellt ist die katalytische Reaktion der Superoxid-Dismutase (SOD) (A) und die in zwei Teilreaktionen ablaufende SOD-mimetische Aktivität von CNP im zellfreien System (B) nach Korsvik et al., 2007.

1.8 Ziel der Arbeit

Die Inzidenz von Krebserkrankungen, insbesondere von Hautkrebs, ist in den letzten Jahren stark angestiegen und Krebs ist heute die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen. Jedoch sind die Behandlungsmöglichkeiten sehr begrenzt. Vor allem die Behandlung der metastasierenden Form des malignen Melanoms, dem aggressivsten aller Hauttumore, ist aufgrund der Chemoresistenz von Melanomzellen sehr schwierig. Zudem kommt hinzu, dass die konventionelle Chemotherapie mit schweren Nebenwirkungen auf normale, gesunde Zellen einhergeht, wodurch der Einsatz stark limitiert wird. Die Entwicklung neuer und spezifischerer Therapien ist von großer Bedeutung. Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie ist es, den in Tumorzellen veränderten Redox-Status für therapeutische Zwecke zu nutzen. Da Tumorzellen im Vergleich zu nicht entarteten Zellen einen basal erhöhten ROS-Gehalt aufweisen, reagieren diese weitaus sensitiver auf eine weitere Erhöhung des ROS-Gehalts. Die Nutzbarkeit der Nanomedizin oder genauer einer nano-basierten Krebstherapie könnte hinsichtlich eines redox-modulatorischen Ansatzes erfolversprechende Möglichkeiten bei der Behandlung von Tumorerkrankungen liefern. Redox-aktive Ceroxid-Nanopartikel (CNP) zeigen prooxidative und cytotoxische Wirkungen in verschiedenen Tumorzelllinien und im Gegensatz dazu antioxidative und protektive Effekte in gesunden, nicht-entarteten Zellen. Die Aufklärung des Wirkmechanismus dieser bifunktional wirkenden CNP ist daher Ziel der vorliegenden Dissertation. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss redox-aktiver CNP einer bestimmten Größe auf Melanomzellen (A375) und normale (gesunde, stromale) Zellen untersucht werden. Bei der Entwicklung neuer Krebstherapien ist es von großer Bedeutung nicht nur Effekte auf Tumorzellen, sondern auch die Wirkung auf normale Zellen zu untersuchen, da zum einen bei einer Behandlung diese ebenfalls mit der Substanz in Kontakt kommen und zum anderen Tumorzellen und stromale Zellen sich gegenseitig beeinflussen können (Tumor-Stroma Interaktion). Dadurch können Einblicke über mögliche Nebenwirkungen gewonnen werden. Als Modell für stromale Zellen, wurden in dieser Arbeit primäre Melanozyten (NHEM), welche den normalen, nicht-entarteten Zelltyp von Melanomzellen repräsentieren und Fibroblasten (NHDF), welche den Hauptteil der Zellen der Haut bilden und zu den wichtigsten tumor-assoziierten, stromalen Zellen zählen, verwendet. Fragen zur zellulären Aufnahme, zur Toxizität und zur redox-modulatorischen Kapazität der CNP sollten mittels zellbiologischer, molekularbiologischer und biochemischer Methoden beantwortet werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

A375 – Humane maligne Melanomzellen

Bei der Zelllinie A375 handelt es sich um humane, amelanotische Zellen eines malignen Melanoms, welches einer 54-jährigen Frau entnommen wurde. Die Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Wesel) (ATCC® CRL-161™) erworben.

NHEM – Normale humane epidermale Melanozyten

NHEM sind normale humane epidermale Hautmelanozyten, die aus dem Präputium eines juvenilen Spenders stammen. Die Zellen sind kommerziell erhältlich (PromoCell, Heidelberg) (#C-12400). Für die Experimente wurden Zellen zwischen den Passagen 2 und 16 benutzt.

NHDF – Normale humane dermale Fibroblasten

NHDF sind normale humane dermale Hautfibroblasten, die ebenfalls aus Präputien juveniler Spender gewonnen wurden. Für die Experimente wurden kommerziell erhältliche Zellen (PromoCell, Heidelberg) (#C-12300) zwischen den Passagen 2 und 25 benutzt.

2.1.2 Nanopartikel

In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche Ceroxid-Nanopartikel (CNP) von der Firma Sciventions (Toronto, Kanada) verwendet. Die verwendeten CNP lagen in einer Konzentration von 1.5 mg/ml (~ 8.7 mM) in einer Acrylat-stabilisierten (1.27 mg/ml) wässrigen Suspension vor. Sie wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Neu erworbene CNP wurden vor experimenteller Verwendung auf Chargengleichheit mittels Größenbestimmung (DLS), Aufnahme des Transmissionsspektrums (UV/VIS Spektroskopie) und Cytotoxizität (MTT-Test) überprüft. Als Referenz wurden für manche Experimente Cer(IV)oxid-Nanopartikel (CNP-S) der Firma Sigma Aldrich

(Taufkirchen) verwendet. CNP-S weisen eine Größe von ≥ 25 nm auf und liegen in einer 10% (w/v) wässrigen Dispersion vor (100 mg/ml).

2.1.3 Chemikalien

2-DG	Sigma, Taufkirchen
APS analytical grade	Serva, Heidelberg
BHT	Sigma, Taufkirchen
Biolyte	BioRad, München
BSA (98%)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chaps	Sigma, Taufkirchen
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad, München
Coomassie® Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt
Dimedon	Sigma, Taufkirchen
DMEM (<i>low & high glucose</i>)	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
Doxorubicin Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100%) (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
FeCl ₂	Sigma, Taufkirchen
GAPDH	Sigma, Taufkirchen
GlutaMAX™	Gibco, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin $\geq 99.9\%$	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Merck, Darmstadt

H ₂ -DCF-DA	Sigma, Taufkirchen
H ₂ O ₂ , (30 Gew.%), stabilisiert	Sigma, Taufkirchen
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Iodoacetamid	Sigma, Taufkirchen
Melanocyte Einfriermedium	PromoCell, Heidelberg
Melanocyte Medium (<i>Growth & Basal</i>)	PromoCell, Heidelberg
Melanocyte Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	BioRad, München
MTT 98%	Sigma, Taufkirchen
N-Ethylmaleimid	Sigma, Taufkirchen
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, Egelsbach
PBS	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Merck, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Protein Assayreagenzien (A,B,S)	BioRad, München
Rotiphorese Gel 40 (37.5:1)	Roth, Karlsruhe
SDS Ultra Pure ≥ 99%	Roth, Karlsruhe
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
SOD	Abcam, Cambridge, UK
TBA	Merck, Darmstadt

TBP	Sigma, Taufkirchen
TCA	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Roth, Karlsruhe
TMP	Sigma, Taufkirchen
Tris Pufferan $\geq 99.9\%$	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Merck, Darmstadt
Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockfort USA
Xanthin	Sigma, Taufkirchen
Xanthinoxidase	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Kits

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

2D Quant Kit	GE Healthcare, Solingen
BrdU Cell Proliferation Assay Kit	Merck, Darmstadt
Colorimetric GAPDH Assay Kit	ScienCell, USA
DC TM Protein Assay Kit (nach Lowry)	BioRad, München
Human Apoptosis Array Kit	R&D Systems, USA
L-Lactate Assay Kit	Cayman Chemicals, USA
Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin

2.1.5 Lösungen und Puffer

4x SDS Probenpuffer (Laemmli-Puffer)	40% Glycerin 20% β -Mercaptoethanol 12% SDS 0.4% Bromphenolblau
--------------------------------------	--

10x SDS-Laufpuffer	10 g SDS 30.3 g Tris 144.1 g Glycin ad 1 L dH ₂ O
10x TBS-T	0.5 M Tris 1.5 M NaCl ad 1 L dH ₂ O 0.1% Tween
2D-Equilibrierungspuffer I	6 M Harnstoff 30% Glycerin 5% SDS 0.05 M Tris pH 8.8 1% DTT frisch zugegeben
2D-Equilibrierungspuffer II	6 M Harnstoff 30% Glycerin 5% SDS 0,05 M Tris pH 8.8 5% Iodoacetamid frisch zugegeben
2D-Lysepuffer	30 mM Tris 7 M Urea 2 M Thiourea 4% Chaps pH 7.5
2D-Rehydrierungspuffer	8 M Harnstoff 2 mM TBP 10 mM DTT 1% Chaps 0.25% Biolyte
Anodenpuffer I	0.3 M Tris 10% (v/v) MeOH ad 1 L dH ₂ O
Anodenpuffer II	pH 10.4 25 mM Tris 10% (v/v) MeOH ad 1 L dH ₂ O pH 10.4
Blockierlösung (Western Blot)	5% Milchpulver in 1x TBS-T

Coomassie-Färbelösung	0.05% Coomassie Brilliant Blue 20% MeOH 7.5% Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	50% Methanol 1% Essigsäure
Kathodenpuffer	25 mM Tris 10% (v/v) MeOH 40 mM Glycin ad 1 L dH ₂ O pH 9.4
Laufmittel HPLC	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ Puffer 50 mM; pH 6.5 MeOH im Verhältnis 6:4 (v/v)
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 pH 7.4
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris pH 6.8
SDS-Lysepuffer	1% SDS Protease Inhibitor Cocktail (Verdünnung 1/1000)
Trenngelpuffer	1.5 M Tris pH 8.8

2.1.6 Antikörper

Alle Primärantikörper wurden 1:1000, alle Sekundärantikörper 1:20000 in 5% Milchpulver in 1x TBS-T verdünnt.

Primärantikörper

Mouse-anti-human α -Tubulin	Sigma, Taufkirchen
Mouse-anti-human FDXR	Sigma, Taufkirchen

Polyclonal rabbit α -haptan-anti-sulfenic acid	entwickelt & hergestellt von K.S. Carroll (Seo und Carroll, 2009)
Rabbit-anti-human DDB2	Cell Signaling, Frankfurt a.M.
Rabbit-anti-human GAPDH	Sigma, Taufkirchen
Rabbit-anti-human SQSTM1/p62	Cell Signaling, Frankfurt a.M.

Sekundärantikörper

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

2.1.7 Molekulargewichtsstandard

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)

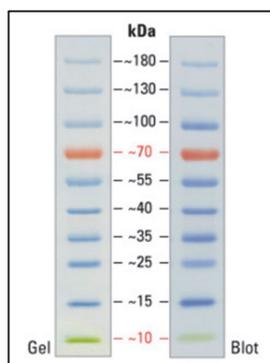


Abb. 2.1: Proteinmarker für die SDS-PAGE
(<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616>).

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Dispenser-Spitzen	Starlab, Hamburg
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Einmal-Spitzen	Starlab, Hamburg
Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe
HPLC-Säule (pKb-100, 250 x 4.6 mm)	Sigma, Taufkirchen
IPG-Streifen (pH 4-7, 11 cm)	BioRad, München

Kryotubes	Greiner Bio-One, Frickhausen
Objektträger	ThermoFisher Scientific, Egelsbach
PVDF-Membran	GE Healthcare, Freiburg
Protein Desalting Spin Columns	ThermoFisher Scientific, Egelsbach
Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Feather, Japan
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Whatman-Papier	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (75 cm ² & 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturplatten (24-Well & 96-Well Format)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellkulturschalen (Ø 3.5 cm, 6 cm, 10 cm)	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zellschaber	Corning Inc., Mexico

2.1.9 Geräte

2D-Apparaturen	BioRad, München
Analysen- & Feinwaage	Sartorius, Rimbach
Blotting Apparaturen (semi-dry)	Roth, Karlsruhe & BioRad, München
Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, USA
Clean Air Sterilwerkbank	ThermoFisher Scientific, Egelsbach
Fireboys	Integra Biosciences, Biebertal
Geldokumentationsanlage Fusion-FX7	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelkammer Novex Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Heizblock	Peqlab, Erlangen
Heiz- & Kühlblock PCH2 grant-bio	Grant Instruments Ltd., England
HPLC LaChrom	Merck, Darmstadt
Inkubator Binder	ThermoFisher Scientific, Egelsbach

Laborwaage	Sartorius, Rimbach
Lichtmikroskop DMIL	Leica, Wetzlar
Licht- & Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Bad Dürkheim
Magnetrührer	J&K IKAMAG®RCT, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiter Plate Reader FLUOstar Optima	BMG Labtech, Ortenberg
Mikrotiter Plate Reader Tecan infinite M200 pro	Tecan Ltd., Männedorf
Mikrotiter Plate Reader Victor 1420	Wallac, Freiburg
Milli-Q-Anlage	Millipore, Schwalbach
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Göttingen
pH-Meter HI221	Hanna Instruments, Kehl
Pipetboys	Integra Biosciences, Biebertal
Photometer Ultrospec 1000 & 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Powersupplier PowerPac Basic & HC	BioRad, München
Powersupply Consort EV265	Sigma, Taufkirchen
Protean IEF Cell	BioRad, München
Rollschüttler RM-5-Assistant	Braun, Melsungen
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	J&K IKAMAG®RCT, Staufen
Schüttler Rotomax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
UV-Bestrahlungseinheit BioSUN	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer	J&K IKAMAG®RCT, Staufen
Wasserbad Aqualine AL 25	Lauda, Königshofen
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.10 Software

Fusion Capt. Advance

GraphPad Prism 6.05

Image J Launcher

Microsoft Office 2013 (Excel, Word, Powerpoint)

Perseus 1.5.2.6 & 1.5.6.0

Zetasizer

2.2 Methoden

2.2.1 Zellfreie Methoden zur Charakterisierung der Nanopartikel

2.2.1.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (engl. *dynamic light scattering*, DLS) ist eine schnelle und präzise Methode zur Größenbestimmung kleinster Teilchen im Submikron-Bereich (wie z.B. Nanopartikel). Das Messprinzip beruht auf der Brown'schen Molekularbewegung der sich in Suspension befindenden Teilchen. Die Brown'sche Molekularbewegung von Teilchen verursacht die Streuung des auf die Probe gestrahlten Laserlichtes mit unterschiedlichen Intensitäten. Die Analyse und Auswertung dieser Intensitätsschwankungen liefert die Geschwindigkeit der Brown'schen Molekularbewegung, aus welcher sich die Partikelgröße (genauer der hydrodynamische Radius) über die Stokes-Einstein-Beziehung (Abb. 2.2) bestimmen lässt (Barth und Sun, 1989; Dörfler, 2002; Berne und Pecora, 2013).

$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$	<ul style="list-style-type: none">• $d(H)$ = hydrodynamischer Partikeldurchmesser• k = Boltzmannkonstante• T = absolute Temperatur• η = dynamische Viskosität des Lösemittels• D = Diffusionskoeffizient
--------------------------------	--

Abb. 2.2: Stokes-Einstein-Beziehung

Alle Messungen wurden am Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd., U.K.) im Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie I (Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf) mit der Hilfe von Dr. Hajo Meyer durchgeführt. Die Bestimmung der Größe der CNP wurde in einer Lösung mit mindestens 0.5 mg/ml CNP bei einer konstanten Temperatur von 20°C in Glasküvetten dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Zetasizer des Geräteherstellers.

2.2.1.2 UV/VIS Spektroskopie

Der Oxidationsstatus von CNP und somit die Redox-Aktivität der Partikel wurde mittels Ultraviolett-Visible (UV/VIS) Spektroskopie bestimmt. Für die Untersuchung wurde ein Transmissionsspektrum der Nanopartikel-Lösung vor und nach Oxidation mit H₂O₂ aufgezeichnet. Die Partikel absorbieren Licht im Bereich von 210 nm bis ca. 350 nm, wenn ein ausgewogenes Verhältnis von Ce³⁺ zu Ce⁴⁺ vorliegt (Alili et al., 2011). Durch die Zugabe von H₂O₂ wird Ce³⁺ zu Ce⁴⁺ oxidiert, was sich im Transmissionsspektrum als ein *shift* nach rechts zeigt (Heckert et al., 2008a). Hierbei wird das Verhältnis von Ce³⁺ zu Ce⁴⁺ zugunsten von Ce⁴⁺ verschoben. Die Eigenschaft der Partikel autokatalytisch von Ce⁴⁺ zu Ce³⁺ wechseln zu können, lässt sich ebenfalls über Transmissionsspektroskopie nachweisen.

Für die Messung der Transmission der verwendeten Nanopartikel, wurde eine Lösung von 1 mM in PBS hergestellt, wobei PBS als Leerkontrolle benutzt wurde. Die Transmission der Partikel wurde über einen Wellenlängenbereich von 190-1100 nm gemessen (Ultrospec3000, Pharmacia Biotech). Nach Zugabe von H₂O₂ wurde die Transmission der Partikel erneut gemessen. Für die Oxidation mit H₂O₂ wurde eine Konzentration von 75 mM eingestellt.

Von jeder Charge wurde ein Transmissionsspektrum aufgenommen um das Verhältnis von Ce³⁺ zu Ce⁴⁺ zu bestimmen und die Konzentration der Lösung zu überprüfen und damit die gleichbleibende Qualität der Chargen zu gewährleisten.

2.2.1.3 Superoxid-Dismutase (SOD)-Assay

Viele Studien beschreiben, dass CNP über Superoxid-Dismutase (SOD)-mimetische Aktivität verfügen. Für die SOD-mimetische Aktivität von CNP wird eine zweistufige Reaktion angenommen, wobei Superoxid in der ersten Teilreaktion zu H₂O₂ und in der zweiten Teilreaktion zu molekularem Sauerstoff reduziert wird (Korsvik et al., 2007; Alili et al., 2013). Um die SOD-mimetische Aktivität der in dieser Arbeit verwendeten CNP zu untersuchen, wurde ein kolorimetrischer, zellfreier Assay durchgeführt (Abb. 2.3).

Dieser Assay wurde aus der Publikation von Wang et al. (2011) für die Messung der CNP angepasst (Wang et al., 2011).

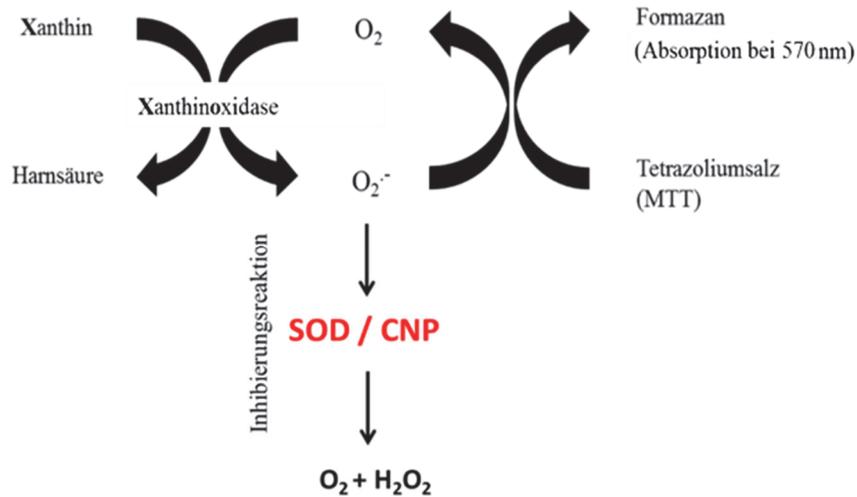


Abb. 2.3: SOD-Test Die Umwandlung von Xanthin und O₂ in Harnsäure durch die Xanthinoxidase erzeugt Superoxidanionradikale. Die Superoxidanionradikale reduzieren das Tetrazoliumsalz MTT zu einem gefärbten Formazanprodukt, das Licht absorbiert. SOD bzw. SOD-mimetische CNP fangen Superoxidanionradikale ab, wodurch die Formazan-Farbstoffbildung inhibiert wird.

Hierbei wurde ein Xanthin/Xanthinoxidase-System zur Bildung von Superoxidanionradikalen und ein Tetrazoliumsalz zur farblichen Indikation der Reaktion eingesetzt. Das durch das X/XO-System generierte Superoxidanionradikal reduziert das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) in ein blau-violettes wasserunlösliches Formazan, dessen Bildung bei 570 nm spektrometrisch bestimmt werden kann. Die Zugabe der SOD oder der SOD-mimetischen CNP erniedrigt die Menge der Superoxidanionradikale, sodass weniger Formazan gebildet wird. Somit ist die Rate des gebildeten Formazan ein Hinweis für die SOD-mimetische Aktivität der CNP.

Für die Durchführung des Versuchs wurden in eine Einmal-Küvette 50 µl Xanthin (3 mM), 50 µl EDTA (3 mM) und 50 µl MTT (1 mg/ml) zu 800 µl PBS (pH 7.4) gegeben. Durch Zugabe von 50 µl Xanthinoxidase (1 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet. Die Absorption des gebildeten Formazan wurde bei 570 nm im Photometer (Ultrospec 1000, (Pharmacia Biotech) gemessen. Die Farbentwicklung wurde jede min über einen Zeitraum von 20 min aufgezeichnet. Zur Bestimmung der SOD-mimetischen Aktivität der CNP, wurde CNP in einer Konzentration von 150 µM, 500µM und 1 mM zu dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch pipettiert. Als Positivkontrolle wurde SOD

verwendet. Die Reaktion wurde ebenfalls nach Zugabe der Xanthinoxidase gestartet und die Absorption bei 570 nm bestimmt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Kulturbedingungen

Die hier verwendeten adhärenen Zelltypen (Melanomzellen (A375), normale humane epitheliale Melanozyten (NHEM) und normale humane dermale Fibroblasten (NHDF)) wurden unter Standardkulturbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Für die Kultivierung der A375 und NHDF wurde als Nährmedium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, *low glucose*), welches mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde (Komplettmedium), verwendet. Die NHEM wurden in *Melanocyte Growth Medium* (MGM), ergänzt mit Melanocyte Supplement Mix und 1% Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Die Zellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen oder für experimentelle Ansätze in Zellkulturplatten oder -schalen verschiedener Formate ausgesät und bis zur Subkonfluenz (ca. 70-90% Konfluenz) kultiviert. Für experimentelle Untersuchungen wurden ausschließlich subkonfluente Zellen herangezogen.

Passagierung der Zellen

Nach Erreichen der Subkonfluenz der Zellen in Zellkulturflaschen, wurden die Zellen für weitere experimentelle Ansätze weiterpassagiert. Zum Passagieren der A375 und NHDF wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung über einen Zeitraum von 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 7 ml DMEM (Komplettmedium) gestoppt und die Zellzahl lichtmikroskopisch unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen für weitere Experimente ausplattiert. Zum Passagieren der NHEM wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung und PBS, in einem Verhältnis von 1:1, unter mikroskopischer Beurteilung bei RT abtrypsinisiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Reaktion mit 5 ml 20% FCS-haltigem MGM gestoppt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen

wurden für weitere experimentelle Ansätze mit entsprechenden Zellzahlen ausgesät. Es erfolgte ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage.

Behandlung der Zellen

Nach Erreichen der Subkonfluenz und mikroskopischer Beurteilung der Morphologie wurden Zellen, die für experimentelle Ansätze ausplattiert wurden, mit Testsubstanzen inkubiert. Vor der Behandlung wurden alle Zellen einmal mit PBS gewaschen. A375 und NHDF wurden in serumfreien DMEM (*high glucose*) und NHEM weiterhin in MGM behandelt.

2.2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Kryokonservierung

Zum Einfrieren wurden subkonfluente Zellen aus 175 cm²-Kulturflaschen verwendet. Diese wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Die Reaktion des Trypsins wurde mit FCS-haltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension für 3 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 10⁶ Zellen/ml in Kryotubes bei -80°C eingefroren. Das Einfriermedium von A375 und NHDF bestand aus DMEM (*low glucose*), das mit 20% FCS und 10% DMSO supplementiert wurde. NHEM wurden in vom Hersteller empfohlenen Einfriermedium eingefroren.

Revitalisierung

Kryokonservierte Zellsuspensionen, die bei -80°C gelagert wurden, wurden zunächst bei RT aufgetaut und in temperiertem Nährmedium in 75 cm²-Kulturflasche überführt. Nach mehreren Stunden bzw. erfolgter Adhäsion der Zellen wurde das Medium gewechselt um den DMSO-Gehalt zu reduzieren und somit Zellschäden vorzubeugen. Die Zellen wurden einmal passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2.2.3 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind kleine, zellwandlose und parasitierende Bakterien, welche den Stoffwechsel und das Wachstum der Wirtszelle beeinträchtigen (Stanbridge, 1971). Eine Infektion der im Labor verwendeten Zellkulturen mit Mycoplasmen kann zu veränderten biochemischen Eigenschaften der Zellen führen (Pisal et al., 2016). Daher wurden in

regelmäßigen Abständen alle Zelllinien auf Kontaminationen mit Mycoplasmen untersucht. Mycoplasmen können mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Bisbenzimid (DAPI) mikroskopisch nachgewiesen werden. DAPI bindet selektiv an die DNA und macht somit Zellkerne über eine hellblaue Fluoreszenz sichtbar. Im Falle einer Kontamination sind neben der Fluoreszenz der normalen Zellkerne auch viele kleine fluoreszierende Zellkerne von Mycoplasmen im Bereich der äußeren Zellmembran und auch zwischen den Zellen zu sehen.

Für die Durchführung wurden Zellen auf einem Glasplättchen in einer kleinen Zellkulturschale (Ø 3.5 cm) kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen auf dem Glasplättchen mit PBS gewaschen und 10 min bei -20°C in Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) auf Objektträger überführt und dabei mit DAPI angefärbt. Die Kernfärbung mit DAPI wurde fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

Alternativ wurden Mycoplasmen in Zellkulturen mittels PCR überprüft. Hierfür wurden Überstände von Zellkulturmedien entnommen und mit Hilfe des Venor®GeM Classic Mycoplasma Detection Kits (minerva biolabs, Berlin) auf den Befall mit Mycoplasmen getestet.

2.2.2.4 Viabilitätstest (MTT-Assay)

Der MTT-Assay ist eine quantitative und kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Viabilität von Zellen. Mittels eines MTT-Tests kann die cytotoxische Wirkung der zu untersuchenden Substanz bestimmt werden. Das Verfahren beruht auf der indirekten Ermittlung der Viabilität von Zellen über die Aktivität der zellulären, mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen (Mosmann, 1983). Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid), einem wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalz behandelt, welches nur von metabolisch aktiven Zellen enzymatisch über Reduktion in ein blau-violettes wasserunlösliches Formazan überführt wird (Abb. 2.4) (Riss et al., 2004). Das gebildete Formazan wird dann durch ein organisches Lösungsmittel aus den Zellen extrahiert und die Absorption photometrisch bei 570 nm gemessen. Die Absorption bei 570 nm dient dann als Maß für die Viabilität von Zellen.

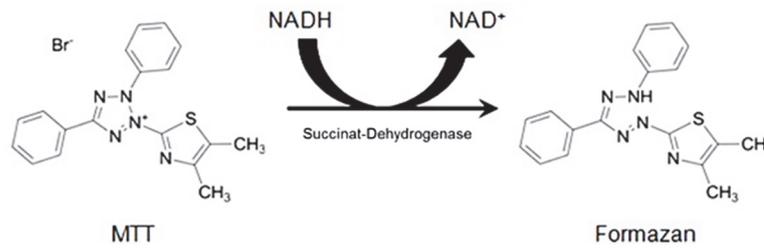


Abb. 2.4: Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses MTT zum blau-violetten, schwerlöslichen Formazansalz durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen Die Absorption des Formazansalzes gilt als ein Maß für die Viabilität von Zellen (verändert nach Riss et al., 2014).

In dieser Arbeit wurde der MTT-Assay in 24-Wellplatten durchgeführt. Nach Behandlung mit den zu testenden Substanzen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium mit 10% MTT-Gehalt bis zu einer deutlichen Blaufärbung im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für A375 und NHDF wurde serumfreies DMEM und für NHEM wurde *Melanocyte Basal Medium* (MBM) verwendet. Die Zellen wurden unterschiedlich lang mit der MTT-Inkubationslösung inkubiert, denn eine Blaufärbung konnte je nach metabolischer Aktivität der Zelltypen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten beobachtet werden. Tumorzellen sind im Vergleich zu den normalen Hautzellen metabolisch aktiver und brauchten daher eine kurze Inkubationszeit um das MTT umzusetzen. Bei den Melanomzellen kam es nach 20 min zu einer deutlichen Blaufärbung, wobei Fibroblasten und Melanozyten bis zu einer sichtbaren Blaufärbung eine Inkubationszeit von ca. 1.5 h benötigten. Nach der Blaufärbung wurde das MTT-haltige Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Der Farbstoff wurde mit DMSO aus den Zellen extrahiert und die Absorption bei 570 nm gemessen (Plattenlesegerät Victor 1420 & FLUOstar Optima). Für die Auswertung wurde von den Messwerten der Nullwert, welcher durch die Behandlung der Zellen mit 2 mM H₂O₂ für 24 h (Positivkontrolle) bestimmt wurde, abgezogen. Zur weiteren Auswertung wurde die Absorption von unbehandelten Kontrollzellen auf 100% gesetzt, die der behandelten Zellen auf diese bezogen und so die prozentuale Viabilität berechnet.

2.2.2.5 Proliferationstest (BrdU-Assay)

Zur Bestimmung der Proliferation der verwendeten Zellen wurde der BrdU Cell Proliferation Assay (Merck, Darmstadt) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Mit dem BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin) Assay wird die Zellproliferation über den Einbau eines Basenanalogs während der DNA-Replikation quantitativ erfasst. In der

S-Phase wird anstelle von Thymidin das Analogon BrdU in die neu synthetisierte DNA eingebaut, welches anschließend immunochemisch nachgewiesen werden kann (Porstmann et al., 1985). Hierfür werden die Zellen fixiert, die Membran permeabilisiert und die DNA denaturiert. Mittels eines hochspezifischen Antikörpers wird dann das Thymidin-Analogon BrdU erfasst und mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgt durch photometrische Absorptionsmessung. Die Intensität der Absorption ist dabei proportional zur Menge des eingebauten BrdU und damit zur neu synthetisierten DNA.

Für die Versuchsdurchführung wurden Zellen in 96-Wellplatten ausgesät. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurde das Thymidin-Analogon BrdU für 24 h zugefügt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm und der Referenzwellenlänge von 540 nm im Plattenlesegerät FLUOstar Optima.

2.2.2.6 Langzeitexperiment mit CNP

Um die Langzeitwirkung der CNP zu untersuchen wurde die kumulative Populationsdichte (*cumulative population doubling*, CPD) von Zellen nach Behandlung mit CNP bestimmt. Für die Bestimmung der CPD wurde die Summe aller Verdopplungen bzw. Populationsdichten (*population doubling*, PD) gebildet.

$$CPD = \sum PD \quad ; \quad PD = \frac{\ln(\text{Zellzahl geernteter Zellen}) - \ln(\text{Zellzahl ausgesäter Zellen})}{\ln 2}$$

Für die Durchführung wurden Zellen in große Zellkulturschalen (Ø 10 cm) ausplattiert und mit 150 µM und 300 µM CNP in serumfreiem DMEM für 96 h behandelt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl für die Berechnung der PD mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden 70.000 Zellen erneut ausplattiert und in serumhaltigem DMEM (mit 10% FCS) für drei Tage regeneriert. Danach wurden die Zellen erneut mit CNP behandelt, nach 96 h abtrypsiniert und die PD der zweiten Woche bestimmt. Dieser Vorgang wurde über mehrere Wochen wiederholt und jedes Mal die PD und anschließend die CPD bestimmt.

2.2.3 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zellysaten

Für die Herstellung von Zellysaten für weitere biochemische und molekularbiologische Untersuchungen wurden Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. A375 wurden in kleine (Ø 3.5 cm), NHDF und NHEM in mittelgroße (Ø 6 cm) Zellkulturschalen ausgesät. Nach der Behandlung der subkonfluenten Zellen mit den zu testenden Substanzen wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer versetzt. Hierbei wurden A375 mit 100 µl Lysepuffer und NHDF bzw. NHEM mit 80 µl Lysepuffer pro Zellkulturgefäß lysiert. Der Lysepuffer bestand aus 1%igem SDS mit 1:1000 verdünntem Protease Inhibitor Cocktail (PIC). Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der jeweiligen Schale abgekratzt und die Zellysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, welche sofort auf Eis gelagert wurden. Bis zur weiteren experimentellen Verwendung wurden die Lysate bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung der Zellysate für die Proteinbestimmung wurden diese für 15 sec sonifiziert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinmenge (nach Lowry)

Proteinmengenbestimmungen der zuvor lysierten Zellproben erfolgten auf der Grundlage der Methode nach Lowry et al. (1951) mithilfe eines Kits zur Proteinbestimmung von BioRad Laboratories (München) nach Angaben des Herstellers mit kleiner Abweichung. Die nach Lowry modifizierte Folin-Methode beruht auf zwei Reaktionen (Lowry et al., 1951). Der erste Schritt basiert auf der Biuret-Reaktion, bei welcher Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung durch Peptidbindungen zu blau-violetten Farbstoffkomplexen komplexiert werden. In einem zweiten Schritt werden Kupfer(II)-Ionen durch Peptidbindungen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, welche dann das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäure) zu Molybdänblau umsetzen. Die resultierende Blaufärbung wird zur Quantifizierung des Proteingehalts photometrisch vermessen.

Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden jeweils 20 µl einer Probe in Plastikkuvetten gegeben und anschließend mit 100 µl Reagenz A', das aus den Reagenzien A und S (20 µl Reagenz S in 1 ml Reagenz A) bestand, versetzt. Zuletzt wurde 750 µl des Reagent B hinzugefügt und für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert,

bevor die Optische Dichte (OD) bei 750 nm gemessen wurde (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech). Mithilfe einer Proteinstandardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) wurde der Proteingehalt in den Proben ermittelt. Je nach Experiment wurde dann die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt.

2.2.3.3 Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Bei der von U.K. Laemmli entwickelten Methode werden Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, Ladung und Struktur der Proteine haben keinen Einfluss auf die Auftrennung (Laemmli, 1970). Durch die in dem Proben-Puffer (auch Laemmli-Puffer genannt) enthaltenen Bestandteile, wie den Detergentien Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol, sowie der anschließenden Hitzeinkubation (5 min bei 95°C) werden die Proteine denaturiert. Zudem wird durch die Zugabe von überschüssigem SDS die Eigenladung der Proteine maskiert. Dabei bindet SDS an die Proteine in einem stöchiometrischem Verhältnis (ca. 1.4 μg SDS pro μg Protein), sodass alle Proteine eine negative Nettoladung erhalten. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine im Polyacrylamidgel ist dann nur noch von der Größe abhängig. Im Polyacrylamidgel wird ein Netzwerk aus Acrylamid und Bisacrylamid mit einer definierten Porengröße generiert. Die Polymerisation und Vernetzung des Gels wird durch freie Radikale initiiert. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, welche auf einem Tris-HCl/Tris-Glycerin Puffersystem basiert. Das Prinzip beruht auf der Nutzung von zwei verschiedenen dichten Polyacrylamid-Gelen: ein weitporiges Sammelgel und ein engporiges Trenngel. So wandern die aufgetragenen Proben zuerst durch das Sammelgel und werden an der Grenzschicht zum Trenngel aufkonzentriert, um das zeitgleiche Einlaufen der Proteine in das Trenngel und somit eine präzise elektrophoretische Auftrennung der Proteinbanden zu erreichen. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Durch den Vergleich mit Markerproteinen oder Proteinstandards, die aus Proteinen definierter Größe bestehen, können die Größen der zu untersuchenden Proteine bestimmt werden. Nach Auftrennung der Proteine ist das Gel für weitergehende Bearbeitungen zugänglich, wie z.B. Färbungen oder immunologische Nachweise (Western Blot).

Für die Durchführung einer SDS-PAGE wurden zunächst Polyacrylamid-Gele (6x8 cm) bestimmter Porengröße in Gelkassetten vorbereitet. Die Porengröße richtete sich dabei

nach der Größe des zu nachweisenden Proteins und war abhängig von der eingesetzten Acrylamid-Konzentration. Denn je höher das Gel konzentriert ist, desto kleiner ist der Trennbereich in Basenpaaren. Die chemische Kopolymerisierung der Acrylamidmoleküle erfolgte nach Zugabe von APS (Radikalstarter) und TEMED (Vernetzer). Für die in dieser Arbeit verwendeten Gele wurde ein 12% Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung eines 12% Trenngels und eines Sammelgels (5%) ist in Tab. 2.1 gezeigt.

	12% Trenngel	5% Sammelgel
dest. H₂O	4.3 ml	3.53 ml
Rotiphorese Gel 40	3 ml	720 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	-
1.5 M Tris (pH 6.8)	-	650 µl
10% SDS	100 µl	50 µl
10% APS	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl

Tab 2.1: Zusammensetzung eines 12% Trenn- und 5% Sammelgels

Ein weitporiges Sammelgel (pH 6.8) wurde über ein engporiges Trenngel (pH 8.8) gegossen, nachdem dieses auspolymerisiert war. Fertige Gele wurden in feuchte Tücher verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.3). Je nach Abundanz des zu untersuchenden Proteins wurden für die Elektrophorese Proteinmengen zwischen 20 und 40 µg aufgetragen. Dabei wurde die vorher eingestellte Proteinkonzentration (in µg) mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt (1/4 des Probenvolumens) und vor dem Beladen des Gels für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Trennung im Sammelgel bei 15-20 mA und im Trenngel bei 30-40 mA pro Gel.

2.2.3.4 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese kombiniert die sogenannte isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur besseren Trennung von Proteingemischen in Einzelproteine. Hierbei werden Proteine nicht nur nach der Molekülgröße, sondern auch nach dem isoelektrischen Punkt getrennt (O'Farrell, 1975). Die 2D Gelelektrophorese unterscheidet sich vom klassischen Ablauf der Gelelektrophorese und besteht neben der Probenvorbereitung aus folgenden

Einzelschritten: Rehydrierung, 1. Dimension (IEF), Equilibrierung und 2. Dimension (SDS-PAGE).

Probenvorbereitung

Subkonfluente Melanomzellen wurden mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt, anschließend zweimal mit 50 mM Tris gewaschen und in 2D Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde mehrmals sonifiziert und zwischendurch auf Eis gelagert. Anschließend wurde eine Zentrifugation durchgeführt, um den entstandenen Schaum zu lösen und Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Proteinmengenbestimmung mit dem 2D Quant Kit (GE Healthcare), welches mit den im 2D-Lysepuffer enthaltenen Inhaltsstoffen und Konzentrationen kompatibel war, wurden ca. 50-75 µg Protein für die weitere Versuchsdurchführung eingesetzt.

Rehydrierung

Für die Rehydrierung der IPG-Streifen wurde das eingestellte Proteinlysate in 2D-Rehydrierungspuffer aufgenommen (Gesamtvolumen 200 µl), in das entsprechende Tray im Protean IEF Cell (BioRad) pipettiert und der IPG-Streifen luftblasenfrei darüber gelegt. Für die 2D-Gelelektrophorese wurden IPG-Streifen (11 cm) mit einem pH Gradienten von 4-7 (BioRad) verwendet. Nach 30 min Einziehzeit der Probe in den IPG-Streifen wurde dieser mit Mineralöl überschichtet um ein Austrocknen während der Rehydrierung zu vermeiden. Anschließend wurde die aktive Rehydrierung gestartet (50 V, 12-16 h).

1. Dimension (IEF)

Im ersten Schritt, bei der sogenannten 1. Dimension, werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) innerhalb eines pH Gradienten getrennt. Für die Durchführung wurden schmale Filterpapierstücke mit dH₂O angefeuchtet und unter die IPG-Streifen gelegt. Diese sollten den Stromfluss begünstigen und Salze zurückhalten. Anschließend wurden die IPG-Streifen wieder mit Mineralöl überschichtet und Protean IEF Cell (BioRad) für die IEF folgendermaßen programmiert:

S01: 200 V, linear, 5 min
S02: 200 V, linear, 2 h
S03: 500 V, linear, 5 min
S04: 500 V, linear, 2 h
S05: 1000 V, linear, 10 min

S06: 1000 V, linear, 1 h
 S07: 3500 V, linear 30 min
 S08: 3500 V, linear, 20000 Vh
 S09: 1000 V, rapid, 24 h

Damit die Banden nachher schärfer wurden, wurden die IPG-Streifen nach Ende der IEF (S08) 12-24 h bei -20°C eingefroren. Falls die IEF nachts endete, wurde mit dem letzten Schritt der IEF (S09) die Diffusion der Proteine aus dem Gelstreifen verhindert.

Equilibrierung

Bevor die fokussierten IPG-Streifen auf die vorbereiteten SDS-Gele aufgelegt wurden, mussten sie in zwei Schritten equilibriert werden. Dafür wurden sie je 15 min im Equilibrierungspuffer I (mit DTT) und II (mit Iodoacetamid) geschüttelt. DTT sorgte für eine Spaltung der Disulfidbrücken, wobei Iodoacetamid freie Thiolgruppen alkylierte und vor Reoxidation schützte. SDS, welches in beiden Equilibrierungspuffern enthalten war, lagerte sich, wie auch bei einer eindimensionalen SDS-PAGE, an die Proteine an und maskierte die Eigenladung der Proteine, sodass die Auftrennung in der 2. Dimension ausschließlich nach Molekulargewicht erfolgte.

2. Dimension (SDS-PAGE)

Die 2. Dimension der 2D-Gelelektrophorese besteht aus einer SDS-PAGE nach U.K. Laemmli (1970) ohne Sammelgel. Dazu wird das elektrische Feld senkrecht zur Laufrichtung der 1. Dimension angelegt. Für den Versuch wurden am Vortag große 10% SDS-Gele gegossen (Zusammensetzung siehe Tab. 2.2) und in feuchte Tücher verpackt bei 4°C gelagert. Für die Durchführung der 2. Dimension wurden die equilibrierten IPG-Streifen luftblasenfrei auf die vorbereiteten Trenngele gelegt, mit 1%iger Agarose überschichtet und an den Strom angelegt (100-120 V). Nach der Elektrophorese konnten die Gele fixiert, gefärbt oder für Western Blot-Analysen verwendet werden.

	10% Trenngel
dest. H₂O	4.3 ml
Rotiphorese Gel 40	3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	4 µl

Tab 2.2: Zusammensetzung eines 10% Trenngels

2.2.3.5 Western Blot („semi-dry“-Methode)

Der Western Blot wurde zum Nachweis verschiedener Proteine eingesetzt. Bei einem Western Blot werden Proteine aus einem SDS-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Trägermembran (hier: PVDF-Membran) elektrotransferiert und immobilisiert (Blotting). Danach können die Proteine auf der Membran entweder gefärbt (Coomassie Blau- oder Ponceau S-Färbung) oder durch spezifische Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die semi-dry Methode mit einem 3 Puffersystem verwendet. Bei einem semi-dry Blotting erfolgt der Transfer der Proteine auf die Membran durch einen geschichteten, luftblasenfreien Aufbau (Abb. 2.5) innerhalb einer Blottingapparatur.

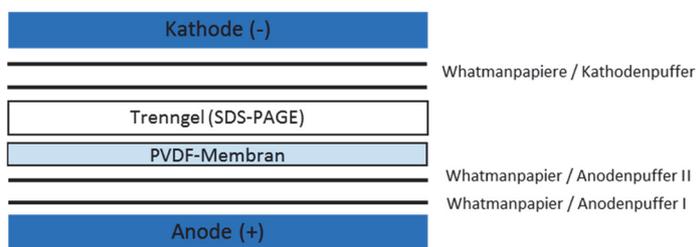


Abb. 2.5: Schematischer Aufbau des semi-dry Blottingverfahrens

Der geschichtete Aufbau gliederte sich von unten mit der Anodenplatte beginnend, in Anodenpuffer I und II getränkte Whatmanpapiere, der in Methanol-aktivierten (10 sec) PVDF-Membran, dem Trenngel, zwei in Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere und abschließend der Kathodenplatte. Der Transfer erfolgte bei 75 mA pro Gel über 1 h.

2.2.3.6 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, wurde diese zur Absättigung bzw. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierlösung aus 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver in 1x TBST für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C schüttelnd in Schalen oder rotierend in 50 ml-Tubes inkubiert. Danach konnte die Membran mit dem primären Antikörper umgesetzt werden. Die Primärantikörper (siehe Kapitel 2.1.6) wurden 1:1000 in Blockierlösung angesetzt und entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran dreimal für 15 min in 1x TBS-T gewaschen. Der entsprechende Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.1.6) wurde ebenfalls in Blockierlösung verdünnt und die Membran darin für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert.

Danach wurde die Membran erneut dreimal für 15 min in 1x TBS-T gewaschen. Da die verwendeten sekundär Antikörper an Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt sind, konnten diese über eine Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden, wobei die Intensität des Signals proportional zur Menge an gebundenem Protein ist und somit eine semiquantitative Auswertung erlaubt. Dafür wurden die Membranen mit Luminol/Peroxidase (Clarity™ Western ECL Substrate) im Verhältnis 1:1 versetzt und das entstehende Lichtsignal in der Geldokumentationsanlage Fusion-FX7 detektiert. Die Expositionszeiten variierten dabei je nach Membran und Signalstärke. Um zu überprüfen, ob die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Referenzproteine der sogenannten *housekeeping genes* GAPDH (37 kDa) oder α -Tubulin (50 kDa) als interne Ladekontrolle bei jeder Membran mit nachgewiesen. Die Banden wurden mit dem Programm Image J oder Fusion Capt. Advance densitometrisch ausgewertet und durch den Bezug der Zielproteine auf die Ladekontrolle konnte die x-fache Änderung nach Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt werden.

2.2.3.7 Immunologischer Nachweis von Sulfensäuren

Die Bildung von ROS in der Zelle kann zu Modifikationen an Seitenketten von Proteinen führen (Reczek und Chandel, 2015). Dabei können ROS, wie H_2O_2 , mit Thiolgruppen von Cysteinen in Proteinseitenketten reagieren und das spezifische Oxidationsprodukt, die Sulfensäure, bilden. Der Nachweis von Sulfensäuren ist daher ein Marker für die spezifisch durch H_2O_2 -vermittelte Proteinoxidation (Seo und Carroll, 2009). Um zu überprüfen, ob CNP Einfluss auf die Thioloxydation von Proteinen hat, wurde die Bildung von Sulfensäuren untersucht. Da Sulfensäuren sehr instabil sind und schnell weiter reagieren können, lassen sich diese mit dem cyclischen Diketon Dimedon nachweisen, welches an oxidierte Cysteine bindet und ein stabiles Thioether-Produkt bildet (Abb. 2.6). Das gebildete Thioether-Produkt wird als Epitop von spezifischen α -Hapten-Antikörpern, die von Kate S. Carroll und ihrer Arbeitsgruppe entwickelt wurden, erkannt und nachgewiesen.

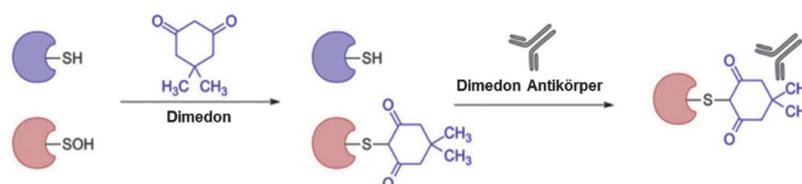


Abb. 2.6: Mechanismus des Antikörper-basierten Nachweises von Sulfensäuren Chemoselektive Alkylierung von Sulfensäuren durch Dimedon liefert ein synthetisches Epitop, das vom α -Hapten-Antikörper erkannt wird (verändert nach Gupta und Carroll, 2014).

Für die Durchführung wurden subkonfluente Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. In den letzten 2 h der Gesamtkubation wurde allen Zellen 10 mM Dimedon zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die enthaltene Proteinmenge (nach Lowry) bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.2). Für die weitere Versuchsdurchführung wurden 20 µg Protein eingesetzt. Die Proben wurden auf ein 12%iges Gel aufgetragen und im Weiteren wurde bis zur Detektion der Sulfensäuren und Auswertung, wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben, vorgegangen. Der primäre Antikörper (polyclonal rabbit alpha-hapten-anti-sulfenic acid) wurde 1:1000 und der Sekundärantikörper (goat anti-rabbit HRP) 1:20000 in Blockierlösung verdünnt.

Die Bildung von Sulfensäuren wurde ebenfalls im zellfreien System mit isolierter GAPDH aus Kaninchenmuskeln (Sigma) nach der Methode von Seo & Carroll (2009) mit kleinen Abweichungen bestimmt. Dafür wurde GAPDH (4 mg/ml in PBS, pH 7.4) zuerst mit 1 mM DTT reduziert (20 min bei 0°C). Damit DTT in weiteren Schritten nicht stört, wurde es mittels *Protein Desalting Spin Columns* (ThermoFisher Scientific) entfernt. Für den Nachweis von Sulfensäuren wurde dann Dimedon-tagged GAPDH hergestellt, indem reduzierte GAPDH mit 5 mM Dimedon inkubiert wurde. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit Laemmli-Puffer gestoppt und das Reaktionsgemisch auf ein 12%iges Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE erfolgte die Analyse mittels Western Blot und dem α -Hapten-Antikörper, wie in den Kapiteln zuvor beschrieben.

2.2.3.8 „Stripping“ der PVDF-Membran

Nach dem Umsatz mit Antikörpern und anschließender Detektion können die gebundenen Antikörper von der PVDF-Membran abgelöst werden. Dieser Vorgang wird auch *stripping* genannt. Dadurch kann die Membran für weitere immunologische Nachweise verwendet werden. Nach dem *stripping* muss die Membran erneut blockiert werden, um mit neuen Primär- bzw. Sekundärantikörpern umgesetzt werden zu können. Somit kann eine Membran für mehrere immunologische Nachweise verschiedener Proteine benutzt werden.

Vor dem *stripping* wurde die Membran 15 min in 1x TBST gewaschen. Danach wurde sie mit dem Stripping Buffer (Thermoscientific) überschichtet und schüttelnd für 25 min bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde erneut mit 1x TBST gewaschen (15 min) und in Blockierlösung 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C blockiert. Mit neuen Primär- bzw.

Sekundärantikörpern wurden weitere Untersuchungen, wie z.B. die Überprüfung der Ladekontrollen, erbracht.

2.2.3.9 Coomassie-Färbung

Im Falle einer nicht auswertbaren oder uneindeutigen Ladekontrolle wurde eine Coomassie-Färbung der Membran für die densitometrische Auswertung herangezogen. Um den gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran mit Coomassie angefärbt. Coomassie ist ein Farbstoff, der unspezifisch an Proteine bindet und so alle Proteinbanden auf der Membran sichtbar macht. Dazu wurde die Membran 5 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend mit der Entfärbelösung bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden entfärbt.

2.2.3.10 Untersuchungen zur Apoptose

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der Zellen kontrolliert zum Zelltod führt (Maslinska, 2003). Um zu überprüfen, ob CNP den apoptotischen Zelltod auslösen, wurde ein Apoptose Array (Human Apoptosis Array Kit) vom Hersteller R&D Systems verwendet. Mit dieser Methode kann ein weites Spektrum an Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind, gleichzeitig detektiert werden. Das Kit beinhaltet Nitrozellulosemembranen, die mit Antikörpern gegen 35 verschiedene Proteine versehen sind. Dabei ist jeder Antikörperspot als Duplikat vorhanden. Nach Inkubation mit den zu untersuchenden Zelllysaten können die gebundenen Proteine mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Streptavidin-HRP und des Chemilumineszenz-Reagenz wird an jedem Spot ein Signal erzeugt, dessen Intensität proportional zur Menge an gebundenem Protein ist und eine semiquantitative Auswertung erlaubt.

Für die Durchführung wurden A375 Melanomzellen in große Zellkulturschalen (Ø 10 cm) ausplattiert und nach Erreichen der Subkonfluenz mit Substanzen inkubiert. Anschließend wurde der Array nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.11 Fluorimetrischer Nachweis von intrazellulärem ROS (DCF-Assay)

In Zellen gebildete ROS können fluorimetrisch mit Hilfe des Farbstoffs 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (H₂DCF-DA) nachgewiesen werden. H₂DCF-DA ist ein membranpermeables Molekül, das intrazellulär durch ROS zu dem fluoreszenten

Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird. Nach Aufnahme des Farbstoffs in die Zellen, wird die Esterbindung durch Esterasen zum Acetat und H₂DCF gespalten, sodass H₂DCF membranimpermeabel ist und in Anwesenheit von ROS oxidiert werden kann. Für die Versuchsdurchführung wurden Zellen in 24-Wellplatten bis zur Subkonfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µM H₂DCF-DA in HBSS für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach 30 min wurde die H₂DCF-DA Lösung abgenommen und die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit 500 µl HBSS überschichtet und nach Zugabe von den zu untersuchenden Substanzen direkt gemessen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im auf 37°C vorgeheizten Plattenlesegerät (FLUOstar Optima, BMG Labtech) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Die Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 90 min im Abstand von jeweils 5 min gemessen. Die gemessene Fluoreszenz bzw. die relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescence unit*, RFU) sind somit direkt proportional zur Menge der intrazellulär entstehenden ROS.

2.2.3.12 Nachweis von MDA zur Indikation von Lipidperoxidation

Als Indikator für Lipidperoxidation, der oxidativen Schädigung von Lipiden, dient der Nachweis von Malondialdehyd (MDA) (Gawel et al., 2004; Ayala et al., 2014). MDA ist ein End- und Oxidationsprodukt der Lipidperoxidation und kann über die Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (TBA) mittels HPLC nachgewiesen werden (Moselhy et al., 2013).

Zur Analyse von MDA in Zellproben wurden subkonfluente Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert oder mit UV-A in der UV-Bestrahlungseinheit BioSun (Vilber Lourmat) bestrahlt. Nach Ende der Inkubation und Bestrahlung wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in PBS aufgenommen und abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 150 µl dH₂O lysiert. 50 µL jeder Probe wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit je 200 µL Thiobarbitursäure (TBA; 0.4% in 0.2 M HCl) und 25 µL 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT; 0.05% in Ethanol) gemischt. BHT ist ein Antioxidationsmittel, welches die weitere Bildung von MDA während der folgenden Erhitzung und Aufarbeitung der Proben verhindert. Die Proben wurden dann für 30 min bei 95°C erhitzt. Dabei war die Bildung eines leicht rosafarbenen Farbstoffes zu beobachten. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert, um restliche Bruchstücke der Zellpellets abzutrennen. Anschließend erfolgte die Analyse per HPLC. Dazu wurden 50 µL auf einer

pKb-100 Säule der Firma Sigma aufgetrennt und mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 513 nm und einer Emissionswellenlänge von 550 nm detektiert. Eine Standardkurve für die MDA-Bestimmung wurde mit 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) erstellt. Dazu wurde zuerst eine Lösung von TMP in 6:4 (v/v) Wasser/MeOH hergestellt und diese in unterschiedlichen Konzentrationen in dH₂O verdünnt. Zur Normierung der MDA-Werte aus Zellen wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3.2).

2.2.3.13 Bestimmung der spezifischen GAPDH-Aktivität

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Schlüsselenzym der zellulären Glykolyse. Die Aktivität der GAPDH kann über die Oxidation der Cysteine im aktiven Zentrum reguliert bzw. gehemmt werden (Hildebrandt et al., 2015). Um den Effekt der CNP auf die GAPDH zu bestimmen, wurde die Aktivität der GAPDH nach Inkubation mit CNP bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung der GAPDH erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Colorimetric GAPDH Assay (ScienCell, USA). Das Prinzip des Assays beruht auf der Oxidation von NADH zu NAD⁺, welche in der Umkehrreaktion von GAPDH durch die Umwandlung von 1,3-BPG (1,3-Bisphosphoglycerat) zu GAP (Glycerinaldehyd-3-Phosphat) katalysiert wird (Vopel und Makhatadze, 2012) (Abb. 2.7). Über die Rate der NADH Oxidation, welche bei 340 nm photometrisch verfolgt werden kann, wird die Aktivität von GAPDH bestimmt. Die Abnahme der Extinktion je Zeiteinheit ist damit ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit der GAPDH. Da aber für die Auswertung die Differenz aus den einzelnen Absorptionsmessungen nach verschiedenen Reaktionszeiten (t_x) und dem Nullwert (t_0) gebildet wird ($\Delta A_{340\text{nm}}$), stellt hierbei die Zunahme von $\Delta A_{340\text{nm}}$ je Zeiteinheit ein Maß für die Aktivität der GAPDH dar.

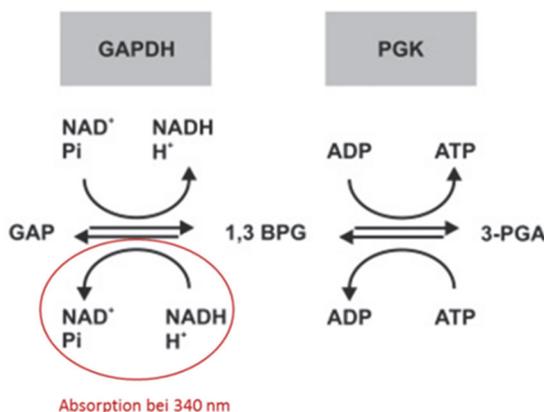


Abb. 2.7: Reaktionsmechanismus der gekoppelten GAPDH Aktivitätsbestimmung In der Vorwärtsreaktion katalysiert GAPDH die Umsetzung des Substrats GAP zu 1,3-BPG, welches von PGK wiederum zu 3-PGA umgesetzt wird. Über die Umkehrreaktion wird die Aktivität von GAPDH bestimmt. In der Umkehrreaktion ergibt die Umwandlung von 3-PGA zu 1,3-BPG über PGK das Substrat für GAPDH. Die Umsetzung zu GAP wird durch die Änderung der NADH Konzentration überwacht und darüber die Aktivität von GAPDH bestimmt. (verändert nach Vopel und Makhatadze, 2012).

Für die Versuchsdurchführung wurden Zellen in 24-Wellplatten kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden diese behandelt, lysiert und nach Angaben des Herstellers (mit kleinen Abweichungen) auf die Aktivität von GAPDH getestet. Nach Zugabe des Lysats zum Testpuffer (aus 3-PGA, β -NADH, ATP und 3-PGK) wurde die Absorption bei 340 nm jede min über einen Zeitraum von 20 min im Plattenlesegerät Tecan gemessen. Für die Auswertung wurde die Anfangssteigung der Reaktion bestimmt ($\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$) und anhand einer Standardkurve aus bekannten GAPDH Konzentrationen wurde die GAPDH Konzentration in U/ml in den Proben ermittelt. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der GAPDH (U/mg) wurde die Proteinmenge in den Zelllysaten nach Durchführung des Assays bestimmt. Für die Auswertung wurde die Kontrolle auf 100% gesetzt und die Änderung nach Behandlung prozentual ermittelt.

Der Assay wurde ebenfalls in einem zellfreien System mit isolierter GAPDH aus Kaninchenmuskeln von Sigma durchgeführt. Hierfür wurde, wie bereits in Kapitel 2.2.3.7 beschrieben, nach der Methode von Seo & Carroll (2009) vorgegangen und die Aktivität von GAPDH nach der Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen bestimmt.

2.2.3.14 Messung des Laktatgehalts

Laktat ist das Endprodukt der anaeroben Glykolyse. Es wird verstärkt gebildet, wenn Zellen in einen hypoxischen Zustand gelangen und ihren Energiebedarf nicht mehr aerob decken können. Tumorzellen jedoch weisen auch unter normoxischen Bedingungen aufgrund des sogenannten Warburg-Effekts eine hohe Glykolyserate und einen hohen Laktatgehalt auf (Liberti und Locasale, 2016).

Um den Effekt von CNP auf die Glykolyse und nachfolgend auf den Laktatgehalt zu ermitteln, wurde der Laktatgehalt bestimmt. Die zelluläre Laktatkonzentration wurde mit dem Lactate Assay Kit (Cayman) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Oxidation von Laktat zu Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase unter Reduktion von NAD^+ zu NADH. NADH reagiert mit einem fluoreszenten Substrat zu einem stark fluoreszierenden Produkt, das bei einer Anregungswellenlänge von 530-540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585-595 nm analysiert werden kann. Die gemessene Fluoreszenz bzw. die relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescence unit*, RFU) sind somit direkt proportional zur Laktatmenge.

Nach der Versuchsdurchführung mit subkonfluenten Zellen wurde anhand des mitgelieferten Standards die Menge an Laktat in μM bestimmt. Nach Normierung auf die Zellzahl wurde die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die x-fache Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt.

2.2.4 Massenspektrometrische Methoden

2.2.4.1 ICP-MS

Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen wurde in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich (Abteilung Analytik ZEA-3) mit der Hilfe von Dr. Volker Nischwitz mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) untersucht. Diese Analyseverfahren erlaubt aufgrund ihrer hohen Nachweisstärke die Bestimmung einer Vielzahl von Elementen im Spurenbereich. Elemente der Seltenen Erden, wie z.B. Cerium, zählen ebenfalls zu den nachweisbaren Elementen (Li et al., 2016).

Für die Versuchsdurchführung wurden subkonfluente Zellen in großen Zellkulturschalen ($\text{\O} 10 \text{ cm}$) mit CNP behandelt. Unbehandelte Zellen dienten zur Negativkontrolle. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen für die Messung aufbereitet. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen bevor diese vom Boden der Zellkulturschale abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die erhaltenen Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die zelluläre Cerium-Konzentration wurde dann im Forschungszentrum Jülich bestimmt.

2.2.4.2 Analyse der Proteinexpression („Proteomics“)

Die Proteomik („Proteomics“) umfasst die Erforschung des Proteoms, d.h. der Gesamtheit in einer Zelle unter definierten Bedingungen vorhandenen Proteine. Ändern sich diese Bedingungen beispielsweise nach einer Behandlung, hat das qualitative und quantitative Auswirkungen auf die Proteinzusammensetzung (Graves und Haystead, 2002). Die Analyse des Proteoms mit MS-basierten Techniken ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Proteinmischungen. Um zu überprüfen, ob CNP Änderungen des Proteoms verursachen, wurde in Kooperation mit dem Molecular Proteomics Laboratory (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) von

Dr. Gereon Poschmann eine labelfreie Methode zur Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Grundlage für die Messung bildet die Tatsache, dass die Signalintensität eines Peptids im Massenspektrometer mit seiner Konzentration in der Probe korreliert. Somit ist es möglich anhand der Signalintensität, genauer mit *area under the curve* (AUC), ein bestimmtes Peptid über mehrere Proben hinweg relativ zu quantifizieren.

Für die Durchführung wurden subkonfluente Zellen mit in großen Zellkulturschalen (Ø 10 cm) behandelt. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen für die Messung, wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, aufbereitet. Die Proben wurden im Molecular Proteomics Laboratory (MPL) vermessen. Für die Auswertung wurden Vulcano Plots mit der Software Perseus erstellt.

2.2.4.3 Analyse von reversiblen Cystein/Thiol-Modifikationen in Proteinen mit BIAM-Switch Assay („Redox-Proteomics“)

Um den Redox-Status bezüglich der Thioloxydation von Zellen zu visualisieren und die posttranslational veränderten Proteine mit reversiblen Cysteinoxydationen zu identifizieren wurde eine Methode über die Massenspektrometrie in Kooperation mit Frau Dr. Ilka Wittig (Institut für Funktionelle Proteomics, Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt. Hierfür werden zuerst freie Thiolgruppen mit N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert, um den Oxidationszustand der Cysteine zu erhalten. Nach Entfernung von ungebundenem NEM werden oxidierte Cysteine mittels Dithiothreitol (DTT) reduziert, welche im Folgenden über biotinyliertes Iodoacetamid (BIAM) markiert und an Streptavidin-beschichtete Beads gebunden werden. Anschließend können die gebundenen Proteine angereichert und über die Massenspektrometrie analysiert werden.

Für die Versuchsdurchführung wurden subkonfluente Zellen in großen Zellkulturschalen (Ø 10 cm) behandelt. Nach der Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit NEM-haltigem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20% TCA abgekratzt und in Eppendorf-Gefäße überführt. Für das weitere Vorgehen wurden die Proben in die Abteilung Funktionelle Proteomics der Goethe-Universität Frankfurt geschickt. Für die Auswertung wurden Vulcano Plots mit der Software Perseus erstellt.

2.3 Allgemeine Versuchsbedingungen

Verwendete Lösungen wurden mit dH₂O aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Die im Ergebnisteil dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt (Ausnahmen sind vermerkt). Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Clean Air Sterilbank, Thermo Life Sciences) durchgeführt.

2.4 Statistik

Für die statistische Analyse der Signifikanz wurden Tests wie One-Way-ANOVA mit anschließendem Dunett's Test bei Experimenten, die mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt wurden, mit Hilfe des Programms Graphpad Prism durchgeführt. Der Student's t-Test wurde durchgeführt, wenn zwei Datenreihen miteinander verglichen werden sollten. Vor der Studie wurden * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ als Maß für die Signifikanz festgelegt.

3 Ergebnisse

Die Entwicklung alternativer Therapieformen des malignen Melanoms ist aufgrund von begrenzten Therapiemöglichkeiten und der geringen Ansprechrate gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika von großer Bedeutung. Auf der Suche nach alternativen, therapeutischen Ansätzen gegen das schwer zu bekämpfende maligne Melanom haben redox-aktive Ceroxid-Nanopartikel (CNP) in früheren Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Es wurden cytotoxische und zudem auch antiinvasive Effekte in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* festgestellt (Alili et al., 2011; Sack-Zschauer et al., 2017a). Auch *in vivo* inhibierten CNP das Tumorwachstum in Xenograft-Mausmodellen (Alili et al., 2013). Allerdings sind die molekulare Wirkung und der zugrunde liegende Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind. Daher sollten in dieser Studie die Effekte von CNP auf Melanomzellen (A375) und im Vergleich dazu auf normale (gesunde, stromale) Hautmelanozyten (NHEM) und -fibroblasten (NHDF) untersucht werden. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung ist es wichtig, die Effekte auch auf normale Zellen zu ermitteln, um mögliche Nebenwirkungen zu erfassen. Neben Untersuchungen der Cytotoxizität, der Proliferation und der Aufnahme von CNP wurde auch die Wirkung von CNP auf die Proteinexpression untersucht. Aufgrund von redox-aktiven Eigenschaften von CNP wurde auch die Redox-Aktivität genauer untersucht. Da die Eigenschaften der Partikel für eine therapeutische Anwendbarkeit von großer Bedeutung sind, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel zunächst auf ihre Eigenschaften hin untersucht und mit anderen CNP verglichen um für weitergehende Untersuchungen die am besten geeigneten zu verwenden. Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (Sack-Zschauer et al., 2017b).

3.1 Charakterisierung der verwendeten CNP

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung ist eine genaue Charakterisierung der Nanopartikel (Größe, Aggregationsverhalten, Oberflächenladung und Oberflächeneigenschaften) notwendig (Sack-Zschauer et al., 2017b; Das et al., 2013; Dowding et al., 2013; Karakoti et al., 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten CNP sind kommerziell erhältliche Nanopartikel, welche von der Firma Sciventions (Toronto,

Kanada) erworben wurden. Die CNP (1.5 mg/ml bzw. ~ 8.7 mM) lagen in einer Acrylat-stabilisierten (1.27 mg/ml), wässrigen Suspension (pH 7-8) vor. Das nicht toxische Acrylat wird in der Synthese von Nanopartikeln häufig zur Gewährleistung der kolloidalen Stabilität in der Lösung und der Hemmung der Aggregation genutzt (Sehgal et al., 2005). Die Partikelaggregation verändert physikalische Eigenschaften von Nanopartikeln, sodass beispielsweise durch Größenzunahme die Aufnahme in die Zellen verlangsamt bzw. verhindert wird und die intrazellulären Effekte variieren können (Dowding et al., 2013; Albanese et al., 2012). Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigen (Abb. 3.1), dass die hier verwendeten Partikel überwiegend vereinzelt vorliegen. Gezeigt sind TEM-Aufnahmen nach Herstellerangaben und Messungen am XRD (*X-ray Diffraction*) (Abb. 3.1). Mittels XRD, auch Röntgendiffraktometrie oder Röntgenbeugung genannt, können Aussagen über die Struktur von Nanomaterialien getroffen werden (Arya et al., 2014; Whitfield und Mitchell, 2004). Das XRD-Spektrum zeigt, dass die in dieser Arbeit verwendeten CNP eine kristalline Struktur aufweisen.

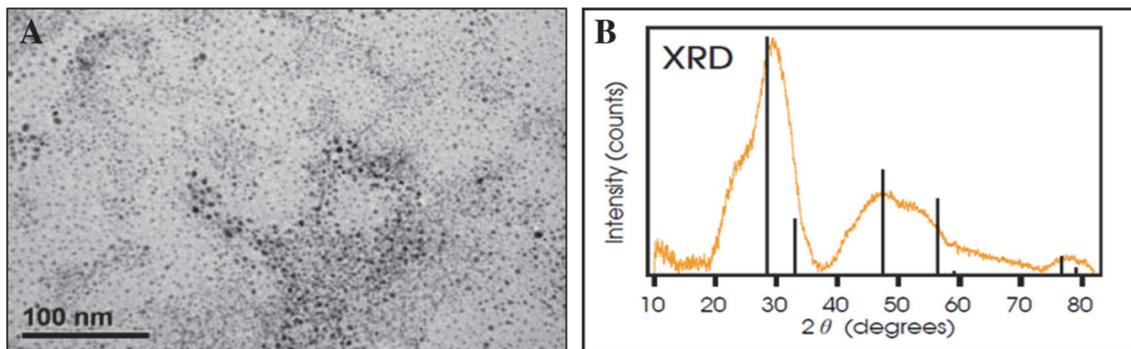


Abb. 3.1: Charakterisierung der verwendeten CNP (A) Transmissionselektronische Aufnahme (B) XRD-Spektrum (www.sciventions.com).

3.1.1 Bestimmung der Größe von CNP mittels DLS

Die TEM-Aufnahmen vom Hersteller (Abb. 3.1) deuten auf eine kleine Partikelgröße von CNP im Submikron-Bereich hin. Zur genauen Größenbestimmung der CNP wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie I (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Messungen mittels DLS (dynamische Lichtstreuung, engl. *dynamic light scattering*) durchgeführt. DLS ist eine weitverbreitete Technik zur Bestimmung der Größe und Größenverteilung von Nanopartikeln in Lösung (Murdock et al., 2008; Dörfler, 2002). In Abb. 3.2 ist die Größenverteilung der CNP

gezeigt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Für jede Messung wurden mindestens 3 Einzelmessungen durchgeführt, welche gemittelt wurden. Eine Größenverteilung kann nach Intensität, Volumen oder Anzahl angegeben werden. Die intensitätsgewichtete Verteilung, welche als Messwert zuerst angegeben wird, berücksichtigt nicht, dass größere Partikel mehr Licht streuen als kleinere Partikel. Mit entsprechenden Annahmen, beispielsweise über den Brechungsindex oder die Dichte der Partikel, kann die Verteilung umgerechnet werden, die größere Partikel übertönt. In der vorliegenden Arbeit ist daher die volumengewichtete Verteilung von CNP dargestellt, wobei die Größe als hydrodynamischer Durchmesser in nm angegeben wird. Das Ergebnis zeigt, dass sich die Größenverteilung der CNP über einen kleinen Bereich erstreckt und die Partikel im Mittel einen hydrodynamischen Durchmesser von $4.7 (\pm 3.6)$ nm haben. Da nur ein Hauptpeak zu sehen ist, kann festgestellt werden, dass die verwendeten CNP kein Agglomerationsverhalten aufweisen und vorwiegend einzeln vorliegen.

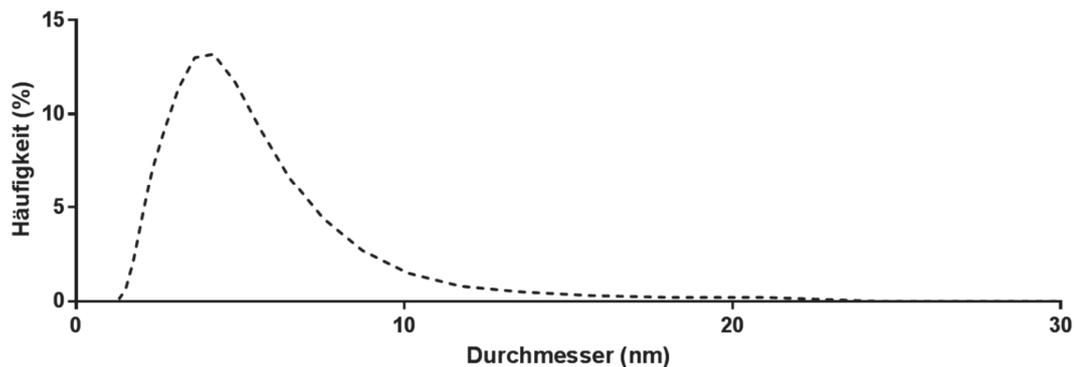


Abb. 3.2: Größenverteilung von CNP (veröffentlicht in Sack-Zschauer et al., 2017b) Die Bestimmung der Größe bzw. Größenverteilung erfolgte mit DLS. Dargestellt wurde die volumenbasierte Häufigkeitsverteilung gegen den hydrodynamischen Durchmesser (in nm) der Größenverteilung von CNP. Es wurden drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente ($n=3$) gemittelt und mit Hilfe der Software Zetasizer ausgewertet.

Als Referenz zu den in dieser Arbeit verwendeten CNP mit einer Größe von < 10 nm wurden weitere CNP mit einer durchschnittlichen Größe von ≥ 25 nm verwendet (CNP-S von Sigma), welche zudem auch stärker agglomerieren und so eine Größe von bis zu 100 nm erreichen können (Daten nicht gezeigt, veröffentlicht in Sack-Zschauer et al., 2017b). Untersuchungen in Zellen zeigten, dass größere Partikel wie CNP-S im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung nicht geeignet sind (Sack-Zschauer et al., 2017b). Deshalb sind die in dieser Studie verwendeten Partikel mit einem kleinen Durchmesser (< 10 nm) für weitere, biochemische Untersuchungen am besten geeignet. Nicht nur die

kleine Größe ist ein positives Kriterium für die Entscheidung der weiteren Verwendung, sondern auch die Eigenschaft hinsichtlich einer redox-aktiven Wirkung, welche im nächsten Kapitel näher erläutert und untersucht wird.

3.1.2 Analyse der Transmission von CNP zur Bestimmung des Oxidationsstatus

CNP weisen aufgrund der Fähigkeit des Lanthanoids Cerium (Ce), zwischen seinen zwei Oxidationsstufen (III und IV) wechseln zu können, vielversprechende Eigenschaften bezüglich einer redox-aktiven Wirkung auf. Nicht nur die Fähigkeit zwischen den beiden Oxidationsstufen autokatalytisch wechseln zu können, sondern auch die Entstehung von Sauerstoffvakanz auf der Oberfläche bei der Herstellung der Partikel begünstigt die Redox-Aktivität der CNP (Das et al., 2013; Karakoti et al., 2010; Korsvik et al., 2007). Hierbei ist die biologische Aktivität der Partikel in den Zellen stark von dem Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} abhängig (Sack-Zschauer et al., 2017b; Pulido-Reyes et al., 2015; Dunnick et al., 2015). Die Analyse der Transmission der Partikel mit UV/VIS Spektroskopie liefert Hinweise auf deren Oberflächenladung, denn in Anwesenheit von Ce^{3+} auf der Partikeloberfläche ist im Transmissionsspektrum nach Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ein charakteristischer *shift* des Spektrums in den langweiligen Bereich (nach rechts) zu beobachten (Heckert et al., 2008a). Dieser *shift* wird als Folge einer Änderung der Oxidationsstufe gesehen. Hierbei wird durch die Zugabe von H_2O_2 das Ce^{3+} zu Ce^{4+} oxidiert.

Für die Untersuchung der Transmission der hier verwendeten CNP wurde in dieser Arbeit nach der Methode von Heckert et al. (2008), gearbeitet. Transmissionspektren von CNP (1 mM) wurden vor und nach der Oxidation durch H_2O_2 in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 1100 nm aufgezeichnet. Das Ergebnis in Abb. 3.3 zeigt, dass die hier verwendeten Partikel nach Zugabe von H_2O_2 den oben beschriebenen *shift* (um ca. 100 nm) zeigen. Das Ce in den hier verwendeten CNP zeigt somit ein Mischverhältnis der Oxidationsstufen III und IV. Durch den Vergleich mit Partikeln, für welche das Verhältnis von Ce^{3+} zu Ce^{4+} bekannt ist (Sack-Zschauer et al., 2017b; Korsvik et al., 2007), kann vermutet werden, dass ein ausgewogenes Verhältnis von Ce^{3+} - zu Ce^{4+} -Ionen in der Nanopartikel-Lösung vorliegt, welches durch Oxidation zugunsten von Ce^{4+} verschoben wird.

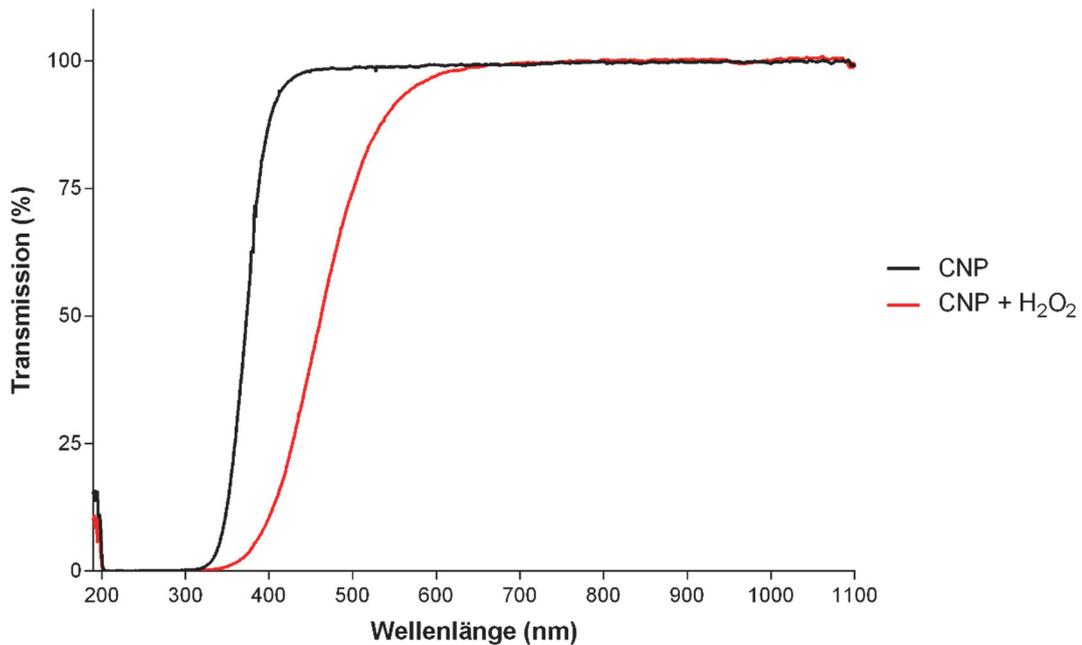


Abb. 3.3: Charakteristisches Transmissionsspektrum von CNP mit den Oxidationsstufen III und IV (veröffentlicht in Sack-Zschauer et al., 2017b) Transmission einer 1 mM CNP-Lösung mit einem ausgeglichenen Verhältnis von Ce³⁺ zu Ce⁴⁺ (schwarze Linie) und typischer *shift* nach Oxidation durch H₂O₂ (75 mM) in Richtung Ce⁴⁺ (rote Linie).

Der charakteristische *shift* erfolgt nur in Anwesenheit von Partikeln mit der Oxidationsstufe III. CNP, die auf ihrer Oberfläche nur die Oxidationsstufe IV aufweisen, zeigen nach der Zugabe von H₂O₂ keinen *shift* nach rechts. Als Referenz wurden CNP-S untersucht, die bekanntermaßen auf ihrer Oberfläche nur die Oxidationsstufe IV haben. In Abb. 3.4 ist zu sehen, dass CNP-S (1 mM) keine Verschiebung des Transmissionsspektrums nach Zugabe von H₂O₂ zeigen. Es wird nicht verändert und somit kann geschlossen werden, dass diese Partikel aufgrund einer niedrigen Menge oder komplett fehlendem Ce³⁺ nicht oxidiert werden können und dass das Cer dieser Partikel ausschließlich als Ce⁴⁺ vorliegt. Somit ist eine Redox-Aktivität dieser Partikel nicht gegeben und eine intrazelluläre Wirkung der CNP-S deshalb ausgeschlossen. Für die weiteren Experimente wurden CNP mit einer kleinen Größe (< 10 nm) und einem vorliegenden Ce³⁺/Ce⁴⁺-Verhältnis verwendet. Eine genaue Bestimmung der prozentualen Mengen von Ce³⁺ und Ce⁴⁺ war mit den vorliegenden Methoden nicht möglich.

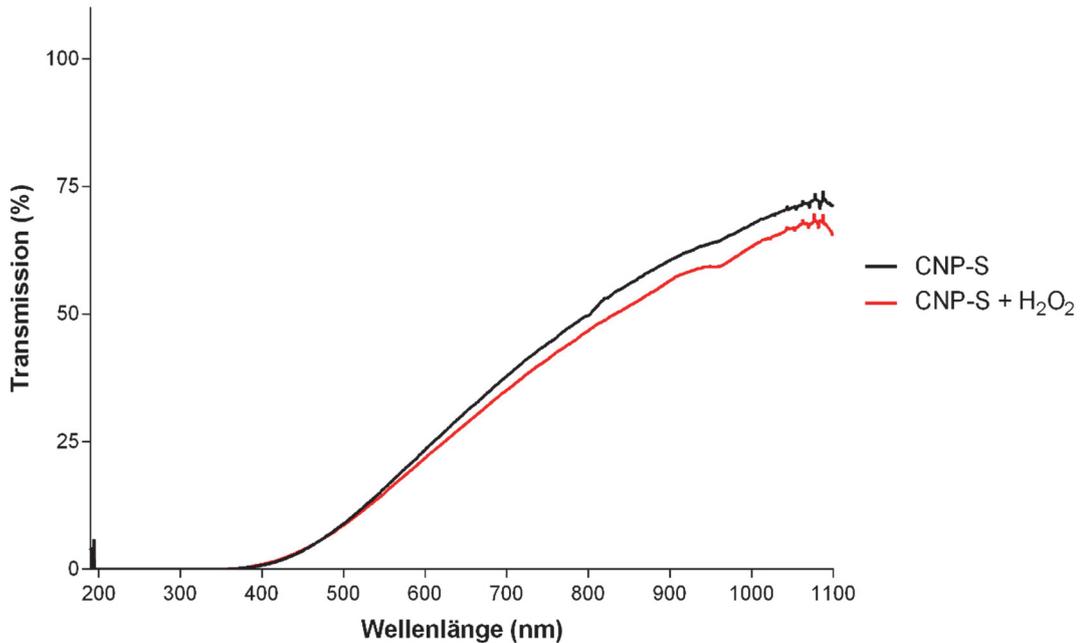


Abb. 3.4: Charakteristisches Transmissionsspektrum von CNP-S mit der Oxidationsstufe IV (veröffentlicht in Sack-Zschauer et al., 2017b) Transmission einer 1 mM CNP-S Lösung vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) der Oxidation durch H₂O₂. Es wurde kein *shift* nach Zugabe von H₂O₂ beobachtet.

3.1.3 Untersuchungen zur SOD-mimetischen Aktivität von CNP

Mechanistische Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von redox-aktiven CNP zeigen, dass CNP in zellfreien Systemen eine Superoxid-Dismutase (SOD)-mimetische Aktivität aufweisen (Alili et al., 2011; Korsvik et al., 2007). Ähnlich der zellulären SOD wird eine zweistufige Reaktion angenommen. Es wird vermutet, dass in der ersten Teilreaktion Ce⁴⁺ durch Superoxid zu Ce³⁺ reduziert wird, wodurch aus Superoxid molekularer Sauerstoff entsteht. In der zweiten Teilreaktion reagiert Ce³⁺ mit einem weiteren Superoxid und 2 Protonen (H⁺) zu H₂O₂. Hierbei wird Ce³⁺ wieder zu Ce⁴⁺ oxidiert (Korsvik et al., 2007). Um zu überprüfen, ob die in dieser Studie verwendeten CNP ebenfalls katalytisch wirken und eine SOD-mimetische Wirkung aufweisen, wurde ein zellfreier SOD-Test unter Verwendung von einem Xanthin/Xanthinoxidase-System (X/XO-System) als Superoxidquelle und einem Tetrazoliumsalz (MTT) als Farbindikator der Reaktion durchgeführt. Das gebildete Superoxid kann MTT zu blau-violettem Formazan reduzieren, dessen Bildung photometrisch bei 570 nm bestimmt werden kann. Somit ist die Bildung von Formazan ein indirekter Nachweis für die Entstehung und

Anwesenheit von Superoxid. Die Zugabe von SOD oder SOD-mimetischen CNP eliminiert das gebildete Superoxid und hemmt somit die Bildung von Formazan. Die Rate der Hemmung ist somit ein Hinweis auf die Aktivität der SOD bzw. SOD-mimetischen CNP.

Um den Assay zu verifizieren, wurde als Positivkontrolle aufgereinigte SOD der Firma Abcam in den Konzentrationen 1 U/ml, 2 U/ml und 5 U/ml eingesetzt. Anhand der Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass das verwendete System funktioniert und zur Überprüfung der SOD-Wirkung von CNP eingesetzt werden kann. Die Zugabe von reiner SOD hemmt im Vergleich zur Negativkontrolle die Bildung von Formazan konzentrationsabhängig. Die Zugabe von 1 U/ml SOD hemmt die Bildung von Formazan um ca. 32%, 2 U/ml um ca. 47% und 5 U/ml um ca. 66%. (Abb. 3.5). Die Messung von SOD dient als Positivkontrolle und wurde daher nur einmal durchgeführt.

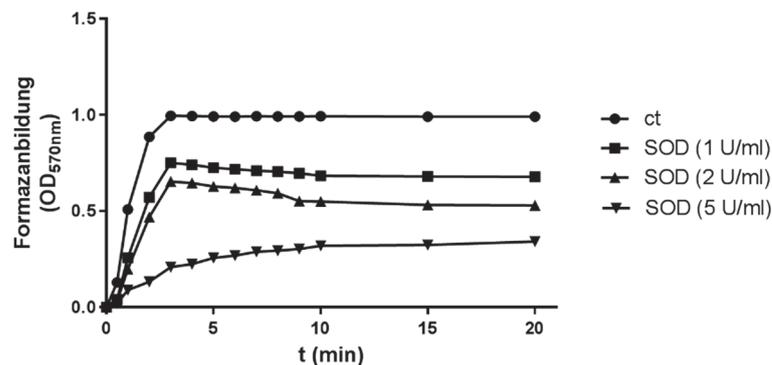


Abb. 3.5: Aktivität der SOD Die Aktivität wurde mit Hilfe von MTT in einem Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)-System als Superoxidquelle gemessen. MTT dient als Detektor für die gebildeten Superoxidradikale. Die Reduktion von gelbem MTT zu blau-violettem Formazansalz durch die Superoxidradikale wird in Anwesenheit von SOD gehemmt, sodass weniger Formazan gebildet wird. Die Bildung von Formazan wurde photometrisch bei 570 nm gemessen (n=1). t, Zeit; ct, Kontrolle

Nach Bestätigung der Funktionalität des Assays wurden im Weiteren CNP auf ihre SOD-mimetische Eigenschaft hin untersucht. Für die Durchführung wurden CNP in drei verschiedenen Konzentrationen (150 μ M, 500 μ M und 1000 μ M) getestet. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente für jede Konzentration durchgeführt. Dargestellt sind eine repräsentative Kinetik (Abb. 3.6) und die Zusammenfassung der Experimente (Abb. 3.7) mit der prozentualen Hemmung der Formazanbildung in Bezug auf die Kontrolle. Die Ergebnisse zusammen (Abb. 3.6 und 3.7) zeigen, dass CNP die Bildung von Formazan signifikant und konzentrationsabhängig hemmen. Abb. 3.7 zeigt, dass in

Anwesenheit von 150 μM CNP ca. 33% weniger Formazan gebildet wird, wobei mit 300 μM die Hemmung 52% und mit 1 mM 68% beträgt.

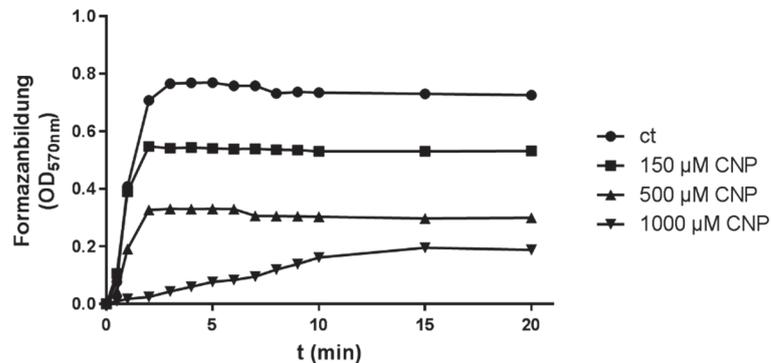


Abb. 3.6: SOD-mimetische Aktivität von CNP Die Aktivität wurde mit Hilfe von MTT in einem Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)-System als Superoxidquelle gemessen. MTT dient als Detektor für die gebildeten Superoxidradikale. Die Reduktion von gelbem MTT zu blau-violettem Formazansalz durch die Superoxidradikale wird in Anwesenheit von CNP gehemmt, sodass weniger Formazan gebildet wird. Die Bildung von Formazan wurde photometrisch bei 570 nm gemessen. Dargestellt ist eine repräsentative Messung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n=3$). t, Zeit; ct, Kontrolle

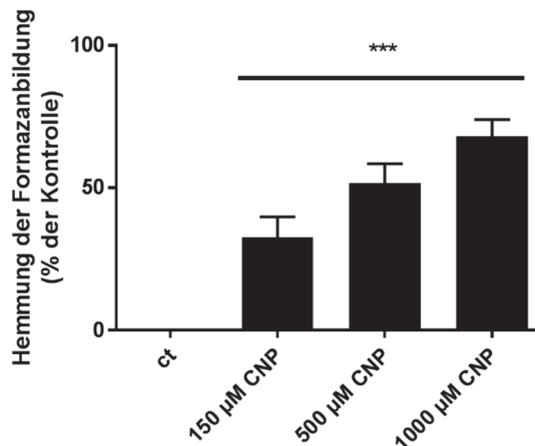


Abb. 3.7: Hemmung der Formazanbildung durch CNP Die SOD-mimetische Wirkung von CNP wurde mit Hilfe von MTT in einem Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)-System gemessen. Die Reduktion von gelbem MTT zu blau-violettem Formazansalz durch die vom X/XO-System gebildeten Superoxidradikale wird in Anwesenheit von CNP gehemmt, sodass weniger Formazan entsteht. Die Bildung von Formazan wurde photometrisch bei 570 nm gemessen. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Formazanbildung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n=3$) (** $p < 0.001$; One-way-ANOVA mit Dunett's post hoc Test). ct, Kontrolle

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in vielen Publikationen beschriebene SOD-mimetische Aktivität der CNP auch in den in dieser Arbeit verwendeten CNP nachgewiesen werden kann. Zusammen mit den vorherigen Ergebnissen bezüglich der

Partikelgröße (Abb. 3.2) und Oberflächenladung (Abb. 3.3) kann festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten CNP geeignete Eigenschaften für weitergehende biochemische Untersuchungen in Zellen aufweisen.

3.2 Einfluss von CNP auf Zellviabilität und -proliferation

Für neue Therapien von Krebserkrankungen, in diesem Fall von Hautkrebs, sind neben Erkenntnissen über die Wirkung auf Tumorzellen auch die Aufklärung über die Wirkung auf normale Zellen erforderlich, um mögliche Nebenwirkungen und auch Einflüsse auf die Tumor-Stroma Interaktion zu erfassen. Um die Wirkung von CNP auf Hautkrebszellen zu testen, wurden Melanomzellen der Zelllinie A375 verwendet. Als Referenz für normale (gesunde, stromale) Zellen wurde mit Hautzellen gearbeitet, welche *in vivo* den Tumor umgeben und einen großen Anteil der Zellen der Haut bilden. Zum einen wurden normale humane epidermale Hautmelanozyten (NHEM), welche den nicht transformierten Zelltyp der Melanomzellen repräsentieren, und zum anderen normale humane dermale Hautfibroblasten (NHDF) untersucht, welche eine bedeutende Rolle in der Tumor-Stroma Interaktion spielen und den Hauptteil der Zellen der Haut bilden. Somit stellen diese Zellen das ideale Modell stromaler Zellen dar. In Abb. 3.8 sind mikroskopische Bilder von Melanomzellen (A375) (A), epidermalen Melanozyten (NHEM) (B) und dermalen Fibroblasten (NHDF) (C) zu sehen. Für die Durchführung der Experimente wurde mit subkonfluenten Zellen gearbeitet.

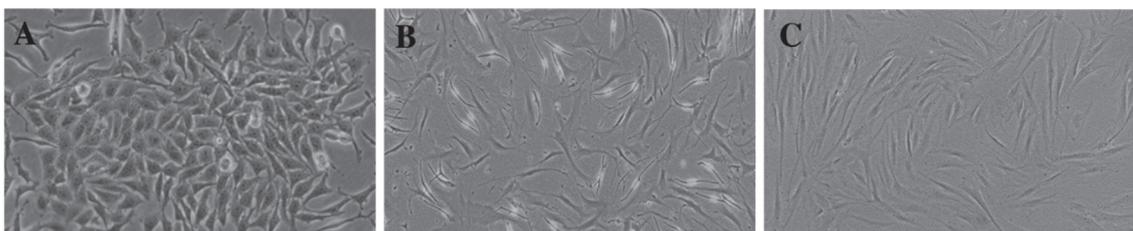


Abb. 3.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelltypen Gezeigt sind subkonfluente (A) Melanomzellen (A375), (B) normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) und (C) normale humane dermale Fibroblasten (NHDF).

3.2.1 Cytotoxizität von CNP

Wie bereits in vorherigen Kapiteln erwähnt, zeigen *in vitro* Untersuchungen mit Dextran-gekoppelten CNP cytotoxische Effekte in einigen Tumorzelllinien (Alili et al., 2013; Alili et al., 2011), wohingegen in den untersuchten normalen Zellen keine Toxizität festgestellt wurde, sondern tendenziell sogar eine Protektion gegenüber exogenen Noxen wie Doxorubicin (Sack et al., 2014) oder Paraquat (von Montfort et al., 2015). Um die Wirkung der hier verwendeten Acrylat-stabilisierten CNP auf die zu untersuchenden Zellen zu ermitteln, wurde ein Cytotoxizitätstest durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss von CNP auf die Zellviabilität von Melanomzellen (A375) und normalen Hautzellen (NHEM und NHDF) mit Hilfe des MTT-Assays untersucht. Für die Durchführung des MTT-Assays wurden zunächst subkonfluente Melanomzellen mit verschiedenen Konzentrationen CNP (150 μM , 300 μM und 450 μM) für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h behandelt. In Abb. 3.9 ist das Ergebnis als Dosis-Wirkungs-Kurve von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Nach der Behandlung mit CNP konnte in den Melanomzellen eine signifikante, konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität festgestellt werden. Nach 24 h ist bei allen drei Konzentrationen keine relevante Toxizität aufgetreten, sodass bei der höchsten Konzentration von 500 μM die Zellviabilität etwa 89% beträgt. Eine stärkere Abnahme der Zellviabilität konnte erst bei längeren Inkubationszeiten (> 48 h) festgestellt werden. Nach 48 h wird bei der geringsten Konzentration von 150 μM eine Verringerung der Zellviabilität um ca. 11% erreicht, welche mit zunehmender Konzentration stärker wird. Bei 300 μM liegt die Zellviabilität bei 83% und bei 500 μM bei 70%. Nach 72 h werden die cytotoxischen Effekte durch CNP noch stärker, sodass in den beiden höheren Konzentrationen von 300 μM und 500 μM eine signifikante Toxizität durch CNP erreicht wird. Demzufolge verringert sich die Zellviabilität bei 300 μM um ca. 48% und bei 500 μM um ca. 68%. Nach 72 h Inkubation mit 150 μM beträgt die Zellviabilität ca. 65%. Nach 96 h verringert sich die Zellviabilität noch weiter, sodass diese bei der höchsten Konzentration von 500 μM nur noch bei ca. 16% liegt. Nach 96 h Inkubationszeit mit 150 μM ist die Zellviabilität auf ca. 44% und bei 300 μM auf ca. 27% gefallen. Somit zeigen die CNP eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Toxizität in den A375 Melanomzellen.

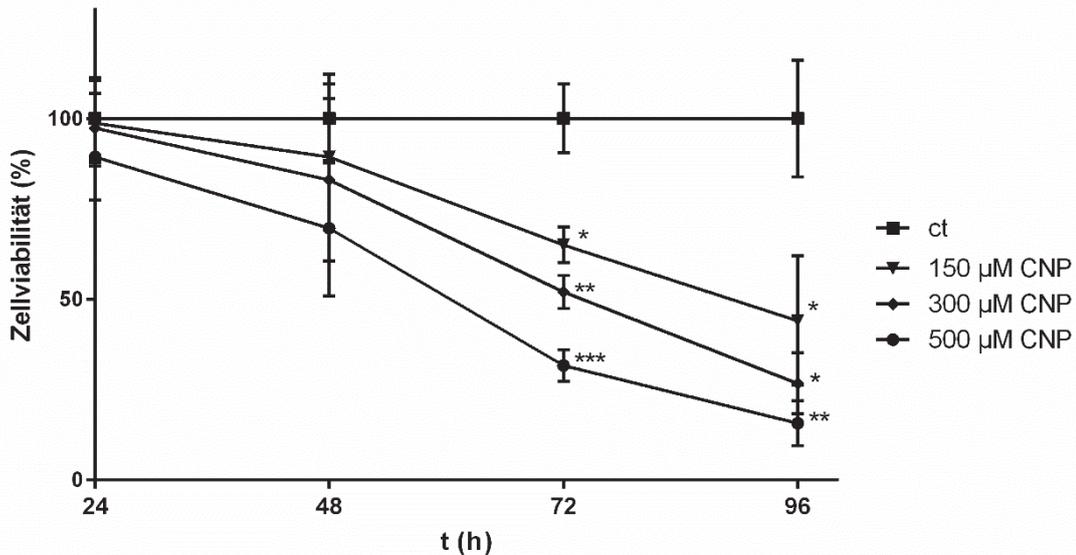


Abb. 3.9: Zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Cytotoxizität von CNP in Tumorzellen
 Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mit 150 µM, 300 µM und 500 µM CNP behandelt. Die Zellviabilität wurde durch den MTT-Test bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente (n=3) mit Dreifachbestimmungen in jeder Dosisgruppe für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Die Mittelwerte \pm S.E.M. der Absorptionen bei 570 nm wurden bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (ct), deren Viabilität auf 100% gesetzt wurde, bezogen. Dargestellt sind die prozentualen Erniedrigungen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; One-way-ANOVA mit Dunett's post hoc Test). t, Zeit

Um die Wirkung von CNP in normalen Hautzellen zu überprüfen, wurden Melanozyten (NHEM) und Fibroblasten (NHDF) ebenfalls mit 150 µM, 300 µM und 500 µM CNP behandelt. Da die stärkste Toxizität von CNP in den Melanomzellen nach 96 h nachgewiesen werden konnte, wurde der Assay in normalen, stromalen Zellen nur nach 96 h durchgeführt. Das Ergebnis in Abb. 3.10 zeigt, dass CNP nach 96 h keine cytotoxischen Effekte auf normale Zellen haben, sodass folglich eine Überprüfung der früheren Zeitpunkte nicht erforderlich ist, weil eine vorangegangene Toxizität ausgeschlossen werden kann. Es kann vielmehr tendenziell sogar eine Zunahme der Zellviabilität nach Behandlung mit CNP beobachtet werden. In Abb. 3.10 sind Tumorzellen und normale Hautzellen im Vergleich dargestellt. CNP wirken toxisch auf Tumorzellen, wohingegen keine toxischen Effekte in normalen Zellen festgestellt werden können.

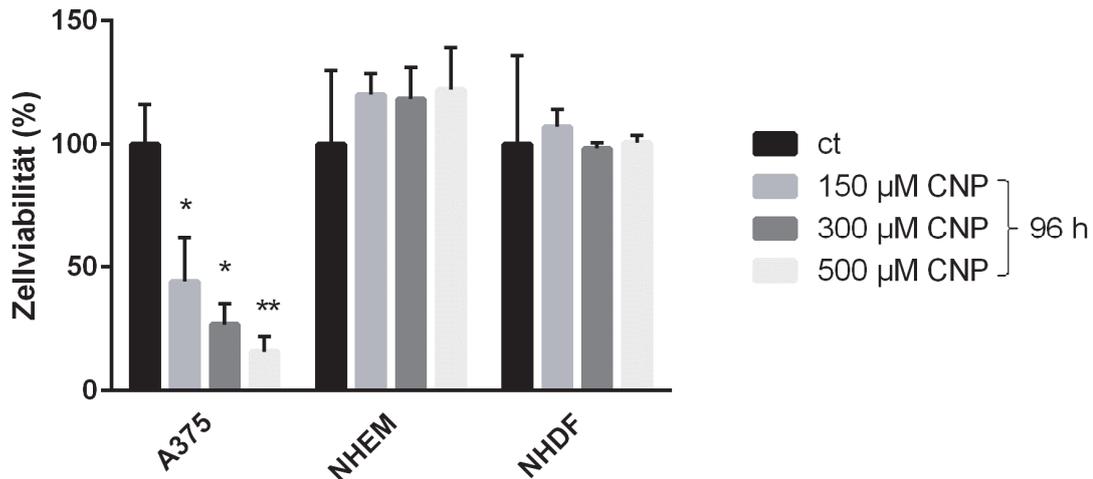


Abb. 3.10: Selektiv cytotoxische Wirkung von CNP in Tumorzellen Subkonfluente Melanomzellen (A375), normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) und normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) wurden 96 h mit 150 µM, 300 µM und 500 µM CNP behandelt. Die Zellviabilität wurde durch den MTT-Test bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente (n=3) mit Dreifachbestimmungen in jeder Dosisgruppe für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Die Mittelwerte der Absorptionswerte \pm S.E.M., gemessen bei 570 nm, wurden bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (ct), deren Viabilität auf 100% gesetzt wurde, bezogen. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (*p<0.05, **p<0.01; One-way-ANOVA mit Dunett's post hoc Test).

Für die folgenden Experimente wurde basierend auf den Ergebnissen des MTT-Assays hauptsächlich die Konzentration von 300 µM für die Behandlung der Zellen mit CNP festgelegt, da diese Konzentration toxisch auf Tumorzellen und nicht toxisch, tendenziell sogar proliferationsfördernd, auf normale Zellen wirkt. Ebenso wurden weitere *in vitro* Untersuchungen immer im Bereich von 24 h bis 72 h durchgeführt, da ab 72 h zunehmende Cytotoxizität in den Tumorzellen einsetzt.

3.2.2 Effekt von CNP auf die Zellproliferation

Nach den vielversprechenden Daten zur Cytotoxizität sollte als nächstes untersucht werden, inwiefern CNP die Proliferation der Zellen beeinflussen. Um CNP gegen maligne Tumoren einsetzen zu können, sollten diese die Proliferation der Tumorzellen nicht positiv beeinflussen, sondern vielmehr verringern. Eine Erhöhung der Proliferation würde das Wachstum des Tumors begünstigen und somit gegen den therapeutischen Einsatz von CNP sprechen. Um den Einfluss von CNP auf die Zellproliferation von Melanomzellen (A375) und normalen Hautzellen (NHEM und NHDF) zu untersuchen, wurde der BrdU-Proliferationstest der Firma Merck durchgeführt.

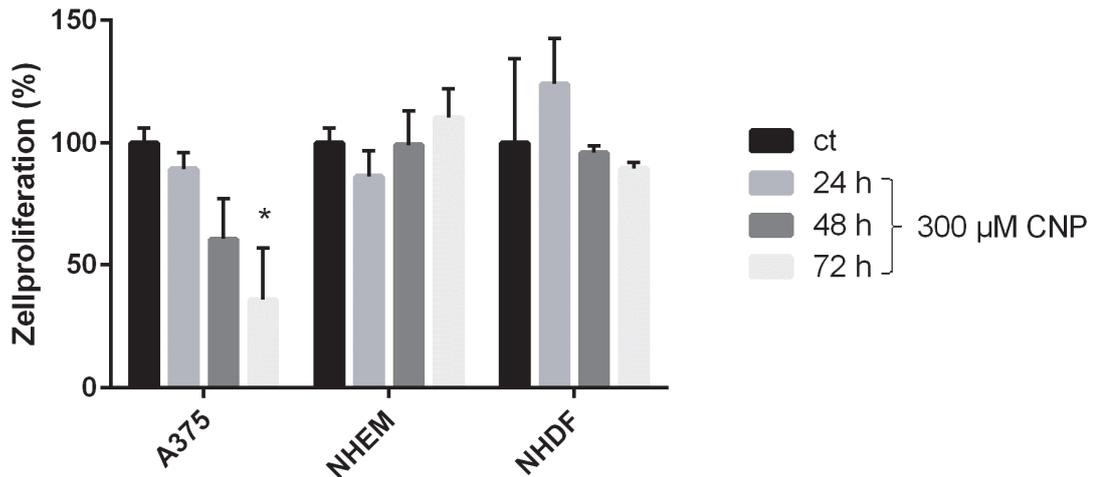


Abb. 3.11: Selektiv proliferationshemmende Wirkung von CNP in Tumorzellen Subkonfluente Melanomzellen (A375), normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) und normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) wurden 24 h, 48 h und 72 h mit 300 μ M CNP behandelt. Die Zellproliferation wurde durch den BrdU-Assay bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente ($n=3$) mit Zweifachbestimmung für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. der RFU (*relative fluorescence units*) als Maß für die Proliferation. Die Proliferationsrate der unbehandelten Kontrollzellen (ct) wurde auf 100% gesetzt und die Messwerte der behandelten Zellen auf diese bezogen (* $p<0.05$; One-way-ANOVA mit Dunett's post hoc Test).

Alle Zellen wurden mit 300 μ M CNP für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die längste Inkubationszeit von 96 h wurde aufgrund der hohen Cytotoxizität in A375 Melanomzellen (Abb. 3.9 und 3.10) nicht getestet. Nach Ende der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen mit dem Thymidin-Analogon BrdU für 24 h inkubiert. Der Einbau von BrdU in die neusynthetisierte DNA dient als Maß für die Proliferation der Zellen. Abb. 3.11 zeigt die Mittelwerte von jeweils drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, wobei die unbehandelten Kontrollen der einzelnen Zelltypen auf 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen wurden. In Melanomzellen zeigt die Behandlung mit 300 μ M CNP eine zeitabhängige Abnahme der Proliferation, während in Melanozyten und Fibroblasten der Haut keine durch CNP hervorgerufene Abnahme der Proliferation beobachtet wird, vielmehr sogar tendenziell eine CNP-bedingte Erhöhung der Zellproliferation. Demzufolge beträgt die Abnahme der Proliferation in den Melanomzellen im Vergleich zu den unbehandelten Melanomzellen (ct) nach 24 h 10%, nach 48 h 39% und nach 72 h 64%.

Die Ergebnisse der Proliferation korrelieren somit mit den Ergebnissen zur Cytotoxizität von CNP in diesen Zellen. Zusammenfassend zeigen CNP bei Tumorzellen

proliferationshemmende und cytotoxische Effekte, während in normalen Hautzellen bei gleichen Konzentrationen kein Einfluss auf die Viabilität und auch Proliferation beobachtet werden kann.

3.3 Aufnahme von CNP in die Zellen

In früheren Studien wurden durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von vergleichbar großen CNP sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FITC-markierten CNP eine intrazelluläre Aufnahme in Tumorzellen und normalen Zellen gezeigt (Sack et al., 2014; Alili et al., 2011). Hierbei wurden CNP hauptsächlich im Cytosol der Zellen detektiert. Die intrazelluläre Verteilung von CNP, welche frühestens nach 4 h nachgewiesen werden konnte, beschränkt sich auf das Cytosol, wohingegen CNP nicht im Zellkern nachweisbar waren. Diese Beobachtung bestätigt, dass CNP keine genotoxischen Effekte aufweisen (Sack et al., 2014).

Im Weiteren sollte die zelluläre Aufnahme der hier verwendeten Acrylat-stabilisierten CNP näher untersucht werden. Denn bislang wurde nicht aufgeklärt, ob CNP konzentrationsabhängig von verschiedenen Zelltypen wie Tumorzellen und normalen, stromalen Zellen in unterschiedlichen Mengen aufgenommen werden. Ein Unterschied in der Aufnahme von CNP könnte zu dem in den vorangegangenen Experimenten beobachteten selektiven Effekt von CNP in Tumorzellen und normalen Hautzellen führen. Es wurde gezeigt, dass CNP toxisch und proliferationshemmend in Tumorzellen wirken, während kein negativer Einfluss auf normale Zellen beobachtet wird. Um die Menge aufgenommener CNP quantifizieren zu können, wurde eine massenspektrometrische Methode mit induktiv gekoppeltem Plasma, auch ICP-MS genannt, angewendet. Die Methode der ICP-MS ermöglicht den quantitativen Nachweis nahezu aller chemischen Elemente. Der quantitative Nachweis von Nanopartikeln erfolgt über die spezifische Elementbestimmung. Folglich wurden CNP über die analytische Bestimmung des Cerium (Ce)-Gehalts nachgewiesen.

Da nicht nur die Aufnahme an sich („*proof of uptake*“), sondern quantitativ die aufgenommene Menge in Tumorzellen und normalen Hautzellen verglichen und zudem eine Beziehung zwischen den beobachteten toxischen Effekten in Tumorzellen und tatsächlich aufgenommener CNP-Menge aufgestellt werden sollte, wurden ein früher Zeitpunkt (24 h), bei dem keine bis leichte toxischen Effekte in den Tumorzellen

beobachtet werden, und ein späterer Zeitpunkt (72 h), bei welchem eine deutliche Toxizität in Tumorzellen zu sehen ist, getestet. In den gesunden, stromalen Zellen ist zu keinem dieser Zeitpunkte eine Toxizität sichtbar.

Für die Versuchsdurchführung wurden subkonfluente Melanomzellen (A375) und Melanozyten (NHEM) mit 300 μM CNP für 24 h und 72 h inkubiert. Melanozyten wurden für dieses Experiment als repräsentativer normaler Zelltyp der Haut verwendet. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Messung der Proben erfolgte von Dr. Volker Nischwitz mit ICP-MS im Forschungszentrum Jülich in der Abteilung Analytik ZEA-3. In Abb. 3.12 sind Mittelwerte von zwei Replikaten pro Behandlung dargestellt, wobei die gemessene Ce-Menge auf die Masse der Zellproben bezogen wurde.

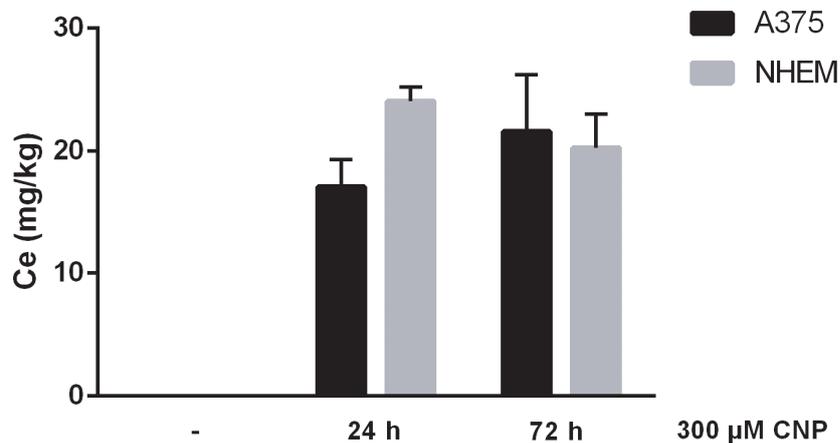


Abb. 3.12: Identische Menge an CNP in Melanomzellen und Melanozyten Für die Untersuchung wurden subkonfluente A375 Melanomzellen und Melanozyten (NHEM) mit 300 μM CNP für 24 h und 72 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (-). Zwei große Zellkulturschalen wurden pro Ansatz prozessiert. Die Messung erfolgte mittels ICP-MS (Forschungszentrum Jülich). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. der Messwerte, welche auf die Masse der Zellproben bezogen wurden. Ce, Cerium

Die Analyse mittels ICP-MS ergibt, dass die Behandlung mit CNP keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme in Melanomzellen und Melanozyten zeigt. Nach 24 h ist die nachgewiesene Ce-Menge in Melanozyten tendenziell größer als in Melanomzellen, wobei nach 72 h kaum noch Unterschiede sichtbar sind, sodass die Ce-Menge bei beiden Zelltypen ungefähr gleich ist. Innerhalb der jeweiligen Zelltypen gibt es auch keine signifikanten, zeitabhängigen Unterschiede. Die Ce-Menge in den Melanomzellen ist nach 72 h Inkubation tendenziell mehr als nach 24 h, wobei in den Melanozyten eine

leichte Abnahme nach 72 h im Gegensatz zu 24 h sichtbar ist. Bei den unbehandelten Kontrollen der beiden Zelltypen kann wie erwartet kein Cerium nachgewiesen werden.

Ein wichtiger Aspekt, der durch die Analyse mittels ICP-MS auch festgestellt werden kann, ist, dass von der eingesetzten CNP-Konzentration (300 μ M), welche mit 51.6 mg/l gleichzusetzen ist, zwischen 33% und 46% in der ICP-MS nachgewiesen werden. Es ist zu bemerken, dass in die Messwerte sowohl die intrazellulär aufgenommene Menge von CNP als auch diejenige an der äußeren Zellmembran eingehen. Eine alternative, nachweisstärkere Methode als die ICP-MS zur Differenzierung und Quantifizierung der intra- und extrazellulären CNP war nicht gegeben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Menge an CNP in Tumorzellen und normalen Zellen nahezu identisch ist. Nicht die Menge, sondern nur die zelluläre Wirkung von CNP, welche Gegenstand von weiteren Untersuchungen dieser Arbeit darstellt, scheint ausschlaggebend für die selektive Wirkung zu sein.

3.4 CNP-bedingte Modulation der Apoptose in Tumorzellen

Die cytotoxische Wirkung einer Substanz kann über verschiedene Wege vermittelt werden. Zum einen über die Apoptose, den physiologischen und programmierten Zelltod und zum anderen über die Nekrose, den unkontrollierten Zelltod, welcher mit pathologischen Prozessen wie z.B. Entzündung einhergeht (Ashkenazi und Salvesen, 2014; Maslinska, 2003). In der Literatur und auch in vorherigen Projekten innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brenneisen wurde gezeigt, dass Dextran-gekoppelte CNP ihre cytotoxische Wirkung in Tumorzellen über den apoptotischen Zelltod vermitteln. Alili et al. (2013) untersuchten klassische Marker der Apoptose wie die Freisetzung von Cytochrom C, die Aktivierung von Caspase 3 und die Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) nach Behandlung mit vergleichbaren CNP in Tumorzellen. Eine CNP-bedingte Induktion der Apoptose konnte mit diesen Markern nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit verwendeten Acrylat-stabilisierten CNP ebenfalls den apoptotischen Zelltod in A375 Melanomzellen induzieren, wurde ein Proteinarray der Firma R&D Systems zum Nachweis von apoptotischen Proteinen durchgeführt. Auf dem sogenannten Apoptose-Array befinden sich 35 Antikörper, die nach Inkubation mit Zelllysaten den parallelen Nachweis von 35 Apoptose-assoziierten

Proteinen ermöglichen. Für den Versuch wurden subkonfluente A375 Melanomzellen mit 300 μM CNP für 24 h und 72 h inkubiert. Als Referenzsubstanz wurden die Zellen mit 0.5 μM Doxorubicin für 24 h behandelt, eine Substanz, die in der herkömmlichen Chemotherapie als Cytostatikum häufig zum Einsatz kommt und über die Interkalation in die DNA, Hemmung der Topoisomerase II und Erhöhung der ROS-Menge Apoptose auslöst (Beretta und Zunino, 2008; Minotti et al., 2004a). Für die Auswertung wurde das erhaltene Proteinsignal densitometrisch ausgewertet und die Mittelwerte der Duplikate sowie das Verhältnis der Signale aus behandelten zu unbehandelten Proben gebildet. Das Experiment wurde zur Validierung der bereits veröffentlichten proapoptotischen Wirkung von CNP nur einmal durchgeführt, weshalb die Ergebnisse nicht statistisch, sondern nur tendenziell beurteilt werden können.

Das Ergebnis in Abb. 3.13 zeigt, dass CNP zeitabhängig die Erhöhung von wichtigen proapoptotischen Proteinen verursachen. Nach 24 h CNP-Behandlung wird in den meisten Apoptose-assoziierten Proteinen eine leichte Erhöhung beobachtet, wobei nach 72 h die Erhöhung deutlicher wird. Außerdem zeigt das Ergebnis, dass durch CNP beide Wege der Apoptose induziert werden. Hierbei wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose unterschieden, die durch die Induktion von charakteristischen Proteinen nachgewiesen werden können. Beim intrinsischen Weg wird durch die Expression pro-apoptotischer Proteine der Bcl2-Familie wie Bad und Bax die Ausschüttung von Cytochrom C mit anschließender Signalkaskade induziert (Elmore, 2007). Bezogen auf die unbehandelten Zellen führt CNP in den Melanomzellen zu einem 1.22-fachen Anstieg von Bad und zu einem 1.18-fachen Anstieg von Bax nach 24 h. Nach 72 h ist die Expression von Bad um das 2.03-fache und von Bax um das 1.56-fache erhöht. Die Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x ist nach CNP-Behandlung nicht moduliert (Daten nicht gezeigt). Weitere wichtige Proteine, welche bei der Induktion von Apoptose mitwirken, sind die des Zellzyklus. Kann der Zellzyklus aufgrund von Schäden nicht fortgesetzt werden, so wird p53 über Phosphorylierung aktiviert. Die Anhäufung von p53 führt zur Aktivierung von p21, welches die Proliferation unterbindet und schließlich zur Induktion von Apoptose führt (Gartel und Tyner, 2002). Beide Proteine sind nach der Behandlung mit CNP erhöht. Die Erhöhung ist nach 72 h 1.77-fach (p53) und 1.52-fach (p21).

Protein	(-)	300 μ M CNP 24 h	Ratio (+/-)	(-)	300 μ M CNP 72 h	Ratio (+/-)
Referenz Spots			1			1
Bad			1.22			2.03
Bax			1.18			1.56
TRAIL R1/DR4			1.16			1.66
TRAIL R2/DR5			1.17			1.35
FADD			1.22			1.70
Fas/TNFRSF6/CD95			0.91			1.43
HIF-1 α			0.98			1.32
p21/CIP1/CDKN1A			1.27			2.63
p27/Kip1			1.20			1.52
Phospho-p53 (S15)			1.03			1.77

Abb. 3.13: Zunahme proapoptotischer Proteinmarker nach Behandlung mit CNP in Tumorzellen
 Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden für 24 h und 72 h mit 300 μ M CNP inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Apoptose-Array durchgeführt (n=1). Dargestellt sind Antikörperspots ausgewählter proapoptotischer Proteine und das Verhältnis der Signale aus behandelten und unbehandelten Proben (Ratio +/-).

Der extrinsische Weg der Apoptose erfolgt über die Aktivierung zellmembranständiger, sogenannter Todesrezeptoren, die für die Weiterleitung der Signale von sogenannten Todesliganden intrazellulär verantwortlich sind und so zur Induktion von Apoptose führen (Khosravi-Far und Esposti, 2004). Zu diesen Rezeptoren gehören die TRAIL-Rezeptoren. Nach 72 h CNP-Behandlung wird eine 1.66-fache Erhöhung beim TRAIL R1-Rezeptor und eine 1.35-fache Erhöhung beim TRAIL R2-Rezeptor beobachtet. Weitere pro-apoptotische Proteine, die zum extrinsischen Weg gehören, sind FAS und FADD, welche ebenfalls nach der Behandlung mit CNP erhöht sind. Der extrinsische Weg kann über das Verknüpfungprotein tBid intrazellulär in den intrinsischen Weg überführt werden. Allerdings sind weitere Untersuchungen erforderlich, um nähere Aussagen bezüglich des Verhältnisses intrinsischer zu extrinsischer Apoptose durch CNP treffen zu können. Die vorliegenden Daten bieten einen Ansatz für diese Untersuchungen.

Ein weiterer Nachweis für eine pro-apoptotische Wirkung von CNP ist die Menge der α -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1, welcher als Transkriptionsfaktor die zelluläre Antwort auf Hypoxie reguliert und eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression einnimmt, indem HIF-1 die Transkription von Genen für Enzyme der Glykolyse und Prozesse der Angiogenese aktiviert (Lu et al., 2002). Unter normoxischen Bedingungen wird die Untereinheit HIF-1 α von spezifischen Prolylhydroxylasen

hydroxyliert, welche in Folge ubiquitiniert und zur Degradation vom gesamten HIF-1 Protein führt. Unter hypoxischen Bedingungen werden die Prolylhydroxylasen inaktiviert, sodass HIF-1 nicht destabilisiert wird (Semenza, 2008; Vaupel, 2004). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wird außerdem durch erhöhte ROS-Mengen aktiviert, welche einer Hypoxie ähneln, die sich u.a. in einem vermehrten ROS *signaling* äußert (Bonello et al., 2007). Alili et al. (2013) haben gezeigt, dass CNP zur Stabilisierung der α -Untereinheit und damit zur Aktivierung von HIF-1 führen. Mit den hier verwendeten CNP kann ebenfalls eine leichte Akkumulation von HIF-1 α nach 72 h festgestellt werden, was mit einer Erhöhung der Aktivität von HIF-1 einhergeht.

Das als Referenzsubstanz eingesetzte Cytostatikum Doxorubicin zeigt auch die Induktion von pro-apoptotischen Faktoren in A375 Melanomzellen (Abb. 3.14). Hierbei sind ebenfalls Erhöhungen in den Proteinen des intrinsischen und extrinsischen Weges zu sehen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass CNP und Doxorubicin in diesem Kontext ähnliche Wirkungen aufweisen und einen pro-apoptotischen Effekt auf die Tumorzellen ausüben.

Protein	(-)	0.5 μ M DOX 24 h	Ratio (+/-)
Referenz Spots			1
Bad			0.71
Bax			1.71
TRAIL R1/DR4			1.42
TRAIL R2/DR5			1.26
FADD			0.73
Fas/TNFRSF6/CD95			1.58
HIF-1 α			1.96
p21/CIP1/CDKN1A			1.65
p27/Kip1			2.27
Phospho-p53 (S15)			2.59

Abb. 3.14: Zunahme proapoptotischer Proteinmarker nach Behandlung mit Doxorubicin in Tumorzellen Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden für 24 h mit 0.5 μ M Doxorubicin (DOX) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Apoptose-Array durchgeführt (n=1). Dargestellt sind Antikörperspots ausgewählter proapoptotischer Proteine und das Verhältnis der Signale aus behandelten und unbehandelten Proben (Ratio +/-).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier verwendeten Acrylatstabilisierten CNP die Aktivierung von apoptotischen Signalwegen in Tumorzellen

vermitteln und die Cytotoxizität von CNP über Apoptose vermittelt wird. Außerdem wird deutlich, dass die Ergebnisse zur Apoptose mit den Ergebnissen zur Cytotoxizität von CNP (Abb. 3.9) in Tumorzellen korrelieren, denn nach 24 h CNP-Behandlung wird in den A375 Melanomzellen nur eine leichte Cytotoxizität im Vergleich zu den stark cytotoxischen Effekten nach 72 h gesehen. Die Ergebnisse hier zeigen, passend zu den Toxizitätsdaten, eine stärkere Induktion von pro-apoptotischen Proteinen nach 72 h CNP-Behandlung als nach 24 h.

3.5 Analyse der Proteinexpression in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP („Proteomics“)

Zahlreiche Publikationen sprechen den CNP schon jetzt ein hohes Potenzial als antikanzerogenes Mittel in der Zukunft zu (Gao et al., 2014; Xu und Qu, 2014; Das et al., 2013). Die selektiv cytotoxische Wirkung in Tumorzellen und normalen Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist eine sehr gute Voraussetzung, um CNP als therapeutisches Mittel gegen Krebs einzusetzen (Alili et al., 2013; Alili et al., 2011). Um CNP sicher im Rahmen einer Therapie einsetzen zu können, muss der zugrunde liegende Wirkmechanismus vollständig aufgeklärt werden. Um einen Überblick über die Wirkung von CNP in Zellen auf das Proteinstückchen zu erhalten und Therapie-relevante Zielstrukturen („Proteintargets“) identifizieren zu können, wurde im Weiteren der Einfluss von CNP auf die Proteinexpression analysiert. Hierbei sollte überprüft werden, ob CNP eine Änderung des Proteoms in Tumorzellen verursachen, welche zu den beobachteten cytotoxischen Effekten führen könnten. Als Referenz und Positivkontrolle wurde das genotoxische Doxorubicin benutzt. Änderungen im Proteom nach Behandlung mit Doxorubicin sind in zahlreichen Publikationen beschrieben (Hammer et al., 2010; Chen et al., 2002).

Für die Durchführung der Analyse wurden A375 Melanomzellen mit 300 µM CNP und als Referenz mit 0.5 µM Doxorubicin für 24 h behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach 24 h wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, vorbereitet und zur Messung dem Molecular Proteomics Laboratory von Prof. Kai Stühler der hiesigen Universität in Kooperation zur Verfügung gestellt. Nach massenspektrometrischer Analyse und Auswertung der Daten wurden insgesamt 1905 Proteine in Melanomzellen identifiziert. Die Ergebnisse wurden zur leichteren

Interpretation als Vulkandiagramme (Volcano Plots) dargestellt, bei denen signifikant veränderte Proteine einen negativen (Erniedrigung der Proteinexpression) und positiven (Erhöhung der Proteinexpression) \log_2 -Wert auf der x-Achse haben und oberhalb von 1.3 auf der y-Achse liegen. Hierbei wurde der negative dekadische Logarithmus des Wahrscheinlichkeitswertes (p-Wert) gegen den binären Logarithmus des Expressionsunterschiedes (x-fache Änderung) aufgetragen. Für die Analyse der Daten wurden somit Proteine ausgewählt, die einen Expressionsunterschied von mindestens ± 2 zeigen und einen signifikanten p-Wert < 0.05 haben. In Abb. 3.15 wird die Analyse der Daten aus Doxorubicin-behandelten Melanomzellen, verglichen mit den Daten der unbehandelten Melanomzellen, dargestellt. Die Behandlung der Melanomzellen mit Doxorubicin zeigt, wie erwartet, eine Änderung in der Proteinexpression. Demzufolge werden viele Proteine mit einer x-fachen Erhöhung und Erniedrigung identifiziert. In Tabelle 3.1 sind alle Proteine aufgelistet, die nach der Behandlung mit Doxorubicin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter den festgelegten Bedingungen (≥ 2 Expressionsunterschied, $p < 0.05$) hoch- und herunterreguliert werden.

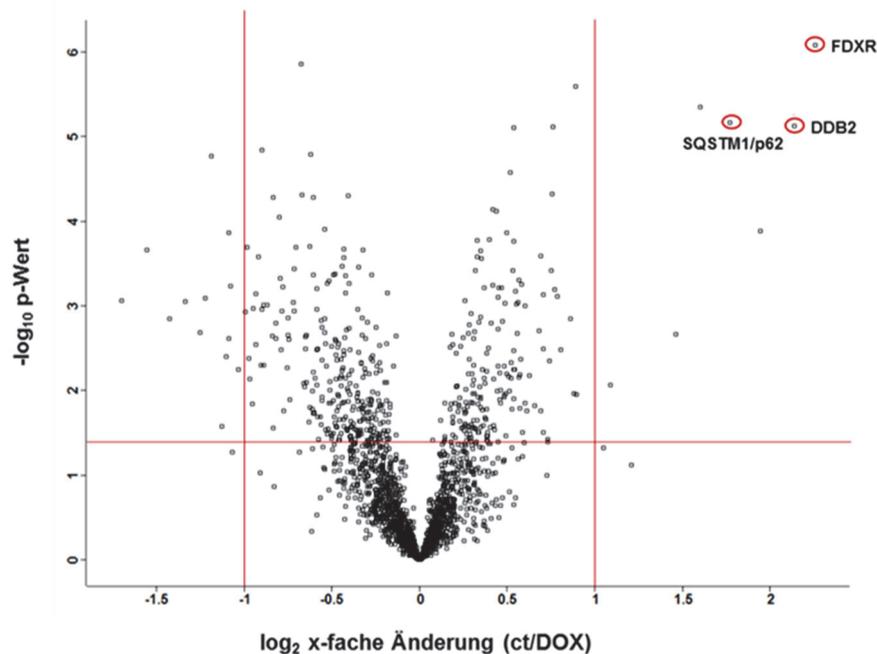


Abb. 3.15: Veränderte Proteinexpression nach Behandlung mit Doxorubicin in Tumorzellen Nach der Behandlung von subkonfluenten A375 Melanomzellen mit $0.5 \mu\text{M}$ Doxorubicin (DOX) für 24 h wurde der Einfluss auf das Proteom untersucht. Vier große Zellkulturschalen wurden für die Messung unabhängig voneinander prozessiert. Die weitere Messung erfolgte im Proteomics Molecular Laboratory (MPL) mittels Massenspektrometrie und die Analyse der Daten zuerst mit der Software MaxQuant und anschließend mit der Software Perseus. Es wurde ermittelt, ob durch die Behandlung Gruppen von Proteinen in ihrer Abundanz verändert werden. Dargestellt ist das Ergebnis in einem Volcano Plot, welcher die x-fache Erhöhung (rechts) bzw. Erniedrigung (links) der Proteinmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ct) sowie deren Signifikanz zeigt. Die horizontale Linie (rot) (p-Wert: $-\log_{10}(1.3) = 0.05$) repräsentiert die Signifikanzebene $p < 0.05$, während die vertikalen Linien (rot) ($-\log_2(-1/1) \cong 2$ -fache Erniedrigung/2-fache Erhöhung) die x-fache Änderung darstellen.

Doxorubicin bewirkt die Änderung der Abundanz von Proteinen in verschiedenen funktionellen Gruppen. So ist beispielsweise die Expression von *DNA damage binding protein 2* (DDB2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 4.45-fach erhöht. DDB2 wird rekrutiert, wenn eine Schädigung in der DNA vorliegt und eine Reparatur notwendig ist (Stoyanova et al., 2009). Ein weiteres Protein, das *Sequestosome-1* (SQSTM1, auch als p62 bekannt), ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 3.4-fach erhöht. Es ist beschrieben, dass Doxorubicin den Prozess der Autophagie blockiert, was u.a. über die Akkumulation von SQSTM1/p62 gezeigt werden kann. Autophagie ist ein Überlebensmechanismus, der bei Dysfunktion zur Apoptose führt (Bjorkoy et al., 2009). Weitere Beispiele für Proteine, die durch Doxorubicin moduliert werden, sind Proteine des Zellmetabolismus wie *Fructose-2,6-bisphosphatase TIGAR* (TIGAR) und des Elektronentransports wie *Ferredoxin reductase* (FDXR). Die Doxorubicin-vermittelten Veränderungen im Proteom der Tumorzellen geben Hinweise zum Wirkmechanismus von Doxorubicin und tragen letztendlich zum cytotoxischen Effekt bei.

	Proteinname	x-fache Änderung (≥ 2); $p < 0.05$
Erhöhung der Expression	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase (mitochondrial); Ferredoxin reductase (FDXR)	4.82
	Sequestosome-1 (SQSTM1/p62)	3.41
	Kynureninase (KYNU)	2.63
	MICAL-like protein 1 (MICALL1)	2.22
	DNA damage-binding protein 2 (DDB2)	4.45
	Perilipin-2 (PLIN2)	3.87
	Tubulin alpha-1C chain (TUBA1C)	2.06
	Fructose-2,6-bisphosphatase TIGAR (TIGAR)	3.02
	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (RSL1D1)	2.29
	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain (HLA-DRA)	2.01
Erniedrigung der Expression	Integrin beta-3 (ITGB3)	2.16
	Asparagine synthetase; glutamine-hydrolyzing (ASNS)	2.12
	Importin subunit alpha-1 (KPNA2)	2.27
	ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3 (ARF1; ARF3)	2.13
	A-kinase anchor protein 12 (AKAP12)	3.17
	CCAAT/enhancer-binding protein zeta (CEBPZ)	2.12
	Bystin (BYSL)	2.60
	Pumilio domain-containing protein KIAA0020 (KIAA0020)	2.87
	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A (UTP14A)	2.36
	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47 (DDX47)	2.47
Nucleolar protein 6 (NOL6)	2.12	

Tab. 3.1: Zusammenfassung der veränderten Proteine nach Doxorubicin Behandlung in A375 Melanomzellen

In Abb. 3.16 ist das Ergebnis von CNP im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass CNP im Gegensatz zu Doxorubicin nach 24 h keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression haben. Es werden keine Proteine detektiert, welche durch CNP signifikant erhöht oder erniedrigt wurden. Untersuchungen zur intrazellulären Aufnahme zeigen auch, dass CNP nur im Cytosol verteilt und nicht in den Kern aufgenommen werden, sodass vermutlich keine direkten Effekte auf die zelluläre DNA und Genexpression stattfinden (Sack et al., 2014; Alili et al., 2011). Passend dazu haben Sack et al. (2014) mit Hilfe des Comet Assays gezeigt, dass CNP keine genotoxischen Effekte in Melanomzellen verursachen.

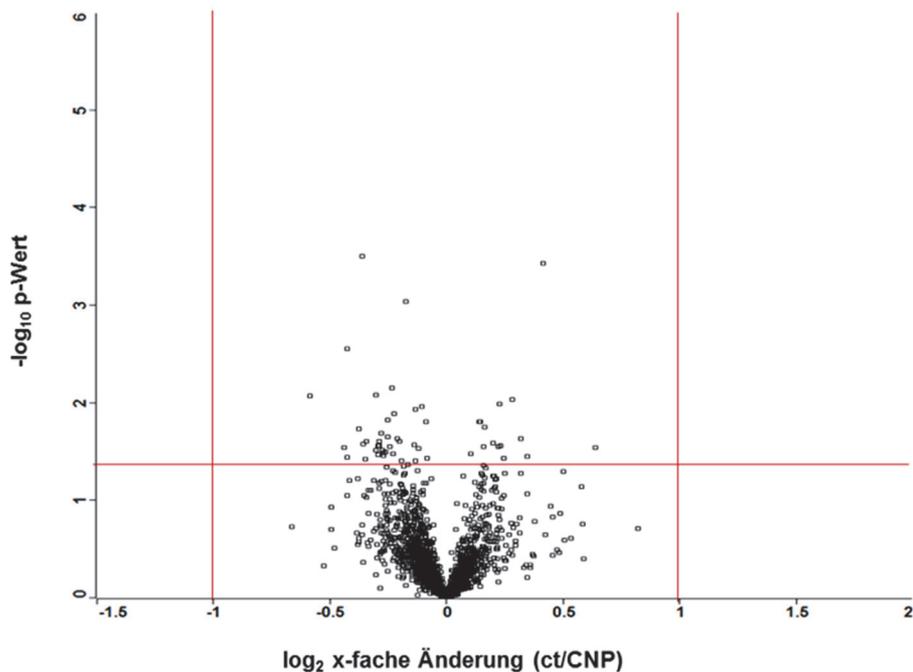


Abb. 3.16: Kein Einfluss von CNP auf die Proteinexpression in Tumorzellen Nach der Behandlung von subkonfluenten A375 Melanomzellen mit 300 μM CNP für 24 h wurde der Einfluss auf das Proteom untersucht. Vier große Zellkulturschalen wurden für die Messung unabhängig voneinander prozessiert. Die Messung erfolgte im Proteomics Molecular Laboratory (MPL) mittels Massenspektrometrie und die Analyse der Daten zuerst mit der Software MaxQuant und anschließend mit der Software Perseus. Es wurde ermittelt, ob durch die Behandlung Gruppen von Proteinen in ihrer Abundanz verändert werden. Dargestellt ist das Ergebnis in einem Vulcano Plot, welcher die x-fache Erhöhung (rechts) bzw. Erniedrigung (links) der Proteinmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ct) sowie deren Signifikanz zeigt. Die horizontale Linie (rot) ($p\text{-Wert: } -\log_{10}(1.3) = 0.05$) repräsentiert die Signifikanzebene $p < 0.05$, während die vertikalen Linien (rot) ($-\log_2(-1/1) \cong 2\text{-fache Erniedrigung}/2\text{-fache Erhöhung}$) die x-fache Änderung darstellen.

Da die Behandlung mit CNP keine signifikanten Expressionsunterschiede verursacht, wurden zur Validierung der Daten repräsentativ drei Proteine herausgesucht, welche nach der Behandlung mit Doxorubicin signifikant erhöht wurden. Demzufolge wurden die

Proteine DDB2, SQSTM1/p62 und FDXR, welche auch in Abb. 3.15 farblich markiert wurden, zur Validierung der MS-Analyse mittels Western Blot-Analysen herangezogen. Hammer et al. (2010) haben die Doxorubicin-bedingte Erhöhung von FDXR in Leberkrebszellen (HepG2) nachgewiesen. Außerdem haben De Luca et al. (2011) die Zunahme der Proteinexpression von DDB2 nach Behandlung mit Doxorubicin in Prostatakrebszellen, sowie Kobayashi et al. (2010) und Moruno-Manchon et al. (2016) die Erhöhung von SQSTM1/p62 in Kardiomyozyten und Nervenzellen gezeigt.

In Abb. 3.17 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analysen dargestellt, jeweils mit einem repräsentativen Blot und der densitometrischen Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. So wie auch in den zugehörigen Vulcano Plots, führt die Behandlung mit CNP zu keiner Veränderung der Proteinexpression, wohingegen Doxorubicin zu einer Erhöhung der Proteinmengen führt. Somit können die Daten der MS-Analyse mit den Ergebnissen der Western Blot-Analysen validiert werden.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass CNP im Gegensatz zu Doxorubicin keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression haben, weshalb im Weiteren die Redox-Aktivität der Partikel näher untersucht werden sollte.

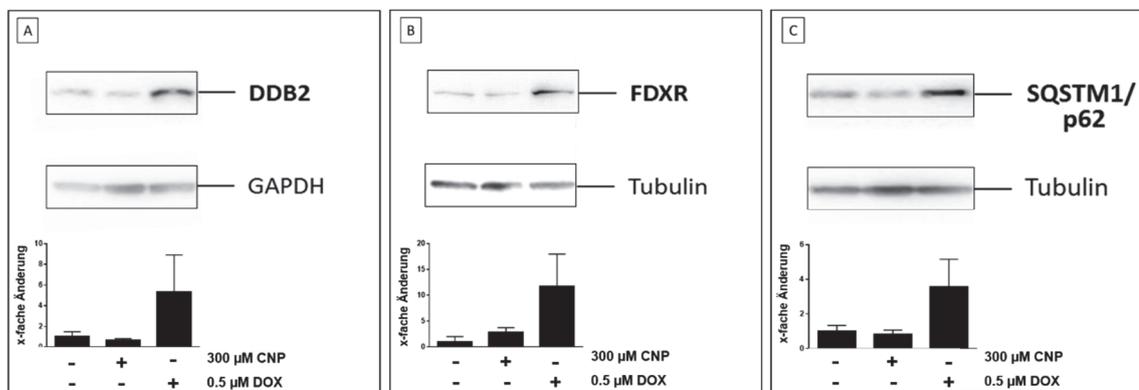


Abb. 3.17: Western Blot-Analysen zur Validierung der Ergebnisse der Proteinexpression in A375 Melanomzellen Die Expression von DDB2 (43 kDa) (A), FDXR (~54 kDa) (B) und SQSTM1/p62 (62 kDa) (C) wurde in subkonfluenten A375 Melanomzellen durch die Behandlung mit 300 μM CNP sowie mit 0.5 μM Doxorubicin (DOX) für 24 h mittels Western Blot untersucht. Unbehandelte Zellen dienen als Negativkontrolle, GAPDH (~37 kDa) oder α -Tubulin (~50 kDa) dienen als Ladekontrollen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot und die densitometrische Analyse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=3), wobei die unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde und die anderen Werte für die Ermittlung der x-fachen Änderung auf diese bezogen wurden.

3.6 Redox-Aktivität von CNP

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente legen den Schluss nahe, dass die hauptsächliche Wirkung von redox-aktiven CNP auf posttranslationaler Ebene stattfindet. Daher sollten im Weiteren ROS-abhängige Prozesse näher untersucht werden. Zunächst sollte der Einfluss von CNP auf den ROS-Gehalt in Zellen und infolgedessen mögliche oxidative Schäden bzw. Modifikationen von Makromolekülen wie Lipiden und Proteinen untersucht werden, um den zugrundeliegenden Mechanismus der Partikel weiterhin zu erforschen.

3.6.1 Einfluss von CNP auf den intrazellulären ROS-Gehalt

In zahlreichen Studien ist beschrieben und kontrovers diskutiert, dass CNP redox-aktive Eigenschaften besitzen und sowohl anti- als auch prooxidative Effekte in verschiedenen Zelltypen verursachen. So wurde der intrazelluläre ROS-Gehalt CNP-bedingt in vielen Tumorzelllinien wie in Plattenepithelkarzinomzellen erhöht (Alili et al., 2011). Auch in humanen Leber- und Lungenkarzinomzellen wurde eine Erhöhung des intrazellulären Gehalts an ROS beobachtet (Cheng et al., 2013; Lin et al., 2006). Antioxidative Effekte hingegen wurden in stromalen Fibroblasten (von Montfort et al., 2015), retinalen Neuronen (Chen et al., 2006) und Endothelzellen (Chen et al., 2013) beobachtet.

Um festzustellen, ob die in vorherigen Experimenten beobachteten cytotoxischen Effekte von CNP in Tumorzellen primär durch ROS vermittelt werden, wurde zuerst der Einfluss von CNP auf den intrazellulären ROS-Gehalt von Melanomzellen untersucht. Im Vergleich dazu wurde auch der Einfluss von CNP auf den intrazellulären ROS-Gehalt in normalen Hautzellen ermittelt. Für die Untersuchung des intrazellulären ROS-Gehalts wurde der DCF-Assay durchgeführt, welcher intrazellulär Peroxide detektiert. Dazu wurden subkonfluente Melanomzellen (A375), Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (H₂DCF-DA) angefärbt, der intrazellulär in Anwesenheit von ROS zu dem stark fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs steigt proportional mit der Menge an intrazellulären ROS an und dient somit als Maß für den ROS-Gehalt in den Zellen. Für die Messungen am Fluorometer wurden die Zellen zuerst mit H₂DCF-DA angefärbt und danach mit 300 µM CNP inkubiert. Als technische Positivkontrolle wurden die Zellen mit 500 µM H₂O₂ behandelt (Daten nicht

gezeigt), als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (ct). Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, von denen ein repräsentatives Beispiel, jeweils von Melanomzellen (A375), Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM), dargestellt ist (Abb. 3.18).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen nach 90 min von drei Versuchen ergibt in Melanomzellen (A375) einen deutlichen Anstieg des intrazellulären ROS-Gehalts durch CNP. Nach Behandlung mit CNP steigt der ROS-Gehalt im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle um ca. 64% an. In den gesunden, stromalen Zellen führen CNP ebenfalls zu einem Anstieg des intrazellulären ROS-Gehalts, wobei der Anstieg verglichen mit dem in Tumorzellen nicht so stark ausfällt. In NHDF führen CNP zu einem 33%igen und in NHEM zu einem 22%igen Anstieg von ROS.

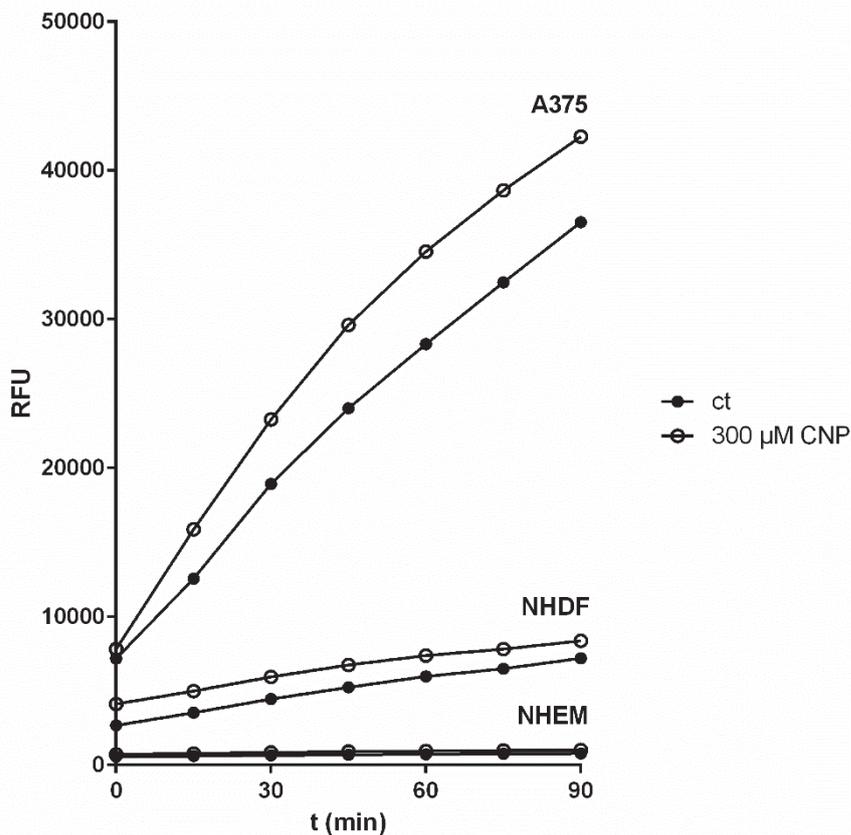


Abb. 3.18: Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts in Tumorzellen und normalen Hautzellen im Vergleich (Ergebnisse von A375 und NHDF veröffentlicht in Sack-Zschauer et al., 2017b) Subkonfluente Melanomzellen (A375), Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) wurden zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff $H_2DCF\text{-}DA$ inkubiert. Nach 30 min wurde extrazelluläres $H_2DCF\text{-}DA$ entfernt und die Zellen mit $300\ \mu\text{M}$ CNP inkubiert. Die Fluoreszenz des gebildeten DCF (RFU, *relative fluorescence unit*) wurde zu Beginn der Behandlung über einen Zeitraum von 1.5 h alle 5 min gemessen. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n=3$), von denen jeweils ein repräsentatives Beispiel dargestellt ist. t, Zeit; ct, unbehandelte Kontrolle

CNP weisen somit eine stark prooxidative Wirkung in Melanomzellen auf, während in normalen Fibroblasten und Melanozyten nur ein leichter Effekt zu sehen ist. Eine in der Literatur beschriebene antioxidative Wirkung von CNP konnte in den hier verwendeten normalen Zellen nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist zu bemerken, dass die ROS-Mengen vor und nach der Behandlung mit CNP in den Fibroblasten und Melanozyten zu jedem Zeitpunkt der Messung viel niedriger sind als die in den Tumorzellen (Abb. 3.18). Während bei den Fibroblasten am Endpunkt der Messung (nach 90 min) die RFU-Werte unter 10000 und bei den Melanozyten unter 1000 sind, liegt die Fluoreszenzintensität in den Melanomzellen über 30000 RFU. Der basale ROS-Gehalt von Melanomzellen ist verglichen mit den Fibroblasten um das 2.9-fache und mit den Melanozyten um das 19-fache erhöht. Es ist festzuhalten, dass die in den Fibroblasten und Melanozyten beobachtete Erhöhung des ROS-Gehalts durch die Behandlung mit CNP zu jedem Zeitpunkt der Messung unterhalb der von den unbehandelten Melanomzellen liegt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CNP in allen hier untersuchten Zelltypen prooxidativ wirken, wobei die Tumorzellen sowohl basal als auch CNP-bedingt einen höheren ROS-Gehalt zeigen als die Fibroblasten und Melanozyten. Andere ROS-Messungen innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brenneisen unterstützen den hier beobachteten prooxidativen Effekt von CNP. In einem zusätzlichen Assay wurde als weiterer Nachweis für die prooxidative Wirkung von CNP der extrazelluläre Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (H_2O_2) gemessen. Die Behandlung mit CNP führt zu einem signifikanten Anstieg der extrazellulären Konzentration an H_2O_2 in Tumorzellen (Alili et al., 2013). Beruhend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass es in Zellen aufgrund der CNP-vermittelten Bildung von ROS zu einer Veränderung des zellulären Redox-Status kommen kann, welcher vermutlich in einer oxidativen Schädigung bzw. Modifikation von Makromolekülen resultiert. Daher wurden im Folgenden mögliche Konsequenzen der CNP-vermittelten Änderung des intrazellulären ROS-Gehalts überprüft und dabei der Einfluss von CNP auf Lipidperoxidation und Proteinoxidation näher untersucht.

3.6.2 Einfluss von CNP auf oxidative Lipidschädigung

Prooxidative Substanzen, die eine Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts verursachen, führen zu oxidativem Stress, wenn das antioxidative System die Erhöhung nicht kompensieren kann. Dieser kann zu oxidativen Modifikationen und Schäden von

Makromolekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen führen (Reczek und Chandel, 2015; Valko et al., 2006; Turrens, 2003). Eine durch ROS-verursachte Schädigung an Lipiden, auch Lipidperoxidation genannt, erfolgt v.a. an Lipiden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Es ist beschrieben, dass die Oxidation der Doppelbindungen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren eher durch hochreaktive, radikalische Sauerstoffverbindungen wie das Hydroxylradikal und weniger durch nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen wie H_2O_2 erfolgen kann. Durch die sogenannte Fenton-Reaktion können aus H_2O_2 , welches durch freie Eisen(II)-Ionen reduziert wird, Hydroxylradikale generiert werden, wodurch die Lipidperoxidation initiiert werden kann (Ayala et al., 2014; Mylonas und Kouretas, 1999). Es gibt unterschiedliche Methoden zum Nachweis einer Lipidperoxidation. Malondialdehyd (MDA) ist einer der am häufigsten bestimmten Marker der Lipidperoxidation, welcher über die Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (TBA) bestimmt werden kann (Moselhy et al., 2013; Gawel et al., 2004). Das gebildete fluoreszierende Addukt kann als Maß für die Menge an MDA gemessen werden. Über diese Methode kann auch indirekt ermittelt werden, welche Art von ROS durch CNP gebildet werden und ob CNP eine Fenton-ähnliche Reaktion ausüben. Frühere Studien deuten auf die CNP-vermittelte Bildung von H_2O_2 hin. Jedoch gibt es neuere Studien anderer Forschungsgruppen, welche zeigen, dass die in der Nanopartikel-Lösung enthaltenen Ce^{3+} -Ionen H_2O_2 reduzieren und so zur Bildung von Hydroxylradikalen führen können (Xu und Qu, 2014; Heckert et al., 2008b).

In der vorliegenden Arbeit wurde MDA als Marker für die Lipidperoxidation mittels HPLC bestimmt. Für den Nachweis von MDA wurden zunächst subkonfluente Melanomzellen mit $300 \mu\text{M}$ CNP für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Es wurden drei verschiedene Positivkontrollen verwendet. Zum einen wurden die Zellen mit $250 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 (2 h) als Positivkontrolle für nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen behandelt. Zum anderen wurden sie beispielhaft für radikalische Sauerstoffverbindungen mit $200 \mu\text{M}$ FeCl_2 (2 h) behandelt, welches intrazellulär die Initiation der Fenton-Reaktion und somit die Bildung von Hydroxylradikalen verursacht und drittens mit UV-A bestrahlt, was zur Bildung von freien, reaktiven Radikalen, wie z.B. Singulett-Sauerstoff und Superoxidanionradikalen, führt (Tyrrell, 2012). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Melanomzellen. Die Menge an MDA wurde über eine Standardkurve, welche mit 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) erstellt wurde, bestimmt. Für die Auswertung wurde die Proteinmenge in den Proben ermittelt und die Messwerte normalisiert.

Das Ergebnis in Abb. 3.19 zeigt Mittelwerte der durchgeführten Experimente, wobei die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen wurden. Eine Behandlung mit CNP resultiert nicht in einem Anstieg des MDA-Gehalts im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Behandlung mit H₂O₂ führt ebenfalls zu keiner Zunahme von MDA, während die Behandlung der Zellen mit FeCl₂ und die Bestrahlung mit UV-A zu einem drastischen Anstieg führen. Die Zunahme beträgt mehr als das 3-fache der unbehandelten Kontrolle.

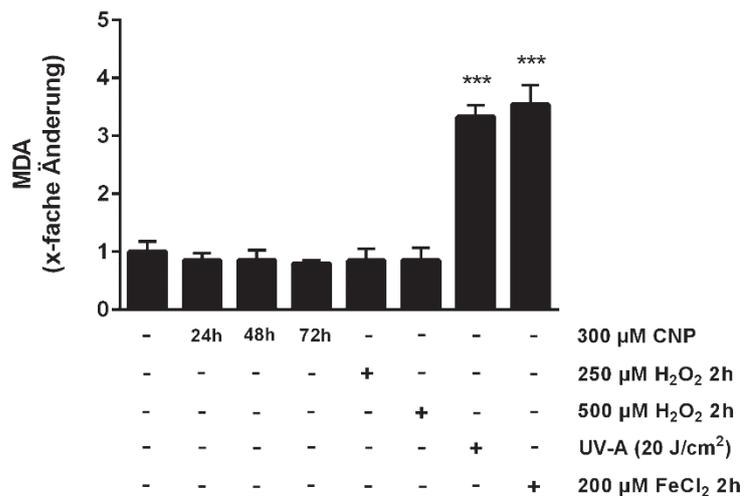


Abb. 3.19: Keine Auswirkung von CNP auf die Lipidperoxidation (MDA-Bildung) in den Tumorzellen Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden mit 300 µM CNP für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Als Positivkontrollen dienten H₂O₂- und FeCl₂-behandelte sowie UV-A-bestrahlte Zellen. Unbehandelte bzw. unbestrahlte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Bestimmung des MDA-Gehalts erfolgte über HPLC. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (n=3). Dargestellt ist das x-fache der unbehandelten Kontrolle ± S.E.M. (***)p<0.001; One-way-ANOVA mit Dunett's post hoc Test).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein MDA durch CNP entsteht und somit keine CNP-bedingte Lipidperoxidation stattfindet. Daher lässt sich vermuten, dass keine Hydroxylradikale durch CNP generiert werden und auch keine Fenton-ähnliche Reaktion stattfindet. Die CNP-bedingte Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen kann somit vorerst ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zu den Positivkontrollen H₂O₂ und FeCl₂/UV-A sowie die ROS-Messung in vorangegangenem Experiment deuten darauf hin, dass es sich bei den von CNP verursachten ROS primär um H₂O₂ handelt, was durch die vorherigen Ergebnisse untermauert wird. Eine Erhöhung der zellulären H₂O₂-Konzentration kann zu reversiblen und irreversiblen oxidativen Schäden führen. Daher sollte im Folgenden näher auf oxidative Proteinmodifikationen, genauer auf das H₂O₂-sensitive Thiol-Proteom, eingegangen werden.

3.6.3 Einfluss von CNP auf oxidative Proteinmodifikation

Neben oxidativen Schäden an Lipiden können intrazellulär erhöhte ROS-Mengen auch zu oxidativen Proteinmodifikationen führen. Eine durch ROS verursachte Schädigung erfolgt meistens über oxidative Modifikationen der Seitenketten von Proteinen. Eine charakteristische Modifikation ist die sehr spezifische Thioloxydation von Cysteinen, die durch H_2O_2 vermittelt wird (Gupta und Carroll, 2014; Paulsen und Carroll, 2013; Lo Conte und Carroll, 2013). Die H_2O_2 -vermittelten Oxidationsprodukte in Cysteinen von Proteinseitenketten werden auch Sulfensäuren (-SOH) genannt. Sulfensäuren sind reversibel und können über Glutathion zurück zu freien Thiolen reduziert werden. Doch bei bestehendem, übermäßigem oxidativem Stress können Sulfensäuren weiter zu Sulfin-(-SO₂H) und Sulfonsäuren (-SO₃H) oxidiert werden, die irreversibel sind und zu Proteindegradation führen (Pan und Carroll, 2014). Oxidative Modifikationen an Proteinen können erhebliche Auswirkungen auf zelluläre Funktionen haben. Die Oxidation von Proteinen kann zu einer Denaturierung oder Konformationsänderung führen, was meistens mit einem Funktionsverlust einhergeht (Davies, 2016; Birben et al., 2012).

Im Folgenden sollte die Thioloxydation von Cysteinen, vielmehr die Bildung von Sulfensäuren nach Behandlung mit CNP, untersucht werden. Für die Versuchsdurchführung wurden zunächst A375 Melanomzellen 2 h, 4 h und 24 h mit CNP behandelt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 500 μM H_2O_2 für 2 h behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Da Sulfensäuren sehr instabil sind, lassen sich diese über eine charakteristische Reaktion der Sulfensäure mit dem membranpermeablen, cyclischen Diketon 5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion (Dimedon) nachweisen, weshalb in den letzten 2 h der Inkubation 10 mM Dimedon zu den Zellen gegeben wurde. Sulfensäuren bilden mit dem Dimedon ein stabiles Thioether-Produkt, das von spezifischen α -Hapten-Antikörpern erkannt und nachgewiesen werden kann. Die Methode und der α -Hapten-Antikörper wurden von Kate S. Carroll und ihrer Arbeitsgruppe entwickelt (Seo und Carroll, 2009).

Abb. 3.20 zeigt einen exemplarischen Western Blot und die densitometrische Auswertung dreier voneinander unabhängiger Versuche. Da klassische Ladekontrollen nicht sinnvoll sind, da diese u.a. Thiole besitzen und zudem beim Nachweis von Sulfensäuren Proteine aller Größen auf der Membran vom α -Hapten-Antikörper detektiert werden, wurden

Coomassie-gefärbte Membranen zur densitometrischen Analyse und Normierung verwendet. Mit der Software Fusion Capt. Advance wurden die Bandenintensitäten für jedes der drei Experimente bestimmt und gemittelt. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die x-fache Änderung der anderen Werte dargestellt. Das Ergebnis der Analyse von Sulfensäuren in den Melanomzellen zeigt, dass CNP eine Zunahme von Sulfensäuren bewirkt. Hierbei wird eine zeitabhängige Zunahme beobachtet. So zeigt die Behandlung mit CNP im Vergleich zur Negativkontrolle eine 2.5-fache Zunahme nach 2 h und eine 2.8-fache Zunahme nach längeren Inkubationszeiten (4 und 24 h). CNP erhöhen die Bildung von Sulfensäuren in etwa dem gleichen Ausmaß wie 500 μM H_2O_2 , wo eine 2.2-fache Zunahme zu beobachten ist.

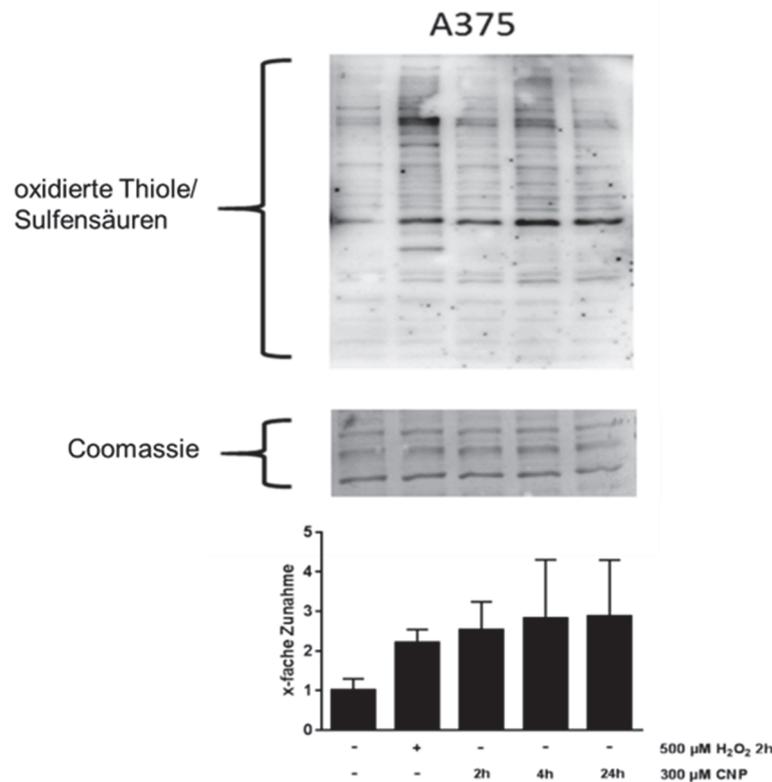


Abb. 3.20: Zeitabhängige Zunahme der oxidativen Thiolmodifikation in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden für 2 h, 4 h und 24 h mit 300 μM CNP behandelt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 500 μM H_2O_2 (2 h) inkubiert. Für den Nachweis von Sulfensäuren wurden alle Zellen mit 10 mM Dimedon behandelt. Dimedon bindet spezifisch an Sulfensäuren und bildet ein stabiles Thioether-Produkt, welches spezifisch über einen α -Hapten-Antikörper detektiert wird. Die Färbung der Membran mit Coomassie diente als Ladekontrolle. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (n=3), von denen ein repräsentativer Western Blot dargestellt ist. Mit der Software Fusion Capt. Advance wurden die Bandenintensitäten für jedes der drei Experimente bestimmt und gemittelt. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen.

Da in den ROS-Messungen eine leichte Zunahme nach Behandlung mit CNP in normalen Hautzellen beobachtet wurde, sollte im Weiteren der Einfluss von CNP ebenfalls auf die

Thioloxidation in den Fibroblasten und Melanozyten bestimmt werden. Die Versuchsdurchführung entsprach der von A375 Melanomzellen. In Abb. 3.21 ist das Ergebnis der Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) zu sehen. In CNP-behandelten Melanozyten wird im Vergleich zur Negativkontrolle keine vermehrte Bildung von Sulfensäuren detektiert, während in H_2O_2 -behandelten Melanozyten wesentlich mehr (2,3-fach) oxidierte Thiole nachgewiesen werden. Im Vergleich wird in den Fibroblasten durch CNP nach kurzen Inkubationszeiten eine sehr leichte Erhöhung von Sulfensäuren beobachtet, wohingegen nach 24 h im Vergleich zur Negativkontrolle keine Erhöhung mehr detektiert werden kann. Die Erhöhung ist nach 2 h 1.16-fach und nach 4 h 1.35-fach. Diese leichte Erhöhung an oxidierten Thiolen passt zu der leichten ROS-Erhöhung in Fibroblasten durch CNP. Dennoch ist insgesamt die CNP-bedingte Bildung von Sulfensäuren in den Tumorzellen viel stärker als in den Fibroblasten.

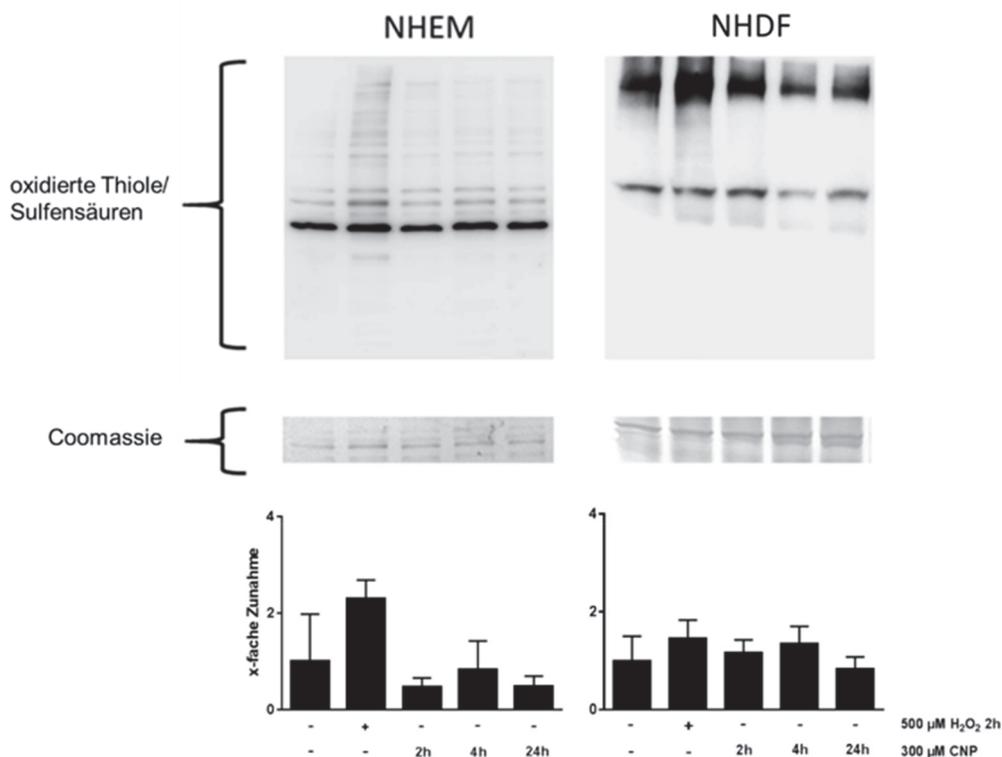


Abb. 3.21: Keine CNP-vermittelte oxidative Thiolmodifikation in normalen Hautzellen
 Subkonfluente Melanozyten (NHEM) und Fibroblasten (NHDF) wurden für 2 h, 4 h und 24 h mit 300 μ M CNP behandelt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 500 μ M H_2O_2 (2 h) inkubiert. Für den Nachweis von Sulfensäuren wurden alle Zellen mit 10 mM Dimedon behandelt. Dimedon bindet spezifisch an Sulfensäuren und bildet ein Thioether-Produkt, welches spezifisch über einen α -Hapten-Antikörper detektiert wird. Die Färbung der Membran mit Coomassie diente als Ladekontrolle. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (n=3), von denen ein repräsentativer Western Blot dargestellt ist. Mit der Software Fusion Capt. Advance wurden die Bandenintensitäten für jedes der drei Experimente bestimmt und gemittelt. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen.

Insgesamt kann gezeigt werden, dass CNP sowohl in Tumorzellen als auch in normalen Hautzellen prooxidative Effekte vermitteln, wobei die prooxidativen Effekte in den Tumorzellen stärker sind als die in den normalen Zellen. Dieses Ergebnis liefert den Nachweis für eine oxidative Modifikation von Proteinen bedingt durch die CNP-induzierte Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts. Darüber hinaus dient dieses Ergebnis als ein weiterer Nachweis dafür, dass es sich bei den von CNP gebildeten ROS um H_2O_2 handelt, weil Sulfensäuren spezifisch durch die Reaktion von H_2O_2 mit Thiolen entstehen.

Allerdings kann mit diesem Ansatz keine Aussage darüber getroffen werden, welche Proteine durch CNP oxidiert werden. Daher sollten im Folgenden mit 2D-basierten Methoden CNP-bedingte, oxidierte Proteine identifiziert werden. Im ersten Schritt wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden subkonfluente A375 Melanomzellen mit $300 \mu M$ CNP für 2 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden Proteinlysate in der ersten Dimension aufgrund ihres isoelektrischen Punktes fokussiert und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist in Kapitel 2.2.3.4 zu finden. Über den im Anschluss an die 2D-Gelelektrophorese durchgeführten Western Blot mit dem α -Hapten Antikörper kann eine Änderung des Proteinmusters detektiert werden (Abb. 3.22).

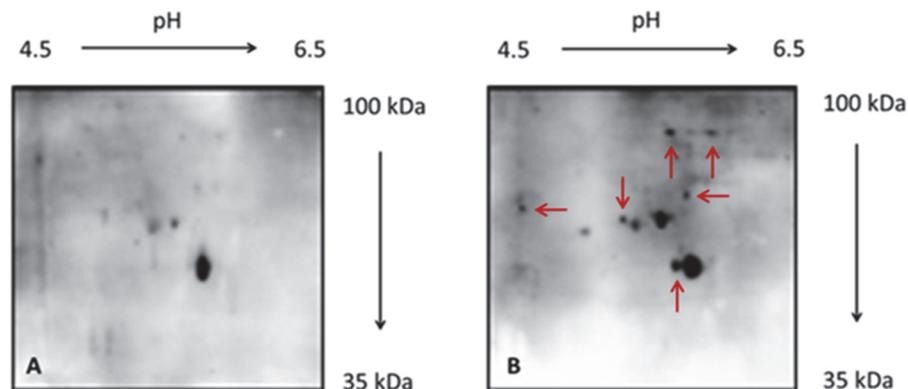


Abb. 3.22: 2D-basierter Nachweis der Bildung von Sulfensäuren in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden 2 h mit $300 \mu M$ CNP behandelt. Für den Nachweis von Sulfensäuren wurden die Zellen mit 10 mM Dimedon behandelt. Dimedon bindet spezifisch an Sulfensäuren und bildet ein Thioether-Produkt, welches spezifisch über einen α -Hapten-Antikörper detektiert wird. Nach der Inkubation wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend die Bildung von Sulfensäuren detektiert. Von links nach rechts erfolgte die Trennung in der ersten Dimension mittels IEF, von oben nach unten die Trennung aufgrund der Molekülgröße mittels SDS-PAGE. Die Pfeile (rot) deuten Proteine an, die nach Behandlung mit CNP (B) oxidiert werden und in Kontrollzellen (A) nicht vorkommen. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt ($n=2$), wovon ein exemplarischer 2D-Blot dargestellt ist. A, unbehandelte Kontrollzellen; B, CNP-behandelte Melanomzellen.

Das Ergebnis bestätigt, dass im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle CNP prooxidativ wirken und die Bildung von Sulfensäuren verursachen. Nach Etablierung der 2D-Analyse war die Durchführung einer Immunpräzipitation (IP) Gegenstand weiterer Untersuchungen. Allerdings stellte sich heraus, dass der α -Hapten-Antikörper zum Nachweis von Sulfensäuren in einer IP nicht tauglich war, sodass über diese 2D-Methode oxidierte Proteine nach der Behandlung mit CNP nicht identifiziert werden konnten.

Im Weiteren wurden Ansätze der sogenannten „*Redox Proteomics*“ verwendet, um Proteine mit CNP-bedingter posttranslationaler Modifikation in den Cysteinen massenspektrometrisch analysieren und identifizieren zu können. Die Durchführung einer zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (2D-DIGE), genauer gesagt einer REDOX-DIGE, bei welcher über die Kopplung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen oxidierte Proteine von nicht-oxidierten unterschieden werden können, lieferte aufgrund mangelnder Sensitivität keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Der sogenannte BIAM-Switch Assay (Löwe et al., 2017) hingegen, welcher im Weiteren durchgeführt wurde, bietet eine vielversprechende Methode an, um redox-modifizierte Proteine analysieren zu können.

3.6.4 Identifizierung von posttranslational modifizierten Proteinen nach CNP-Behandlung („*Redox-Proteomics*“)

Nachdem in den vorhergegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass CNP über die Bildung von ROS oxidative Proteinmodifikationen in Form von Sulfensäuren vermitteln können, wurde im Folgenden eine Methode zur Identifizierung von Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen durch CNP durchgeführt. Da Sulfensäuren aufgrund der chemischen Instabilität und der hohen Reaktivität schwer zu detektieren sind und weitere Modifikationen von Cysteinen bzw. Thiolgruppen durch CNP nicht vollständig bekannt sind und daher nicht ausgeschlossen werden können, wurden hierbei neben Sulfensäuren auch weitere reversible Oxidationen von Cystein, wie S-Glutathionylierung und S-Nitrosylierung, sowie die Bildung von Disulfidbrücken untersucht. Der Nachweis von Proteinen mit reversiblen Cysteinoxidationen erfolgte anhand der Methode der sogenannten *Redox Proteomics*. Der an die Massenspektrometrie gekoppelte BIAM-Switch Assay ermöglicht die Identifizierung von differentiell modifizierten Proteinen nach der Behandlung mit CNP und wurde am Institut für Funktionelle Proteomics an der Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Frau

Dr. Ilka Wittig durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine mit spezifisch reversibel oxidierten Cysteinen mit einem Biotinrest markiert. Im ersten Schritt werden nach Thioloxidation noch freie (nicht-oxidierte) Thiolgruppen durch Inkubation mit der thiol-spezifischen Alkylierungssubstanz N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Nach dem Blockierungsschritt werden die oxidierten Cysteine durch DTT wieder zu freien Thiolgruppen reduziert. Diese „neu“ gebildeten Thiole reagieren im letzten Schritt mit biotinyliertem Iodoacetamid (BIAM), einer weiteren thiol-spezifischen Substanz. Die so biotinylierten Proteine können dann über immobilisiertes Streptavidin angereichert und analysiert werden. Mittels dieser Methode ist es außerdem möglich, die Position der Cysteinioxidation innerhalb des Proteins zu ermitteln. Irreversible Cysteinmodifikationen, wie die Bildung von Sulfin (SO₂H)- und Sulfon (SO₃H)-säuren, werden durch diese Methode nicht erfasst.

Für die Versuchsdurchführung wurden subkonfluente A375 Melanomzellen mit 300 µM CNP für 4 h und 24 h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Zellproben wurden für die Durchführung des Experiments Frau Dr. Ilka Wittig und ihrer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Zur Auswertung wurden alle Proteine mit einem hohen Signifikanzniveau ($p < 0.05$) berücksichtigt. Eine Bedingung für die x-fache Änderung im Vergleich zur Negativkontrolle, wie in Kapitel 3.6, wurde hierbei nicht definiert, weil auch eine geringfügige Änderung des Redox-Status von Proteinen zu erheblichen Auswirkungen in der Zelle führen kann (McDonagh et al., 2016; Dunlop et al., 2009; Marshall et al., 2000). Dargestellt sind die Ergebnisse in den Abb. 3.23 und 3.24 als Vulcano Plots. Eine Veränderung nach rechts steht für eine Zunahme an oxidierten Proteinen, wobei eine Veränderung nach links eine Abnahme an oxidierten Proteinen bzw. eine Zunahme an reduzierten Proteinen im Vergleich zur Negativkontrolle bedeutet.

Die Untersuchungen in A375 Melanomzellen ergeben (Abb. 3.23 und 3.24), dass durch CNP im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen die Menge an Proteinen mit reversiblen Cysteinmodifikationen erhöht wird (*shift* nach rechts). Dies korreliert auch mit den Untersuchungen zur Bildung von Sulfensäuren, welche sowohl in dieser Arbeit als auch in vorherigen Studien mit Dextran-gekoppelten CNP gezeigt werden konnte (Sack et al., 2014; Alili et al., 2013). Zusätzlich konnte auch festgestellt werden, dass durch die Behandlung mit CNP die Menge an reduzierten Proteinen im Vergleich zur Negativkontrolle zunimmt (*shift* nach links). Da aber die Oxidation von Cysteinen im

Hinblick auf die zelluläre Redox-Homöostase eine große Rolle spielt und in vorangegangenen Experimenten eine prooxidative Wirkung von CNP beobachtet werden kann, wurde im Weiteren der Fokus auf oxidierte Proteine gelegt. Über die CNP-vermittelte Reduktion von reversiblen Cysteinmodifikationen ist bisher wenig bekannt und bietet daher einen Ansatz für weitere Untersuchungen im Rahmen anderer Projekte.

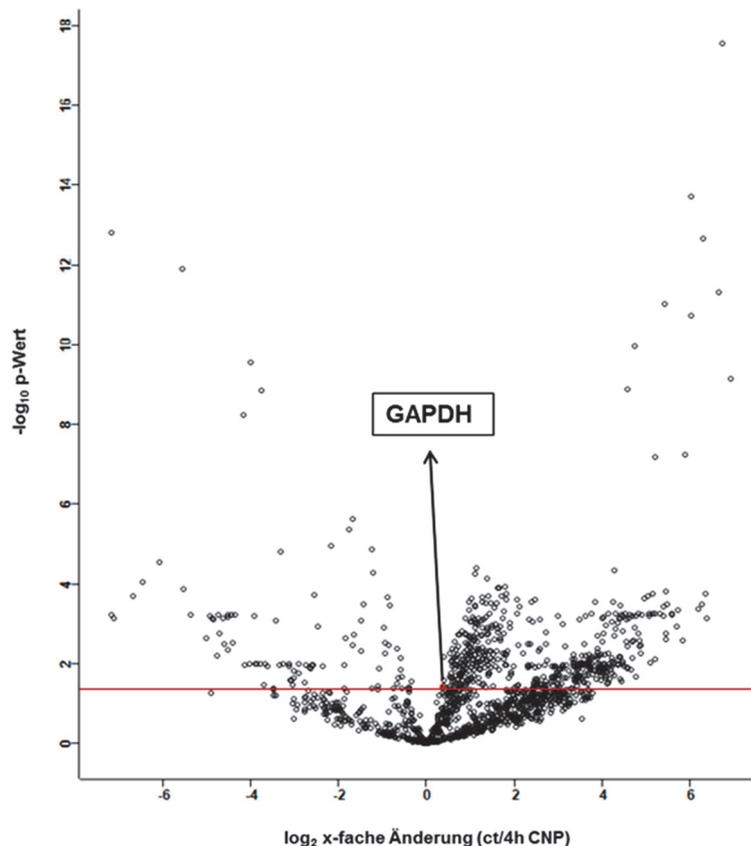


Abb. 3.23: Zu- und Abnahme von Proteinen mit reversiblen Cystein-/Thiolmodifikationen in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP (4 h) Nach der Behandlung von subkonfluenten A375 Melanomzellen mit 300 μM CNP für 4 h wurde der Einfluss auf das Cystein-Proteom untersucht. Sieben große Zellkulturschalen wurden für die Messung unabhängig voneinander prozessiert und für die Durchführung der MS-basierten BIAM-Switch-Methode in die Abteilung Funktionelle Proteomics der Goethe Universität Frankfurt geschickt. Die Analyse der Daten erfolgte zuerst mit der Software MaxQuant und anschließend mit der Software Perseus. Es wurde ermittelt, ob durch die Behandlung reversible Cysteinmodifikationen in Proteinen entstehen. Dargestellt ist das Ergebnis in einem Vulcano Plot, welcher die x-fache Erhöhung (rechts) bzw. Erniedrigung (links) der Proteinoxidation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ct) sowie deren Signifikanz zeigt. Die horizontale Linie (rot) ($p\text{-Wert: } -\log_{10}(1.3) = 0.05$) repräsentiert die Signifikanzebene $p < 0.05$.

In den Vulcano Plots ist außerdem ein zeitabhängiger Effekt durch CNP zu sehen. Nach 4 h ist der CNP-vermittelte Effekt stärker als nach 24 h, sodass weniger Proteine nach längerer Inkubationszeit nachgewiesen werden können. So sind mehr als 600 Proteine

nach 4 h CNP-Behandlung signifikant verändert, während nur weniger als 50 Proteine nach 24 h posttranslational verändert sind.

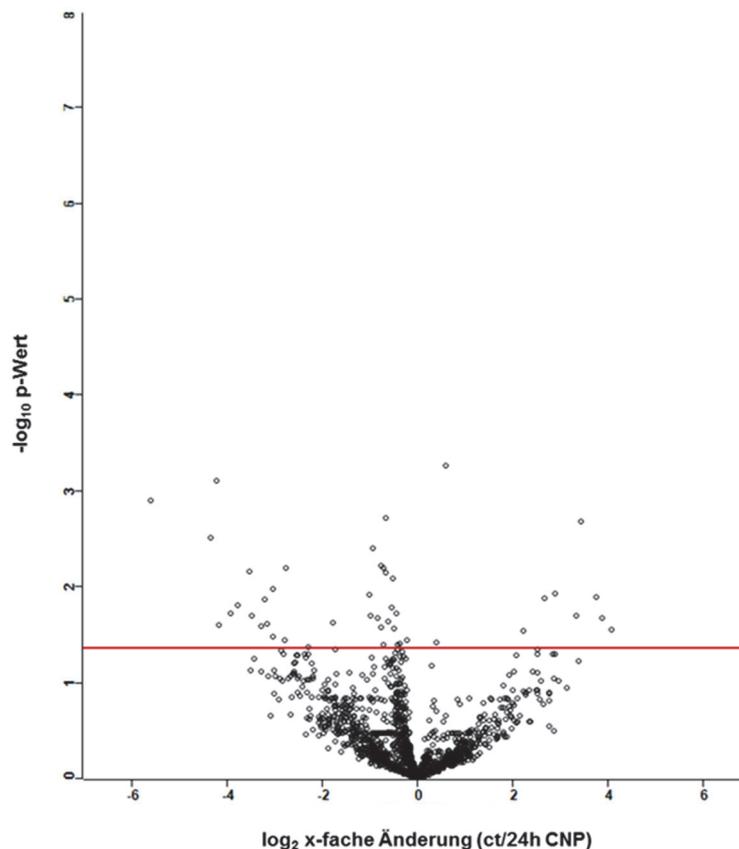


Abb. 3.24: Zu- und Abnahme von Proteinen mit reversiblen Cystein-/Thiolmodifikationen in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP (24 h) Nach der Behandlung von subkonfluenten A375 Melanomzellen mit 300 μ M CNP für 24 h wurde der Einfluss auf das Cystein-Proteom untersucht. Sieben große Zellkulturschalen wurden für die Messung unabhängig voneinander prozessiert und für die Durchführung der MS-basierten BIAM-Switch-Methode in die Abteilung Funktionelle Proteomics der Goethe Universität Frankfurt geschickt. Die Analyse der Daten erfolgte zuerst mit der Software MaxQuant und anschließend mit der Software Perseus. Es wurde ermittelt, ob durch die Behandlung reversible Cysteinmodifikationen in Proteinen entstehen. Dargestellt ist das Ergebnis in einem Vulcano Plot, welcher die x-fache Erhöhung (rechts) bzw. Erniedrigung (links) der Proteinoxidation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ct) sowie deren Signifikanz. Die horizontale Linie (rot) (p -Wert: $-\log_{10}(1.3) = 0.05$) repräsentiert die Signifikanzebene $p < 0.05$.

Die weitere Analyse der Daten zeigt, dass Proteine aus verschiedenen subzellulären Lokalisationen wie z.B. dem Cytoplasma und Mitochondrien sowie unterschiedlichen funktionellen Gruppen wie z.B. Zellteilung und Glukosemetabolismus identifiziert und durch CNP oxidiert werden. Beispielsweise sind die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die Pyruvatkinase (PKM) als Proteine des Glukosemetabolismus betroffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein für die

Zelle wichtiges Enzym, die GAPDH, genauer untersucht. In Abb. 3.25 ist das Ergebnis der BIAM-Switch Methode von der GAPDH gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen LFQ (*label free quantification*)-Werte als Maß für die Intensität der oxidierten GAPDH. Nach 4 h CNP-Behandlung wird GAPDH signifikant oxidiert und zeigt eine 1,3-fache Zunahme an oxidierten Cysteinen (Cys 152, 156 und 247) im Vergleich zur Negativkontrolle, während nach 24 h kein signifikanter Effekt mehr detektiert werden kann. Eine Veränderung im Redox-Status der Zellen und die reversible sowie irreversible Oxidation von Cysteinen können zu Funktionsveränderungen von Enzymen führen (Leonard und Carroll, 2011; Reddie und Carroll, 2008). Daher wurde im Folgenden die funktionelle Konsequenz der CNP-vermittelten Cysteinmodifikation in GAPDH näher untersucht.

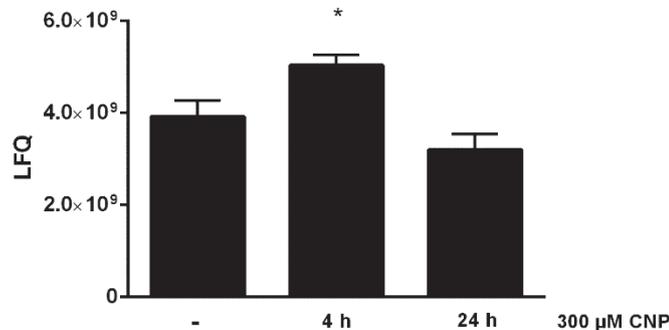


Abb. 3.25: CNP-vermittelte Cysteinoxidation der GAPDH in Tumorzellen Nach der Behandlung von subkonfluenten A375 Melanomzellen mit 300 μ M CNP für 4 h und 24 h wurde die MS-basierte BIAM-Switch-Methode in der Abteilung Funktionelle Proteomics der Goethe Universität Frankfurt durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte zuerst mit der Software MaxQuant. Dargestellt ist das Ergebnis der gemessenen LFQ (*label free quantification*)-Werte der GAPDH von sechs unabhängig voneinander prozessierten Zellproben (* $p < 0.05$; One-way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test).

3.6.5 GAPDH als Modellenzym für CNP-induzierte posttranslationale Modifikationen von Proteinen

GAPDH ist ein redox-reguliertes Enzym, das eine entscheidende Aufgabe in der zellulären Glykolyse ausübt. GAPDH katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) und baut damit über eine Anhydridbindung eine energiereiche Phosphat-Bindung auf, welche im nachfolgenden Schritt der Glykolyse auf ADP übertragen wird und zur Entstehung von ATP führt. Außerdem entsteht bei der Reaktion ein $\text{NADH} + \text{H}^+$, welches als Reduktionsäquivalent für weitere zelluläre Prozesse wie der Atmungskette dienen kann (Heinrich et al., 2014;

Rassow et al., 2006). GAPDH enthält reaktive Cysteine (z.B. Cys152) im aktiven Zentrum, die durch H_2O_2 zu Sulfensäuren oxidiert werden können. Hierbei findet die Reaktion von H_2O_2 mit den Cysteinen im aktiven Zentrum von GAPDH zu Sulfensäuren wesentlich schneller ($10^2\text{-}10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als mit freien Cysteinen, Glutathion und gut bekannten redox-regulierten Proteinen ($1\text{-}10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) statt (Hildebrandt et al., 2015; Seo und Carroll, 2009). Eine Oxidation der Cysteine im aktiven Zentrum kann zum Funktionsverlust führen, wodurch die Zellen ihren Energiebedarf nicht mehr decken können. Normale, gesunde Zellen erhalten die für ihre physiologischen Vorgänge notwendige Energie zu einem geringen Teil aus der Glykolyse und zum größeren Teil aus der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Tumorzellen jedoch, die einen hohen Energiebedarf haben, betreiben trotz der Anwesenheit von Sauerstoff viel mehr Glykolyse als nicht-entartete, gesunde Zellen, was auch als „aerobe Glykolyse“ oder Warburg-Effekt bezeichnet wird (Vander Heiden et al., 2009; Warburg, 1956). Aus diesem Grund wird in letzter Zeit den Krebspatienten eine ketogene Ernährungsweise mit kohlenhydratarmer Kost empfohlen (Allen et al., 2014). Ebenso gibt es verschiedene Therapieansätze, die gezielt in Tumorzellen die Glykolyse hemmen und somit das Wachstum der Tumorzellen erschweren (Pelicano et al., 2006). Ein Beispiel ist der Einsatz von 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), die die Funktionstüchtigkeit der Hexokinase in der Glykolyse herabsetzt und somit die Glykolyse hemmt (Zhang et al., 2006).

Um zu überprüfen, ob prooxidativ wirkende CNP reaktive Cysteine der GAPDH, wie beispielsweise im aktiven Zentrum, oxidieren und so die Aktivität des Enzyms beeinflussen können, wurde im Weiteren der Effekt von CNP auf die GAPDH sowohl im zellfreien System als auch in Zellen getestet. Somit dient die GAPDH auch repräsentativ als Modell für den Nachweis der molekularen Wirkung von CNP. Zunächst wurde, methodisch nach Seo & Carroll (2009), im zellfreien System isolierte GAPDH aus Kaninchenmuskeln im reduzierten Zustand, der durch die Vorbehandlung mit DTT erreicht werden soll, mit der Antikörper-basierten Detektion von H_2O_2 -spezifischen Sulfensäuren auf die Oxidierbarkeit durch CNP untersucht. Da CNP eine Superoxidquelle brauchen, um ihre SOD-mimetische Aktivität und die Bildung von H_2O_2 ausüben zu können, wurde das Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)-System eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde H_2O_2 verwendet. Es wurden vier Reaktionsansätze mit GAPDH (4 mg/ml in PBS) angesetzt. Zu jedem Ansatz wurde zuerst Dimedon hinzugegeben, das über die Reaktion mit Sulfensäuren ein stabiles Thioether-Produkt bildet und so von α -Hapten-Antikörpern erkannt wird. Anschließend wurden die Ansätze jeweils mit dem

X/XO-System, X/XO-System in Kombination mit CNP (Zweifachbestimmung) und H_2O_2 für 30 min inkubiert. Der Ansatz, welcher nur GAPDH und Dimedon enthielt, diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde nach Zugabe von Laemmli-Puffer die Reaktion gestoppt und eine SDS-PAGE durchgeführt, um danach die Bildung von Sulfensäuren mittels Western Blot detektieren zu können. Aufgrund der hohen GAPDH-Konzentration, welche experimentell eingesetzt werden musste, war der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle nicht sinnvoll („negative staining“), weshalb die Membran Coomassie gefärbt wurde. Das Ergebnis der Untersuchung zeigt (Abb. 3.26), dass durch die Behandlung mit dem X/XO-System und CNP im Vergleich zur Negativkontrolle die Bildung von Sulfensäuren leicht erhöht wird, wobei der Effekt von H_2O_2 (Positivkontrolle) im Gegensatz zu den anderen Behandlungen am deutlichsten ist.

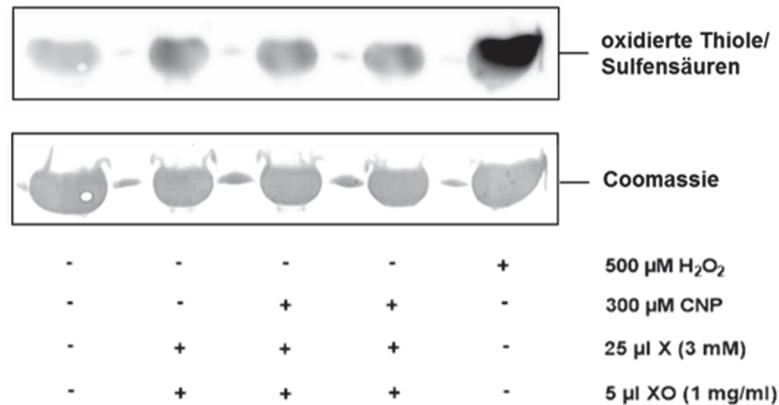


Abb. 3.26: Bildung von H_2O_2 -vermittelten Sulfensäuren im zellfreien System GAPDH aus Kaninchenmuskeln (4 mg/ml in PBS, pH 7.4) wurde nach der Vorbehandlung mit DTT 30 min mit Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO) alleine und in Kombination mit 300 μ M CNP inkubiert. Als Positivkontrolle diente 500 μ M H_2O_2 und als Negativkontrolle unbehandelte GAPDH. Für den Nachweis von Sulfensäuren wurden alle Zellen mit Dimedon behandelt. Dimedon bindet spezifisch an Sulfensäuren und bildet ein Thioether-Produkt, welches spezifisch über einen α -Hapten-Antikörper detektiert wird. Die Färbung der Membran mit Coomassie diente als Ladekontrolle. Das Experiment wurde einmal durchgeführt (n=1).

Das X/XO-System generiert neben Superoxidanionradikalen auch zu einem geringen Teil H_2O_2 (Sakuma et al., 2015; Kelley et al., 2010; Fatokun et al., 2007), was zur schwachen Oxidation und Bildung von Sulfensäuren in der GAPDH geführt haben kann. Über den Effekt von CNP kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, weil in dem durchgeführten Western Blot nicht zwischen CNP- und X/XO-Wirkung differenziert werden kann. Eine Western Blot-Analyse zeigt nur semiquantitative Ergebnisse und ist nicht sensitiv genug, um kleine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu zeigen.

Aus diesem Grund wurde das Experiment nur einmal durchgeführt und stattdessen der Fokus auf eine quantitativere Methode zur Überprüfung des Effekts von CNP auf GAPDH gelegt. Dafür wurde im Folgenden die Aktivität der GAPDH im zellfreien System mit Hilfe eines Aktivitätstests der Firma ScienCell (USA) bestimmt. Je nach Ausmaß der Oxidation sollten unterschiedliche Effekte auf die Aktivität der GAPDH vermittelt werden und so im Gegensatz zur vorherigen Western Blot-Analyse differenziertere Aussagen bezüglich der Wirkung von CNP und des X/XO-Systems getroffen werden.

Wie zuvor beschrieben, wurde mittels DTT reduzierte GAPDH aus Kaninchenmuskeln für den Assay verwendet. Nach der Behandlung mit dem X/XO-System alleine und in Kombination mit CNP sowie H₂O₂ als Positivkontrolle wurde die Oxidationsrate von NADH als Maß für die Aktivität der GAPDH bestimmt. Über einen Standard bekannter GAPDH-Konzentrationen und anschließender Proteinmengenbestimmung wurde die spezifische Enzymaktivität in U/mg bestimmt. Für die Auswertung wurden Werte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gemittelt, die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die Werte auf diese bezogen (Abb. 3.27). Zu sehen ist, dass alle Behandlungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die Aktivität der GAPDH hemmen. Jedoch gibt es hierbei deutliche Unterschiede zwischen den Reaktionsansätzen, welche in der Western Blot-Analyse in Abb. 3.26, bis auf die Behandlung mit H₂O₂, nicht detektiert werden konnten. Die Aktivitätsbestimmung zeigt, dass das X/XO-System in Kombination mit CNP eine stärkere Hemmung verursacht als das X/XO-System alleine. Die Kombination des X/XO-Systems und der CNP hemmt die Aktivität der GAPDH um ca. 30%, wobei durch das X/XO-System alleine nur eine 5,8%ige Abnahme zu beobachten ist. Am stärksten ist die Hemmung der GAPDH durch H₂O₂ (71%). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Menge an H₂O₂ unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität der GAPDH hat. Eine geringe H₂O₂-Konzentration, die beispielsweise durch das X/XO-System generiert wird, resultiert infolge der schwachen Oxidation des Enzyms in einer leichten Erniedrigung der GAPDH-Aktivität, wobei höhere Mengen an H₂O₂, die nach Zugabe von CNP zum X/XO-System gebildet werden, zu einer stärkeren Hemmung führen. Viel stärkere H₂O₂-Konzentrationen wie z.B. die als Positivkontrolle eingesetzte Konzentration von 500 µM zeigen den stärksten Effekt bezüglich einer Verringerung der Enzymaktivität. Für den Funktionsverlust sind u.a. modifizierte Cysteine im aktiven Zentrum der GAPDH verantwortlich. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese oxidiert werden, steigt mit zunehmender H₂O₂-

Konzentration. Zusammenfassend kann im zellfreien System gezeigt werden, dass CNP in Anwesenheit einer Superoxidquelle, des X/XO-Systems, die Aktivität der GAPDH mittels H_2O_2 -spezifischer Thioloxydation, insbesondere im aktiven Zentrum, herabsetzt.

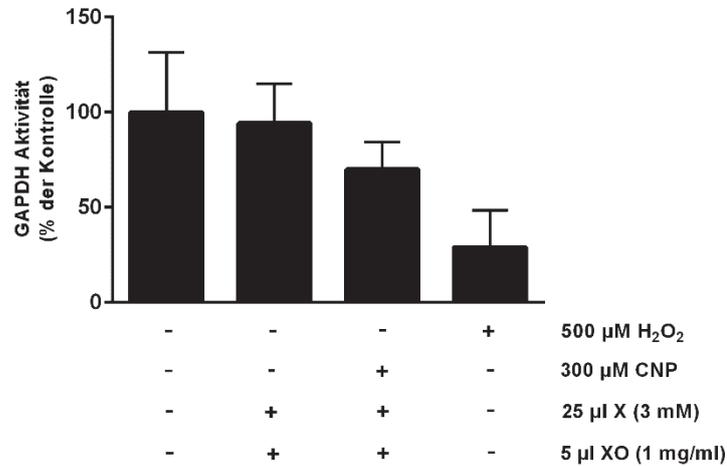


Abb. 3.27: Hemmung der GAPDH-Aktivität im zellfreien System durch CNP GAPDH aus Kaninchenmuskeln (4 mg/ml in PBS, pH 7.4) wurde nach der Vorbehandlung mit DTT 30 min mit Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO) alleine und in Kombination mit 300 μM CNP inkubiert. Als Positivkontrolle diente 500 μM H_2O_2 und als Negativkontrolle unbehandelte GAPDH. Nach der Inkubation wurde die Aktivität der GAPDH in U/mg mit dem Assay Kit (ScienCell) bestimmt. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (n=2), wobei die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen wurden.

Um sich den Prozessen in einer physiologischen Umgebung anzunähern, wurde anschließend die Aktivität der GAPDH im zellulären System gemessen, damit der Einfluss des antioxidativen Systems normaler, gesunder und transformierter Zellen aufgezeigt werden kann. Hierbei geht es insbesondere um den Vergleich physiologischer Prozesse mit dem veränderten Tumormetabolismus, der beispielsweise zu einer erhöhten Auslastung des antioxidativen Systems führt. Hierbei sollte überprüft werden, ob CNP, die in vorangegangenen Experimenten stark prooxidative Effekte in Melanomzellen und geringe Effekte in normalen Zellen gezeigt haben, auch im zellulären System die Aktivität der GAPDH hemmen und es Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen gibt. Für die Versuchsdurchführung wurden zunächst Lysate von 300 μM CNP-behandelten Melanomzellen nach 4 h und 24 h gesammelt und für die Bestimmung der Aktivität der GAPDH in den Assay eingesetzt. H_2O_2 wurde wieder als Positivkontrolle und unbehandelte Zellen als Negativkontrolle verwendet. Nach 4 h konnte eine leichte Erniedrigung der Aktivität der GAPDH durch CNP in den Melanomzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), wobei der Effekt nach 24 h stärker ausfällt und deshalb

weiter untersucht wurde. In Abb. 3.28 ist das Ergebnis der Untersuchung nach 24 h CNP-Behandlung in A375 Melanomzellen gezeigt. Es wird deutlich, dass die Aktivität der GAPDH signifikant gehemmt wird. Die Abnahme beträgt im Vergleich zur Negativkontrolle ca. 38.4%. Die Behandlung mit H₂O₂ (Positivkontrolle) zeigt ebenfalls eine signifikante Abnahme der zellulären GAPDH-Aktivität um 57%.

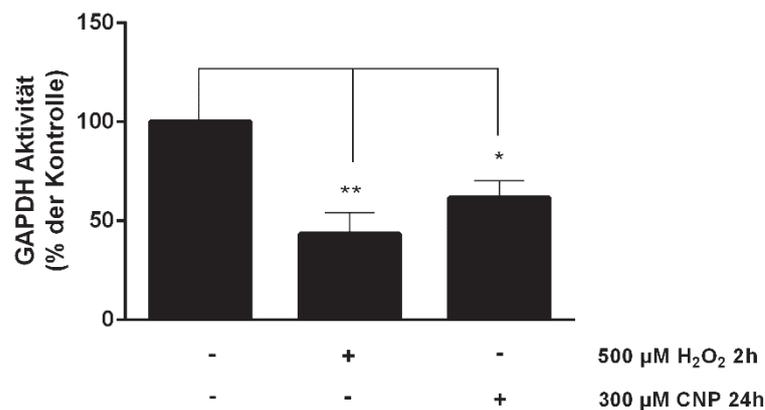


Abb. 3.28: Hemmung der GAPDH-Aktivität in Tumorzellen nach Behandlung mit CNP
Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden mit 300 µM CNP (24 h) inkubiert. Als Positivkontrolle dienten H₂O₂-behandelte und als Negativkontrolle unbehandelte Zellen. Nach der Inkubation wurde die Aktivität der GAPDH in U/mg mit dem Assay Kit (ScienCell) bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (n=3), wobei die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen wurden (*p<0.05, **p<0.01, One-way-ANOVA mit Dunett's post hoc Test).

Das Ergebnis der normalen Fibroblasten (NHDF) sowie Melanozyten (NHEM) (Abb. 3.29) zeigt im Vergleich zu den Melanomzellen keine signifikante Veränderung der Aktivität der GAPDH nach der Behandlung mit CNP. Eine leichte Abnahme der Aktivität ist in den Fibroblasten zu sehen, während tendenziell eine Zunahme der Aktivität in den Melanozyten zu beobachten ist. Die als Positivkontrolle mit H₂O₂-behandelten Zellen zeigen wie auch in den Melanomzellen eine Abnahme der Aktivität in Melanozyten um 42% und in Fibroblasten um 31%.

Letztendlich zeigen CNP eine selektiv hemmende Wirkung auf die Aktivität der redox-regulierten GAPDH im zellulären System. In Tumorzellen wirken die Partikel signifikant inhibierend, während in normalen Zellen der Haut keine signifikante Hemmung, vielmehr sogar tendenziell eine aktivierende Wirkung (Melanozyten), festgestellt werden kann. Diese selektive Wirkung der Partikel konnte auch in vorherigen Untersuchungen zur Cytotoxizität, Proliferation, ROS-Bildung und Cysteinmodifikation in Form von

Sulfensäuren aufgezeigt werden, sodass die Ergebnisse weitgehend miteinander korrelieren.

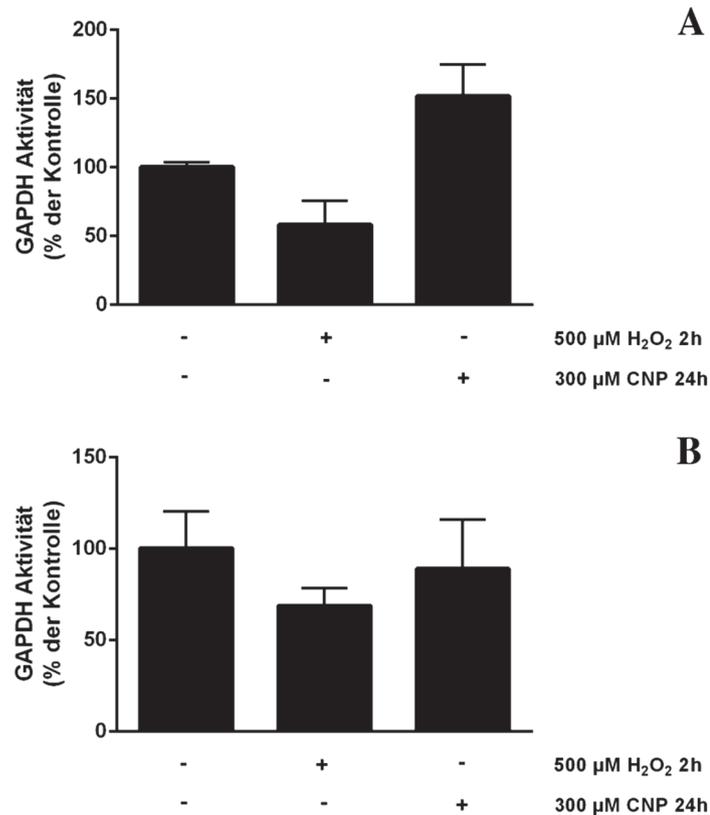


Abb. 3.29: Kein Effekt von CNP auf die Aktivität der GAPDH in normalen Hautzellen
 Subkonfluente Melanozyten (NHEM) (A) und Fibroblasten (NHDF) (B) wurden mit 300 μM CNP (24 h) inkubiert. Als Positivkontrolle dienen H_2O_2 -behandelte und als Negativkontrolle unbehandelte Zellen. Nach der Inkubation wurde die Aktivität der GAPDH in U/mg mit dem Assay Kit (ScienCell) bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n=3$), wobei die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen wurden.

Im Weiteren stellt sich die Frage, um welche Art der Enzymhemmung es sich in den Tumorzellen handelt. Da CNP nur in den A375 Melanomzellen eine Hemmung der GAPDH zeigen, wurde das Experiment nur in diesen Zellen durchgeführt. Bei der Enzymhemmung wird hauptsächlich zwischen kompetitiv und nicht-kompetitiv unterschieden. Anhand der sogenannten Michaelis-Menten-Kinetik und der Linearisierung dieser mit dem sogenannten Lineweaver-Burk-Diagramm kann die Art der Hemmung bestimmt werden (Heinrich et al., 2014; Rassow et al., 2006). Für die Erstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik wurde der Enzymassay mit zunehmenden Substratmengen sowohl im zellfreien als auch im zellulären System durchgeführt. Für die Versuchsdurchführung wurde für zunehmende Substratkonzentrationen (0-7 mM) die

Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$) bestimmt. Anhand der Mittelwerte von unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurde eine Michaelis-Menten-Kurve erstellt (Abb. 3.30). Über die Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_M), welche die Substratkonzentration, bei der die Geschwindigkeit $\frac{1}{2}V_{\text{max}}$ beträgt, angibt, können Aussagen über die Art der Hemmung getroffen werden.

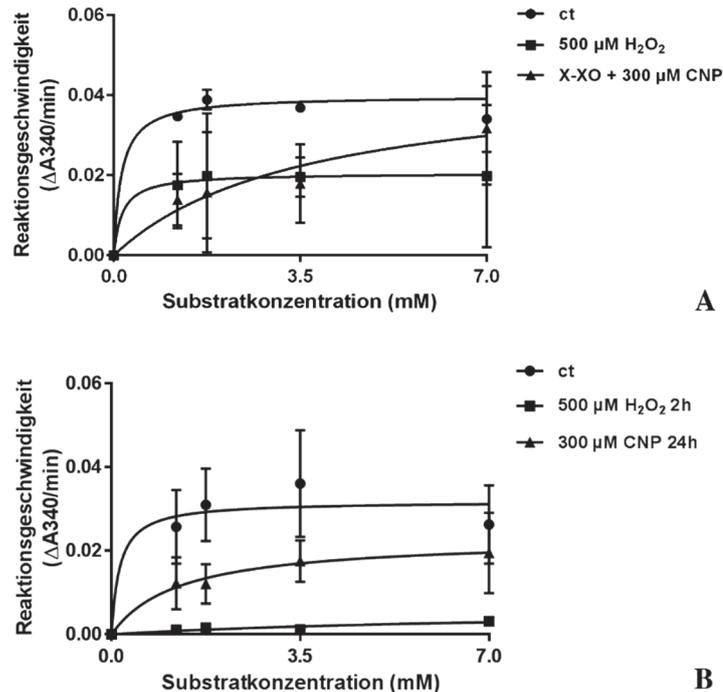


Abb. 3.30: Michaelis-Menten-Diagramm der GAPDH im zellfreien (A) und im zellulären (B) System
Die Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$) der GAPDH im zellfreien System (A) und in A375 Melanomzellen (B) wurde für verschiedene Substratkonzentrationen (0-7 mM) ermittelt. Anschließend wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik erstellt und folglich der K_M -Wert und V_{max} mit Hilfe der Software Graphpad Prism bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von zwei ($n=2$) (A) und drei ($n=3$) (B) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. ct, Kontrolle

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zeigt das Ergebnis in Abb. 3.30, dass sowohl im zellfreien als auch im zellulären System die Hemmung der GAPDH mit einem erniedrigten V_{max} und einem erhöhten K_M -Wert einhergeht. Je höher der K_M -Wert ist, desto niedriger ist die Substrataffinität des Enzyms und je niedriger V_{max} ausfällt, desto langsamer und schlechter arbeitet das Enzym. Die Konstellation von V_{max} und K_M hierbei passt jedoch weder zu der kompetitiven Enzymhemmung, bei welcher K_M größer wird, aber V_{max} gleich bleibt, noch zu der nicht-kompetitiven Enzymhemmung, bei welcher K_M gleich bleibt, aber V_{max} kleiner wird. Aus dem Ergebnis der Untersuchungen mit CNP kann abgeleitet werden, dass es sich hierbei vielmehr um einen Mischtyp aus beiden

Hemmformen handeln kann. Eine Aussage oder ein Vergleich mit der Positivkontrolle (H_2O_2) kann nicht getroffen werden, da die Behandlung mit H_2O_2 im zellulären System höchstwahrscheinlich zu einer Schädigung und einer irreversiblen Hemmung des Enzyms führt, sodass die Aktivität sehr gering ist. Dagegen deutet die Wirkung von H_2O_2 im zellfreien System auf eine nicht-kompetitive Hemmung hin.

Da die GAPDH ein Schlüsselenzym der Glykolyse ist, sollte eine Hemmung auch einen Einfluss auf die Laktatbildung haben. Angesichts der Tatsache, dass Tumorzellen eine erhöhte Glykolyserate und infolgedessen eine vermehrte Laktatproduktion im Vergleich zu normalen Zellen haben, sollte somit im weiteren Verlauf die Wirkung von CNP auf die Laktatproduktion in den A375 Melanomzellen untersucht werden. Eine Laktatmengenbestimmung wurde mit dem Lactate Assay Kit (Cayman) durchgeführt. Hierfür wurden subkonfluente A375 Melanomzellen mit $300 \mu\text{M}$ CNP für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 und 1 mM 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) behandelt, wobei unbehandelte Zellen als Negativkontrolle dienten. 2-DG wurde als bekannter Inhibitor der Glykolyse verwendet.

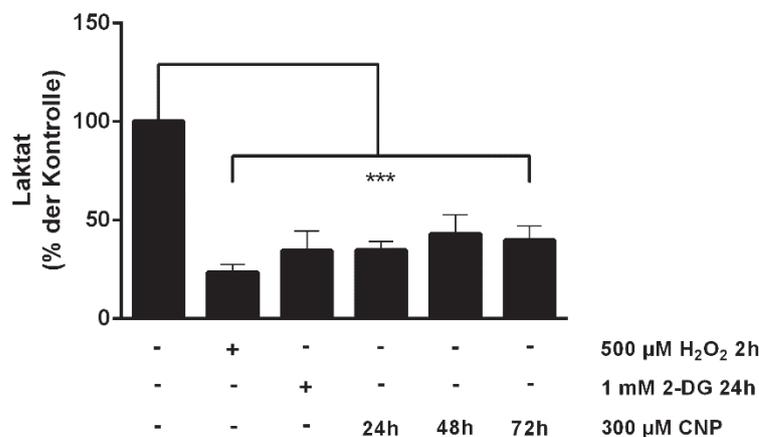


Abb. 3.31: Erniedrigung der Laktatkonzentration in den Tumorzellen nach Behandlung mit CNP
Subkonfluente A375 Melanomzellen wurden mit $300 \mu\text{M}$ CNP für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienten H_2O_2 - und 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG)-behandelte Zellen, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Laktatmengenbestimmung erfolgte mit dem Lactate Assay Kit (Cayman) in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n=3$). Die Laktatmenge (μM) bezogen auf die Zellzahl in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (***) $p < 0.001$; One-way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test).

Für die Auswertung wurde die ermittelte Laktatmenge (μM) auf die Zellzahl bezogen. In Abb. 3.31 sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten

Experimenten dargestellt, wobei die unbehandelte Kontrolle auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen wurden. Die Behandlung mit CNP als auch mit 2-DG und H₂O₂ führen zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären Laktatgehalts in den Tumorzellen. Durch CNP wird der Laktatgehalt um 65% (24 h), 57% (48 h) und 60% (72 h) erniedrigt, während H₂O₂ zu einer 77%igen und 2-DG zu einer 66%igen Abnahme führen. Somit dient dieses Ergebnis als ein weiterer Nachweis für die Hemmung der GAPDH und folglich der zellulären Glykolyse durch CNP.

3.7 Therapieansätze mit CNP

Um zu überprüfen, ob CNP für einen zukünftigen Therapieansatz geeignet sind, sollen im Folgenden zwei Fragen näher untersucht werden:

1. Wie kann überprüft werden, ob die Tumorzellen per se gegenüber normalen, gesunden Zellen sensitiver auf einen weiteren exogenen ROS-Stimulus (CNP, H₂O₂) aufgrund ihres endogen erhöhten ROS-Gehalts reagieren?
2. Was hat eine Langzeitbehandlung mit CNP für eine Auswirkung auf die Behandlung mit klassischen Chemotherapeutika wie Doxorubicin?

3.7.1 Einfluss von ROS auf die Zellviabilität von Tumorzellen und normalen Hautzellen

Es ist beschrieben, dass Tumorzellen sensitiver auf weitere ROS-Erhöhungen reagieren als nicht-entartete Zellen (Liou und Storz, 2010; Verschoor et al., 2010; Pelicano et al., 2004). Um die unterschiedliche Sensitivität im Hinblick auf einen möglichen Therapieansatz mit CNP zu untersuchen, wurde H₂O₂ als einfaches, repräsentatives Modell für die SOD-mimetische Aktivität von CNP benutzt. Um zu überprüfen, ob Melanomzellen tatsächlich sensitiver auf eine exogen initiierte ROS-Erhöpfung reagieren, wurde im Folgenden der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ (10-1000 µM) auf die Zellviabilität von Melanomzellen (A375), Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) getestet. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde der MTT-Assay durchgeführt. In Abb. 3.32 sind Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen dargestellt.

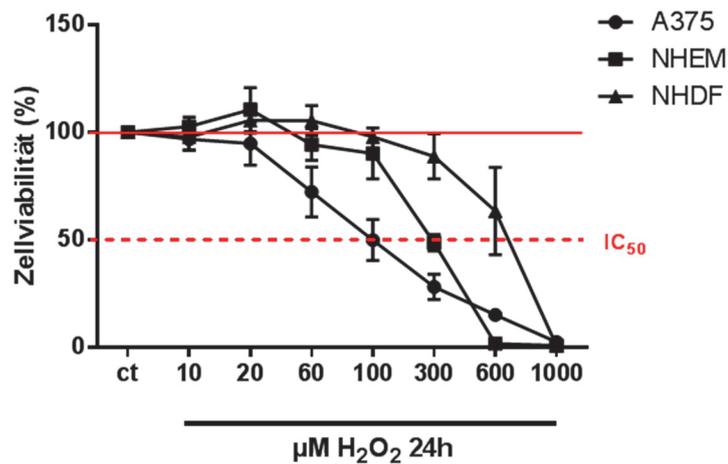


Abb. 3.32: Erhöhte Sensitivität von Tumorzellen gegenüber H_2O_2 im Gegensatz zu normalen Zellen
 Subkonfluente Melanomzellen (A375), Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 (10-1000 μM) behandelt. Die Zellviabilität wurde durch den MTT-Test bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (n=3). Die Mittelwerte mit \pm S.E.M. der Absorption bei 570 nm wurden bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (ct), deren Viabilität auf 100% gesetzt wurde, bezogen.

Das Ergebnis zeigt, dass bei den Melanomzellen (A375) die Cytotoxizität bereits bei niedrigeren Konzentrationen von H_2O_2 ($> 20 \mu\text{M}$) einsetzt, während Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) höhere Konzentrationen von H_2O_2 tolerieren und erst ab 100 μM toxische Effekte zeigen. Bei niedrigeren Konzentrationen ist tendenziell sogar eine Zunahme der Zellviabilität bei den gesunden, stromalen Zellen zu sehen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Tumorzellen sensitiver auf H_2O_2 reagieren und eher absterben als normale Zellen. Anhand von IC_{50} -Werten wird der Unterschied zwischen den Zelltypen noch deutlicher. Der IC_{50} -Wert von H_2O_2 in Melanomzellen ist mit ca. 100 μM bedeutend kleiner als der von Melanozyten ($\text{IC}_{50} = 300 \mu\text{M}$) und Fibroblasten ($\text{IC}_{50} = 670 \mu\text{M}$). Bei der höchsten Konzentration (1000 μM) überleben fast keine Zellen mehr. Da H_2O_2 ein starkes Oxidationsmittel ist, ist dieses Ergebnis nicht außergewöhnlich. Ab dieser Konzentration wird H_2O_2 auch oft als Positivkontrolle für Cytotoxizitätstests genutzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die SOD-mimetische Aktivität von CNP, die zu einer Erhöhung von H_2O_2 führt, therapeutisch genutzt werden kann, da die Tumorzellen sensitiver auf eine exogen stimulierte ROS-Erhöhung reagieren als die entsprechenden normalen (gesunden, stromalen) Zellen.

3.7.2 Langzeituntersuchung von CNP in Tumorzellen und normalen Hautzellen

Ein wichtiger Aspekt in der systemischen Behandlung von Tumoren ist die Langzeitanwendung von antitumoralen Agenzien. Die Entwicklung von Resistenzen bei der Behandlung von Tumoren ist ein zentrales Problem von konventionellen Cytostatika, wodurch die Chemotherapie ineffizient wird und die Prognose der Krebspatienten sinkt (Alfarouk et al., 2015). Ebenso ist die Langzeitwirkung auf gesunde Zellen entscheidend, um unerwünschte Spätfolgen auszuschließen. Die Toxizität in Tumorzellen und die Nicht-Toxizität in normalen Zellen über einen langen Behandlungszeitraum wäre entscheidend für die Verwendung von CNP als therapeutisches und systemisches Mittel gegen Tumorerkrankungen, insbesondere da nicht bekannt ist, wie CNP im Organismus metabolisiert, ausgeschieden und eventuell akkumuliert werden.

Um den Langzeiteffekt von CNP in Tumorzellen und gesunden Zellen zu untersuchen, wurden Melanomzellen (A375) und dermale Hautfibroblasten (NHDF) über 19 Wochen in festgelegten Abständen mit CNP behandelt und die kumulative Populationsdichte (CPD) als Maß für die Proliferationsrate ermittelt. Da Melanozyten (NHEM) *in vitro* nicht lange kultivierbar sind, wurden für dieses Experiment Fibroblasten als repräsentativen gesunden Zelltyp der Haut untersucht. Die Zellen wurden 96 h mit 150 μM und 300 μM CNP in serumfreiem DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und zur Regeneration für 72 h in FCS-haltiges DMEM überführt. Nach der Regenerationsphase wurde erneut mit der Behandlung, die sich über 19 Wochen erstreckte, begonnen. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei unabhängig voneinander prozessierten Zellproben.

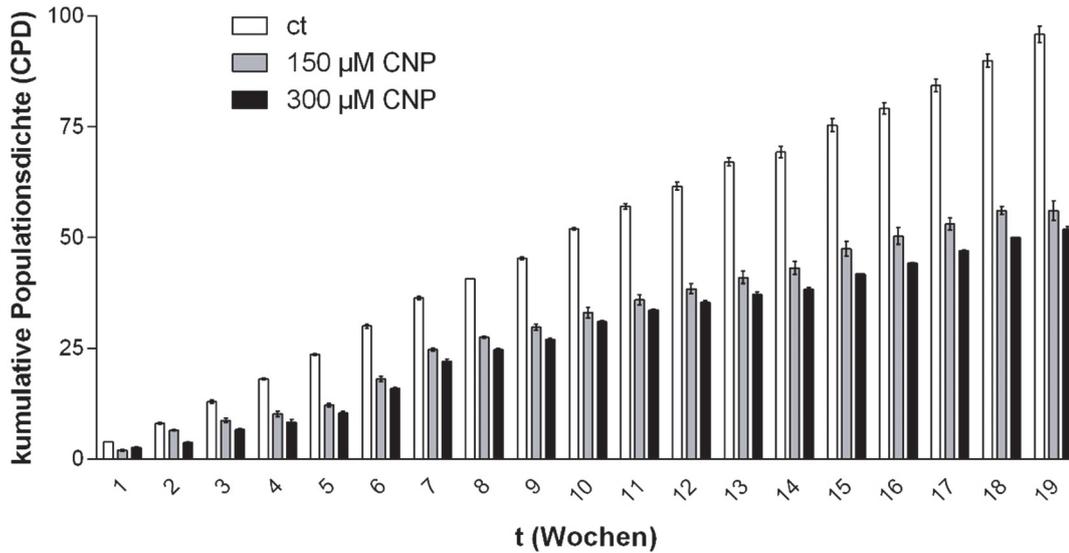


Abb. 3.33: Gleichbleibende Cytotoxizität von CNP in Tumorzellen nach einer Langzeitbehandlung
 A375 Melanomzellen wurden mit 150 µM (graue Balken) und 300 µM (schwarze Balken) CNP in serumfreiem DMEM behandelt. Nach 96 h wurden die Zellen abtypsiniert und die kumulative Populationsdichte (CPD) berechnet. Für die Regeneration wurden die Zellen anschließend in serumhaltigem DMEM (mit 10% FCS) für 72 h kultiviert. Danach wurde erneut behandelt, sodass der Vorgang 19 Wochen lang wiederholt wurde. t, Zeit; ct, unbehandelte Kontrollzellen (weiße Balken).

Die Behandlung mit 150 µM und 300 µM CNP für 96 h führt, wie auch in Abb. 3.9 bzw. 3.10 gezeigt, zu cytotoxischen Effekten in A375 Melanomzellen. Der toxische Effekt von CNP im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen steigert sich nach mehreren Wochen, sodass die Abnahme der kumulativen Populationsdichte (CPD) von 26% (150 µM) und 32% (300 µM) nach der ersten Woche nach der 19. Woche mit 40.5% (150 µM) und 47.5% (300 µM) ansteigt (Abb. 3.33). Selbst nach ca. 50 Wochen gleicher Behandlung (Daten nicht gezeigt) bleiben CNP weiterhin toxisch für Melanomzellen. Der Unterschied von 30-40% in der CPD zwischen Kontrollzellen und CNP-behandelte Zellen wird beibehalten. Insgesamt zeigen CNP-behandelte Melanomzellen nach mehreren Wochen keine Entwicklung einer Resistenz gegenüber CNP.

Wie bereits in Abb. 3.10 dargestellt, vermitteln CNP nach 96 h keine Cytotoxizität in Fibroblasten. Nach Langzeitexposition mit CNP werden ebenfalls keine inhibitorischen Effekte von CNP auf die Fibroblasten festgestellt (Abb. 3.34). Selbst nach 19 Wochen zeigt die CPD keine Abnahme im Vergleich zur Negativkontrolle, sondern sogar tendenziell eine Zunahme. Die Langzeitbehandlung mit CNP führt zu keinen adversen

Effekten in gesunden Zellen der Haut, aber zu einer dauerhaften Cytotoxizität in Melanomzellen.

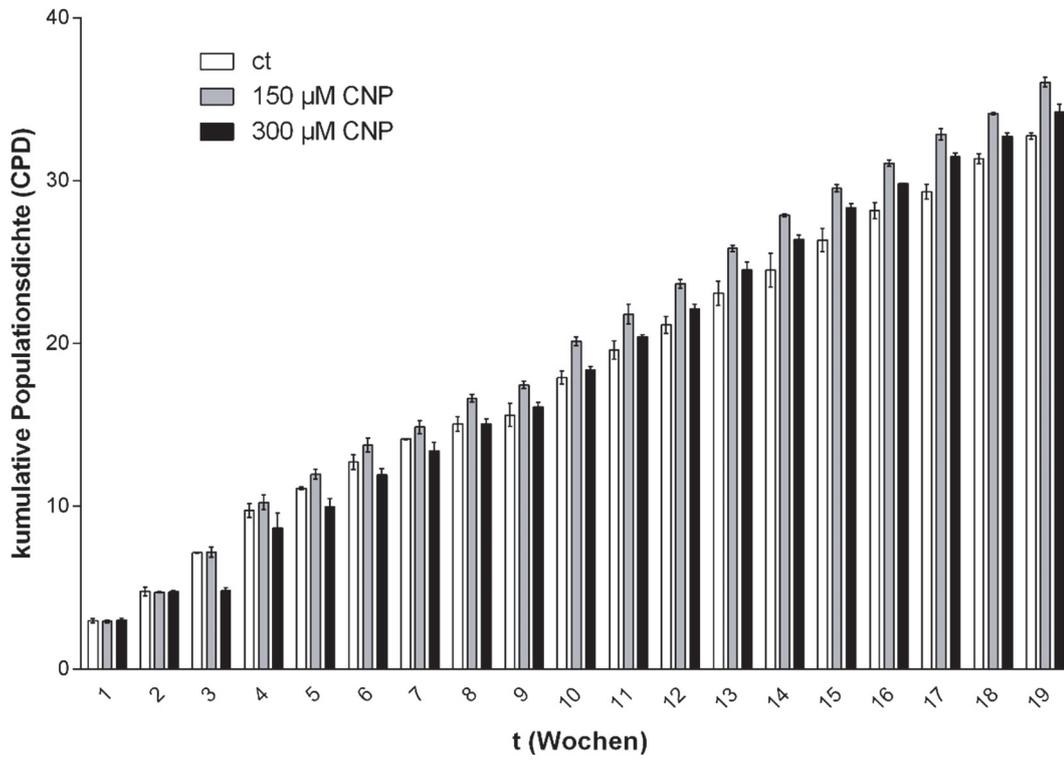


Abb. 3.34: Kein Einfluss einer CNP-Langzeitexposition auf die Cytotoxizität in Fibroblasten (veröffentlicht in Sack-Zschauer et al., 2017b) Stromale Fibroblasten (NHDF) wurden mit 150 µM (graue Balken) und 300 µM (schwarze Balken) CNP in serumfreiem DMEM behandelt. Nach 96 h wurden die Zellen abtypisiert und die kumulative Populationsdichte (CPD) berechnet. Für die Regeneration wurden die Zellen anschließend in serumhaltigem DMEM (mit 10% FCS) für 72 h kultiviert. Danach wurde erneut behandelt, sodass der Vorgang 19 Wochen lang wiederholt wurde. t, Zeit; ct, unbehandelte Kontrollzellen (weiße Balken).

In den Ergebnissen zuvor wurde gezeigt, dass CNP cytotoxische Effekte in Tumorzellen aufweisen, während in gesunden Zellen keine CNP-bedingten toxischen Effekte festgestellt werden. Diese selektive Eigenschaft macht die Nanopartikel zu einem gut geeigneten Werkzeug bezüglich der Entwicklung neuer Therapieansätze für Krebs. In einer Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen wurde untersucht, ob sich CNP für eine Kombinationstherapie mit klassischen Chemotherapeutika wie Doxorubicin eignen. Bezüglich der cytotoxischen und prooxidativen Effekte wurden synergistische Effekte nach der Kombinationsbehandlung von Dextran-gekoppelten CNP und Doxorubicin in Melanomzellen beobachtet, während CNP gesunde Fibroblasten vor der Doxorubicin-vermittelten Cytotoxizität schützten (Sack et al., 2014). Im Rahmen einer Supplementationstherapie zeigen Dextran-gekoppelte CNP somit vielversprechende

Ergebnisse. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob Acrylat-stabilisierte CNP nach einer Langzeitbehandlung ebenfalls die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber klassischen Chemotherapeutika erhöhen oder die Partikel eventuell zu einem Schutz der Tumorzellen führen. Für die Versuchsdurchführung wurden CNP-vorbehandelte bzw. langzeitbehandelte A375 Melanomzellen und als klassisches Chemotherapeutikum erneut Doxorubicin eingesetzt. Die Melanomzellen wurden, wie zuvor beschrieben, über 19 Wochen in festgelegten Abständen mit 150 μM und 300 μM CNP inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Um herauszufinden, ob eine Langzeitbehandlung mit CNP die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Doxorubicin erhöht oder erniedrigt, wurden die langzeitbehandelten Melanomzellen mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin (0.15-2 μM) behandelt und nach 24-stündiger Inkubationszeit der MTT-Assay durchgeführt. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei die jeweiligen Kontrollen auf 100% gesetzt und die anderen Werte auf diese bezogen wurden.

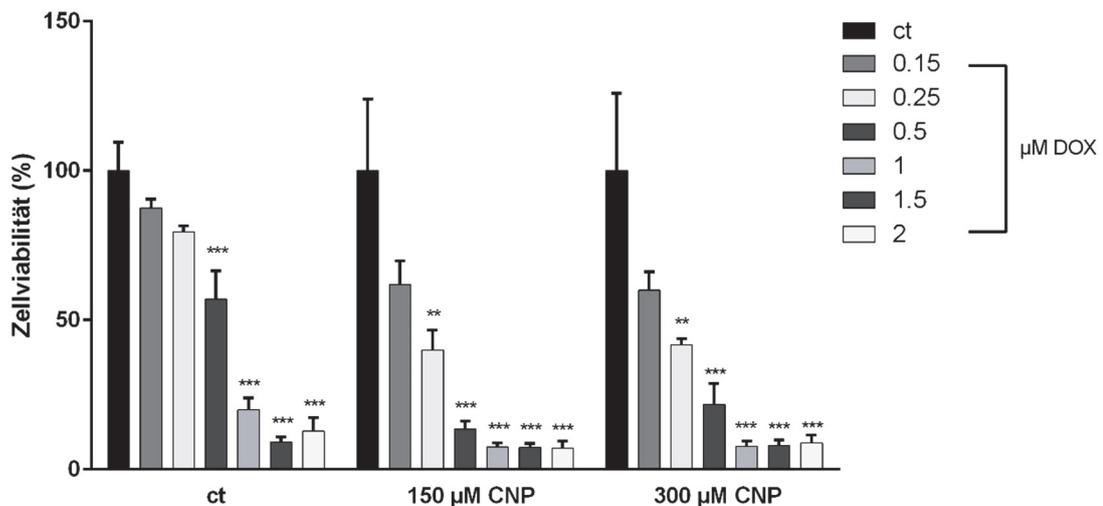


Abb. 3.35: Erhöhte Cytotoxizität von Doxorubicin nach 19 Wochen CNP-Langzeitbehandlung in Tumorzellen A375 Melanomzellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Doxorubicin (0.15-2 μM) behandelt. Die Melanomzellen wurden vorher über 19 Wochen in bestimmten Abständen mit 150 μM und 300 μM CNP für 96 h inkubiert. Nicht mit CNP-langzeitbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Die Zellviabilität wurde durch den MTT-Test bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente ($n=3$) mit Dreifachbestimmungen in jeder Dosisgruppe durchgeführt. Die Mittelwerte mit \pm S.E.M. der Absorption bei 570 nm wurden bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (ct) bezogen, deren Viabilität auf 100% gesetzt wurde. Dargestellt sind die prozentualen Erniedrigungen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (** $p<0.01$, *** $p<0.001$; One-way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test).

Das Ergebnis in Abb. 3.35 zeigt, dass Acrylat-stabilisierte CNP die Sensitivität von langzeitbehandelten Tumorzellen gegenüber Doxorubicin erhöhen und dass Doxorubicin toxischer in diesen Zellen wirkt. Generell wird bei allen Zellen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität durch Doxorubicin gesehen. Des Weiteren ist der toxische Effekt von Doxorubicin in den CNP-langzeitbehandelten Tumorzellen stärker als in den unbehandelten Zellen. Wenn eine Konzentration von $0.5 \mu\text{M}$ Doxorubicin, die der *steady-state* Plasmakonzentration in Patienten nach einer Standardinfusion mit Doxorubicin entspricht (Spagnuolo et al., 2011; Minotti et al., 2004b), näher betrachtet wird, fällt auf, dass Doxorubicin die Zellviabilität in den Kontrollzellen um 43% erniedrigt. Die Abnahme der Zellviabilität in den CNP-langzeitbehandelten Zellen ist dagegen erhöht und liegt bei 86% ($150 \mu\text{M}$) und 78% ($300 \mu\text{M}$). Demzufolge wirkt Doxorubicin sensitiver (toxischer) in den CNP-behandelten Zellen als in den Kontrollzellen. Perspektivisch gesehen, bestätigt dieses Ergebnis die Idee einer Supplementationstherapie.

-Eigenbeteiligung an den bereits publizierten Ergebnissen-

In der vorliegenden Dissertation sind Teile der Ergebnisse (Abb. 3.2; Abb. 3.3; Abb. 3.4; Abb. 3.18 und Abb. 3.34) bereits veröffentlicht (Sack-Zschauer et al., 2017b). Die in dieser Arbeit verwendeten Partikel wurden in der Veröffentlichung Sack-Zschauer et al., 2017b als CNP-2 bezeichnet.

In Abb. 3.2 ist das Ergebnis der Größenverteilung der in der Dissertation verwendeten CNP gezeigt. Die Bestimmung der Größe erfolgte mittels DLS im Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie I (Prof. Christoph Janiak). Die DLS-Messungen dieser Partikel wurden von mir, nach entsprechender Einführung und Einarbeitung in das Gerät von Dr. Hajo Meyer, durchgeführt und die Daten ebenso von mir ausgewertet.

Die in den Abb. 3.3 und 3.4 dargestellten Transmissionspektren wurden in unserem Institut (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I) von mir angefertigt und ausgewertet. In Sack-Zschauer et al., 2017b wurden die in Abb. 3.4 als Referenzpartikel verwendeten CNP als CNP-3 bezeichnet.

In Abb. 3.18 sind Ergebnisse der ROS-Messungen in den Zellen A375, NHDF und NHEM dargestellt, von welchen nur die Ergebnisse von A375 und NHDF in Sack-Zschauer et al., 2017b publiziert sind. Die Experimente wurden in unserem Institut von mir durchgeführt und die Daten ebenfalls von mir ausgewertet.

In Abb. 3.34 ist das Ergebnis eines Langzeitexperimentes gezeigt. Dieses Experiment wurde mit der technischen Hilfe und Unterstützung von Frau Claudia Wyrich (Biologisch-technische Assistentin in unserer Arbeitsgruppe) angefertigt. Frau Wyrich hat mir in der Zellkultur bei der Langzeitkultivierung der Zellen geholfen und auch zu der Endauswertung durch die Bestimmung der Populationsdichten (PD) beigetragen.

4 Diskussion

Redox-aktive Eigenschaften machen Ceroxid-Nanopartikel (CNP) zu einem gut geeigneten Werkzeug bezüglich der Entwicklung neuer Therapieansätze gegen verschiedene Krankheitsbilder wie Krebs (Gao et al., 2014; Das et al., 2013; Wason und Zhao, 2013). Eine optimale Krebstherapie soll die Zerstörung von Tumorzellen sowie die Hemmung der Tumorinvasion und Neoangiogenese beinhalten, während normale (gesunde, stromale) Zellen nicht beeinträchtigt werden. Jedoch ist dies bei einer klassischen Chemotherapie oft nicht der Fall, da auch normale Zellen geschädigt werden (Leischner, 2017; Graefe et al., 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass CNP einen vielversprechenden Ansatz bei der Behandlung von Hautkrebs bieten (Sack et al., 2014; Alili et al., 2013; Alili et al., 2011). Neuere Ansätze der Krebsforschung nutzen den veränderten Redox-Status von Tumorzellen für therapeutische Zwecke, um eine gezielte Tumorthherapie zu ermöglichen (Wondrak, 2009; Schumacker, 2006). Tumorzellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen einen basal erhöhten ROS-Gehalt auf und reagieren daher weitaus empfindlicher auf oxidativen Stress als nicht transformierte Zellen (Liou und Storz, 2010; Verschoor et al., 2010; Pelicano et al., 2004). Dieses Erkenntnis ist für die vorliegende Arbeit richtungsweisend und führt zur genaueren Analyse der molekularen Wirkmechanismen von redox-aktiven CNP in einem einfachen Modell für Tumor-Stroma Interaktion, um die Anwendbarkeit von CNP als molekulares Werkzeug in der Krebstherapie zu erhöhen und damit verbundene Nebenwirkungen und Risiken zu überprüfen. In dieser Arbeit kann zum ersten Mal gezeigt werden, dass CNP über ROS-abhängige Prozesse posttranslationale Veränderungen in Proteinen vermitteln, welche zu Funktionsverlust von redox-sensitiven und redox-regulierten Enzymen wie der GAPDH, einem wichtigen Enzym der Glykolyse, führen.

4.1 Ideale Eigenschaften von CNP im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung gegen Krebs

Die therapeutische Anwendung von Nanomaterialien, insbesondere von CNP, bildet in letzter Zeit den Schwerpunkt vieler Studien. So zeigen CNP im Rahmen der Krebsforschung je nach untersuchtem Zelltyp unterschiedliche Effekte auf die Zellviabilität. In einigen Studien können cytotoxische Effekte in verschiedenen Tumorzellen *in vitro* nachgewiesen werden, beispielsweise im Lungenkarzinom,

Kolonkarzinom, Melanom und Plattenepithelkarzinom (Pesic et al., 2015; Alili et al., 2011; Lin et al., 2006). Eine antikanzerogene Wirkung von CNP kann zudem in Xenograft-Mausmodellen nachgewiesen werden, bei denen das Tumorstadium signifikant verringert wurde (Alili et al., 2013). Weitere Studien zeigen jedoch, dass CNP nicht in allen Tumorzelllinien toxisch wirken. Es gibt auch Tumorzellen, die weniger empfindlich auf die Behandlung mit CNP reagieren (Pesic et al., 2015). In normalen Zellen werden ebenfalls unterschiedliche Effekte nachgewiesen. So werden cytotoxische Effekte in Makrophagen (Forest et al., 2017) und protektive Effekte von CNP gegenüber exogenen Noxen in dermalen Fibroblasten (von Montfort et al., 2015; Sack et al., 2014) gezeigt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse wird die Wirkung von CNP derzeit kontrovers diskutiert. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass in vielen Studien bei gleicher Fragestellung und Zielsetzung oft CNP mit unterschiedlichen Eigenschaften für Untersuchungen eingesetzt werden, was zu widersprüchlichen Ergebnissen führt. Aus diesem Grund können CNP-bedingte Effekte in Zellen oft nicht miteinander verglichen und schon gar nicht reproduziert werden, was einen großen Nachteil im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung darstellt. In diesem Kontext spielen Parameter von Nanopartikeln, wie Größe, Struktur, Oberflächenladung, Zeta-Potenzial und Beschichtung (auch *coating* genannt), sowie die Umgebung (z.B. pH-Wert) eine bedeutende Rolle und haben einen wichtigen Einfluss auf die zelluläre Wirkung von CNP (Sack-Zschauer et al., 2017b; Das et al., 2013; Dowding et al., 2013; Karakoti et al., 2012).

Sack-Zschauer et al. (2017b) haben vier verschieden synthetisierte CNP anhand wichtiger Parameter, u.a. in Zusammenhang auf Tumor-Stroma Interaktion, untersucht, um die am besten geeigneten Nanopartikel für weitergehende Untersuchungen und eine zukünftige Krebstherapie zu finden. Als Referenzpartikel werden CNP verwendet, welche bereits ausführlich charakterisiert sind und in früheren Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen vielversprechende Ergebnisse zeigten (von Montfort et al., 2015; Sack et al., 2014; Alili et al., 2013; Alili et al., 2011). Diese sind mit einem Durchmesser von 4.5 (\pm 1.7) nm die kleinsten Nanopartikel der Studie und verfügen über ein definiertes, ausgewogenes Verhältnis an Ce^{3+} - und Ce^{4+} -Ionen, was sich im Transmissionsspektrum als charakteristische *shift* in den längerwelligen Bereich des Spektrums in Folge der Oxidation mit H_2O_2 zeigt. Außerdem haben diese Referenzpartikel ein hohes toxisches Potenzial in Tumorzellen, während keine toxischen Effekte in normalen Zellen vermittelt werden (Alili et al., 2013; Alili et al., 2011). Für eine optimale Krebstherapie wäre die

Voraussetzung, dass Tumorzellen unter der Behandlung absterben und ihre invasive Kapazität verlieren, während möglichst keine adversen Effekte in normalen, gesunden Zellen auftreten sollen (Panieri und Santoro, 2016; Sullivan und Chandel, 2014; Baudino, 2015). CNP mit einem größeren Durchmesser (≥ 25 nm) hingegen, teilweise bedingt durch ein starkes Agglomerationsverhalten, zeigen nicht die gewünschte selektiv toxische Wirkung in den untersuchten Zellen. So sind unerwünschte, toxische Effekte in normalen Fibroblasten zu sehen, während die toxischen Effekte in den Tumorzellen im Vergleich zu den Referenzpartikeln niedriger ausfallen. Mögliche Gründe für die Unempfindlichkeit der Tumorzellen kann die verringerte Partikelaufnahme aufgrund der Größe sein. Partikel mit einem kleineren Durchmesser (< 10 nm) können frei über die Zellmembran diffundieren, während größere Partikel nur über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden können (Popov et al., 2016). Nicht nur die kleine Größe von CNP, sondern auch eine hohe Redox-Aktivität über die Verfügbarkeit beider Oxidationsstufen von Cer (Ce^{3+} und Ce^{4+}) sowie Sauerstoffvakanz auf der Oberfläche werden möglicherweise für eine toxische Wirkung in Tumorzellen benötigt, denn in den Partikeln mit unerwünschten Wirkungen (≥ 25 nm) liegt das Cer ausschließlich im Oxidationszustand IV (Ce^{4+}) vor.

Die in dieser Arbeit verwendeten CNP sind ein Teil der Studie Sack-Zschauer et al. (2017b) und wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit in Bezug auf Größe, Oberflächenladung sowie Redox-Aktivität in zellfreien Experimenten charakterisiert. Die Untersuchungen zeigen, dass die hier verwendeten Partikel, wie auch die Referenzpartikel, einzeln vorliegen (keine Agglomeration) und einen relativ kleinen Durchmesser von $4.7 (\pm 3.6)$ nm haben (Abb. 3.2) sowie den charakteristischen *shift* im Transmissionsspektrum nach Oxidation mit H_2O_2 zeigen (Abb. 3.3), was auf ein ausgewogenes Verhältnis von Ce^{3+} und Ce^{4+} hinweist, das zusammen mit den zufällig entstehenden Sauerstoffvakanz auf der Oberfläche die Redox-Aktivität der Partikel begünstigt. In Bezug auf die Redox-Aktivität kann zusätzlich gezeigt werden, dass die verwendeten CNP über eine, in vielen Studien beschriebene, SOD-mimetische Aktivität verfügen (Abb. 3.6 & 3.7). Über die hier durchgeführten Untersuchungen und die im Rahmen der Studie Sack-Zschauer et al. (2017b) gewonnenen Erkenntnisse kann festgestellt werden, dass die hier verwendeten CNP, nach den Referenzpartikeln, am besten geeignet sind, um als molekulares Werkzeug für weitergehende Untersuchungen und Aufklärung der zellulären Wirkmechanismen eingesetzt werden zu können.

4.2 Selektiv cytotoxische und proliferationshemmende Wirkung von CNP auf Tumorzellen

Die weiteren Untersuchungen erfolgten in einer humanen *in vitro* Tumor-Stroma-Zellkultur. Humane Melanomzellen der Zelllinie A375 wurden als Modell für Tumorzellen und primäre Melanozyten (NHEM) sowie Fibroblasten (NHDF) als Modell für normale, nicht-entartete Zellen eingesetzt. Zunächst wurde der Einfluss der hier verwendeten CNP auf die Zellviabilität getestet. Die Behandlung mit CNP führt zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität in den Melanomzellen (A375), wobei bei gleichen Konzentrationen von CNP (150 μ M, 300 μ M und 450 μ M) keine toxischen Effekte in primären, stromalen Hautzellen (NHEM und NHDF) nachgewiesen werden können (Abb. 3.9 & 3.10). Ein therapeutischer Ansatz mit CNP bietet nur dann einen Vorteil gegenüber konventionellen Chemotherapeutika, wenn ein selektiver Toxizitätsunterschied zwischen Tumor- und stromalen Zellen besteht. In Tumorzellen des malignen Melanoms (A375) und normalen Hautzellen (NHEM und NHDF), kann diese spezifische Toxizität durch CNP bei gleichen Konzentrationen beobachtet werden, sodass CNP toxisch in Melanomzellen wirken, während die Zellviabilität von gesunden, stromalen Zellen nicht beeinflusst wird. Selbst nach langzeitiger Exposition (> 19 Wochen) der stromalen Zellen (NHDF) mit CNP sind keine adversen Effekte zu sehen (Abb. 3.34). Die Verträglichkeit neuer Medikamente von normalen, gesunden Zellen ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung, denn die Behandlung mit herkömmlichen Chemotherapeutika verursacht oft unerwünschte Nebenwirkungen, wodurch die Dauer und Dosis der Therapie eingeschränkt wird. Eine schädigende Wirkung von CNP kann in normalen, gesunden Fibroblasten und Melanozyten sowohl nach Kurzzeitbehandlung (24-96 h) als auch nach Langzeitbehandlung (> 19 Wochen) nicht nachgewiesen werden. CNP bieten somit eine selektive, spezifische Wirkung auf Tumorzellen. Innerhalb der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Brenneisen konnte darüber hinaus noch gezeigt werden, dass neben Fibroblasten weitere normale Zellen, wie Endothelzellen (Sack-Zschauer et al., 2017a; Alili et al., 2013) durch die Behandlung mit CNP nicht in ihrer Zellviabilität beeinflusst werden, während in diversen Tumorzelllinien wie Tumorzellen des Glioms (MOG-G-CCM) (Sack-Zschauer et al., 2017a) toxische Effekte nachgewiesen werden können. Des Weiteren können toxische Effekte von CNP in Plattenepithelkarzinomzellen (Alili et al., 2011) gezeigt werden und im Gegensatz dazu kann keine Cytotoxizität in humanen

Keratinocyten (HaCaT) (Singh et al., 2016) beobachtet werden. Eine zellspezifische Wirkung von CNP kann auch im Rahmen von anderen Untersuchungen weiterer Forschungsgruppen nachgewiesen werden. So zeigen Tarnuzzer et al. (2005) und Colon et al. (2009) eine radioprotektive Wirkung von CNP in humanen Brustepithelzellen, während keine Radioprotektivität in Brustkrebszellen (MCF-7) beobachtet wird (Colon et al., 2009; Tarnuzzer et al., 2005). Die Bestrahlung gehört bei der Behandlung von vielen Tumorarten zur Standardtherapie (Schmitt, 1999). Herkömmliche Chemotherapeutika können normale Zellen in der Regel nicht vor einer Bestrahlung schützen und sind auch meist nur für bestimmte Tumorarten einsetzbar, wodurch diese in der Anwendung sehr beschränkt sind (Taylor und Kirby, 2015; Schmitt, 1999). Eine zellspezifische und breite Wirkung von CNP würde einen bedeutenden Vorteil gegenüber der alleinigen Chemo- und Strahlentherapie mit sich bringen, da diese mit starken Nebenwirkungen verbunden sind, die durch Schädigung normaler, gesunder Zellen zustande kommen (Hubenak et al., 2014).

Ein weiterer Punkt, der bei der Entwicklung von neuen Therapieansätzen zu beachten ist, ist der Einfluss auf die Zellproliferation, um auszuschließen zu können, dass durch die Behandlung die Proliferation von Tumorzellen und damit das Tumorwachstum gefördert wird. Eine Erhöhung der Proliferation von Tumorzellen begünstigt die Tumorprogression und wäre in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung nicht wünschenswert. Eine Erniedrigung der Proliferation von normalen Zellen hingegen wäre ebenfalls nicht erstrebenswert und würde wegen der Schädigung von normalen Zellen gegen den therapeutischen Einsatz von CNP sprechen. Die Untersuchungen zur Zellproliferation zeigen, dass CNP zeitabhängig die Proliferation der Tumorzellen verringern. Die Hemmung der Zellproliferation nach einer CNP-Behandlung zeigt, dass keine Neusynthese von DNA unter der Behandlung mit CNP stattfindet, sodass sich die Zellen nicht mehr vermehren können. Im Gegensatz zu den Tumorzellen zeigen die Untersuchungen in stromalen Zellen (NHEM und NHDF) bei gleicher Konzentration keine CNP-bedingte Änderung der Proliferation. Vielmehr weisen die Ergebnisse sogar eine tendenziell proliferationsfördernde Wirkung durch die Partikel auf (Abb. 3.11). Eine CNP-bedingte Stimulation der Zellproliferation von normalen Zellen konnte ebenfalls in Studien anderer Forschungsgruppen gezeigt werden (Davidson et al., 2016; Popov et al., 2016). Diese Erkenntnisse stimmen damit mit den Ergebnissen zur Toxizität von CNP überein, wo nach einer Behandlung mit CNP in Tumorzellen eine zeitabhängige Abnahme in der Zellviabilität festgestellt wird, während in normalen Hautzellen

tendenziell eine Zunahme beobachtet wird. Weitere Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen eine CNP-abhängige Zunahme von ROS in Tumorzellen und normalen Zellen, wobei der Anstieg in Tumorzellen viel stärker als in normalen Zellen ist (Abb. 3.18). ROS in hohen Mengen können die DNA-Synthese stoppen und zum Zellzyklusarrest sowie zur Induktion von Apoptose führen (Circu und Aw, 2010). In geringen Mengen wirken ROS als *second messenger* und können die Zellproliferation stimulieren. Dieser konzentrationsabhängige Effekt von ROS unterliegt dem sogenannten Hormesis-Prinzip (Ludovico und Burhans, 2014). Es ist anzunehmen, dass die von CNP generierten ROS die Proliferation in Tumorzellen hemmen und über die Induktion von Apoptose cytotoxisch wirken, während in normalen Zellen die leichte ROS-Erhöhung durch CNP zu einem proliferationsstimulierenden Effekt führt. In einer Studie mit Silber-Nanopartikeln (AgNP) konnte gezeigt werden, dass in Brutskrebszellen (MDA-MB-231) durch eine Partikel-bedingte Erhöhung von ROS das Zellwachstum gehemmt und infolgedessen die Apoptose induziert werden kann (Abdal Dayem et al., 2017; Gurunathan et al., 2013), wohingegen in einer anderen Studie die Behandlung von murinen Fibroblasten mit Citrat-stabilisierten CNP mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 3-4 nm in einer Stimulation der Zellproliferation resultiert. CNP werden daher auch im Vergleich zu klassischen Wachstumsfaktoren als kostengünstige Alternative für Zellkulturmedien von schwer zu kultivierbaren primären Zellen betrachtet (Popov et al., 2016).

Eine CNP-vermittelte Induktion von Apoptose wurde in früheren Studien mit Dextran-gekoppelten Partikeln gezeigt (Alili et al., 2013). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Apoptose bestätigten den pro-apoptotischen Effekt von CNP in Melanomzellen, welche mit Acrylat stabilisiert waren (Abb. 3.13). Außerdem wird gezeigt, dass der pro-apoptotische Effekt von CNP nach 72 h stärker ist als nach 24 h, was die Ergebnisse zur Cytotoxizität und Proliferation, bei welchen auch ein stärkerer Effekt nach 72 h festgestellt wird als nach 24 h, unterstützt. Darüber hinaus wird beobachtet, dass CNP sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg der Apoptose induzieren. Ähnliche Effekte werden mit Doxorubicin, einem klassischen Cytostatikum, das als Referenzsubstanz verwendet wird, beobachtet (Abb. 3.14). Die CNP-vermittelte und ROS-bedingte Induktion des intrinsischen Weges der Apoptose durch CNP wurde in früheren Studien, beispielsweise über die Freisetzung von Cytochrom C, nachgewiesen (Mittal und Pandey, 2014; Alili et al., 2013; Celardo et al., 2011). Über die CNP-induzierte extrinsische Apoptose ist wenig bekannt. Allerdings ist

bekannt, dass oxidativer Stress beide Wege der Apoptose induzieren kann. Es ist beschrieben, dass Doxorubicin u.a. durch die Bildung von ROS, welche die sogenannten zellmembranständigen Todesrezeptoren aktivieren, den extrinsischen Apoptoseweg einleiten kann (Sinha et al., 2013; Octavia et al., 2012; Circu und Aw, 2010). So könnte die ROS-Bildung durch CNP auch den extrinsischen Weg ausgelöst haben. Es ist auch nicht auszuschließen, dass ein *cross talk* zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Weg stattfindet. Allerdings stellt die verwendete Methode zur Überprüfung von CNP-induzierter Apoptose eine semi-quantitative Analyse dar und ist somit nicht aussagekräftig genug, um konkrete Aussagen zu treffen. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. die Aktivitätsmessung von an extrinsischer Apoptose beteiligten Caspasen, um die Beteiligung des extrinsischen Weges der Apoptose durch CNP bestätigen zu können. Somit zeigen CNP und Doxorubicin in diesem Kontext ähnliche Wirkungen und üben einen pro-apoptotischen Effekt auf die A375 Melanomzellen aus. Wenn aber die Nebenwirkungen der klassisch verwendeten chemotherapeutischen Agenzien wie Doxorubicin auf normale Zellen bedacht werden (Tokarska-Schlattner et al., 2006; Minotti et al., 2004a; Keizer et al., 1990), wird offensichtlich, dass CNP, welche keine adversen Effekte in normalen Zellen haben, im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung im Vorteil sind.

Aufgrund ihrer selektiv cytotoxischen und proliferationshemmenden Wirkung scheinen die hier verwendeten CNP gut geeignet für eine therapeutische Anwendung in der Krebstherapie zu sein. Jedoch werfen die Erkenntnisse die Frage auf, wodurch die Selektivität von CNP genau begründet ist und durch welche zugrundeliegenden Mechanismen die selektive Wirkung in Tumorzellen vermittelt werden, während bei gleichen Konzentrationen von CNP normale Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Die CNP-vermittelte Bildung von ROS scheint hierbei eine große Rolle zu spielen.

4.3 Identische Menge an CNP in Tumorzellen und normalen Hautzellen

Eine wichtige Fragestellung, die bisher nicht aufgeklärt wurde, ist, ob die Menge der aufgenommenen Partikel ihre Selektivität erklärt. Es gibt Untersuchungen sowohl durch unsere Arbeitsgruppe als auch von anderen, welche die Aufnahme von CNP nach relativ kurzen Inkubationszeiten (3-4 h) in Zellen nachweisen (Sack et al., 2014; Alili et al.,

2011; Singh et al., 2010). Die intrazelluläre Verteilung von CNP wird sowohl in Tumorzellen, wie Melanom- und Plattenepithelkarzinomzellen, als auch in stromalen Fibroblasten über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von FITC-markierten CNP sowie elektronenmikroskopische Darstellung gezeigt (Sack et al., 2014; Alili et al., 2011). Eine zelltypspezifische Quantifizierung der aufgenommenen Menge an CNP wurde bislang jedoch nicht untersucht. Es wäre vorstellbar, dass Tumorzellen infolge von veränderten Eigenschaften der Zelloberfläche (Chen et al., 2016; Abercrombie und Ambrose, 1962) mehr CNP aufnehmen und infolgedessen mehr ROS gebildet werden als in normalen Zellen, wodurch die selektive Wirkung von CNP auf Tumorzellen erklärt werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurden Untersuchungen mit Melanomzellen (A375) durchgeführt, welche mit Melanozyten (NHEM) verglichen wurden. Die zellulären Ce-Mengen wurden nach 24- und 72-stündiger CNP-Behandlung mittels ICP-MS im Forschungszentrum Jülich bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass CNP bezogen auf die Menge nicht unterschiedlich von Melanomzellen und Melanozyten aufgenommen wurden (Abb. 3.12). Es existieren keine zelltypspezifischen Unterschiede in der Menge der CNP-Aufnahme. Bei ungefähr gleichen zellulären Konzentrationen wirken CNP cytotoxisch in Melanomzellen, während normale Zellen weitgehend unbeeinträchtigt bleiben. Auch sind in den jeweiligen Zelltypen keine signifikanten Unterschiede zwischen der CNP-Behandlung nach 24 h und 72 h zu sehen, sodass die zeitabhängigen Effekte in Tumorzellen nicht mit der zellulären CNP-Menge korrelieren. Somit ist der selektiv cytotoxische Effekt von CNP in Tumorzellen nicht auf ihre zelluläre Konzentration zurückzuführen, sondern auf die intrazelluläre Wirkung. Eine extrazelluläre Rezeptor-vermittelte Wirkung kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, da über die verwendete Methode sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre, an die Zellmembran gebundene CNP detektiert werden und es Beispiele anderer Nanopartikel gibt, die ihre Wirkung nur über Rezeptor-vermittelte Effekte ausüben (Unfried et al., 2007). Die präsentierten Daten werden durch *in vivo* Daten zur Bioverteilung von CNP unterstützt. Es kann gezeigt werden, dass CNP, welche Mäusen intraperitoneal injiziert wurden, in der Haut der Mäuse (12-20 ng/g Hautgewebe) und in weiteren Geweben nachgewiesen werden (Hirst et al., 2013; Alili et al., 2011).

4.4 Kein Einfluss von CNP auf die Proteinexpression in Tumorzellen

Mit Hilfe von Analysen des Proteoms können möglichst viele Proteine in einer Probe detektiert und analysiert werden. Auf diese Art und Weise können Schlüsselproteine oder sogenannte Biomarker identifiziert werden, um Erkenntnisse über die Wirkmechanismen einer Substanz zu gewinnen. Somit ermöglicht der Vergleich von Proteinmustern aus unbehandelten und behandelten Zellen die Aufklärung der intrazellulären Funktion (Graves und Haystead, 2002). Über die genauen Wirkmechanismen von CNP gibt es bislang keine eindeutigen Erkenntnisse. Mit einem Screening-Verfahren können CNP-bedingte Änderungen in der Expression von Proteinen in Zellen erfasst und über funktionelle Kategorisierung der Änderungen mögliche Wirkmechanismen entdeckt werden. Um den Einfluss von CNP auf die Proteinexpression zu bestimmen, wurde nach einer 24-stündigen CNP-Inkubation ein quantitativer, MS-basierter *Proteomics*-Ansatz durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das klassische Cytostatikum Doxorubicin verwendet. Klassische Chemotherapeutika entfalten ihre cytostatische Wirkung meist über genotoxische Wirkungen und zeigen auf Expressionsebene viele Änderungen (Annovazzi et al., 2017; Lin et al., 2013). Die Untersuchungen ergeben, dass CNP interessanterweise keine Änderung im Proteinmuster von Melanomzellen bewirken (Abb. 3.16), während Doxorubicin, wie erwartet, zu einer deutlichen Veränderung führt (Abb. 3.15). Nach der Behandlung mit Doxorubicin werden viele Proteine wie z.B. die Proteine FDXR, DDB2 sowie SQSTM1/p62 verändert exprimiert (Moruno-Manchon et al., 2016; De Luca et al., 2011; Hammer et al., 2010; Kobayashi et al., 2010). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Behandlung mit CNP zu späteren Zeitpunkten eine Veränderung in der Expression von Proteinen zeigt. Nach 24 h werden keine stark cytotoxischen, proliferationshemmenden und infolgedessen pro-apoptischen Effekte gesehen. Nach späteren Zeitpunkten (> 48 h) werden die zuvor genannten Effekte in den Melanomzellen stärker, weshalb möglicherweise auch auf Expressionsebene Veränderungen auftreten können. Jedoch wären diese Änderungen wahrscheinlich die Folgen der CNP-induzierten Cytotoxizität und würden somit keine direkten Erkenntnisse über die primäre, molekulare Wirkung von CNP verschaffen. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen zur Apoptose verstärkt (Abb. 3.13), bei welchen die Expression von pro-apoptischen Proteinen nach 72 h CNP-Behandlung stärker induziert wird als nach 24 h, was zum einen das Ergebnis der MS-Analyse und zum

anderen die Vermutung eines späteren Effektes von CNP auf die Proteinexpression bestätigen würde. So gibt es Beispiele von CNP, welche bereits nach 24 h stark cytotoxische Effekte aufweisen und demzufolge auch nach 24 h die Expression von u.a. Apoptose-assoziierten Proteinen steigern (Mittal und Pandey, 2014).

Das Ergebnis der MS-Analyse kann auch als ein indirekter Nachweis dafür betrachtet werden, dass CNP im Gegensatz zu Doxorubicin keine genotoxischen Effekte in Zellen verursachen, wie es bereits Sack et al. (2014) gezeigt haben. So wird beispielsweise nach der Behandlung mit Doxorubicin die Expression von *DNA damage binding protein 2* (DDB2) zur Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen gesteigert (Stoyanova et al., 2009), was die genotoxische Wirkung von Doxorubicin bestätigt. Durch CNP werden keine Gene in Zusammenhang mit DNA-Schäden exprimiert, was zeigt, dass durch CNP keine Reparaturmechanismen aktiviert werden. Passend dazu haben Sack et al. (2014) gezeigt, dass sich die intrazelluläre Verteilung von CNP auf das Cytosol beschränkt und CNP nicht im Zellkern der untersuchten Melanomzellen nachgewiesen werden konnte. Oft geht eine systemische Chemotherapie mit konventionellen, genotoxischen Agenzien mit dem Risiko einer sekundären Neoplasie einher (Dong und Chen, 2014; Boffetta und Kaldor, 1994). CNP wirken nicht genotoxisch aber dennoch antitumoral und zeigen somit einen weiteren Vorteil gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und ideale Voraussetzungen in Hinsicht auf die Prävention sekundärer Neoplasien.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass CNP keinen Einfluss auf die Proteinexpression haben, sodass der Wirkmechanismus von CNP in erster Linie nicht auf Expressionsebene liegt. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die hauptsächlichste Wirkung von CNP auf posttranslationaler Ebene stattfindet und die Redox-Aktivität der Partikel eine bedeutende Rolle spielt. Somit ist es umso wahrscheinlicher, dass der beschriebene Redox-Code von Jones & Sies (2015), der mit dem Cystein (Cys)-Proteom assoziiert ist, durch CNP moduliert wird.

4.5 Effekte von CNP sind ROS-abhängig

CNP sind redox-aktive Nanopartikel, die in Tumorzellen Apoptose induzieren (Alili et al., 2013). Im Rahmen dieser Studie kann gezeigt werden, dass CNP in den hier untersuchten Tumorzellen cytotoxisch wirken, während bei gleichen Konzentrationen keine Toxizität in den normalen Zellen der Haut beobachtet wird. Diese Selektivität in

der Wirkung von CNP ist nicht durch die aufgenommene Menge bedingt. Zudem zeigen die Untersuchungen zur Proteinexpressionsanalyse keine CNP-bedingten Änderungen und liefern somit keine Hinweise zur Identifizierung möglicher Wirkmechanismen in Zellen. Die Gesamtheit der Daten deutet auf eine mögliche posttranslationale Wirkung der Partikel hin. Die Erkenntnisse früherer Studien über die redox-aktiven Eigenschaften der Partikel unterstützen die Hypothese, dass CNP ROS-abhängige Effekte vermitteln. Jedoch gibt es in der Literatur wie bei den Untersuchungen zur Zellviabilität je nach untersuchtem Zelltyp unterschiedliche Effekte, die sowohl antioxidativ als auch prooxidativ ausfallen können. Aufgrund der kontroversen Datenlage können keine genauen Aussagen über die redox-basierten zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen von CNP getroffen werden. Beispielsweise werden antioxidative Effekte von CNP gegenüber dem Redox-Cycler Paraquat in dermalen Fibroblasten (von Montfort et al., 2015) nachgewiesen, wobei in humanen Lungenepithelzellen (BEAS-2B) und diversen Tumorzelllinien wiederum prooxidative Effekte und somit die Induktion von oxidativem Stress gezeigt wird (Mittal und Pandey, 2014; Lin et al., 2006).

Um die Redox-Aktivität der hier verwendeten CNP in den hier untersuchten Zellen aufzuklären und um festzustellen, ob die beobachtete selektive Wirkung von CNP auf redox-aktive Eigenschaften der Partikel zurückzuführen ist und durch ROS-abhängige posttranslationale Effekte vermittelt wird, wurde zunächst der Einfluss von CNP auf die intrazelluläre ROS-Bildung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass CNP in allen untersuchten Zellen redox-aktive Effekte ausüben und prooxidativ wirken (Abb. 3.18). Demzufolge ist der intrazelluläre ROS-Gehalt in allen Zellen durch die Behandlung mit CNP erhöht, wobei der ROS-Gehalt in den Melanomzellen sowohl basal als auch CNP-bedingt viel höher ist als in den normalen Hautzellen. In Studien mit vergleichbar großen CNP können ebenfalls prooxidative Effekte in Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) (Alili et al., 2011) kolorektalen Adenokarzinomzellen (HT-29) (Pesic et al., 2015) und humanen sowie murinen Fibroblasten (Culcasi et al., 2012) nachgewiesen werden. In redox-basierten Therapieansätzen wird der im Vergleich zu normalen Zellen veränderte Redox-Status von Tumorzellen als therapeutisches Ziel genutzt (Wondrak, 2009; Schumacker, 2006; Pelicano et al., 2004). Es ist beschrieben, dass Tumorzellen eine basal erhöhte ROS-Konzentration aufweisen und viel sensitiver auf weitere Erhöhungen des ROS-Gehalts reagieren als normale Zellen, welche im Gegensatz zu Tumorzellen durch eine mögliche Anpassung ihres endogenen antioxidativen Schutzsystems einer ROS-Erhöhung und daraus resultierender Schädigung entgegenwirken können, während

Tumorzellen möglicherweise die volle Kapazität ihres antioxidativen Schutzsystems bereits ausgeschöpft haben und sich an der Grenze der maximalen antioxidativen Reparaturkapazität befinden (Panieri und Santoro, 2016; Sullivan und Chandel, 2014). Es ist bekannt, dass beispielsweise Melanomzellen infolge des erhöhten ROS-Gehalts eine hohe Expression und Aktivität von antioxidativen Enzymen aufweisen sowie hohe Mengen an Glutathion zur Detoxifizierung von ROS haben, sodass eine weitere Steigerung des antioxidativen Schutzsystems nicht möglich ist (Liu-Smith et al., 2014; Meyskens et al., 2001). Im Vergleich dazu gibt es auch Studien, welche zeigen, dass Mutationen in Enzymen des antioxidativen Systems zu einer gesteigerten ROS-Bildung in Melanomzellen führen und weitere Erhöhungen nicht kompensiert werden können (Liu-Smith et al., 2014; Wittgen und van Kempen, 2007). Deshalb wird durch die Behandlung mit prooxidativen Substanzen wie CNP der kritische Schwellenwert an ROS bereits bei niedrigeren Konzentrationen überschritten (Abb. 4.1) (Hambright und Ghosh, 2017).

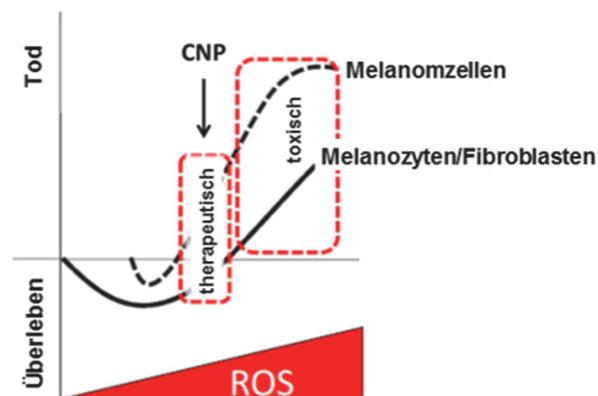


Abb. 4.1: Einfluss des intrazellulären ROS-Gehalts auf das zelluläre Schicksal In physiologischen Konzentrationen wirken reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nicht schädigend, sondern stimulieren als *second messenger* zelluläre Prozesse, wie Proliferation. Mit zunehmender ROS-Menge, als Resultat endogener oder exogener Stimuli, wird das antioxidative System angepasst um die Erhöhung zu kompensieren. In Tumorzellen, welche einen erhöhten pathophysiologischen Grundlevel an ROS besitzen, befindet sich das antioxidative System an der oberen Grenze der Kapazität, sodass durch eine weitere Erhöhung der Schwellenwert überschritten wird und die Zellen in Apoptose münden. Eine weitere stärkere Erhöhung würde den therapeutischen Rahmen verlassen und auch zu toxischen Effekten in normalen (gesunden, stromalen) Zellen führen (verändert nach Hambright und Ghosh, 2017).

In Tumorzellen fördern hohe ROS-Mengen deren genomische Instabilität und Proliferation, die in zu hohen Konzentrationen jedoch unbeabsichtigt schädigend wirken und zur Einleitung der Apoptose führen können (Pelicano et al., 2004). Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnte die selektiv cytotoxische Wirkung von CNP auf unterschiedlichen basalen ROS-Mengen beruhen. Diese Hypothese bestätigend, konnten

in dem hier untersuchten Tumor-Stroma-Modell basal unterschiedliche ROS-Mengen nachgewiesen werden. So kann gezeigt werden, dass die A375 Melanomzellen im Vergleich zu normalen Hautzellen (Melanozyten und Fibroblasten) einen erhöhten Grundgehalt an ROS besitzen, der vermutlich durch die Behandlung mit CNP weiter erhöht wird und letztendlich zur Zellschädigung führt. Dabei können die Tumorzellen die hervorgerufene Schädigung durch CNP möglicherweise nicht kompensieren, sodass die Behandlung schließlich zur Induktion der Apoptose führt. Die CNP-bedingte Erhöhung des ROS-Gehalts in normalen Hautzellen hingegen führt nicht zu einer verminderten Zellviabilität, sondern vermutlich zur Stimulation des endogenen antioxidativen Schutzsystems. Daher könnte die durch CNP tendenziell gesteigerte Zellviabilität auf die Anpassung des antioxidativen Systems zurückgeführt werden. So wurde im Rahmen anderer Projekte der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen beispielsweise eine gesteigerte Expression von der Glutathion-Peroxidase (GPx) auf mRNA-Level sowie eine vermehrte Aktivität in humanen dermalen Fibroblasten nach der Behandlung mit CNP nachgewiesen (unveröffentlichte Daten der Masterarbeiten von Miriam Knühmann und Matthias Przyklenk). Die GPx ist ein wichtiges Enzym des antioxidativen Schutzsystems, welches die Entgiftung von H_2O_2 , das infolge der SOD-Disproportionierung aus Superoxid entsteht, zu Wasser katalysiert (Wakamatsu et al., 2008; Sies, 1993). Auch andere Studien weiterer Forschungsgruppen zeigen eine CNP-bedingte Steigerung der Expression von wichtigen antioxidativen Enzymen in normalen Zellen (Popov et al., 2016). Die in vielen Studien beschriebene antioxidative Wirkung von CNP konnte in den hier untersuchten stromalen Zellen nicht direkt beobachtet werden. Da aber antioxidative Enzyme durch die Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts hochreguliert werden können, kann von einer indirekten antioxidativen Wirkung von CNP in normalen Zellen und somit auch von einer protektiven Wirkung gesprochen werden. Protektive Wirkungen von CNP auf normale Zellen konnten gezeigt werden. So wurden dermale Fibroblasten durch die Vorbehandlung mit CNP gegenüber exogenen Noxen wie Paraquat (von Montfort et al., 2015) und Doxorubicin (Sack et al., 2014) geschützt. Paraquat und Doxorubicin sind Redox-Cycler, welche über ihre Chinon-Struktur die Bildung von Superoxidanionradikalen katalysieren (Minotti et al., 2004a; Bus und Gibson, 1984). Die CNP-bedingte Stimulation des antioxidativen Systems schützt die Zellen vermutlich vor einer möglichen oxidativen Schädigung. Es wird deutlich, dass die CNP-bedingte, geringe Erhöhung des ROS-Gehalts in normalen Zellen diese nicht abtötet, sondern im Gegenteil zu einem protektiven, antioxidativen Effekt führt.

Auffällig ist auch der stärkere ROS-Anstieg in den Melanomzellen im Verhältnis zu den normalen Hautzellen bei gleicher CNP-Behandlung. Dies ist vermutlich auf die in mehreren Untersuchungen beschriebene katalytische Aktivität von CNP zurückzuführen. Die in zellfreien Systemen aufgezeigte SOD-mimetische Aktivität von CNP (Abb. 3.6 & 3.7) läuft ähnlich der zellulären SOD in zwei Teilreaktionen ab und katalysiert zum einen die Detoxifizierung von O_2^- zu molekularem Sauerstoff und zum anderen die Disproportionierung von O_2^- zu H_2O_2 (Abb. 1.8) (Das et al., 2013; Alili et al., 2013; Alili et al., 2011; Korsvik et al., 2007). Alili et al. (2011) haben die SOD-mimetische Aktivität der Partikel bei verschiedenen pH-Werten gemessen und eine pH-Abhängigkeit festgestellt. Demzufolge ist die zweite Teilreaktion der SOD-Aktivität bei saurem pH-Wert effektiver als bei neutralem pH-Wert. Es wird postuliert, dass Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen einen leicht erniedrigten pH-Wert besitzen (Hou et al., 2017; Bohme und Bosserhoff, 2016; Griffiths, 1991). In der Literatur ist beschrieben, dass die Azidifizierung und der daraus resultierende erniedrigte pH-Wert in Tumorzellen möglicherweise zum einen durch die erhöhte Produktion von Laktat aufgrund des Warburg-Effekts und zum anderen durch die erhöhte Hydrolyserate von ATP wegen des hohen Energiebedarfs in Tumorzellen entsteht (Tannock und Rotin, 1989). Untersuchungen zeigen einen erhöhten Laktatgehalt in Melanomzellen im Vergleich zu humanen Hautfibroblasten, was auf einen erniedrigten pH-Wert in diesen Zellen hindeuten kann (Alili et al., 2013). Asati et al. (2010) zeigen auch, dass die Akkumulation von CNP in Lysosomen zu toxischen Effekten führt. So könnte eine verstärkte Akkumulation von CNP in Lysosomen von Tumorzellen zu einer erhöhten SOD-Aktivität und infolgedessen zu einer erhöhten H_2O_2 -Konzentration führen, welche in cytotoxischen Effekten resultiert. Zudem ist bekannt, dass Tumorzellen eine erhöhte lysosomale Aktivität aufweisen (Dielschneider et al., 2017; Allison, 1974), was diese Überlegung unterstützt. Eine mögliche intrazelluläre Lokalisation der hier verwendeten Partikel in Lysosomen bietet einen weiteren, interessanten Ansatz für nachfolgende Untersuchungen. Demzufolge könnten die unterschiedlichen Effekte von CNP in Tumorzellen und normalen Zellen durch eine pH-Abhängigkeit der redox-aktiven Wirkung von CNP erklärt werden. Wegen des erniedrigten pH-Wertes in Tumorzellen ist es vorstellbar, dass diese eine höhere SOD-Aktivität besitzen als normale Zellen. Dabei läuft die zweite Teilreaktion der SOD-Aktivität von CNP unter sauren Bedingungen besser ab, da für diese Teilreaktion Protonen (H^+) benötigt werden. Zusätzlich weisen Tumorzellen einen basal erhöhten ROS-Gehalt wie beispielsweise

Superoxidationradikale auf, die vermehrt wegen defekter Mitochondrien und dysregulierter Enzymaktivität gebildet werden (Sullivan und Chandel, 2014; Manda et al., 2009; Pelicano et al., 2004). Demnach sollte die zweite Teilreaktion verstärkt in Tumorzellen ablaufen, sodass im Vergleich zu den normalen Zellen mehr H_2O_2 entsteht. Die Messung der extrazellulären H_2O_2 -Menge im Rahmen eines anderen Projektes zeigte ebenfalls eine Zunahme an H_2O_2 durch die Behandlung mit CNP in Tumorzellen (Alili et al., 2013), was die Entstehung von H_2O_2 bestätigt. In stromalen Zellen hingegen würde überwiegend die erste Teilreaktion zur Detoxifikation von O_2^- ablaufen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnte die prooxidative und cytotoxische Wirkung von CNP in Tumorzellen auf die SOD-mimetische Aktivität und die dadurch bedingte Akkumulation von H_2O_2 zurückgeführt werden. Die leicht prooxidative Wirkung in stromalen Zellen könnte aus der fast nur auf die erste Teilreaktion beschränkten SOD-Aktivität resultieren, sodass weniger H_2O_2 entsteht. Andererseits könnte der erniedrigte ROS-Basallevel in normalen Zellen keine erhöhte SOD-mimetische Aktivität der Partikel zulassen.

Wie zuvor beschrieben, reagieren Tumorzellen und normale Zellen unterschiedlich sensitiv auf eine CNP-vermittelte Erhöhung des ROS-Gehalts. Als ein weiterer Nachweis für die unterschiedlich ausgeprägte Reaktion der Zellen auf ROS wurde der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 auf die Zellviabilität von Tumorzellen und stromalen Zellen untersucht (Abb. 3.32). Nach einer 24-stündigen H_2O_2 -Inkubation sind Tumorzellen bereits bei niedrigeren Konzentrationen abgestorben, während stromale Zellen höhere Konzentrationen tolerieren. Damit kann die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber H_2O_2 und somit auch gegenüber CNP noch einmal verdeutlicht werden, da es sich bei den über CNP-gebildeten ROS primär um H_2O_2 handelt. Im Vergleich dazu kann in einer weiteren Studie mit Pankreaskrebszellen gezeigt werden, dass CNP über die Bildung von H_2O_2 den bereits erhöhten ROS-Gehalt von diesen Zellen weiter erhöhen und so die Sensitivität gegenüber Strahlentherapie steigern, während gesunde Zellen durch CNP nicht sensitiviert werden und die Bestrahlung überleben (Wason et al., 2013).

Ein weiterer Hinweis für die CNP-vermittelte Bildung von H_2O_2 zeigt die Untersuchung zur Lipidperoxidation in Melanomzellen (Abb. 3.19). Bei einer Lipidperoxidation kommt es zu einer Kettenreaktion, welche meist über Hydroxylradikale initiiert wird. In den Untersuchungen kann durch CNP keine Zunahme an Malondialdehyd (MDA) gemessen werden. MDA ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation und wird als Marker für Lipidperoxidation untersucht. Die als Positivkontrolle mitgeführte H_2O_2 -Kontrolle zeigt

ebenfalls keine Erhöhung von MDA, womit bestätigt wird, dass durch H_2O_2 und somit auch durch CNP keine Lipidperoxidation ausgelöst wird. Auch in Studien anderer Forschungsgruppen kann keine CNP-bedingte Lipidperoxidation nachgewiesen werden (Horie et al., 2011). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CNP nicht zur Bildung von Hydroxylradikalen führt und so keine Lipidperoxidation auslöst. Somit kann auch die in manchen Studien beschriebene Fenton-ähnliche Reaktion durch CNP (Xu und Qu, 2014; Heckert et al., 2008b) nicht bestätigt werden, denn durch eine CNP-vermittelte Fenton-Reaktion würde H_2O_2 durch Ce^{3+} , ähnlich wie bei der eigentlichen Fenton-Reaktion durch freie Fe^{2+} -Ionen, reduziert werden, was in der Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen resultieren würde, welche wiederum die Bildung von MDA verursacht hätten. Die Redoxpotenziale von $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ (1.7 V) und $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}\cdot$ (0.73 V) zeigen auch, dass dieser Redoxvorgang nicht möglich ist, weil H_2O_2 nur bei Redoxpotentialen kleiner 0.7 V reduziert werden kann und das Redoxpotential von $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ zu positiv ist (Nosaka und Nosaka, 2016; Bilal und Müller, 1992).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die selektiv cytotoxische Wirkung von CNP über einen ROS-Anstieg verursacht wird, welcher in Tumorzellen zu einem stark prooxidativ wirkenden Redox-Status führt, während normale, stromale Zellen bei gleichen Konzentrationen von CNP weitgehend unbeeinflusst bleiben. Bei den durch CNP vermittelten ROS handelt es sich höchstwahrscheinlich um H_2O_2 . Da H_2O_2 eine wichtige Rolle in der Regulation des sogenannten *redox signaling* spielt, stellt sich im Weiteren die Frage, welche Konsequenzen dessen Anstieg für zelluläre Prozesse hat.

4.6 CNP-bedingte posttranslationale Modifikationen von Proteinen in Tumorzellen

Durch die Änderung des zellulären ROS-Gehalts ist auch anzunehmen, dass redox-sensitive Proteine und dadurch redox-sensitive Signaltransduktionswege durch CNP beeinflusst werden. Als Marker für oxidative Modifikationen in Zellen wurde die sehr spezifische Thioloxydation von Cysteinen in Proteinen untersucht. Die Oxidation von Thiolen ist eine durch H_2O_2 -vermittelte Reaktion mit freien Thiolgruppen, die zur Bildung von Sulfensäuren (-SOH) führt und in der vorliegenden Arbeit mit einem α -Hapten-Antikörper, entwickelt von Kate S. Carroll und ihrer Arbeitsgruppe, untersucht wurde (Seo und Carroll, 2009). Bei den Untersuchungen wird, einhergehend mit der

CNP-bedingten Erhöhung des ROS-Gehalts, in den hier untersuchten Zellen eine Zunahme an oxidierten Thiolen bzw. Sulfensäuren nachgewiesen, wobei eine stärkere Erhöhung in Melanomzellen (Abb. 3.20) als in Fibroblasten und Melanozyten (Abb. 3.21) beobachtet werden kann. Die Effekte von CNP ähneln hierbei den Effekten von H₂O₂ (Positivkontrolle), womit die prooxidative Wirkung der CNP über die Akkumulation von H₂O₂ bestätigt wird. In normalen Hautzellen führt die Behandlung mit CNP zur Anpassung des antioxidativen Schutzsystems, wodurch es nicht bzw. nur leicht zur Bildung von Sulfensäuren kommt. Eine über CNP-vermittelte Bildung von Sulfensäuren in Tumorzellen wurde auch in früheren Studien von der Arbeitsgruppe Prof. Brenneisen gezeigt (Sack et al., 2014; Alili et al., 2013). Die Ergebnisse zusammen unterstützen die prooxidative Wirkung von CNP. Jedoch war bisher unklar, welche Konsequenzen diese prooxidative Wirkung von CNP auf den Redox-Code (Jones und Sies, 2015) bzw. Cys-Proteom und die damit verbundene redox-abhängige Signaltransduktion hat. Daher sollten im Weiteren die Modifikationen des Cys-Proteoms näher untersucht werden, um redox-modulierbare Proteine und funktionelle Konsequenzen ermitteln zu können. Über die Methode des Western Blot-Verfahrens zum Nachweis von Sulfensäuren können erste Hinweise über die prooxidative Wirkung einer Substanz ermittelt werden. Jedoch kann keine Aussage getroffen werden, welche Proteine durch die Behandlung oxidiert werden. Außerdem erlaubt eine Western Blot-Methode nur eine semi-quantitative Analyse. Deshalb wurde im Weiteren eine spezifischere Methode, der BIAM-Switch-Assay, durchgeführt (Löwe et al., 2017). Über diese massenspektrometrische Methode konnten Proteine mit reversiblen Thiolmodifikationen nach der Behandlung mit CNP identifiziert und genau quantifiziert werden (= *Redox Proteomics*). Sulfensäuren sind sehr instabil und können beispielsweise mit weiteren Cysteinen reagieren und Disulfidbrücken bilden sowie auch unter dem Einfluss von Glutathion zurück zu freien Thiolen reduziert werden, sodass der Nachweis von Proteinen mit Sulfensäuren schwierig ist (Gupta und Carroll, 2014; Leonard und Carroll, 2011). Da bekannt ist, dass die Bildung von Sulfensäuren mit einer Glutathionylierung einhergeht (Grek et al., 2013; Gallogly und Mieyal, 2007), wurde ein globaler Ansatz ausgewählt, mit dem alle Proteine mit reversiblen Cysteinmodifikationen detektiert werden. Zu diesen zählen neben Sulfensäuren und Glutathionylierung ebenso die Bildung von Disulfiden, die Nitrosylierung und die Acetylierung von Cysteinen (Murray und Van Eyk, 2012). Die Ergebnisse zeigen, dass nach der Behandlung mit CNP, insbesondere nach 4 h (Abb. 3.23), viele redox-sensitive Proteine oxidiert wurden, zu denen beispielsweise die Glykolyseenzyme GAPDH

(Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und PKM (Pyruvatkinase) zählen. Nach 24 h (Abb. 3.24) wurden weniger oxidierte Proteine nachgewiesen, was vermutlich das Resultat einer irreversiblen Überoxidation zu Sulfin(SO₂H)- und Sulfon(SO₃H)-säuren ist (Griendling et al., 2016; Pan und Carroll, 2014; Murray und Van Eyk, 2012), die von beiden genannten Methoden nicht detektiert werden können. Eine transiente Oxidation kann ausgeschlossen werden, weil CNP nach längeren Inkubationszeiten stark cytotoxisch wirken und damit eine Reparatur der oxidativen Modifikationen nicht stattfindet. CNP können über ihre autokatalytische Eigenschaft eine persistierende Redox-Aktivität in Zellen ausüben, sodass der durch CNP anhaltende oxidative Stress in diesen Zellen vermutlich zur Entstehung von Sulfin- (SO₂H) und Sulfonsäuren (-SO₃H) führt, welche irreversibel sind und zur Schädigung oder Degradation betroffener Proteine führen, die letztendlich die Apoptose einleiten. Eine irreversible Schädigung in Melanomzellen wird auch durch die CNP-vermittelte Carbonylierung von Proteinen gezeigt, welche als ein weiterer Marker für irreversible, oxidative Proteinschädigung in Bezug auf oxidativen Stress herangezogen wird (Alili et al., 2013). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass durch die Behandlung mit CNP nicht nur die einfache Oxidation zu Sulfensäuren vermittelt wird, sondern weitere Modifikationen entstehen, welche reversibel und irreversibel sein können. Diese Modifikationen tragen möglicherweise zur Störung der zellulären Redox-Homöostase bei, welche im Weiteren in einer Schädigung von Proteinen und deren Funktionen oder deren Degradation resultieren können, wobei die Auswirkungen der irreversiblen Modifikationen für die Zelle schwerwiegender sind (Reczek und Chandel, 2015; Birben et al., 2012; Reddie und Carroll, 2008).

Zur Validierung der Daten sowie zur Überprüfung der funktionellen Konsequenz der CNP-vermittelten Cysteinmodifikation von Proteinen wurde im Weiteren ein wichtiges Enzym der Glykolyse, die GAPDH, näher untersucht. Die GAPDH ist ein redox-reguliertes Enzym, das Cysteine, u.a. im aktiven Zentrum (Cys 152), enthält, welche bei der Regulation der Enzymaktivität eine bedeutende Rolle spielen (Nakajima et al., 2017; Hildebrandt et al., 2015). Es ist bekannt, dass die GAPDH ein hochreaktives Zentrum hat, das für die schnelle und effiziente Metabolisierung von Glukose verantwortlich ist. Jedoch reagiert dieses ebenso mit unspezifischen Substraten wie H₂O₂, wodurch Cysteine in der katalytischen Domäne des Enzyms oxidiert werden und es u.a. zur Hemmung der Aktivität des Enzyms kommt (Hildebrandt et al., 2015). Oxidantien können auch zu einer Konformationsänderung der Dehydrogenase und damit zu einem Funktionsverlust führen (Nakajima et al., 2007). Diese Feinsteuerung der GAPDH über den „Thiolschalter“ im

aktiven Zentrum macht dieses zu einem auf Veränderungen im zellulären Redoxstatus reagierenden Sensor (Hildebrandt et al., 2015). Zudem ist beschrieben, dass eine Behandlung mit thiolmodifizierenden Substanzen wie z.B. Iodoacetamid und Iodoacetat die Aktivität der zellulären GAPDH beeinflussen kann (Schmidt und Dringen, 2009). Die Empfindlichkeit des Enzyms GAPDH gegenüber H_2O_2 wurde auch von Carroll & Seo (2009) anhand der Bildung von Sulfensäuren in einem zellfreien System gezeigt und des Weiteren im Rahmen anderer Studien beschrieben (Hildebrandt et al., 2015; Peralta et al., 2015).

Um zu überprüfen, ob die GAPDH nach einer Behandlung mit CNP oxidiert wird, wurde zunächst eine Western Blot-Analyse in einem zellfreien System mit GAPDH aus Kaninchenmuskeln durchgeführt, in welcher die Bildung von Sulfensäuren mittels eines α -Hapten-Antikörpers detektiert wird (Abb. 3.26). Dieser Ansatz liefert keine eindeutigen Ergebnisse, sodass im Weiteren eine sensitivere Methode angewendet wurde, mit welcher die Aktivität der GAPDH nach der Behandlung mit CNP sowohl zellfrei als auch in Zellen bestimmt werden kann. Sowohl im zellfreien System, in Anwesenheit einer Superoxidquelle, als auch in den Tumorzellen kann festgestellt werden, dass CNP die Aktivität der GAPDH verringern (Abb. 3.27 & 3.28). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Cysteine im aktiven Zentrum mittels H_2O_2 oxidiert werden, das durch die SOD-mimetische Aktivität der CNP entstanden ist. Die Daten der BIAM-Switch-Methode zeigen auch, dass durch CNP Oxidationen an den Cysteinen 152, 156 und 247 hervorgerufen werden, welche hochreaktiv gegenüber H_2O_2 sind (Hildebrandt et al., 2015). Wie zuvor diskutiert, zeigt die MS-Analyse einen zeitabhängigen Effekt, welcher ebenfalls bei der GAPDH zu sehen ist (Abb. 3.25). Nach 24 h CNP-Behandlung konnte im Gegensatz zu 4 h CNP-Behandlung keine Oxidation mehr in der MS-Analyse nachgewiesen werden. Ebenfalls ist die Aktivität des Enzyms nach einer 24-stündigen Inkubation mit CNP in Tumorzellen verringert (Abb. 3.28), was wiederum auf eine Überoxidation zu irreversiblen Schädigungen hindeutet.

In normalen, gesunden Zellen hingegen kann keine Verringerung der Enzymaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.29), was auch mit dem Ergebnis der Western Blot-Analyse, bezüglich der CNP-vermittelten Bildung von Sulfensäuren, korreliert. In normalen Zellen wirken CNP indirekt antioxidativ wegen des Hormesis-Effekts und führen deshalb nicht zur dauerhaften Bildung von Sulfensäuren bzw. weiteren Cysteinmodifikationen, sodass vermutlich das redox-sensitive Enzym GAPDH nicht

gehemmt wird. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass CNP über ihre prooxidative Wirkung wichtige Enzyme wie die GAPDH einerseits in Tumorzellen hemmen können und andererseits in normalen Zellen infolge der antioxidativen Reparaturmechanismen nicht beeinflussen.

Ein weiterer Unterschied zwischen Tumorzellen und normalen Zellen besteht in einer basal erhöhten Glykolyserate und einer daraus resultierenden erhöhten Laktatbildung (Liberti und Locasale, 2016; Vander Heiden et al., 2009). Daher wurde als einen weiteren Nachweis für die CNP-bedingte Hemmung der Aktivität der GAPDH der Laktatgehalt in A375 Melanomzellen nach der Behandlung mit CNP untersucht (Abb. 3.31). Die Untersuchungen ergeben, dass CNP die Laktatkonzentration in den Tumorzellen stark verringern, womit die Hemmung der GAPDH und somit auch der Glykolyse bestätigt wird. Wie auch in vorherigen Experimenten, ähneln sich die Effekte von CNP und dem als Positivkontrolle eingesetzten H_2O_2 . Auch in Studien anderer Gruppen wurde gezeigt, dass der durch H_2O_2 verursachte oxidative Stress den Glukosemetabolismus in Zellen beeinträchtigt und in der Erniedrigung der zellulären Laktatmengen resultiert (Liddell et al., 2009). Darüber hinaus wurde mit einer weiteren Positivkontrolle, der 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), überprüft und bestätigt, dass generell die Hemmung der Glykolyse den Laktatgehalt verringert. Die 2-DG ist ein Glukoseanalogon, das die Glykolyse und somit auch das Wachstum bzw. die Proliferation von Tumorzellen hemmt. Da die Tumorzellen wegen ihres hohen Energiebedarfs von der Glykolyse abhängig sind, konnte in einigen malignen Tumorzelllinien gezeigt werden, dass die Behandlung mit 2-DG zu einer Proliferationshemmung führt und dadurch das Wachstum von Krebszellen blockiert (Zhang et al., 2006).

Ein weiterer, jedoch indirekter Hinweis für die antiglykolytische Wirkung von CNP ist die Aktivierung von HIF-1, einem Transkriptionsfaktor, welcher unter hypoxischen Bedingungen die Expression von glykolytischen Enzymen hochreguliert. Da hohe ROS-Mengen einer Hypoxie ähneln (Bonello et al., 2007), wird HIF-1 auch unter oxidativem Stress, der in diesem Fall durch CNP ausgelöst wird, aktiviert. In den hier durchgeführten Untersuchungen in Bezug auf Apoptose (Abb. 3.13) kann durch CNP tendenziell die ROS-bedingte Akkumulation von HIF-1 α beobachtet werden, was auf die Stabilisierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 hindeutet. Auch in früheren Studien mit vergleichbaren CNP wurde bereits die Stabilisierung von HIF-1 α und so die Aktivierung von HIF-1 nachgewiesen (Alili et al., 2011). Durch die Hemmung der GAPDH könnten

Tumorzellen versuchen, über die HIF-1 vermittelte Expression von glykolytischen Enzymen die hohe Glykolyserate aufrecht zu erhalten, um ausreichend ATP produzieren zu können. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine antiglykolytische Wirkung von CNP. Die gezielte Hemmung der Glykolyse in Tumorzellen ist ein neuer Ansatz in der Krebsforschung mit wenig bekannten Nebenwirkungen. Zu den wichtigsten Enzymen der Glykolyse zählt die GAPDH, die ein pleiotropes Enzym mit weiteren Funktionen beispielsweise in Apoptose und Tumorprogression ist. Einige Studien deuten auf eine wichtige Funktion der GAPDH in der Regulation der Apoptose hin und andere beschreiben, dass die GAPDH die Tumorprogression fördert und somit als ein neues therapeutisches Ziel dient (Zhang et al., 2015; Tarze et al., 2007) Daher gehört die antiglykolytische Krebstherapie, insbesondere gegen GAPDH gerichtet, zu den vielversprechendsten Ansätzen in letzter Zeit (Pelicano et al., 2006).

4.7 Auswirkungen von CNP auf den Warburg-Effekt – eine Hypothese

Tumorzellen haben im Gegensatz zu normalen Zellen einen veränderten (Glukose-) Metabolismus. Sie sind metabolisch aktiver, wodurch die hohe Proliferationsrate vermittelt wird. Durch das von Otto Warburg (1956) zum ersten Mal beobachtete Phänomen der „*aeroben Glykolyse*“ (Warburg-Effekt) zeigen Tumorzellen eine erhöhte Glykolyserate und ATP-Produktion. Der hohe Glukoseverbrauch resultiert in diesen Zellen in der Bildung und Sezernierung von Laktat (Liberti und Locasale, 2016; Vander Heiden et al., 2009). Lange Zeit wurde die Wirkung von Laktat diskutiert, jedoch ist heutzutage bekannt, dass Laktat eine wichtige Rolle im Tumormetabolismus spielt. So wird Laktat beispielsweise in Zusammenhang mit der Bildung von Metastasen gebracht (Hirschhaeuser et al., 2011). Laktat kann auch als Metabolit von umgebendem Gewebe wie stromalen Zellen und auch von benachbarten, hypoxischen Tumorzellen wieder aufgenommen werden, um weiter metabolisiert zu werden (Gill et al., 2016). Die Einschleusung von Laktat als Kohlenstoffquelle resultiert dann in einer erhöhten ATP-Produktion sowie in der Bildung von Biomasse (z.B. Reduktionsäquivalenten, Nukleinsäuren, Aminosäuren und Lipiden), welche eine schnelle Proliferation von Tumorzellen ermöglicht. Dieser Prozess wird auch als der „reverse Warburg-Effekt“ bezeichnet (Vander Heiden et al., 2009). Die Funktionen des sogenannten Warburg-

Effekts sind vielfältig, jedoch kann dieser nicht direkt experimentell getestet und überprüft werden. Aufgrund von bestimmten Ergebnissen können Rückschlüsse auf den Warburg-Effekt gezogen werden. So kann eine erhöhte Laktatbildung auf den Warburg-Effekt hindeuten (Liberti und Locasale, 2016). In den hier durchgeführten Untersuchungen weisen CNP eine antiglykolytische Wirkung in Tumorzellen auf, wodurch weniger Laktat und somit auch vermutlich weniger Biomasse für weiteres Wachstum der Tumorzellen gebildet wird. Dies könnte zu der beobachteten proliferationshemmenden und letztendlich apoptotischen Wirkung von CNP in den hier untersuchten Tumorzellen geführt haben, wobei dazu noch weitere Studien nötig sind. Die Ergebnisse legen vorerst den Schluss nahe, dass CNP den Warburg-Effekt in Tumorzellen einschränken. *In vivo* würde demzufolge der „reverse Warburg-Effekt“ durch die Behandlung mit CNP ebenfalls vermindert ablaufen, sodass der Tumor weniger Energie und Bausteine zur Verfügung hat, was in einem verminderten Tumorstadium resultieren würde.

Zum ersten Mal wird in dieser Arbeit die Modulation des Glukosemetabolismus durch CNP in Tumorzellen gezeigt. Der auf der prooxidativen Wirkung von CNP beruhende antiglykolytische Effekt in Tumorzellen trägt zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen von CNP bei. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass CNP auch in andere Stoffwechselwege eingreifen können. Die Gesamtheit der Daten deutet somit auf einen komplexen Wirkmechanismus von CNP hin. Es sind definitiv weitere Untersuchungen notwendig um CNP-vermittelte Effekte in ihrer Auswirkung zu analysieren und die komplexen Zusammenhänge zu verstehen.

4.8 CNP als alternativer Therapieansatz ausgehend von Langzeitstudien

Ein weiterer, wichtiger Aspekt bei der Entwicklung effektiverer Medikamente gegen Krebserkrankungen ist die Bildung von Resistenzen. Die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber antikanzerogenen Medikamenten kann sich mit der Zeit verändern (Housman et al., 2014). Durch die Bildung von Resistenzmechanismen in Tumorzellen werden Medikamente beispielsweise wegen verminderter Membranpermeabilität nicht aufgenommen, aus den Zellen heraustransportiert (=aktiver

Efflux über sogenannte ATP-abhängige ABC-Transporterproteine) oder über Prozesse der Biotransformation und Ausscheidung verstärkt abgebaut, sodass die notwendige Dosis im Karzinom unterschritten wird und es zu unzureichenden Behandlungserfolgen maligner Tumoren kommt, weshalb die Heilungschancen von Patienten sinken (Abdullah und Chow, 2013; Ganten und Ruckpail, 1998). Eine CNP-bedingte Bildung von Resistenzen durch Tumorzellen ist bisher nicht bekannt. Zudem zeichnen sich Melanomzellen durch eine hohe Resistenzbildung gegen Chemotherapeutika aus (Helmbach et al., 2001; Grossman und Altieri, 2001). Um zu überprüfen, ob Melanomzellen Resistenzmechanismen gegenüber CNP entwickeln, wurde ein Langzeitversuch über viele Wochen (> 19 Wochen) durchgeführt. Hierbei wurden Melanomzellen in bestimmten Abständen mit CNP behandelt und die Populationsdichte als Maß für die Proliferation bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass CNP selbst nach 19 Wochen in Melanomzellen cytotoxisch wirken, was die Annahme zulässt, dass keine Resistenzen gegenüber CNP gebildet wurden (Abb. 3.33). Aufgrund der geringen Größe und der damit verbundenen Membrangängigkeit werden CNP womöglich nicht von den klassischen Resistenzmechanismen erfasst und verbleiben in den Zellen. Dort vermitteln sie die Bildung von ROS und scheinen darüber hinaus unterschiedliche Wirkmechanismen zu haben, was möglicherweise die Entwicklung von Resistenzen erschwert. Dies würde mit vielen Studien einhergehen, dass ein Nanopartikel-vermittelter Transport von Wirkstoffen im Vergleich zu konventionellen Methoden viele Vorteile in Bezug auf eine hohe Spezifität und geringe Nebenwirkungen wie die Bildung von Resistenzen bringen (Thakor und Gambhir, 2013; Hu und Zhang, 2012). So wurde die erste nanopartikuläre Krebsbehandlung mit Nanopartikeln aus Albumin und Paclitaxel (Abraxan®, nab-Paclitaxel) gegen die metastasierende Form von Brustkrebs zugelassen (Gradishar, 2006; Montero et al., 2011). Das an Albumin-Nanopartikel gebundene Cytostatikum Paclitaxel wirkt durch erhöhte Membranpermeabilität und Retention im Tumor toxischer als Paclitaxel alleine (Zhao et al., 2015). Darüber hinaus werden weitere Nanopartikel-basierte Ansätze mit speziellen Inhibitoren der ABC-Transporterproteine wie P-Glykoproteine und antitumoralen Wirkstoffe wie Doxorubicin entwickelt, um die Efflux-vermittelte Resistenz in Tumorzellen zu überwinden und so eine intrazelluläre Verteilung und antitumorale Wirkung zu gewährleisten (Xue und Liang, 2012).

Die Ergebnisse zur Analyse der Resistenz aber auch zur Cytotoxizität zeigen, dass durch CNP nicht alle behandelten Tumorzellen getötet werden. Es wurde immer ein gewisser Prozentsatz an Zellen beobachtet, welche die Behandlung überleben. In der klassischen

Chemotherapie ist dieses Phänomen ebenfalls nicht selten. Eine bestimmte Dosis an Cytostatika kann immer nur einen bestimmten Anteil von Zielzellen abtöten. Dieser Prozentsatz bleibt auch nach weiteren Behandlungen immer gleich (*log cell kill-Hypothese*) (Norton, 2014). Daher sollte die Dosis und Dauer einer Chemotherapie im Laufe der Behandlung nicht vom Behandlungsschema abweichen, was in den meisten Fällen wegen der schädlichen Nebenwirkungen auf normale, gesunde Zellen nicht umsetzbar ist. Dieser Nachteil wäre mit CNP nicht gegeben und die Behandlung mit CNP könnte fortgesetzt werden, da die Partikel *in vitro* keine adversen Effekte auf normale Zellen ausüben. An dieser Stelle wäre eine Kombination bzw. Supplementation mit anderen antikanzerogenen Medikamenten eine erfolgversprechendere Alternative zur Monotherapie. Ein synergistischer Effekt auf die Cytotoxizität durch die Kombination von CNP mit klassischen Chemotherapeutika würde die überlebenden Tumorzellen abtöten und die klinische Dosierung von klassischen Substanzen senken, um mögliche Nebenwirkungen auf normale, gesunde Zellen zu minimieren. Zusätzlich erhöht die lange Vorbehandlung der Melanomzellen mit CNP die Sensitivität gegenüber Doxorubicin, sodass Doxorubicin stärkere cytotoxische Effekte in den CNP-langzeitexponierten Melanomzellen ausübt (Abb. 3.35). Neben der cytotoxischen Wirkung von Nanopartikeln in Tumorzellen werden jene auch als *Drug Carrier* eingesetzt, um den Therapieerfolg bei schwer zu behandelnden, resistenten Tumorerkrankungen zu erhöhen. Beispielsweise verwenden Soma et al. (1999) Doxorubicin-beladene Nanopartikel zur Vermeidung von Resistenzen in Tumorzellen und Sulthana et al. (2017) setzen Doxorubicin gekoppelte CNP ein, um das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) zu behandeln (Sulthana et al., 2017; Soma et al., 1999). Hierbei werden CNP nicht nur als *drug carrier*, sondern auch als funktionelles, antikanzerogenes Mittel (*Nanopharmaceutical*) verwendet. Diesbezüglich wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen auch gezeigt, dass CNP im Rahmen einer Suppletions- bzw. Kombinationstherapie mit klassischen Chemotherapeutika eingesetzt werden können. So werden durch CNP und Doxorubicin synergistische Effekte in Melanomzellen in Bezug auf Cytotoxizität und ROS-Bildung nachgewiesen. Stromale Zellen hingegen werden vor Doxorubicin-vermittelter Cytotoxizität geschützt (Sack et al., 2014).

4.9 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekulare Wirkung sowie die zugrundeliegenden Wirkmechanismen von redox-aktiven CNP in humanen A375 Melanomzellen und in normalen, gesunden Zellen (Fibroblasten und Melanozyten) zu untersuchen. Die hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass die Acrylat-stabilisierten CNP eine cytotoxische und proliferationshemmende Wirkung in Melanomzellen (A375) haben, während bei gleichen Konzentrationen keine negativen Effekte in Fibroblasten (NHDF) und Melanozyten (NHEM) nachgewiesen werden können. Zusammen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der selektive Wirkmechanismus von CNP neben der pH-Abhängigkeit auch auf dem in Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen veränderten ROS-Grundgehalt und Redox-Status basiert. Der ROS-Gehalt bleibt in normalen Zellen im physiologischen Bereich, während Tumorzellen sowohl basal als auch CNP-bedingt pathophysiologisch erhöhte ROS-Mengen besitzen. Der durch die SOD-mimetische Aktivität der Partikel ausgelöste intrazelluläre Anstieg von ROS, hier H_2O_2 , führt in Tumorzellen zu posttranslationalen Cysteinmodifikationen von Proteinen. Anhand des Beispiels der redox-regulierten GAPDH konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit CNP über die Hemmung der GAPDH die Glykolyse hemmt. Diese antiglykolytische Wirkung von CNP könnte zur Beeinträchtigung des Warburg-Effekts in Tumorzellen führen, wodurch vermutlich die Proliferation von Tumorzellen gehemmt wird. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die CNP-vermittelte Erhöhung von H_2O_2 und die damit verbundene Störung der Redox-Homöostase zu cytotoxischen Effekten in Tumorzellen führen, während normale, stromale Zellen nicht beeinflusst werden. Ein Therapieansatz mit CNP scheint für die Behandlung von Krebserkrankungen möglich zu sein, insbesondere weil auch gezeigt werden kann, dass CNP keine adversen Effekte nach einer Langzeitbehandlung (>19 Wochen) in normalen Zellen ausüben, während Melanomzellen keinen Resistenzmechanismus ausbilden und zusätzlich eine Sensibilisierung des Tumors gegenüber klassischen Chemotherapeutika anhand des Beispiels von Doxorubicin stattfindet. Auf diese Weise erfüllen CNP optimal die Kriterien einer antitumoralen Therapie: Cytotoxizität gegenüber dem Primärtumor, Sensibilisierung gegen weitere exogene Noxen und keine Resistenzbildung bei gleichzeitiger Protektion der stromalen Umgebung (Abb. 4.2).

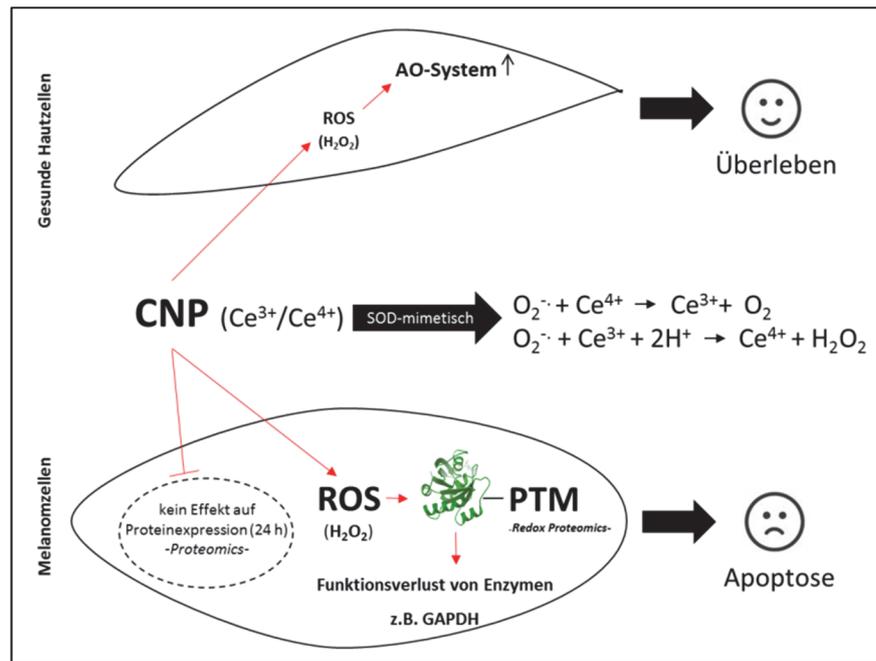


Abb. 4.2: Effekte von CNP in Tumorzellen und normalen Hautzellen CNP zeigen in Tumorzellen und in normalen, gesunden Zellen prooxidative Effekte, wobei diese in Tumorzellen signifikant größer sind als in normalen Zellen. Der intrazelluläre Anstieg von ROS, hier H₂O₂, durch die SOD-mimetische Aktivität der Partikel führt zur Veränderung des Redox-Musters (Thioloxidation) in Tumorzellen. Die vermittelten posttranslationalen Modifikationen führen u.a. zu Funktionsverlust von wichtigen zellulären Enzymen wie z.B. von GAPDH, sodass Apoptose eingeleitet wird. In normalen Zellen wird über die Adaptation des antioxidativen Schutzsystems die über CNP-induzierte induzierte leichte Erhöhung von ROS kompensiert, sodass keine toxischen Effekte auftreten (AO-System=antioxidatives System; PTM=posttranslationale Modifikation).

5 Perspektiven

Ceroxid-Nanopartikel (CNP) zeigen im Rahmen dieser und vorheriger Untersuchungen sehr gute Voraussetzungen und vielversprechende Ergebnisse für eine therapeutische Anwendung u.a. bei Hautkrebs. Die zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen für die selektiv cytotoxische Wirkung von CNP sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Insbesondere fehlten Untersuchungen zum *redox signaling* von CNP. Zum ersten Mal wird im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass CNP Einfluss auf wichtige redox-sensitive Proteine bzw. Enzyme haben, welche zu einer Störung der zellulären Redox-Homöostase und schließlich zur Apoptose der Tumorzellen führen. Die weitere Aufklärung der Wirkung auf redox-regulierte Proteine und die funktionelle Konsequenz dieser CNP-vermittelten posttranslationalen Proteinmodifikationen auf Signaltransduktionswege ist von großer Wichtigkeit. Daher sollten weitere Untersuchungen zum Einfluss von CNP auf den Redox-Code/Redox-Status in Tumorzellen im Vergleich zu normalen, gesunden Zellen durchgeführt werden. Ein weiterer Aspekt, der weiterhin untersucht werden sollte, ist der Einfluss von CNP auf das antioxidative Schutzsystem in normalen Zellen, um die mögliche Adaptation der Zellen durch eventuelle Regulierung von antioxidativen Enzymen aufzuklären. Hierbei sollte der Einfluss von CNP sowohl auf die Expression (*Proteomics*) als auch auf die Aktivität von antioxidativen Enzymen vertieft werden. Innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Brenneisen wurden bisher verschiedene Tumorzelllinien untersucht und gezeigt, dass CNP ein breites Wirkspektrum haben. Über die Wirkung von CNP auf resistente Tumorarten ist bisher jedoch wenig bekannt. Eine mögliche Anwendung von CNP gegen resistente Tumorarten würde ebenfalls für einen therapeutischen Einsatz von CNP sprechen. Beruhend auf den hier und aus früheren Studien gewonnenen Erkenntnissen wäre eine Kombination bzw. Supplementation von CNP mit konventionellen Cytostatika und auch neuartigen Chemotherapeutika, wie z.B. Inhibitoren der Glykolyse, sehr gut vorstellbar. Die meisten Untersuchungen wurden bisher hauptsächlich in Zellkultur durchgeführt. Die Wirkung von CNP auf Tumorzellen in 3D-Hautmodellen sowie in weiteren *in vivo*-Modellen wäre ein weiterer interessanter und notwendiger Ansatz, insbesondere, um Erkenntnisse über Bioverfügbarkeit, Biodegradation und Bioakkumulation zu gewinnen. Demnach ergibt sich weiterer Forschungsbedarf, um herauszuarbeiten, ob CNP effektiv und sicher gegen Krebs in einer zukünftigen Therapie einsetzbar wären.

6 Zusammenfassung

Die Inzidenz von Tumorerkrankungen, wie Hautkrebs, ist in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen. Jedoch sind die Behandlungsmöglichkeiten, vor allem die der metastasierenden Form des malignen Melanoms, infolge der hohen Resistenz gegenüber einer konventionellen Chemotherapie und den unerwünschten Nebenwirkungen auf normale, gesunde Zellen sehr begrenzt. Die Entwicklung neuer oder veränderter Therapieansätze ist daher von großer Bedeutung. Ein neuer Ansatz in der Krebsforschung ist es, den veränderten Redox-Status in Tumorzellen für therapeutische Zwecke zu nutzen. Nanomedizin, die medizinische Anwendung von Nanotechnologie, bietet neue Möglichkeiten für die Behandlung von Krebserkrankungen. In verschiedenen Studien mit redox-aktiven Ceroxid-Nanopartikeln (CNP) konnten vielversprechende Ergebnisse beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Auswirkung von redox-aktiven CNP auf Melanomzellen sowie normale Hautfibroblasten und -melanozyten untersucht werden, um die zugrundeliegenden Wirkmechanismen von CNP weiter aufzuklären. Die hier verwendeten Acrylat-stabilisierten CNP zeigen eine selektiv cytotoxische und proliferationshemmende Wirkung in Tumorzellen, während bei gleichen Konzentrationen normale, stromale Zellen unbeeinflusst sind. Auch nach einer Langzeitexposition mit CNP treten keine adversen Effekte in normalen Zellen auf, wohingegen in Tumorzellen keine Resistenzen und zusätzlich sogar eine Sensibilisierung gegenüber chemotherapeutischen Agenzien wie Doxorubicin stattfinden. Die Effekte von CNP sind abhängig von ROS, wobei der selektive Wirkmechanismus von CNP auf dem in Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen veränderten Redox-Status basiert. Tumorzellen weisen im Vergleich zu nicht entarteten Zellen einen basal erhöhten ROS-Gehalt auf, weshalb Tumorzellen sensitiver auf eine weitere ROS-Erhöhung reagieren, wohingegen normale Zellen eine Erhöhung durch das antioxidative Schutzsystem kompensieren können. Die prooxidative Wirkung von CNP in Tumorzellen resultiert in der posttranslationalen Cysteinmodifikation von redox-regulierten Enzymen, was u.a. zur Hemmung der zellulären Glykolyse über die GAPDH führt. Basierend auf diesen und früheren Erkenntnissen zeigen CNP sehr gute Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung gegen Krebserkrankungen in Form einer Mono- oder Kombinationstherapie mit konventionellen sowie neuartigen Chemotherapeutika.

7 Summary

The incidence of cancer, such as skin cancer, has increased significantly in recent decades, however the treatment options, especially against the metastatic form of the malignant melanoma, are limited due to the high resistance to conventional chemotherapies and the harmful side effects on healthy cells. The development of novel or alteration of previous therapeutic approaches is therefore of great importance. One new approach in cancer research is the use of the altered redox status in tumor cells for therapeutic purposes. Nanomedicine, the medical application of nanotechnology, offers new opportunities for the treatment of cancer. Promising results have been observed in several studies with redox-active cerium oxide nanoparticles (CNP). In this work, the effect of redox-active CNP on melanoma cells as well as normal, healthy fibroblasts and melanocytes was investigated in order to further elucidate the underlying mechanisms of action of CNP. The CNP showed a selective cytotoxic and antiproliferative activity in tumor cells, while healthy cells were unaffected at the same concentration. Even after long-term exposure to CNP, no adverse effects were observed in healthy cells, whereas no resistance to CNP was observed in tumor cells. In addition, a sensitization to chemotherapeutic agents such as doxorubicin was shown. The effect of CNP depends on an increased ROS level, finally resulting in a changed redox status of tumor cells compared to normal healthy cells. Tumor cells have a basally enhanced amount of ROS level compared to healthy cells, which makes tumor cells more sensitive to further increase of the ROS level, whereas healthy cells can compensate an increase by the antioxidant protection system. The prooxidative effects of CNP in tumor cells result in posttranslational cysteine modifications of redox-regulated proteins or enzymes leading, for example, to the inhibition of cellular glycolysis via inhibition of GAPDH. Based on these and previous findings, CNP show promising results for a therapeutic use against cancer in the form of a monotherapy or in combination with conventional as well as novel chemotherapeutic agents.

Literaturverzeichnis

- Abdal Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., und Cho, S. G. 2017. 'The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles', *International Journal of Molecular Sciences*, 18.
- Abdullah, L. N., und Chow, E. K. 2013. 'Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells', *Clin Transl Med*, 2: 3.
- Abercrombie, M., und Ambrose, E. J. 1962. 'The surface properties of cancer cells: a review', *Cancer Res*, 22: 525-48.
- Afanas'ev, I. 2011. 'Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging', *Aging Dis*, 2: 219-30.
- Afanas'ev, I. 2014. 'New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer', *Aging Dis*, 5: 52-62.
- Ahmad, W., Ijaz, B., Shabbiri, K., Ahmed, F., und Rehman, S. 2017. 'Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/ RNS generation', *J Biomed Sci*, 24: 76.
- Alatrash, G., Jakher, H., Stafford, P. D., und Mittendorf, E. A. 2013. 'Cancer immunotherapies, their safety and toxicity', *Expert Opin Drug Saf*, 12: 631-45.
- Albanese, A., Tang, P. S., und Chan, W. C. 2012. 'The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems', *Annu Rev Biomed Eng*, 14: 1-16.
- Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H., et al. 2015. 'Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp', *Cancer Cell Int*, 15: 71.
- Alili, L., Sack, M., Puschmann, K., und Brenneisen, P. 2014. 'Fibroblast-to-myofibroblast switch is mediated by NAD(P)H oxidase generated reactive oxygen species', *Biosci Rep*, 34.
- Alili, L., Sack, M., von Montfort, C., Giri, S., Das, S., Carroll, K. S., Zanger, K., Seal, S., und Brenneisen, P. 2013. 'Downregulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles', *Antioxid Redox Signal*, 19: 765-78.

- Alili, L., Sack, M., Karakoti, A. S., Teuber, S., Puschmann, K., Hirst, S. M., Reilly, C. M., et al. 2011. 'Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions', *Biomaterials*, 32: 2918-29.
- Allen, B. G., Bhatia, S. K., Anderson, C. M., Eichenberger-Gilmore, J. M., Sibenaller, Z. A., Mapuskar, K. A., Schoenfeld, J. D., Buatti, J. M., Spitz, D. R., und Fath, M. A. 2014. 'Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism', *Redox Biol*, 2: 963-70.
- Allison, A. C. 1974. 'Lysosomes in cancer cells', *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 7: 43-50.
- Annovazzi, L., Mellai, M., und Schiffer, D. 2017. 'Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma', *Cancers (Basel)*, 9.
- Arteel, G. E., und Sies, H. 2001. 'The biochemistry of selenium and the glutathione system', *Environ Toxicol Pharmacol*, 10: 153-8.
- Arya, A., Sethy, N. K., Das, M., Singh, S. K., Das, A., Ujjain, S. K., Sharma, R. K., Sharma, M., und Bhargava, K. 2014. 'Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential', *Free Radic Res*, 48: 784-93.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., und Perez, J. M. 2010. 'Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles', *ACS Nano*, 4: 5321-31.
- Ashkenazi, A., und Salvesen, G. 2014. 'Regulated cell death: signaling and mechanisms', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30: 337-56.
- Ayala, A., Munoz, M. F., und Arguelles, S. 2014. 'Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal', *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 360438.
- Barth, H. G., und Sun, S. T. 1989. 'Particle size analysis', *Anal Chem*, 61: 143R-52R.
- Baudino, T. A. 2015. 'Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment', *Curr Drug Discov Technol*, 12: 3-20.
- Bensinger, S. J., und Christofk, H. R. 2012. 'New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology', *Semin Cell Dev Biol*, 23: 352-61.
- Beretta, G. L., und Zunino, F. 2008. 'Molecular mechanisms of anthracycline activity', *Top Curr Chem*, 283: 1-19.

- Berkner, S., Schwirn, K., und Voelker, D. 2016. 'Nanopharmaceuticals: Tiny challenges for the environmental risk assessment of pharmaceuticals', *Environ Toxicol Chem*, 35: 780-7.
- Berne, B.J., und Pecora, R. 2013. 'Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics' *Dover Publications*.
- Bertout, J. A., Patel, S. A., und Simon, M. C. 2008. 'The impact of O₂ availability on human cancer', *Nat Rev Cancer*, 8: 967-75.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., und Moses, H. L. 2004. 'Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression', *Nature*, 432: 332-7.
- Bilal, B. A., und Müller, E. 1992. "Thermodynamic Study of Ce⁴⁺ /Ce³⁺ Redox Reaction in Aqueous Solutions at Elevated Temperatures: 1. Reduction Potential and Hydrolysis Equilibria of Ce⁴⁺ in HClO₄ Solutions." In *Zeitschrift für Naturforschung A*, 974.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., und Kalayci, O. 2012. 'Oxidative stress and antioxidant defense', *World Allergy Organ J*, 5: 9-19.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., und Johansen, T. 2009. 'Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1', *Methods Enzymol*, 452: 181-97.
- Boffetta, P., und Kaldor, J. M. 1994. 'Secondary malignancies following cancer chemotherapy', *Acta Oncol*, 33: 591-8.
- Bohme, I., und Bosserhoff, A. K. 2016. 'Acidic tumor microenvironment in human melanoma', *Pigment Cell Melanoma Res*, 29: 508-23.
- Bonello, S., Zahringer, C., BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., Kietzmann, T., und Grolach, A. 2007. 'Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 755-61.
- Brandner, J. M., und Haass, N. K. 2013. 'Melanoma's connections to the tumour microenvironment', *Pathology*, 45: 443-52.
- Brenneisen, P., Oh, J., Wlaschek, M., Wenk, J., Briviba, K., Hommel, C., Herrmann, G., Sies, H., und Scharffetter-Kochanek, K. 1996. 'Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts', *Photochem Photobiol*, 64: 877-85.

- Brose, M. S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., et al. 2002. 'BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma', *Cancer Res*, 62: 6997-7000.
- Brown, N. S., und Bicknell, R. 2001. 'Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer', *Breast Cancer Res*, 3: 323-7.
- Bus, J. S., und Gibson, J. E. 1984. 'Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity', *Environ Health Perspect*, 55: 37-46.
- Cai, Z., und Yan, L. J. 2013. 'Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health', *J Biochem Pharmacol Res*, 1: 15-26.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., und Calabrese, E. J. 2011. 'Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity', *Mol Aspects Med*, 32: 279-304.
- Castaldo, S. A., Freitas, J. R., Conchinha, N. V., und Madureira, P. A. 2016. 'The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems', *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 8413032.
- Cat, B., Stuhlmann, D., Steinbrenner, H., Alili, L., Holtkotter, O., Sies, H., und Brenneisen, P. 2006. 'Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species', *J Cell Sci*, 119: 2727-38.
- Cat, Bahar, und Brenneisen, Peter. 2009. 'Oxidative stress in tumor progression: intervention by selenium', *Cell Biology and Toxicology*, 25: 204-08.
- Celardo, I., De Nicola, M., Mandoli, C., Pedersen, J. Z., Traversa, E., und Ghibelli, L. 2011. 'Ce(3)+ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles', *ACS Nano*, 5: 4537-49.
- Chen, J., Liu, T., Gao, J., Gao, L., Zhou, L., Cai, M., Shi, Y., et al. 2016. 'Variation in Carbohydrates between Cancer and Normal Cell Membranes Revealed by Super-Resolution Fluorescence Imaging', *Adv Sci (Weinh)*, 3: 1600270.
- Chen, J., Patil, S., Seal, S., und McGinnis, J. F. 2006. 'Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides', *Nat Nanotechnol*, 1: 142-50.
- Chen, S., Hou, Y., Cheng, G., Zhang, C., Wang, S., und Zhang, J. 2013. 'Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress', *Biol Trace Elem Res*, 154: 156-66.

- Chen, S. T., Pan, T. L., Tsai, Y. C., und Huang, C. M. 2002. 'Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin--treated MCF-7 human breast cancer cells', *Cancer Lett*, 181: 95-107.
- Cheng, G., Guo, W., Han, L., Chen, E., Kong, L., Wang, L., Ai, W., Song, N., Li, H., und Chen, H. 2013. 'Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways', *Toxicol In Vitro*, 27: 1082-8.
- Choi, J. D., und Lee, J. S. 2013. 'Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer', *Genomics Inform*, 11: 164-73.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., und Tyminska, A. 2013. 'Skin melanocytes: biology and development', *Postepy Dermatol Alergol*, 30: 30-41.
- Circu, M. L., und Aw, T. Y. 2010. 'Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis', *Free Radic Biol Med*, 48: 749-62.
- Collins, Y., Chouchani, E. T., James, A. M., Menger, K. E., Cocheme, H. M., und Murphy, M. P. 2012. 'Mitochondrial redox signalling at a glance', *J Cell Sci*, 125: 801-6.
- Colon, J., Herrera, L., Smith, J., Patil, S., Komanski, C., Kupelian, P., Seal, S., Jenkins, D. W., und Baker, C. H. 2009. 'Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles', *Nanomedicine*, 5: 225-31.
- Colon, J., Hsieh, N., Ferguson, A., Kupelian, P., Seal, S., Jenkins, D. W., und Baker, C. H. 2010. 'Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2', *Nanomedicine*, 6: 698-705.
- Cui, X. 2012. 'Reactive oxygen species: the achilles' heel of cancer cells?', *Antioxid Redox Signal*, 16: 1212-4.
- Culcasi, M., Benameur, L., Mercier, A., Lucchesi, C., Rahmouni, H., Asteian, A., Casano, G., Botta, A., Kovacic, H., und Pietri, S. 2012. 'EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation', *Chem Biol Interact*, 199: 161-76.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonte, F., und Desmouliere, A. 2014. 'Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing', *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 7: 301-11.
- Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J. F., Riedel, L. M., Seal, S., und Hickman, J. J. 2007. 'Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons', *Biomaterials*, 28: 1918-25.

- Das, S., Dowding, J. M., Klump, K. E., McGinnis, J. F., Self, W., und Seal, S. 2013. 'Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine', *Nanomedicine (Lond)*, 8: 1483-508.
- Davidson, D. C., Derk, R., He, X., Stueckle, T. A., Cohen, J., Pirela, S. V., Demokritou, P., Rojanasakul, Y., und Wang, L. 2016. 'Direct stimulation of human fibroblasts by nCeO₂ in vitro is attenuated with an amorphous silica coating', *Part Fibre Toxicol*, 13: 23.
- Davies, M. J. 2016. 'Protein oxidation and peroxidation', *Biochem J*, 473: 805-25.
- De Luca, P., Vazquez, E. S., Moiola, C. P., Zalazar, F., Cotignola, J., Gueron, G., Gardner, K., und De Siervi, A. 2011. 'BRCA1 loss induces GADD153-mediated doxorubicin resistance in prostate cancer', *Mol Cancer Res*, 9: 1078-90.
- De Wever, O., und Mareel, M. 2002. 'Role of myofibroblasts at the invasion front', *Biol Chem*, 383: 55-67.
- Del Rio, L. A., und Lopez-Huertas, E. 2016. 'ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling', *Plant Cell Physiol*, 57: 1364-76.
- Dielschneider, R. F., Henson, E. S., und Gibson, S. B. 2017. 'Lysosomes as Oxidative Targets for Cancer Therapy', *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 3749157.
- Dong, C., und Chen, L. 2014. 'Second malignancies after breast cancer: The impact of adjuvant therapy', *Mol Clin Oncol*, 2: 331-36.
- Dörfler, Hans-Dieter. 2002. 'Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme' *Springer Verlag*: Berlin.
- Dowding, J. M., Das, S., Kumar, A., Dosani, T., McCormack, R., Gupta, A., Sayle, T. X., et al. 2013. 'Cellular interaction and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials', *ACS Nano*, 7: 4855-68.
- Dunlop, R. A., Brunk, U. T., und Rodgers, K. J. 2009. 'Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation', *IUBMB Life*, 61: 522-7.
- Dunnick, K. M., Pillai, R., Pisane, K. L., Stefaniak, A. B., Sabolsky, E. M., und Leonard, S. S. 2015. 'The Effect of Cerium Oxide Nanoparticle Valence State on Reactive Oxygen Species and Toxicity', *Biol Trace Elem Res*, 166: 96-107.
- Elmore, S. 2007. 'Apoptosis: a review of programmed cell death', *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.

- Esser, C., und Krutmann, J. 2010. '[UV radiation and skin pigmentation. Aryl hydrocarbon receptor - a "new kid on the block"]', *Hautarzt*, 61: 561-6.
- Fatokun, A. A., Stone, T. W., und Smith, R. A. 2007. 'Hydrogen peroxide mediates damage by xanthine and xanthine oxidase in cerebellar granule neuronal cultures', *Neurosci Lett*, 416: 34-8.
- Forest, V., Leclerc, L., Hochepped, J. F., Trouve, A., Sarry, G., und Pourchez, J. 2017. 'Impact of cerium oxide nanoparticles shape on their in vitro cellular toxicity', *Toxicol In Vitro*, 38: 136-41.
- Forman, H. J. 2016. 'Glutathione - From antioxidant to post-translational modifier', *Arch Biochem Biophys*, 595: 64-7.
- Forman, H. J., und Torres, M. 2002. 'Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling', *Am J Respir Crit Care Med*, 166: S4-8.
- Fosslien, E. 2001. 'Mitochondrial medicine--molecular pathology of defective oxidative phosphorylation', *Ann Clin Lab Sci*, 31: 25-67.
- Fregnani, E. R., Sobral, L. M., Alves, F. A., Soares, F. A., Kowalski, L. P., und Coletta, R. D. 2009. 'Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical', *Pathol Oncol Res*, 15: 231-40.
- Fritsch, Peter. 2009. 'Dermatologie & Venerologie für das Studium' *Springer Verlag: Heidelberg*.
- Fuchs-Tarlovsky, V. 2013. 'Role of antioxidants in cancer therapy', *Nutrition*, 29: 15-21.
- Fukai, T., und Ushio-Fukai, M. 2011. 'Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases', *Antioxid Redox Signal*, 15: 1583-606.
- Galbusera, C., Orth, P., Fedida, D., und Spector, T. 2006. 'Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase', *Biochem Pharmacol*, 71: 1747-52.
- Gallogly, M. M., und Mieryl, J. J. 2007. 'Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress', *Curr Opin Pharmacol*, 7: 381-91.
- Ganten, D., und Ruckpaul, K. 2006. 'Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen' *Springer Verlag: Berlin*.
- Ganten, Detlev, und Ruckpaul, Klaus 1998. 'Handbuch der Molekularen Medizin - Tumorerkrankungen' *Springer Verlag: Heidelberg*.

- Gao, Y., Chen, K., Ma, J. L., und Gao, F. 2014. 'Cerium oxide nanoparticles in cancer', *Onco Targets Ther*, 7: 835-40.
- Gartel, A. L., und Tyner, A. L. 2002. 'The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis', *Mol Cancer Ther*, 1: 639-49.
- Gasparre, G., Porcelli, A. M., Lenaz, G., und Romeo, G. 2013. 'Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5.
- Gatenby, R. A., und Gillies, R. J. 2004. 'Why do cancers have high aerobic glycolysis?', *Nat Rev Cancer*, 4: 891-9.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., und Wardas, P. 2004. '[Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]', *Wiad Lek*, 57: 453-5.
- Gems, D., und Partridge, L. 2008. 'Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger"', *Cell Metab*, 7: 200-3.
- Gill, K. S., Tassone, P., Hamilton, J., Hjelm, N., Luginbuhl, A., Cognetti, D., Tuluc, M., Martinez-Outschoorn, U., Johnson, J. M., und Curry, J. M. 2016. 'Thyroid Cancer Metabolism: A Review', *J Thyroid Disord Ther*, 5.
- Giri, S., Karakoti, A., Graham, R. P., Maguire, J. L., Reilly, C. M., Seal, S., Rattan, R., und Shridhar, V. 2013. 'Nanocerium: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer', *PLoS One*, 8: e54578.
- Global Burden of Disease Cancer, Collaboration, Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., et al. 2015. 'The Global Burden of Cancer 2013', *JAMA Oncol*, 1: 505-27.
- Goebeler, Matthias, und Hamm, Henning. 2017. 'Basiswissen Dermatologie' *Springer Verlag*: Berlin.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., und Zhivotovsky, B. 2008. 'Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?', *Trends Cell Biol*, 18: 165-73.
- Goldsmith, Lowell A. , Katz, Stephen I. , Gilchrest, Barbara A., Paller, Amy S., Leffell, David J. , und Wolff, Klaus. 2012. 'Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine' *McGraw-Hill Companies, Inc.*: USA.
- Gough, D. R., und Cotter, T. G. 2011. 'Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule', *Cell Death Dis*, 2: e213.

- Gradishar, W. J. 2006. 'Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane', *Expert Opin Pharmacother*, 7: 1041-53.
- Graefe, K.H., Lutz, W., und Bönisch, H. 2011. 'Pharmakologie und Toxikologie' *Thieme Verlag*: Stuttgart.
- Graves, P. R., und Haystead, T. A. 2002. 'Molecular biologist's guide to proteomics', *Microbiol Mol Biol Rev*, 66: 39-63; table of contents.
- Grek, C. L., Zhang, J., Manevich, Y., Townsend, D. M., und Tew, K. D. 2013. 'Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation', *J Biol Chem*, 288: 26497-504.
- Griendling, Kathy K., Touyz, Rhian M., Zweier, Jay L., Dikalov, Sergey, Chilian, William, Chen, Yeong-Renn, Harrison, David G., und Bhatnagar, Aruni. 2016. 'Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System', *A Scientific Statement From the American Heart Association*, 119: e39-e75.
- Griffiths, J. R. 1991. 'Are cancer cells acidic?', *Br J Cancer*, 64: 425-7.
- Grossman, D., und Altieri, D. C. 2001. 'Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets', *Cancer Metastasis Rev*, 20: 3-11.
- Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Lin, Z., Pestell, R. G., Howell, A., Zimmers, T. A., Casimiro, M. C., et al. 2012. 'Mitochondrial fission induces glycolytic reprogramming in cancer-associated myofibroblasts, driving stromal lactate production, and early tumor growth', *Oncotarget*, 3: 798-810.
- Gupta, V., und Carroll, K. S. 2014. 'Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime', *Biochim Biophys Acta*, 1840: 847-75.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Eppakayala, V., Jeyaraj, M., und Kim, J. H. 2013. 'Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells', *Biomed Res Int*, 2013: 535796.
- Gutteridge, J. M., und Halliwell, B. 2010. 'Antioxidants: Molecules, medicines, and myths', *Biochem Biophys Res Commun*, 393: 561-4.
- Halliwell, B., und Gutteridge, J. M. 1995. 'The definition and measurement of antioxidants in biological systems', *Free Radic Biol Med*, 18: 125-6.
- Hambright, H. G., und Ghosh, R. 2017. 'Autophagy: In the cROSShairs of cancer', *Biochem Pharmacol*, 126: 13-22.

- Hammer, E., Bien, S., Salazar, M. G., Steil, L., Scharf, C., Hildebrandt, P., Schroeder, H. W., Kroemer, H. K., Volker, U., und Ritter, C. A. 2010. 'Proteomic analysis of doxorubicin-induced changes in the proteome of HepG2 cells combining 2-D DIGE and LC-MS/MS approaches', *Proteomics*, 10: 99-114.
- Hanahan, D., und Weinberg, R. A. 2000. 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100: 57-70.
- Hanahan, D., und Weinberg, R. A. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Heckert, E. G., Karakoti, A. S., Seal, S., und Self, W. T. 2008a. 'The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria', *Biomaterials*, 29: 2705-9.
- Heckert, E. G., Seal, S., und Self, W. T. 2008b. 'Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium', *Environ Sci Technol*, 42: 5014-9.
- Heinrich, Peter, Müller, Matthias, und Graeve, Lutz. 2014. 'Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie' *Springer Verlag*: Heidelberg.
- Helmbach, H., Rossmann, E., Kern, M. A., und Schadendorf, D. 2001. 'Drug-resistance in human melanoma', *Int J Cancer*, 93: 617-22.
- Hermann, Gerrit, Heffeter, Petra, Kryeziu, Kushtrim, Berger, Walter, Hann, Stephan, und Koellensperger, Gunda. 2014. 'The study of reduced versus oxidized glutathione in cancer cell models employing isotopically labelled standards', *Analytical Methods*, 6: 3086-94.
- Hildebrandt, T., Knuesting, J., Berndt, C., Morgan, B., und Scheibe, R. 2015. 'Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub?', *Biol Chem*, 396: 523-37.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G., und Mueller-Klieser, W. 2011. 'Lactate: a metabolic key player in cancer', *Cancer Res*, 71: 6921-5.
- Hirst, S. M., Karakoti, A. S., Tyler, R. D., Sriranganathan, N., Seal, S., und Reilly, C. M. 2009. 'Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles', *Small*, 5: 2848-56.
- Hirst, S. M., Karakoti, A., Singh, S., Self, W., Tyler, R., Seal, S., und Reilly, C. M. 2013. 'Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice', *Environ Toxicol*, 28: 107-18.
- Horstkotte, E., und Odoerfer, K. I. 2012. 'Towards improved therapies using nanopharmaceuticals: recent patents on pharmaceutical nanoformulations', *Recent Pat Food Nutr Agric*, 4: 220-44.

- Hou, Hui, Zhao, Yangyang, Li, Chuanping, Wang, Minmin, Xu, Xiaolong, und Jin, Yongdong. 2017. 'Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label-free rapid identification of cancer-cells', *Scientific Reports*, 7: 1759.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., und Sarkar, S. 2014. 'Drug resistance in cancer: an overview', *Cancers (Basel)*, 6: 1769-92.
- Hristozov, Danail, und Malsch, Ineke. 2009. 'Hazards and Risks of Engineered Nanoparticles for the Environment and Human Health', *Sustainability*, 1: 1161.
- Hrycay, E. G., und Bandiera, S. M. 2015. 'Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer', *Adv Pharmacol*, 74: 35-84.
- Hu, C. M., und Zhang, L. 2012. 'Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer', *Biochem Pharmacol*, 83: 1104-11.
- Hubenak, J. R., Zhang, Q., Branch, C. D., und Kronowitz, S. J. 2014. 'Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review', *Plast Reconstr Surg*, 133: 49e-56e.
- Jabir, N. R., Tabrez, S., Ashraf, G. M., Shakil, S., Damanhour, G. A., und Kamal, M. A. 2012. 'Nanotechnology-based approaches in anticancer research', *Int J Nanomedicine*, 7: 4391-408.
- Jain, K. K. 2008. 'Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice', *Med Princ Pract*, 17: 89-101.
- Jain, K. K. 2010. 'Advances in the field of nanooncology', *BMC Med*, 8: 83.
- Jenkins, N. C., und Grossman, D. 2013. 'Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species', *Biomed Res Int*, 2013: 908797.
- Jesenak, M., Zelieskova, M., und Babusikova, E. 2017. 'Oxidative Stress and Bronchial Asthma in Children-Causes or Consequences?', *Front Pediatr*, 5: 162.
- Jones, D. P., und Sies, H. 2015. 'The Redox Code', *Antioxid Redox Signal*, 23: 734-46.
- Jorgenson, T. C., Zhong, W., und Oberley, T. D. 2013. 'Redox imbalance and biochemical changes in cancer', *Cancer Res*, 73: 6118-23.
- Karakoti, A. S., Munusamy, P., Hostetler, K., Kodali, V., Kuchibhatla, S., Orr, G., Pounds, J. G., Teegarden, J. G., Thrall, B. D., und Baer, D. R. 2012. 'Preparation and Characterization Challenges to Understanding Environmental and Biological Impacts of Nanoparticles', *Surf Interface Anal*, 44: 882-89.

- Karakoti, A., Singh, S., Dowding, J. M., Seal, S., und Self, W. T. 2010. 'Redox-active radical scavenging nanomaterials', *Chem Soc Rev*, 39: 4422-32.
- Kaufmann, S. H., und Earnshaw, W. C. 2000. 'Induction of apoptosis by cancer chemotherapy', *Exp Cell Res*, 256: 42-9.
- Keibler, M. A., Wasylenko, T. M., Kelleher, J. K., Iliopoulos, O., Vander Heiden, M. G., und Stephanopoulos, G. 2016. 'Metabolic requirements for cancer cell proliferation', *Cancer Metab*, 4: 16.
- Keizer, H. G., Pinedo, H. M., Schuurhuis, G. J., und Joenje, H. 1990. 'Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity', *Pharmacol Ther*, 47: 219-31.
- Kelley, E. E., Khoo, N. K., Hundley, N. J., Malik, U. Z., Freeman, B. A., und Tarpey, M. M. 2010. 'Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase', *Free Radic Biol Med*, 48: 493-8.
- Kerscher, Martina. 2009. 'Dermatokosmetik' *Steinkopf Verlag*: Darmstadt.
- Khosravi-Far, R., und Esposti, M. D. 2004. 'Death receptor signals to mitochondria', *Cancer Biol Ther*, 3: 1051-7.
- Klemm, F., und Joyce, J. A. 2015. 'Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer', *Trends Cell Biol*, 25: 198-213.
- Klingberg, F., Hinz, B., und White, E. S. 2013. 'The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis', *J Pathol*, 229: 298-309.
- Knasmüller, Siegfried. 2014. 'Krebs und Ernährung' *Thieme Verlage*: Stuttgart.
- Kobayashi, S., Volden, P., Timm, D., Mao, K., Xu, X., und Liang, Q. 2010. 'Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death', *J Biol Chem*, 285: 793-804.
- Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., und Self, W. T. 2007. 'Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles', *Chem Commun (Camb)*: 1056-8.
- Kroschinsky, F., Stolzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., Schellongowski, P., Intensive Care in, Hematological, und Oncological Patients Collaborative, Group. 2017. 'New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management', *Crit Care*, 21: 89.

- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-5.
- Laval, J. 1996. 'Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress', *Pathol Biol (Paris)*, 44: 14-24.
- Leischner, Hannes. 2017. 'BASICS Onkologie' Elsevier Verlag: München.
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., und Seliger, B. 2015. 'Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells', *Cell Commun Signal*, 13: 39.
- Leonard, S. E., und Carroll, K. S. 2011. 'Chemical 'omics' approaches for understanding protein cysteine oxidation in biology', *Curr Opin Chem Biol*, 15: 88-102.
- Li, B., und Wang, J. H. 2011. 'Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement', *J Tissue Viability*, 20: 108-20.
- Li, Y., Yu, H., Zheng, S., Miao, Y., Yin, S., Li, P., und Bian, Y. 2016. 'Direct Quantification of Rare Earth Elements Concentrations in Urine of Workers Manufacturing Cerium, Lanthanum Oxide Ultrafine and Nanoparticles by a Developed and Validated ICP-MS', *Int J Environ Res Public Health*, 13.
- Liberti, M. V., und Locasale, J. W. 2016. 'The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?', *Trends Biochem Sci*, 41: 211-8.
- Libra, Massimo, Malaponte, Grazia, Navolanic, Patrick M., Gangemi, Pietro, Bevelacqua, Valentina, Proietti, Lidia, Bruni, Bibiana, et al. 2005. 'Analysis of BRAF Mutation in Primary and Metastatic Melanoma', *Cell Cycle*, 4: 1382-84.
- Liddell, J. R., Zwingmann, C., Schmidt, M. M., Thiessen, A., Leibfritz, D., Robinson, S. R., und Dringen, R. 2009. 'Sustained hydrogen peroxide stress decreases lactate production by cultured astrocytes', *J Neurosci Res*, 87: 2696-708.
- Lin, H. P., Lin, C. Y., Hsiao, P. H., Wang, H. D., Jiang, S. S., Hsu, J. M., Jim, W. T., Chen, M., Kung, H. J., und Chuu, C. P. 2013. 'Difference in protein expression profile and chemotherapy drugs response of different progression stages of LNCaP sublines and other human prostate cancer cells', *PLoS One*, 8: e82625.
- Lin, W., Huang, Y. W., Zhou, X. D., und Ma, Y. 2006. 'Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells', *Int J Toxicol*, 25: 451-7.
- Liou, G. Y., und Storz, P. 2010. 'Reactive oxygen species in cancer', *Free Radic Res*, 44: 479-96.

- Liu-Smith, F., Dellinger, R., und Meyskens, F. L., Jr. 2014. 'Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression', *Arch Biochem Biophys*, 563: 51-5.
- Lo Conte, M., und Carroll, K. S. 2013. 'The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation', *J Biol Chem*, 288: 26480-8.
- Löwe, Oliver, Heidler, Juliana, Wittig, Ilka, Rezende, Flavia, Moll, Franziska, Schröder, Katrin, und Brandes, Ralf P. 2017. 'P 056 - Novel redox-targets of NADPH oxidase 4 identified by the BIAM switch assay', *Free Radical Biology and Medicine*, 108: S36.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J. 1951. 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *J Biol Chem*, 193: 265-75.
- Lu, H., Forbes, R. A., und Verma, A. 2002. 'Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis', *J Biol Chem*, 277: 23111-5.
- Lubos, E., Loscalzo, J., und Handy, D. E. 2011. 'Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities', *Antioxid Redox Signal*, 15: 1957-97.
- Lucas, D. T., und Szweda, L. I. 1998. 'Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 510-4.
- Ludovico, P., und Burhans, W. C. 2014. 'Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police', *FEMS Yeast Res*, 14: 33-9.
- Manda, Gina, Nechifor, Marina Tamara, und Neagu, Teodora-Monica. 2009. 'Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies', *Current Chemical Biology*, 3: 22-46.
- Mar, P. K., Roy, P., Yin, H. L., Cavanagh, H. D., und Jester, J. V. 2001. 'Stress fiber formation is required for matrix reorganization in a corneal myofibroblast cell line', *Exp Eye Res*, 72: 455-66.
- Marshall, H. E., Merchant, K., und Stamler, J. S. 2000. 'Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression', *Faseb Journal*, 14: 1889-900.
- Maslinska, D. 2003. '[Apoptosis: physiological cell death and its role in pathogenesis of diseases]', *Neurol Neurochir Pol*, 37: 315-26.
- Masoud, G. N., und Li, W. 2015. 'HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy', *Acta Pharm Sin B*, 5: 378-89.

- McCourt, C., Dolan, O., und Gormley, G. 2014. 'Malignant melanoma: a pictorial review', *Ulster Med J*, 83: 103-10.
- McDonagh, B., Scullion, S. M., Vasilaki, A., Pollock, N., McArdle, A., und Jackson, M. J. 2016. 'Ageing-induced changes in the redox status of peripheral motor nerves imply an effect on redox signalling rather than oxidative damage', *Free Radic Biol Med*, 94: 27-35.
- Mendelsohn, A. R., und Larrick, J. W. 2014. 'Paradoxical effects of antioxidants on cancer', *Rejuvenation Res*, 17: 306-11.
- Meyskens, F. L., Jr., McNulty, S. E., Buckmeier, J. A., Tohidian, N. B., Spillane, T. J., Kahlon, R. S., und Gonzalez, R. I. 2001. 'Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes', *Free Radic Biol Med*, 31: 799-808.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., und Gianni, L. 2004a. 'Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity', *Pharmacol Rev*, 56: 185-229.
- Minotti, G., Recalcati, S., Menna, P., Salvatorelli, E., Corna, G., und Cairo, G. 2004b. 'Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms', *Methods Enzymol*, 378: 340-61.
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., und Zujko, M. E. 2017. 'Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body', *Adv Med Sci*, 63: 68-78.
- Mittal, S., und Pandey, A. K. 2014. 'Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis', *Biomed Res Int*, 2014: 891934.
- Moll, Ingrid. 2016. 'Duale Reihe Dermatologie ' *Thieme Verlag*: Stuttgart.
- Montero, A. J., Adams, B., Diaz-Montero, C. M., und Gluck, S. 2011. 'Nab-paclitaxel in the treatment of metastatic breast cancer: a comprehensive review', *Expert Rev Clin Pharmacol*, 4: 329-34.
- Moruno-Manchon, J. F., Uzor, N. E., Kesler, S. R., Wefel, J. S., Townley, D. M., Nagaraja, A. S., Pradeep, S., Mangala, L. S., Sood, A. K., und Tsvetkov, A. S. 2016. 'TFEB ameliorates the impairment of the autophagy-lysosome pathway in neurons induced by doxorubicin', *Aging (Albany NY)*, 8: 3507-19.
- Moselhy, H. F., Reid, R. G., Yousef, S., und Boyle, S. P. 2013. 'A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC', *J Lipid Res*, 54: 852-8.

- Mosmann, T. 1983. 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays', *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
- Mühlstädt, Michael. 2014. 'Kurzlehrbuch Dermatologie' *Urban & Fischer Verlag*: München.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., und Hussain, S. M. 2008. 'Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique', *Toxicol Sci*, 101: 239-53.
- Murray, Christopher I., und Van Eyk, Jennifer E. 2012. 'Chasing Cysteine Oxidative Modifications', *Proteomic Tools for Characterizing Cysteine Redox Status*, 5: 591-91.
- Mylonas, C., und Kouretas, D. 1999. 'Lipid peroxidation and tissue damage', *In Vivo*, 13: 295-309.
- Nakajima, H., Amano, W., Fujita, A., Fukuhara, A., Azuma, Y. T., Hata, F., Inui, T., und Takeuchi, T. 2007. 'The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death', *J Biol Chem*, 282: 26562-74.
- Nakajima, H., Itakura, M., Kubo, T., Kaneshige, A., Harada, N., Izawa, T., Azuma, Y. T., Kuwamura, M., Yamaji, R., und Takeuchi, T. 2017. 'Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death', *J Biol Chem*, 292: 4727-42.
- Norton, L. 2014. 'Cancer log-kill revisited', *Am Soc Clin Oncol Educ Book*: 3-7.
- Nosaka, Yoshio, und Nosaka, Atsuko. 2016. 'Understanding Hydroxyl Radical (\bullet OH) Generation Processes in Photocatalysis', *ACS Energy Letters*, 1: 356-59.
- O'Farrell, P. H. 1975. 'High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins', *J Biol Chem*, 250: 4007-21.
- Oberley, T. D., und Oberley, L. W. 1997. 'Antioxidant enzyme levels in cancer', *Histol Histopathol*, 12: 525-35.
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., und Moens, A. L. 2012. 'Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies', *J Mol Cell Cardiol*, 52: 1213-25.
- Otranto, M., Sarrazy, V., Bonte, F., Hinz, B., Gabbiani, G., und Desmouliere, A. 2012. 'The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling', *Cell Adh Migr*, 6: 203-19.

- Pan, J., und Carroll, K. S. 2014. 'Chemical biology approaches to study protein cysteine sulfenylation', *Biopolymers*, 101: 165-72.
- Panieri, E., und Santoro, M. M. 2016. 'ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells', *Cell Death Dis*, 7: e2253.
- Paulsen, C. E., und Carroll, K. S. 2013. 'Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery', *Chem Rev*, 113: 4633-79.
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., et al. 2009. 'The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma', *Cell Cycle*, 8: 3984-4001.
- Peiris-Pages, M., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., und Lisanti, M. P. 2015. 'Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression?', *Cell Metab*, 22: 956-8.
- Pelicano, H., Carney, D., und Huang, P. 2004. 'ROS stress in cancer cells and therapeutic implications', *Drug Resist Updat*, 7: 97-110.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H., und Huang, P. 2006. 'Glycolysis inhibition for anticancer treatment', *Oncogene*, 25: 4633-46.
- Peralta, D., Bronowska, A. K., Morgan, B., Doka, E., Van Laer, K., Nagy, P., Grater, F., und Dick, T. P. 2015. 'A proton relay enhances H₂O₂ sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation', *Nat Chem Biol*, 11: 156-63.
- Pesic, M., Podolski-Renic, A., Stojkovic, S., Matovic, B., Zmejkoski, D., Kojic, V., Bogdanovic, G., et al. 2015. 'Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity', *Chem Biol Interact*, 232: 85-93.
- Pirmohamed, T., Dowding, J. M., Singh, S., Wasserman, B., Heckert, E., Karakoti, A. S., King, J. E., Seal, S., und Self, W. T. 2010. 'Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity', *Chem Commun (Camb)*, 46: 2736-8.
- Pisal, R. V., Hrebikova, H., Chvatalova, J., Kunke, D., Filip, S., und Mokry, J. 2016. 'Detection of Mycoplasma Contamination Directly from Culture Supernatant Using Polymerase Chain Reaction', *Folia Biol (Praha)*, 62: 203-06.
- Pitot, H. C. 1993. 'The molecular biology of carcinogenesis', *Cancer*, 72: 962-70.
- Popov, A. L., Popova, N. R., Selezneva, II, Akkizov, A. Y., und Ivanov, V. K. 2016. 'Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 68: 406-13.

- Porstmann, T., Ternynck, T., und Avrameas, S. 1985. 'Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response', *J Immunol Methods*, 82: 169-79.
- Pulido-Reyes, G., Rodea-Palomares, I., Das, S., Sakthivel, T. S., Leganes, F., Rosal, R., Seal, S., und Fernandez-Pinas, F. 2015. 'Untangling the biological effects of cerium oxide nanoparticles: the role of surface valence states', *Sci Rep*, 5: 15613.
- Ramos, M. C., Steinbrenner, H., Stuhlmann, D., Sies, H., und Brenneisen, P. 2004. 'Induction of MMP-10 and MMP-1 in a squamous cell carcinoma cell line by ultraviolet radiation', *Biol Chem*, 385: 75-86.
- Rassow, Joachim, Hauser, Karin, Netzker, Roland, und Deutzmann, Rainer. 2006. 'Duale Reihe Biochemie' *Thieme Verlag*: Stuttgart.
- Reczek, C. R., und Chandel, N. S. 2015. 'ROS-dependent signal transduction', *Curr Opin Cell Biol*, 33: 8-13.
- Reddie, K. G., und Carroll, K. S. 2008. 'Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation', *Curr Opin Chem Biol*, 12: 746-54.
- Reinhardt, K., und Winkler, H. 2000. 'Cerium Mischmetal, Cerium Alloys, and Cerium Compounds in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry' *Wiley-VCH Verlag*: Weinheim.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., und Minor, L. 2004. 'Cell Viability Assays.' in Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T. D. Y., Dahlin, J. L., Devanaryan, V., Foley, T. L., Glicksman, M., Hall, M. D., Hass, J. V., Inglese, J., Iversen, P. W., Kahl, S. D., Kales, S. C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Trask, O. J., Jr., Weidner, J. R., Xia, M. und Xu, X. (eds.), *Assay Guidance Manual* (Bethesda (MD)).
- Rivera, M., Rosello-Lleti, E., Garcia de Burgos, F., Bertomeu, V., Paya, R., Cortes, R., Martinez-Dolz, L., et al. 2006. '[8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation in patients with heart failure]', *Rev Esp Cardiol*, 59: 1140-5.
- Sack-Zschauer, M., Bader, S., und Brenneisen, P. 2017a. 'Cerium Oxide Nanoparticles as Novel Tool in Glioma Treatment: An *In vitro* Study', *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 8: 1-9.
- Sack-Zschauer, M., Karaman-Aplak, E., Wyrich, C., Das, S., Schubert, T., Meyer, H., Janiak, C., Seal, S., Stahl, W., und Brenneisen, P. 2017b. 'Efficacy of Different Compositions of Cerium Oxide Nanoparticles in Tumor-Stroma Interaction', *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 13: 1-12.

- Sack, M., Alili, L., Karaman, E., Das, S., Gupta, A., Seal, S., und Brenneisen, P. 2014. 'Combination of conventional chemotherapeutics with redox-active cerium oxide nanoparticles--a novel aspect in cancer therapy', *Mol Cancer Ther*, 13: 1740-9.
- Sakuma, S., Abe, M., Kohda, T., und Fujimoto, Y. 2015. 'Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2', *J Clin Biochem Nutr*, 56: 15-9.
- Sampson, N., Berger, P., und Zenzmaier, C. 2014. 'Redox signaling as a therapeutic target to inhibit myofibroblast activation in degenerative fibrotic disease', *Biomed Res Int*, 2014: 131737.
- Santi, A., Kugeratski, F. G., und Zanivan, S. 2017. 'Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodelling', *Proteomics*.
- Sapone, A., Affatato, A., Canistro, D., Broccoli, M., Trespidi, S., Pozzetti, L., Biagi, G. L., Cantelli-Forti, G., und Paolini, M. 2003. 'Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice', *Mutat Res*, 527: 67-80.
- Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J. J., Halpern, A., Herlyn, M., et al. 2015. 'Melanoma', *Nat Rev Dis Primers*, 1: 15003.
- Schmidt, M. M., und Dringen, R. 2009. 'Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes', *Front Neuroenergetics*, 1: 1.
- Schmitt, G. 1999. 'Onkologie systematisch - Diagnostik und interdisziplinäre Therapie maligner Tumoren' *UNI-MED Verlag*: Bremen.
- Schroeder, A., Heller, D. A., Winslow, M. M., Dahlman, J. E., Pratt, G. W., Langer, R., Jacks, T., und Anderson, D. G. 2011. 'Treating metastatic cancer with nanotechnology', *Nat Rev Cancer*, 12: 39-50.
- Schumacker, P. T. 2006. 'Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword', *Cancer Cell*, 10: 175-6.
- Sehgal, A., Lalatonne, Y., Berret, J. F., und Morvan, M. 2005. 'Precipitation-redispersion of cerium oxide nanoparticles with poly(acrylic acid): toward stable dispersions', *Langmuir*, 21: 9359-64.
- Semenza, G. L. 2008. 'Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis', *IUBMB Life*, 60: 591-7.
- Seo, Y. H., und Carroll, K. S. 2009. 'Profiling protein thiol oxidation in tumor cells using sulfenic acid-specific antibodies', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 16163-8.

- Sies, H. 1993. 'Strategies of antioxidant defense', *Eur J Biochem*, 215: 213-9.
- Sies, H. 1997. 'Oxidative stress: oxidants and antioxidants', *Exp Physiol*, 82: 291-5.
- Sies, H. 2014. 'Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress', *J Biol Chem*, 289: 8735-41.
- Sies, H. 2017. 'Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress', *Redox Biol*, 11: 613-19.
- Sies, H., Berndt, C., und Jones, D. P. 2017. 'Oxidative Stress', *Annu Rev Biochem*, 86: 715-48.
- Sies, H., und Cadenas, E. 1985. 'Oxidative stress: damage to intact cells and organs', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 311: 617-31.
- Singh, R., Karakoti, A. S., Self, W., Seal, S., und Singh, S. 2016. 'Redox-Sensitive Cerium Oxide Nanoparticles Protect Human Keratinocytes from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion', *Langmuir*, 32: 12202-11.
- Singh, S., Kumar, A., Karakoti, A., Seal, S., und Self, W. T. 2010. 'Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles', *Mol Biosyst*, 6: 1813-20.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., und Sil, P. C. 2013. 'Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis', *Arch Toxicol*, 87: 1157-80.
- Soma, C. E., Dubernet, C., Barratt, G., Nemati, F., Appel, M., Benita, S., und Couvreur, P. 1999. 'Ability of doxorubicin-loaded nanoparticles to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages', *Pharm Res*, 16: 1710-6.
- Spagnuolo, R. D., Recalcati, S., Tacchini, L., und Cairo, G. 2011. 'Role of hypoxia-inducible factors in the dexrazoxane-mediated protection of cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity', *Br J Pharmacol*, 163: 299-312.
- Srinivasan, S., Guha, M., und Avadhani, N. G. 2016. 'Mitochondrial respiratory defects promote the Warburg effect and cancer progression', *Mol Cell Oncol*, 3: e1085120.
- Stanbridge, E. 1971. 'Mycoplasmas and cell cultures', *Bacteriol Rev*, 35: 206-27.
- Sterry, Wolfram. 2011. 'Kurzlehrbuch Dermatologie' *Thieme Verlag*: Stuttgart.

- Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Raychaudhuri, P., und Bagchi, S. 2009. 'DDB2 (damaged-DNA binding protein 2) in nucleotide excision repair and DNA damage response', *Cell Cycle*, 8: 4067-71.
- Stuhlmann, Dominik, Ale-Agha, Niloofar, Reinehr, Roland, Steinbrenner, Holger, Ramos, Maria C., Sies, Helmut, und Brenneisen, Peter. 2003. 'Modulation of homologous gap junctional intercellular communication of human dermal fibroblasts via a paracrine factor(s) generated by squamous tumor cells', *Carcinogenesis*, 24: 1737-48.
- Sullivan, L. B., und Chandel, N. S. 2014. 'Mitochondrial reactive oxygen species and cancer', *Cancer Metab*, 2: 17.
- Sulthana, S., Banerjee, T., Kallu, J., Vuppala, S. R., Heckert, B., Naz, S., Shelby, T., Yambem, O., und Santra, S. 2017. 'Combination Therapy of NSCLC Using Hsp90 Inhibitor and Doxorubicin Carrying Functional Nanoceria', *Mol Pharm*, 14: 875-84.
- Tannock, I. F., und Rotin, D. 1989. 'Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation', *Cancer Res*, 49: 4373-84.
- Tarnuzzer, R. W., Colon, J., Patil, S., und Seal, S. 2005. 'Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage', *Nano Lett*, 5: 2573-7.
- Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., und Brenner, C. 2007. 'GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization', *Oncogene*, 26: 2606-20.
- Taylor, C. W., und Kirby, A. M. 2015. 'Cardiac Side-effects From Breast Cancer Radiotherapy', *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 27: 621-9.
- Taylor, R. W., und Turnbull, D. M. 2005. 'Mitochondrial DNA mutations in human disease', *Nat Rev Genet*, 6: 389-402.
- Terhorst, Dorothea. 2016. 'BASICS Dermatologie' *Urban & Fischer Verlag*: München.
- Thakor, A. S., und Gambhir, S. S. 2013. 'Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy', *CA Cancer J Clin*, 63: 395-418.
- Tokarska-Schlattner, M., Zaugg, M., Zuppinger, C., Wallimann, T., und Schlattner, U. 2006. 'New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics', *J Mol Cell Cardiol*, 41: 389-405.

- Tse, E. Y., Ko, F. C., Tung, E. K., Chan, L. K., Lee, T. K., Ngan, E. S., Man, K., Wong, A. S., Ng, I. O., und Yam, J. W. 2012. 'Caveolin-1 overexpression is associated with hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis', *J Pathol*, 226: 645-53.
- Turrens, J. F. 2003. 'Mitochondrial formation of reactive oxygen species', *J Physiol*, 552: 335-44.
- Tyrrell, R. M. 2012. 'Modulation of gene expression by the oxidative stress generated in human skin cells by UVA radiation and the restoration of redox homeostasis', *Photochem Photobiol Sci*, 11: 135-47.
- Unfried, Klaus, Albrecht, Catrin, Klotz, Lars-Oliver, Von Mikecz, Anna, Grether-Beck, Susanne, und Schins, Roel P. F. 2007. 'Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms', *Nanotoxicology*, 1: 52-71.
- Uong, A., und Zon, L. I. 2010. 'Melanocytes in development and cancer', *J Cell Physiol*, 222: 38-41.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., und Telser, J. 2007. 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., und Mazur, M. 2006. 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer', *Chem Biol Interact*, 160: 1-40.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., und Thompson, C. B. 2009. 'Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation', *Science*, 324: 1029-33.
- Vaupel, P. 2004. 'The role of hypoxia-induced factors in tumor progression', *Oncologist*, 9 Suppl 5: 10-7.
- Venugopal, J. R., und Ramakrishna, S. 2016. 'Nanotechnology: 21st century revolution in restorative healthcare', *Nanomedicine (Lond)*, 11: 1511-3.
- Verschoor, M. L., Wilson, L. A., und Singh, G. 2010. 'Mechanisms associated with mitochondrial-generated reactive oxygen species in cancer', *Can J Physiol Pharmacol*, 88: 204-19.
- Vogelstein, B., Lane, D., und Levine, A. J. 2000. 'Surfing the p53 network', *Nature*, 408: 307-10.
- Vohr, Hans-Werner. 2010. 'Toxikologie: Band 1: Grundlagen der Toxikologie' *Wiley-VCH Verlag*: Weinheim.

- von Montfort, C., Alili, L., Teuber-Hanselmann, S., und Brenneisen, P. 2015. 'Redox-active cerium oxide nanoparticles protect human dermal fibroblasts from PQ-induced damage', *Redox Biol*, 4: 1-5.
- Vopel, T., und Makhatadze, G. I. 2012. 'Enzyme activity in the crowded milieu', *PLoS One*, 7: e39418.
- Wakamatsu, T. H., Dogru, M., und Tsubota, K. 2008. 'Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases', *Arq Bras Oftalmol*, 71: 72-9.
- Wang, S., Yu, H., und Wickliffe, J. K. 2011. 'Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂', *Toxicol In Vitro*, 25: 2147-51.
- Warburg, O. 1956. 'On the origin of cancer cells', *Science*, 123: 309-14.
- Waris, G., und Ahsan, H. 2006. 'Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions', *J Carcinog*, 5: 14.
- Wason, M. S., Colon, J., Das, S., Seal, S., Turkson, J., Zhao, J., und Baker, C. H. 2013. 'Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production', *Nanomedicine*, 9: 558-69.
- Wason, M. S., und Zhao, J. 2013. 'Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases', *Am J Transl Res*, 5: 126-31.
- Watt, F. M., und Fujiwara, H. 2011. 'Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Werth, C., Stuhlmann, D., Cat, B., Steinbrenner, H., Alili, L., Sies, H., und Brenneisen, P. 2008. 'Stromal resistance of fibroblasts against oxidative damage: involvement of tumor cell-secreted platelet-derived growth factor (PDGF) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation', *Carcinogenesis*, 29: 404-10.
- Whitfield, Pamela, und Mitchell, Lyndon. 2004. 'X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS OF NANOPARTICLES: RECENT DEVELOPMENTS, POTENTIAL PROBLEMS AND SOME SOLUTIONS', *International Journal of Nanoscience*, 03: 757-63.
- Willis, B. C., Liebler, J. M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A. G., Crandall, E. D., du Bois, R. M., und Borok, Z. 2005. 'Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis', *Am J Pathol*, 166: 1321-32.
- Winterbourn, C. C. 1995. 'Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction', *Toxicol Lett*, 82-83: 969-74.

- Wittgen, H. G., und van Kempen, L. C. 2007. 'Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications', *Melanoma Res*, 17: 400-9.
- Wondrak, G. T. 2009. 'Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities', *Antioxid Redox Signal*, 11: 3013-69.
- Xu, Can, und Qu, Xiaogang. 2014. 'Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications', *Npg Asia Materials*, 6: e90.
- Xue, X., und Liang, X. J. 2012. 'Overcoming drug efflux-based multidrug resistance in cancer with nanotechnology', *Chin J Cancer*, 31: 100-9.
- Yaar, M., und Gilchrest, B. A. 2007. 'Photoageing: mechanism, prevention and therapy', *Br J Dermatol*, 157: 874-87.
- Yadav, A., Kumar, B., Yu, J. G., Old, M., Teknos, T. N., und Kumar, P. 2015. 'Tumor-Associated Endothelial Cells Promote Tumor Metastasis by Chaperoning Circulating Tumor Cells and Protecting Them from Anoikis', *PLoS One*, 10: e0141602.
- Yuspa, S. H., Dlugosz, A. A., Cheng, C. K., Denning, M. F., Tennenbaum, T., Glick, A. B., und Weinberg, W. C. 1994. 'Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis', *J Invest Dermatol*, 103: 90S-95S.
- Zhang, J. Y., Zhang, F., Hong, C. Q., Giuliano, A. E., Cui, X. J., Zhou, G. J., Zhang, G. J., und Cui, Y. K. 2015. 'Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells', *Cancer Biol Med*, 12: 10-22.
- Zhang, X. D., Deslandes, E., Villedieu, M., Poulain, L., Duval, M., Gauduchon, P., Schwartz, L., und Icard, P. 2006. 'Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro', *Anticancer Res*, 26: 3561-6.
- Zhao, M., Lei, C., Yang, Y., Bu, X., Ma, H., Gong, H., Liu, J., Fang, X., Hu, Z., und Fang, Q. 2015. 'Abraxane, the Nanoparticle Formulation of Paclitaxel Can Induce Drug Resistance by Up-Regulation of P-gp', *PLoS One*, 10: e0131429.
- Zheng, J. 2012. 'Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review)', *Oncol Lett*, 4: 1151-57.
- Zhou, D., Shao, L., und Spitz, D. R. 2014. 'Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells', *Adv Cancer Res*, 122: 1-67.
- Zilles, K., und Tillmann, B. . 2010. 'Anatomie' *Springer Verlag*: Heidelberg.

Zink, Ingmar. 2010. 'Nanopartikel - Lasergenerierte Herstellung keramischer Nanopartikel-Aerosole' *Diplomica Verlag*: Hamburg.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M. J., und Kroemer, G. 2013. 'Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance', *Immunity*, 39: 74-88.

Publikationen

- Sack, M., Alili, L., **Karaman, E.**, Das, S., Gupta, A., Seal, S., und Brenneisen, P. 2014. 'Combination of conventional chemotherapeutics with redox-active cerium oxide nanoparticles--a novel aspect in cancer therapy', *Mol Cancer Ther*, 13: 1740-9.
- Sack-Zschauer, M., **Karaman-Aplak, E.**, Wyrich, C., Das, S., Schubert, T., Meyer, H., Janiak, C., Seal, S., Stahl, W., und Brenneisen, P. 2017b. 'Efficacy of Different Compositions of Cerium Oxide Nanoparticles in Tumor-Stroma Interaction', *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 13: 1-12.

Danksagung

Endlich ist es geschafft, doch an dem guten Gelingen dieser Dissertation waren jede Menge mir nahestehender Menschen beteiligt, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Brenneisen für die Bereitstellung des überaus interessanten Forschungsthemas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und sein Verständnis während dieser lehrreichen Zeit danken. Herzlichen Dank, lieber Peter!

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Andreas Reichert für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können und seine wissenschaftlichen Ratschläge in den Institutsseminaren.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie) bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates und die sehr freundliche Mitbetreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl möchte ich ebenfalls für die vielen konstruktiven Ratschläge und die sehr hilfreichen Ideen danken.

Einen ganz besonderen Dank schulde ich an dieser Stelle Frau Dr. Maren Sack-Zschauer für die ausgezeichnete und sehr freundliche Leitung der Arbeitsgruppe, die guten wissenschaftlichen Ratschläge, ihre aufbauenden Worte und zahlreichen Hilfestellungen während dieser Zeit. Liebe Maren, ohne deine fachliche und nette Betreuung hätte ich es nicht geschafft. Danke, für deine Geduld, die sehr schöne Zeit (v.a. in Andros) und dass du immer für mich da warst. ∞ Dank!

Für die exzellente technische Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die sehr netten, motivierenden Gespräche bedanke ich mich sehr bei Frau Claudia Wyrich. Claudia, du warst immer eine riesige Hilfe! Lieben Dank!

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an den Rest der Arbeitsgruppe: Lisa Scharf und Sabine Siegert für die Hilfsbereitschaft, die lustige Zeit im Büro und Labor, die schöne Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. Dieser Dank gilt natürlich auch den

ehemaligen Ehrenmitgliedern der AG Brenneisen: Christina Behrendt, Matthias Pryzklenk und Sina Bader. Ihr seid die beste Arbeitsgruppe, die man sich wünschen kann!

Weiterhin möchte ich mich bei Peter Graf für seine Unterstützung bei den HPLC-Messungen, sowie Heide Krahl, Tanja Portugall, Andrea Borchardt und Gisela Pansegrau für die Geduld und Hilfe bei diversen (Labor-)fragen danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die schöne gemeinsame Laborzeit danke ich außerdem Carina Kolot.

Ein weiteres großes Dankeschön geht auch an Frau Dr. Claudia von Montfort, die mich v.a. in den letzten Zügen der Arbeit hilfreich unterstützt hat.

Auch den ehemaligen Laborleiterinnen Frau Dr. Lirija Alili (jetzt Joch) und Frau Dr. Silke De Spirt möchte ich mich für die wissenschaftlichen Tipps und Hilfestellungen sowie Thomas Becher für seine wertvolle Hilfe bei immer wieder auftretenden Computerproblemen bedanken.

Laura Winkels danke ich für Ihre Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten sowie die netten Gespräche.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Den allergrößten Dank möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Emine & Hikmet, meiner Schwester Ebru sowie meinem Bruder Emre aussprechen, die immer an mich geglaubt haben und mir so viel ermöglicht haben. Vielen Dank für alles, was ihr für mich getan habt. Eigentlich kann ich euch nicht genug danken... *Sizi çok seviyorum!*

Zu guter letzt: Liebster Said, ohne dich hätte ich es nicht geschafft. Danke für dein Verständnis, deine Unterstützung und deine endloose Geduld, die mir das Anfertigen dieser Arbeit so viel erleichtert haben! *S.S.*

Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht und ich habe bisher keine Promotionsversuche unternommen.

Datum, Ort

Unterschrift

