

Biologische Effekte unterschiedlich stabilisierter Gold-Nanopartikel und inhibitorische Wirkung ausgewählter Gold(III)-Komplexe auf die PARP-Aktivität

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von

Wera Hubele

aus

Schwäbisch Hall

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2019

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 28.01.2020

Wera Hubele

Forscher fanden heraus, sind dann aber wieder reingegangen.

-Unbekannt

*Für
meine Eltern*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	7
2.1 Gold-Nanopartikel.....	7
2.1.1 Medizinische Anwendungen.....	7
2.1.2 Zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln.....	8
2.1.3 Nanopartikel-vermittelte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies.....	9
2.1.4 Toxizität von Gold-Nanopartikeln	12
2.2 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1.....	13
2.2.1 Struktureller Aufbau	14
2.2.2 Poly(ADP-Ribosyl)ierung.....	15
2.2.3 Funktion der PARP-1 in DNA-Reparaturmechanismen.....	15
2.2.4 Beteiligung der PARP-1 an Zelltodmechanismen.....	19
2.2.5 PARP-1-Inhibitoren in der Krebstherapie	19
3 Fragestellung	23
4 Material und Methoden	25
4.1 Allgemeines	25
4.2 Partikelsynthese	25
4.3 Partikelcharakterisierung.....	25
4.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie	26
4.3.2 Hydrodynamische Größenverteilung und Zetapotential.....	26
4.3.3 pH-Wert.....	27
4.3.4 Löslichkeitsuntersuchungen in zellkulturrelevanten Flüssigkeiten.....	27
4.4 Verunreinigung mit Mikroorganismen.....	27
4.5 Bestimmung des Goldgehaltes mittels Atomabsorptionsspektroskopie	28
4.6 Verwendete Gold(III)-Komplexe und Liganden	29
4.7 Zellkulturexperimente	30
4.7.1 Zelllinien und Kultivierung.....	30

4.7.2	Kryokonservierung und Inkulturnahme.....	30
4.7.3	Inkubationen.....	31
4.8	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	32
4.9	Intrazelluläre Kolokalisation von Cit- und Pvp-Au NP in Lysosomen.....	33
4.10	Zelluläre Aufnahme von Cit-, Pvp-Au NP und AuCl ₃	33
4.11	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie	34
4.12	Apoptotische/nekrotische Zellanteile und Zellzyklusphasenverteilung.....	35
4.13	Genexpressionsanalysen	36
4.14	PARYlierungs-Aktivität isolierter PARP-1.....	40
4.15	Bestimmung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenzmethode.....	41
4.16	Quantifizierung von Poly(ADP-Ribose) mittels LC-MS/MS Methode	42
4.17	Western Blot-Analyse der PARP-1.....	44
4.18	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay.....	45
4.19	Statistik	46
5	Ergebnisse und Diskussion	47
5.1	Partikelcharakterisierung.....	47
5.1.1	Transmissionselektronenmikroskopie	47
5.1.2	Hydrodynamische Größenverteilung und Zetapotential.....	49
5.1.3	Löslichkeit von Cit- und Pvp-Au NP in zellkulturrelevanten Flüssigkeiten	53
5.2	Zellkulturuntersuchungen mit Cit-, Pvp-Au NP und AuCl ₃	54
5.2.1	Einfluss auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit	54
5.2.2	Einfluss auf den zellulären ATP-Gehalt.....	56
5.2.3	Generierung reaktiver Sauerstoffspezies	57
5.2.4	Zelluläre Aufnahme	59
5.2.5	Genexpressionsanalyse	65
5.3	Inhibitorische Wirkung ausgewählter Gold(III)-Komplexe auf die PARP-Aktivität.....	73
5.3.1	Untersuchung der PARP-1-Aktivität im subzellulären Testsystem	73
5.3.2	Zelluläre Aufnahme von Auphen und Aubenpy	75

5.3.3	Zytotoxizitätsuntersuchungen	77
5.3.4	Einfluss auf die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierung.....	81
5.3.5	Einfluss auf die DNA-Bindung isolierter PARP-1.....	87
5.3.6	Apoptotische/nekrotische Zellanteile und Zellzyklusphasenverteilung	88
5.3.7	Untersuchung der Spaltung der PARP-1.....	92
5.3.8	Generierung reaktiver Sauerstoffspezies	93
5.3.9	Genexpressionsanalyse	95
6	Zusammenfassende Diskussion	99
7	Literaturverzeichnis	113
8	Abbildungsverzeichnis	129
9	Anhang	133
9.1	Abkürzungsverzeichnis	133
9.2	Verwendete Chemikalien und Instrumente	136
9.2.1	Chemikalien und Kits	136
9.2.2	Antikörper	139
9.2.3	Lösungen und Puffer	139
9.3	Verbrauchsmaterialien	142
9.4	Instrumente und Software	143
9.5	Ergänzende Daten.....	145
9.5.1	Herstellerangaben der Partikelcharakterisierung der Pvp-Au NP	145
9.5.2	Genset der HT RT-qPCR-Methode	146
9.5.3	Ergänzende Daten zur Bestimmung des Goldgehaltes mittels GF-AAS.....	147
9.5.4	Partikelgrößenverteilung von Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS.....	147
9.5.5	Mikroskopische Größenabschätzung der lysosomalen Vesikel	148
9.5.6	Zytotoxizität von tri-Natriumcitrat.....	148
9.5.7	Abtrennung membranständiger Au NP mit einer Ätzlösung.....	149
9.5.8	Zellulärer Goldgehalt nach Inkubation mit Auphen, Aupenpy, Phen und Benpy	150
10	Publikationsliste	151

1 Zusammenfassung

In der modernen Medizin ist der Einsatz Gold-basierter Therapeutika zukunftsweisend für eine Reihe von diagnostischen und therapeutischen Anwendungen. Als Kontrastmittel oder *drug delivery* System wird Gold-Nanopartikeln (Au NP) ein hohes Anwendungspotential v.a. in der Krebsvorsorge und Tumorthherapie zugeschrieben. Basierend auf der Thiolaffinität des Metalls sollen zudem Gold-Komplexe als pharmakologische Inhibitoren spezifischer Proteine mit Zinkfinger-Motiven, wie der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1), eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Fragestellungen bezogen auf die zellulären Effekte von Au NP und Gold(III)-Komplexen bearbeitet.

Bezüglich der nanopartikulären Gold-Form wurde der von Sabella *et al.* (2014) für Au NP postulierte *trojan horse type* Mechanismus untersucht. Der Mechanismus beschreibt die zelluläre Freisetzung reaktiver Ionen aus metallischen NP, die in einer gesteigerten toxischen Wirkung der entsprechenden NP resultiert. Unter Verwendung von Citrat- (Cit) und Polyvinylpyrrolidon (Pvp)-stabilisierten Au NP wurde in zellkulturrelevanten Medien untersucht, ob die Partikellöslichkeit dabei von der Oberflächenmodifizierung abhängig ist. In diesen Untersuchungen konnte kein gelöster Goldanteil nach Inkubation der Cit- und Pvp-Au NP in den unterschiedlichen Medien nachgewiesen werden. In Zellkulturexperimenten wurden weiterführend die zelluläre Aufnahme, die akute und subchronische Zytotoxizität und der Einfluss der Au NP auf das Genexpressionsprofil in HeLa S3-Zellen untersucht. Als Referenz wurden äquivalente Konzentrationen der löslichen Goldverbindung AuCl_3 mitgeführt, um Erkenntnisse über Partikel-vermittelte bzw. über Goldionen-vermittelte Effekte zu gewinnen. Trotz ausgeprägter Goldakkumulation bis zu millimolaren Konzentrationen, wurde ausgehend von den partikulären Komponenten lediglich im Falle der Cit-Au NP ein moderater Einfluss auf den ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen festgestellt. Im Vergleich dazu führte die Exposition mit AuCl_3 im Rahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen konzentrationsabhängig zu deutlichen Effekten auf die getesteten Endpunkte wie der Zellzahl, Koloniebildungsfähigkeit und dem zellulären ATP-Gehalt. Auf funktioneller Ebene wurde für die lösliche Goldkomponente AuCl_3 eine gesteigerte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen, wohingegen von den unlöslichen Cit- und Pvp-Au NP kein ROS-Induktionspotential ausging. In Genexpressionsanalysen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR wurde in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Cit-Au NP kein verändertes Genexpressionsprofil beobachtet. Demgegenüber zeigten sich primär Gene, welche im Rahmen der oxidativen Stressantwort reguliert werden, durch AuCl_3 beeinflusst. Ferner kam es zu einer Induktion von Genen der DNA-Schadensantwort, der Apoptoseregulation und des Fremstoffmetabolismus. Auf Basis der Genexpressionsuntersuchungen wird daher eine Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF- κ B durch AuCl_3 in HeLa S3-Zellen postuliert. Die zytotoxische Wirkung von AuCl_3 in HeLa S3-Zellen wird aufgrund der Untersuchungsergebnisse auf die Induktion von oxidativem Stress zurückgeführt und kann aufgrund der

vergleichenden Untersuchungen mit den biobeständigen Cit- und Pvp-Au NP eindeutig der ionischen Goldspezies zugeordnet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Gold(III)-Komplexe [Au(1,10-Phenanthrolin)Cl₂]Cl (Auphen) und [Au(2-Benzylpyridin)Cl₂] (Aubenpy) und der entsprechenden Liganden 1,10-Phenanthrolin (Phen) und 2-Benzylpyridin (Benpy) auf HeLa S3-Zellen untersucht. Dabei lag der Fokus auf der bislang lediglich in subzellulären Testsystemen beschriebenen inhibitorischen Wirkung der Komplexe auf die PARP-1, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Übertragbarkeit auf ein zelluläres Testsystem überprüft wurde. Der postulierte Wirkmechanismus der Gold-Komplexe beruht dabei auf der Freisetzung der Zinkionen aus den Zinkfinger-Motiven der DNA-Bindungsdomäne der PARP-1 und einem Austausch mit „freien“ bzw. komplexierten Goldionen. Dies führt zur Formierung sogenannter Goldfinger, die eine Deformation dieser Domäne verursachen (Laskay *et al.* 2015, Mendes *et al.* 2011, Wenzel *et al.* 2018).

Zunächst wurde das inhibitorische Potential der Substanzen in einem subzellulären Testsystem mit isolierter PARP-1 untersucht. Die Komplexe Auphen und Aubenpy führten dabei zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der PARP-1-Aktivität im unteren mikromolaren Bereich. Die Liganden Phen und Benpy zeigten in diesem Testsystem keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der isolierten PARP-1. Durch das Herauslösen der Zinkionen aus den Zink-bindenden Domänen der PARP-1 und den Austausch mit Goldionen scheint der Einfluss der Gold(III)-Komplexe zu einer Inhibierung der PARP-1-Aktivität zu führen. Die Liganden hingegen scheinen in den subzellulären Untersuchungen nicht zu einer kompetitiven Chelatierung von Zink aus den entsprechenden Domänen der PARP-1 zu führen und nahmen dadurch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. In den weiterführenden Zellkulturuntersuchungen wurde im Falle des Substanzpaares Auphen und Phen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung mit reduziertem Ribosyladenosin-Gehalt in HeLa S3-Zellen festgestellt. Der Komplex Aubenpy wies in den Zellkulturuntersuchungen im Vergleich zu gleichen Konzentrationen an Auphen ein geringeres Inhibierungspotential der H₂O₂-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf. Die Behandlungen mit dem Liganden Benpy zeigten keine veränderte Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität in HeLa S3-Zellen. Da die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierung auch im Rahmen von Zelltodmechanismen beeinflusst werden kann, wurden weiterführend Experimente in Bezug auf die Aufnahme, Zytotoxizität und Wirkmechanismen der Substanzen in HeLa S3-Zellen durchgeführt. Dabei konnte eine gesteigerte Goldakkumulation nach der Exposition mit Aubenpy im Vergleich zu der Behandlung mit Auphen beobachtet werden. In den Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde jedoch lediglich ausgehend von dem Komplex Auphen und dem Liganden Phen ein Einfluss auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit in HeLa S3-Zellen, in dem für die Inhibitorstudien eingesetzten Konzentrationsbereich, gefunden. Auf funktioneller und transkriptioneller Ebene konnte dem Substanzpaar dabei eine Apoptose-induzierende Wirkung nachgewiesen werden. Aufgrund der vergleichbaren Einflüsse von Auphen und Phen wird dieser Effekt auf den freien Liganden zurückgeführt. Unter Zellkulturbedingungen scheint der Komplex Auphen nicht hinreichend stabil zu sein und könnte folglich

zur Dissoziation des Liganden Phen führen. Auf zellulärer Ebene könnte dieser durch Komplexierung weiterer Metalle zu biologisch aktiven Verbindungen oder einer zellulären Metalldefizienz führen und somit die Zytotoxizität von Auphen und Phen begründen. Eine Spaltung von PARP-1 kann aufgrund der zytotoxischen Wirkung von Auphen und Phen nicht vollständig ausgeschlossen werden. In dem für die Inhibitorstudien gewählten Konzentrationsbereich wiesen der Komplex Aubenpy und der Ligand Benpy keine toxischen Effekte auf HeLa S3-Zellen auf. Eine Metall-spezifische Wirkung der Komplexe konnte jedoch im Rahmen der Genexpressionsanalysen, durch die Induktion des oxidativen Stressgens *HMOX1*, nachgewiesen werden.

In einem weiteren subzellulären Ansatz wurde die Bindung der PARP-1 an spezifische DNA-Oligonukleotide unter dem Einfluss der Gold(III)-Komplexe und der Liganden untersucht. Die Ergebnisse deuten dabei auf eine verminderte DNA-Bindung der PARP-1 nach Inkubation mit Auphen und Aubenpy hin, was auf einer Formierung von Goldfingern in der DNA-Bindungsdomäne basieren und so zu einer Inhibierung des Enzyms führen könnte.

Auf Basis der Untersuchungsergebnisse konnte gezeigt werden, dass reaktive Goldionen aus löslichen Verbindungen wie AuCl_3 im Vergleich zu biobeständigen Cit- und Pvp-Au NP ein gesteigertes toxisches Potential aufweisen. Die Induktion von oxidativem Stress scheint dabei einen möglichen zugrundeliegenden Wirkmechanismus von Goldionen auf zellulärer Ebene darzustellen. Darüber hinaus konnte durch spezifische Gold(III)-Komplexe die PARP-Aktivität zunächst in einem subzellulären Testsystem inhibiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte anschließend der Nachweis der inhibitorischen Wirkung der Komplexe Auphen, Aubenpy und der Liganden Phen und Benpy auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität erstmals in einem zellulären Testsystem. Im Falle des untersuchten Substanzpaares Auphen und Phen zeigte der Ligand dabei keinen Einfluss in den subzellulären Untersuchungen, wohingegen vergleichbare Effekte von Komplex und Ligand in HeLa S3-Zellen beobachtet wurden. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zeigt, dass die Resultate aus subzellulären Untersuchungen aufgrund der Komplexität zellulärer Testsysteme nicht direkt übertragbar sind.

Abstract

Gold based therapeutic substances are promising agents in diagnostic and therapeutic applications in modern medicine. For example, contrast media or drug delivery systems based on gold nanoparticles (Au NP) are providing great potential in cancer prevention and tumor therapy. In addition, based on the thiol affinity of the metal ions, gold complexes are suggested as pharmaceutical inhibitors of proteins with zinc finger motifs, such as poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). In this context the present study focused on different gold nanoparticles and gold (III) complexes with special emphasis on cellular effects.

In case of the nanoparticular form of gold, a trojan horse type mechanism postulated by Sabella *et al.* (2014) for Au NP was investigated. This mechanism describes the cellular release of reactive ions from metallic NP upon endocytosis and processing within the lysosomes, which leads to an increased toxicity of the nanomaterial. Using citrate (Cit) and polyvinylpyrrolidone (Pvp) stabilized Au NP, the impact of these stabilizing agents on the particle solubility in cell culture and physiologically relevant media was investigated. In these studies the Cit- and Pvp-Au NP did not dissolve in the tested media. In cell culture experiments using HeLa S3 cells, the acute and subchronic cytotoxicity of Cit- and Pvp-AuNP and the impact of Cit-Au NP on the gene expression profile was determined. The soluble gold (III) compound AuCl_3 served as reference substance and was used in equivalent concentrations in the experiments, to gain insights about the mediated effects by particles or ions. Despite a high cellular gold accumulation after cellular treatment for 24 h with Cit-, Pvp-Au NP and AuCl_3 , only Cit-Au NP had a moderate effect on the cellular ATP-level. In comparison AuCl_3 exerted concentration-dependent effects on cell viability, colony forming ability and the cellular ATP-level. Furthermore in case of AuCl_3 , an increased generation of ROS was detected whereas Cit- and Pvp-Au NP showed no impact. The gene expression analysis via high-throughput RT-qPCR showed no relevant change in the expression of genes related to stress response and genomic stability in HeLa S3 cells after treatment with the Cit-Au NP. In contrast, after incubation with AuCl_3 predominantly oxidative stress-associated genes were differently expressed. Moreover genes coding for distinct proteins in different DNA repair mechanisms, apoptosis and xenobiotic metabolism were upregulated. As a conclusion from these data the activation of the redox sensitive transcription factors Nrf2 and NF- κ B by AuCl_3 is postulated. The cytotoxicity of AuCl_3 is considered to be oxidative stress-mediated and can clearly be attributed to the ionic species because of the comparative studies with the biopersistent Au NP.

The second part of this study focused on the impact of the gold (III) complexes $[\text{Au}(1,10\text{-phenanthroline})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (Auphen) and $[\text{Au}(2\text{-benzylpyridine})\text{Cl}_2]$ (Aubenpy) and the corresponding ligands 1,10-phenanthroline (Phen) and 2-benzylpyridine (Benpy) in HeLa S3 cells. Here, the inhibitory effects of the substances were tested in subcellular and cellular systems. The postulated mode of action implies the replacement of zinc ions within the zinc finger motifs in the DNA-binding domain of PARP-1 with free or complexed gold ions. This is thought

to lead to the formation of so called goldfingers concomitant with a deformation of the domain (Laskay *et al.* 2015, Mendes *et al.* 2011, Wenzel *et al.* 2018).

In initial studies the inhibitory potential of the substances was investigated in a subcellular system. The gold complexes led to a concentration dependent decrease in PARP-1 activity in the low micromolar concentration range. The corresponding ligands Phen and Benpy showed no impact on the enzymatic activity. The release of zinc ions within the zinc-binding domain and displacement with gold ions appear to be the reason for the inhibition of PARP-1 activity. In contrast, the ligands were not able to compete for the zinc ions via chelation within the zinc-binding domain and had no impact on the PARP-1 activity in the subcellular system. In case of the substances Auphen and Phen an inhibition of H₂O₂-induced poly(ADP-ribosyl)ation-activity and a reduced cellular content of ribosyladenosine was observed in HeLa S3 cells. Auphenpy was less potent to inhibit the H₂O₂-induced poly(ADP-ribosyl)ation in HeLa S3 cells, and Benpy showed no effect at all. Since the cellular poly(ADP-ribosyl)ation can also be impaired by cell death mechanisms, further studies on the uptake, cytotoxicity and the cellular mode of action of the substances were conducted in HeLa S3 cells. Even though a higher cellular gold accumulation in case of the complex Auphenpy was observed when compared to Auphen, it caused no cytotoxic effects, in concentrations used for the studies on PARP activity; the same accounts for the free ligand Benpy. In contrast Auphen showed an impact on cell viability and colony forming ability to the same extent as the corresponding ligand Phen. These effects could be attributed to an induction of apoptosis shown on a functional and transcriptional level. Because of the similar toxicity profile of Auphen and Phen the effects seem to be mediated by the free ligand. The complex Auphen appears to be unstable under cell culture conditions, so that the ligand could dissociate and the chelation of other metals by Phen could then lead to biologically active compounds or a cellular metal deficiency resulting in the observed cytotoxic effects. As a result, it can not be excluded that the inhibitory effect of Auphen and Phen on the poly(ADP-ribosyl)ation activity could be based on apoptosis induction. Regarding the gold complexes Auphen and Auphenpy, a metal specific impact was identified by upregulation of the oxidative stress-related gene *HMOX1*. In a further subcellular experiment the impact of the complexes and ligands on PARP-1 binding to specific DNA-oligonucleotides was investigated. The results indicate a decreased binding of PARP-1 to DNA after incubation with Auphen and Auphenpy showing the potential of these gold (III) complexes to inhibit the enzyme by goldfinger formation in the DNA-binding domain.

Taken together, a higher potential of toxicity mediated by gold ions from water soluble compounds like AuCl₃ compared to biopersistent Cit- and Pvp-Au NP was demonstrated. In this context the induction of oxidative stress appears to be an underlying mechanism for the cytotoxicity of gold ions. Furthermore, the PARP activity could be inhibited in a subcellular and cellular test system by specific gold complexes. Within the framework of this dissertation the inhibitory impact of the complexes Auphen, Auphenpy and the ligands Phen and Benpy on the poly(ADP-ribosyl)ation was shown for the first time on a cellular level. In case of Auphen and Phen the

ligand showed no effects on a subcellular level, whereas in HeLa S3 cells similar effects mediated by the complex and ligand could be detected. The different effects indicate that results from subcellular systems cannot be transferred directly to cellular conditions.

2 Einleitung

2.1 Gold-Nanopartikel

Der Einsatz Gold-basierter Nanopartikel ist für diverse medizinische Anwendungen zukunftsweisend und reicht von diagnostischen Verfahren bis hin zu individuellen Therapiemethoden in der Vorsorge und Behandlung von Krebs. Die spezifischen optoelektronischen Eigenschaften der nanoskaligen Goldpartikel (Au NP) machen sie dabei wertvoll für bildgebende Verfahren und die thermale Krebstherapie. Aufgrund ihrer Oberflächenchemie wird darüber hinaus die Funktionalisierung der Au NP ermöglicht, wodurch sie für eine Vielzahl an biochemischen Anwendungen zugänglich werden.

Unter nanoskaligen Partikeln werden laut ISO alle Materialien zusammengefasst, die eine Oberflächenstruktur oder eine innere bzw. äußere Dimension im Größenbereich von 1-100 nm aufweisen. Die Europäische Kommission empfiehlt zusätzlich unter dem Begriff Nanomaterialien alle Materialien zusammenzufassen, die einen Mindestanteil an 50 % ungebundener, agglomerierter oder aggregierter Partikel enthalten, welche in einer oder mehreren Dimensionen eine Größe zwischen 1 und 100 nm besitzen (zusammengefasst in Laux *et al.* 2018).

2.1.1 Medizinische Anwendungen

Au NP weisen stark größenabhängige optoelektronische Eigenschaften auf. Diese sind auf die Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*; SPR) der Au NP zurückzuführen. Als Oberflächenplasmon wird die kollektive Schwingungsanregung der Leitungselektronen gegen die Atomrümpfe in Metallen bezeichnet. Die Plasmonenresonanz von Au NP erfolgt im sichtbaren Bereich des Lichtes (400-800 nm), woraus sich durch Absorptions- und Streuvorgänge Plasmonenbanden ergeben. Die Banden werden dabei durch das Material, die Größe und Form der NP beeinflusst und verleihen kolloidalen Au NP-Suspensionen eine typisch rote Farbe (zusammengefasst in Amendola *et al.* 2017 und Guo *et al.* 2017). Als Plasmonensensoren finden Au NP deshalb Anwendung in Schwangerschaftstest sowie Schnelltests zum Nachweis von Krankheitserregern wie Salmonellen-, E.coli- und Campylobacter-Bakterien (Guo *et al.* 2011, Oh *et al.* 2017, Peng und Chen 2019, Rojanathanes *et al.* 2008). Durch eine Funktionalisierung mit spezifischen Antikörpern werden die plasmonischen Eigenschaften der Partikel ferner in bildgebenden Verfahren wie der Dunkel- und Hellfeldmikroskopie zur gezielten Detektion von Krebszellen genutzt (Huang *et al.* 2007, Qian *et al.* 2010). In einem therapeutischen Ansatz soll zudem der SPR-Effekt der Au NP zur photothermalen Therapie von Tumorgewebe genutzt werden. Unter Einsatz gepulster Laser im nahen Infrarotbereich (NIR) (650 - 900 nm) absorbieren größen- und formspezifische Au NP Licht dieser Wellenlänge, welches in Form von Wärmeenergie wieder freigesetzt wird. Die lokale Überhitzung könnte so zur Behandlung solider Tumore genutzt werden (Dickerson *et al.* 2008, Lu *et al.* 2009).

Bei der Gestaltung von Medikament-Vehikeln zur effizienten, spezifischen und minimal-invasiven Behandlung von Tumorerkrankungen kommt den Au NP als *drug delivery system* ein vermehrtes Interesse zu. Aufgrund ihrer einfachen Synthese und Funktionalisierung über Thiol- oder Amingruppen werden eine Reihe spezifischer Au NP in klinischen Studien auf ihre pharmakologische Wirksamkeit getestet (zusammengefasst in Singh *et al.* 2018). Ein Konzept sieht dabei die zielgenaue Medikamentenfreisetzung im Tumorgewebe vor. Die gesteigerte Angiogenese, die erhöhte Fenestrierung des Endothels und ein mangelhaftes Lymphdrainagesystem des Tumorgewebes fördern dabei die Akkumulation der NP. Gekoppelte tumorspezifische Biomarker wie Antikörper steigern zusätzlich die Präzision. Die gezielte Freisetzung der Pharmaka führt so zu erhöhten Konzentrationen und einer gesteigerten Wirkung im Tumorgewebe (Chen *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011). Ein weiterer Grund für das wachsende Interesse an Au NP ist ihr verstärktes elektrisches Nahfeld, wodurch sich nützliche optische Effekte in den direkt umliegenden Molekülen oder Materialien ergeben wie z.B. der Raman-Streuung (*surface enhanced raman scattering*; SERS). In diagnostischen Verfahren wird die durch Au NP oberflächenverstärkte Raman-Streuung v.a. in Einzelzellstudien in der Krebsforschung angewandt. Ferner können unter der Anwendung von Au NP weitere Methoden zur Einzelmolekül-Detektion abgeleitet werden (zusammengefasst in Lee *et al.* 2013).

2.1.2 Zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln

Der zelluläre Hauptaufnahmeweg Metall-basierter NP stellt die energieabhängige Internalisierung über Endozytose dar. Die Aufnahmemechanismen variieren dabei je nach Material, Größe, Form und Oberflächenmodifikation der NP und sind darüber hinaus zelllinienabhängig.

Die Mechanismen der Endozytose lassen sich zunächst in Phago- und Pinozytose einteilen. Die Phagozytose wird dabei überwiegend spezialisierten Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen oder Monozyten, zugesprochen. Im Zuge der Opsonisierung der NP führt eine spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu einer Signalkaskade, die eine Reorganisation der Aktinfilamente auslöst und zur Internalisierung der Partikel führt. Über Phagozytose werden überwiegend Bakterien und größere Partikel ($> 0,5 \mu\text{M}$) aufgenommen. Die Pinozytose umfasst die Mechanismen Clathrin- bzw. Caveolae-vermittelte Endozytose, Makropinozytose und Clathrin/Caveolae-unabhängige Endozytose. Die Clathrin-vermittelte Endozytose dient überwiegend der Aufnahme von Nährstoffen und Membrankomponenten und kann rezeptorabhängig und -unabhängig initiiert werden. In Clathrin-reichen Bereichen der Zellmembran kommt es durch Rekrutierung von Adapter- und Hilfsproteinen zu einer Stabilisierung der Membraneinstülpung und letztlich zur Vesikelabschnürung unter Beteiligung von Dynamin. Die bis zu 200 nm großen Vesikel verschmelzen intrazellulär mit weiteren Vesikeln und werden durch V-Typ-ATPasen zu sauren Zellkompartimenten, den Lysosomen, prozessiert (zusammengefasst in Behzadi *et al.* 2017 und Mindell 2012).

In Glykosphingolipid- und Cholesterol-reichen Membranbereichen kommt es unter Beteiligung der strukturgebenden Proteine Caveolin-1 und -2 zu flaschenförmigen Einstülpungen. Wie bei der

Clathrin-vermittelten Endozytose verläuft die Vesikelabschnürung (50-80 nm) Dynamin-abhängig. Ob die Initiation der Internalisierung rezeptorvermittelt abläuft ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Die Caveolae-vermittelte Endozytose ist u.a. an der Regulation des Lipid- und Fettsäure-Metabolismus beteiligt. Im Zuge dieses Aufnahmemechanismus kann der endolysosomale Abbau teilweise umgangen werden (zusammengefasst in Canton und Battaglia 2012).

Die Makropinozytose verläuft teilweise Rezeptor-unabhängig, wird durch das Strukturprotein Aktin reguliert und stellt einen wichtigen Mechanismus zur Antigenpräsentation im Rahmen einer Immunantwort dar. Aus diesem Prozess gehen bis zu 5 µm große Vesikel hervor, weshalb diesem Endozytosemechanismus eine entscheidende Rolle bei der Internalisierung großer Partikel zugesprochen wird.

Über Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytosemechanismen erfolgt u.a. die Aufnahme von Flüssigkeiten und Wachstumshormonen (zusammengefasst in Behzadi *et al.* 2017).

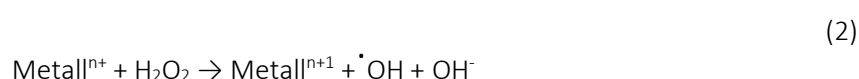
Nach zellulärer Aufnahme werden die beladenen Vesikel lysosomal abgebaut. Im Falle Metall-basierter NP kann der erniedrigte pH-Wert von ~4,5 zu einer gesteigerten Löslichkeit der Partikel führen. Dabei unterscheidet sich die biologische Aktivität unlöslicher bzw. löslicher NP deutlich und damit auch die zellulären Wirkmechanismen. Die Freisetzung reaktiver Metallionen aus löslichen NP resultiert in einer zellulären Überladung und induziert eine Reihe von toxischen Effekten wie z.B. oxidativen Stress. Über direkte oder indirekte Mechanismen können die „freien“ Metallionen zu einer Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen. Diese können zu einer Schädigung von zellulären Makromolekülen wie DNA, Proteinen und Lipiden führen. Dieser sogenannte *trojan horse type* Mechanismus ist für einige Metall-NP, u.a. Kupferoxid NP oder Silber NP, bereits nachgewiesen und trägt maßgeblich zu deren toxischen Wirkung bei (Cronholm *et al.* 2013, Park *et al.* 2010, Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017). Auch für Au NP wurde dieser Mechanismus bereits postuliert (Sabella *et al.* 2014).

2.1.3 Nanopartikel-vermittelte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Bioverfügbarkeit Metall-basierter NP hängt stark von der Löslichkeit der entsprechenden NP ab. Die Freisetzung reaktiver Metallionen in lysosomalen Kompartimenten von Zellen dominiert dabei das toxikologische Profil löslicher NP wie z.B. Kupferoxid NP. Die Generierung von ROS durch Metallionen stellt dabei einen grundlegenden Mechanismus der toxischen Wirkung der entsprechenden Metalle sowie in der Ätiologie Metall-induzierter Krankheiten dar. Demgegenüber bestimmen Oberflächen-vermittelte Effekte die biologische Aktivität unlöslicher NP wie z.B. Titandioxid NP, welche ebenfalls zur Induktion von oxidativem Stress führen können (Donaldson *et al.* 2008, Sager und Castranova 2009).

Als *second messenger* kommen ROS unter physiologischen Bedingungen wichtige Funktionen bei der zellulären Signalübertragung redoxsensitiver Prozesse zu. Durch Oxidation redoxsensitiver Strukturen wie z.B. Thiolgruppen bestimmter Proteine oder Transkriptionsfaktoren erfolgt die Signalweiterleitung, welche u.a. im Rahmen der Zellproliferation, der DNA-Schadensantwort und antioxidativen Schutzmechanismen gesteuert

werden. Eine Dysregulation dieser Prozesse und ein gesteigertes Level an ROS kann jedoch zu einer Schädigung zellulärer Makromoleküle wie DNA, Proteine oder Lipide und so zum Zelltod führen. Die Generierung von ROS kann dabei über verschiedene Mechanismen verlaufen. Die Haber-Weiss (1) und Fenton-Reaktion (2) stellen für redoxaktive Metalle wie Chrom (Cr(III), (V)), Cobalt (Co(II)), Eisen (Fe(II)) und Kupfer (Cu(I)) direkte Mechanismen zur Generierung von ROS dar. Die Generierung von ROS wird dabei von der Ionenspezies der entsprechenden Metalle vermittelt und spielt eine relevante Rolle bei der Induktion von oxidativem Stress durch entsprechende Metallverbindungen und lösliche Metall-basierte NP (zusammengefasst in Lee *et al.* 2012 und Ray *et al.* 2012).



Ferner können indirekte Mechanismen wie die Interaktion mit zellulären antioxidativen Schutzmechanismen zu einer Induktion von oxidativem Stress führen. Diesbezüglich steht beispielsweise die Kanzerogenität von Cadmium im Zusammenhang mit einer gesteigerten ROS-Generierung durch die Hemmung antioxidativer Verbindungen und detoxifizierender Proteine (zusammengefasst in Hartwig 2013). Die Inhibierung der Thioredoxinreduktase spielt ferner bei der Induktion oxidativer Zellschäden durch eine Reihe von Goldverbindungen eine Rolle (Altaf *et al.* 2017, Marzano *et al.* 2007).

Im Falle schwerlöslicher und inerte NP können Oberflächen-vermittelte Effekte wie die Adsorption von Biomolekülen zu einer zellulären Stressantwort führen. Au NP können dabei durch Adsorption von Glutathion zu einer zellulären Depletion des Antioxidans führen und darüber eine ROS-Generierung begünstigen (Gao *et al.* 2011, Mateo *et al.* 2015). Im Falle der unlöslichen Titandioxid NP kann es zudem unter Einfluss von UV-Strahlung zu einer photokatalysierten Generierung von ROS kommen (zusammengefasst in Kwon *et al.* 2008, Zhong *et al.* 2017).

Ein Überblick über die verschiedenen Endozytosemechanismen und eine schematische Darstellung der möglichen Mechanismen der ROS-Generierung durch Metall-basierte NP ist in Abbildung 1 aufgezeigt.

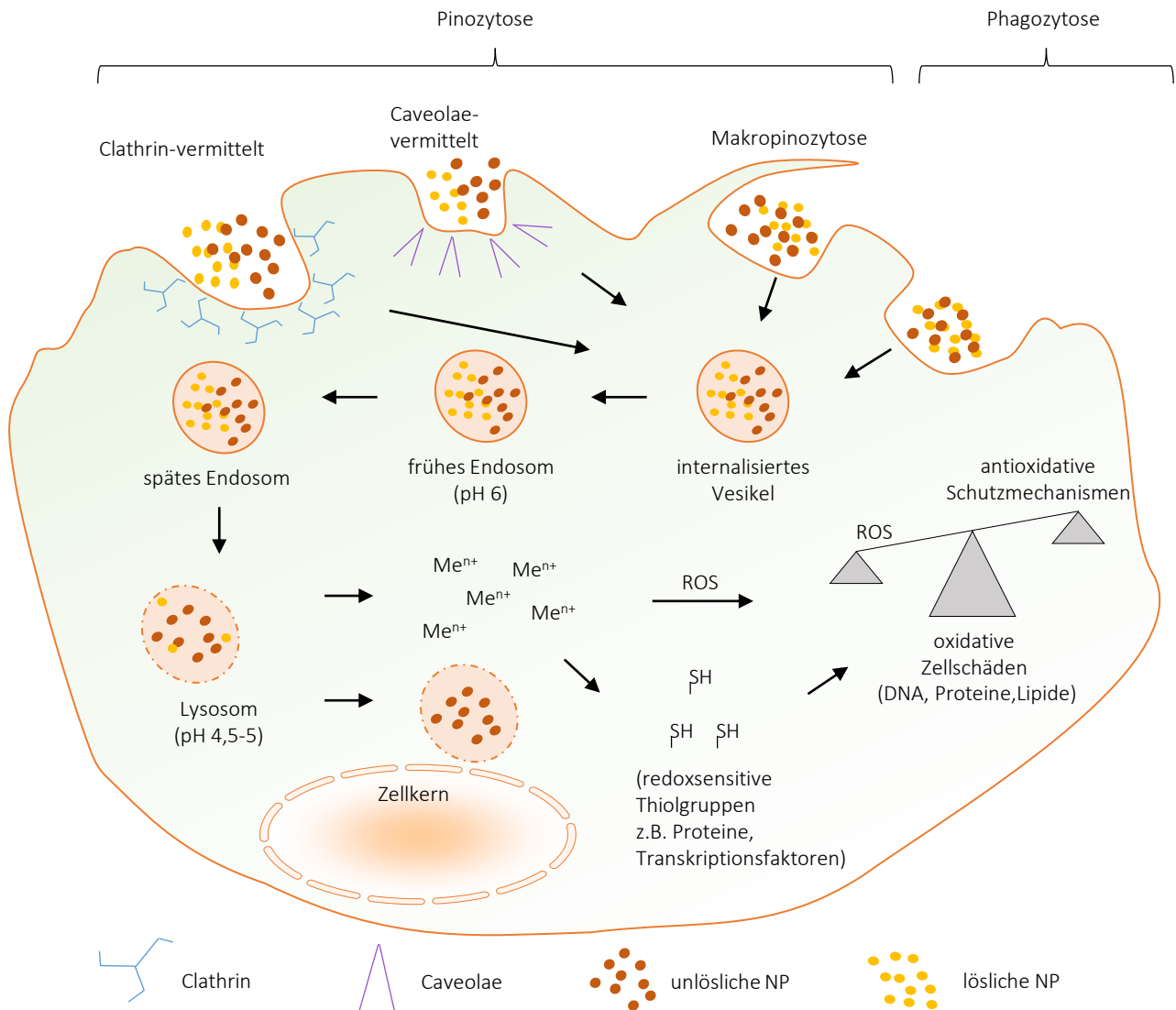


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Endozytosemechanismen und der intrazellulären Prozessierung der internalisierten Partikel sowie mögliche Mechanismen der ROS-Generierung durch lösliche und unlösliche Metall-basierte Nanopartikel. Abhängig von den physikochemischen Eigenschaften können Metall-basierte NP über die Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose, die Makropinozytose oder die Phagozytose aufgenommen werden. Intrazellulär werden die Partikel-enthaltenden Vesikel von Endosomen (~pH 6) zu Lysosomen (~pH 4,5) prozessiert. Aufgrund des sauren pH-Wertes in den Organellen kann es zu einer gesteigerten Löslichkeit der Metall-basierten NP kommen, wodurch reaktive Metallionen (Meⁿ⁺) freigesetzt werden. Über direkte und indirekte Mechanismen können diese zur Generierung von ROS führen. Unlösliche Partikel können durch Oberflächen-vermittelte Mechanismen ebenfalls zu einer Induktion von oxidativem Stress führen (modifiziert nach Behzadi *et al.* 2017 und Oh und Park 2014).

2.1.4 Toxizität von Gold-Nanopartikeln

Eine große Anzahl an Studien befasst sich mit der toxikologischen Evaluierung von Au NP in biologischen Systemen. Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse sind jedoch kontrovers diskutiert, zumal die Versuchsbedingungen der Experimente zahlreiche Variationen aufweisen. In diesem Zusammenhang konnten verschiedene Arbeitsgruppen, im Rahmen von Zellkulturuntersuchungen, toxische Effekte nach Inkubation mit Cit-Au NP feststellen (Bajak *et al.* 2015, Choi *et al.* 2012, Choudhury *et al.* 2013). Demgegenüber stehen weitere Studien, die keine zytotoxische Wirkung nach Exposition mit Cit- und Pvp-Au NP nachweisen konnten (Connor *et al.* 2005). Im Folgenden Kapitel wird ein Überblick über die Literaturdaten zur Toxikologie von Au NP gegeben.

Die Toxizität sphärischer AuNP ist abhängig von der Größe und Oberflächenmodifikation und ist darüber hinaus zelllinienspezifisch. Die zelluläre Aufnahme der Au NP erfolgt dabei meist über Endozytose (Chithrani und Chan 2007, Ng *et al.* 2015, Wang *et al.* 2010). Diesbezüglich zeigte sich im Vergleich zu 30 nm großen Au NP eine gesteigerte Aufnahme 5 nm großer Au NP in Caco-2 Zellen (Bajak 2014). Auch weitere Studien konnten in Zellkulturuntersuchungen eine größenabhängige Akkumulation von Au NP nachweisen (Arnida *et al.* 2010, Chithrani *et al.* 2006). Zudem scheinen sterische Stabilisierungsagenzien wie Polyethylenglycol die Interaktion mit der Zellmembran zu vermindern wodurch es zu einer geringeren Aufnahme dieser Partikel kommt (Arnida *et al.* 2010, Hamblin *et al.* 2003). Ferner wurde in einer Reihe von Studien die Oberflächenchemie als grundlegender Einflussfaktor der Toxizität der Au NP beschrieben (Chandran *et al.* 2017, Chen und Gao 2017, Cho *et al.* 2009, Fraga *et al.* 2013). In diesem Zusammenhang wies die Forschungsgruppe um Pan *et al.* (2009) eine deutlich verstärkte zytotoxische Wirkung von Triphenylphosphin-monosulfat stabilisierten (TPPMS) Au NP, im Vergleich zu Glutathion-funktionalisierten Au NP, in HeLa Zellen nach. Die Wirkmechanismen der TPPMS Au NP werden auf eine Induktion von oxidativem Stress zurückgeführt. Eine Veränderung des zellulären Redoxstatus wurde auch unter Verwendung von Cit-Au NP verzeichnet. Die hohe Thiolaffinität der Au NP führt dabei zu einer Depletion des Antioxidans Glutathion (Gao *et al.* 2011). Weitere Studien bestätigen ein gesteigertes zelluläres Level an ROS sowie die Induktion von Genen, welche mit oxidativem Stress assoziiert sind, unter Verwendung unterschiedlich oberflächenmodifizierter Au NP. Dabei wurde mehrfach eine Schädigung der Mitochondrien und die Induktion von Apoptose beobachtet (Li *et al.* 2011, Mateo *et al.* 2014, Noel *et al.* 2016, Pan *et al.* 2009, Sabella *et al.* 2011). Eine Reihe von Studien sprechen zudem verschiedenen Au NP, durch Nachweis von DNA-Schäden, ein genotoxisches Potential zu (Di Bucchianico *et al.* 2014, Li *et al.* 2011, Paino *et al.* 2012, Xia *et al.* 2017). Auch hier werden die Effekte mit oxidativem Stress assoziiert.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss verschiedener Au NP in Tierversuchen untersucht. Nach intravenöser Verabreichung von Cit-Au NP kam es zu einer gesteigerten Akkumulierung der Au NP u.a. in der Galle und der Leber von Ratten. Dabei konnte keine akute und subchronische Toxizität beobachtet werden

(Rambanapasi *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2010). Im Rahmen von Genexpressionsuntersuchungen in den Geweben der Galle und Leber wies jedoch eine weitere Studie eine veränderte Expression von Fremdstoff- und Lipidmetabolismus-assoziierten Genen nach (Balasubramanian *et al.* 2010).

2.2 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1

Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen zählen zur Gruppe der ADP-Ribosyltransferasen, mit vielfältigen zellulären Funktionen. Die Proteinfamilie katalysiert unter Verbrauch von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) die Übertragung von Ribosyladenosineinheiten auf Akzeptorproteine. Dieser Prozess findet überwiegend im Zellkern statt. Dabei kommt es je nach PARP-Enzym zu einer Mono-, Oligo-, oder Poly(ADP-Ribosyl)ierung (PARylierung). In humanen Zellen ist die PARP-1 für bis zu 90 % der PARylierungs-Aktivität verantwortlich (Bai 2015).

Der PARP-1 kommen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch im Rahmen einer zellulären Stressantwort essentielle Funktionen zum Erhalt der genomischen Stabilität zu. Dazu zählen Prozesse im Zuge verschiedener DNA-Reparatur- und Zelltodmechanismen, der Chromatin-Remodellierung und der Transkriptionsregulation. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung verschiedener Akzeptorproteine (Heteromodifikation) und der PARP-1 selbst (Automodifikation) vermittelt dabei die Aktivierung bzw. Rekrutierung weiterer Proteine. Diverse Proteine können ferner direkt mit der PARP-1 interagieren. Ein Überblick über die biochemischen Funktionen der PARP-1 ist in Abbildung 2 dargestellt.

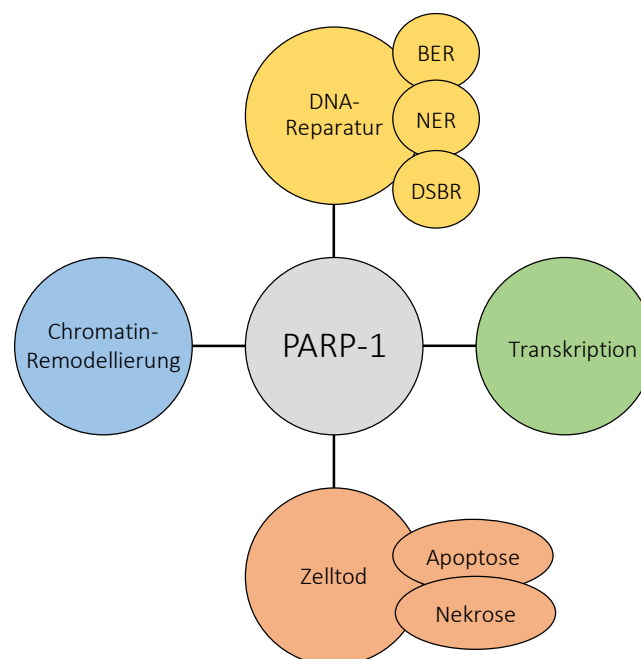


Abbildung 2: Überblick über die biochemischen Funktionen der PARP-1. Zu den zellulären Prozessen an denen die PARP-1 beteiligt ist zählen verschiedene DNA-Reparaturmechanismen (Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Doppelstrangbruchreparatur-Mechanismen (DSBR)), Zelltodmechanismen, die Chromatin-Remodellierung und die Transkriptionsregulation. Die Auto- und Heteromodifikation vermittelt dabei die Aktivierung bzw. Rekrutierung von Proteinen (modifiziert nach Swindall *et al.* 2013).

2.2.1 Struktureller Aufbau

Das aus 1014 Aminosäuren aufgebaute Enzym PARP-1 hat eine Molekularmasse von 113 kDa. Strukturell kann das Enzym in sechs Domänen unterteilt werden, die für die verschiedenen Funktionen der PARP-1 relevant sind. In Abbildung 3 ist der strukturelle Aufbau der PARP-1 dargestellt.

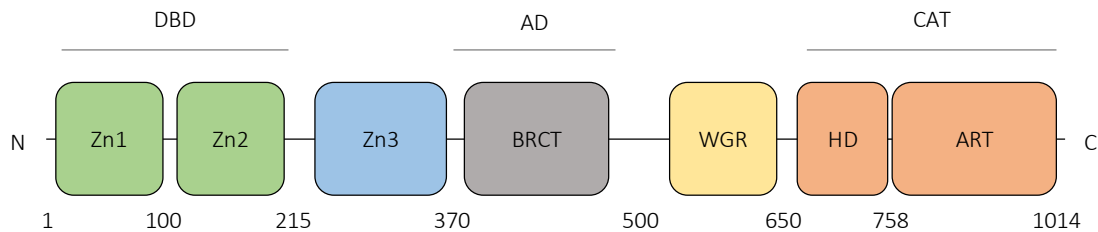


Abbildung 3: Struktureller Aufbau der PARP-1. Dargestellt sind die DNA-Bindungsdomäne (DBD) mit den Zinkfingern Zn1 und Zn2 und einem dritten Zinkfinger-Motiv Zn3. Die Automodifikationsdomäne (AD) weist ein BRCT-Element auf welches im Rahmen der Automodifikation PARyliert wird. Der WGR-Abschnitt weist einen hohen Anteil der Aminosäuren Tryptophan, Glycin und Arginin auf. Die katalytische Domäne (CAT) setzt sich aus der helikalen (HD) und der ADP-Ribosyl-Transferasen (ART)-Domäne zusammen (modifiziert nach Langelier *et al.* 2012).

Am N-terminalen Ende befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus zwei Zinkfinger-Motiven (Zn1, Zn2) und einer Kernlokalisierungssequenz. Die Zinkionen sind dabei von drei Cysteinen und einem Histidin (C_3H_1) komplexiert. Die Zinkfinger-Motive Zn1 und Zn2 sind essentiell für die DNA-Schadenserkennung und DNA-Bindung der PARP-1, wohingegen Zn3 (C_4) als Kommunikationselement der verschiedenen PARP-1-Domänen und bei der Aktivierung des Enzyms eine Rolle zu spielen scheint (zusammengefasst in Langelier und Pascal 2013). Die Automodifikationsdomäne (AD) enthält eine Vielzahl an Glutaminsäure-Resten, an denen im Falle einer DNA-Schädigung die Auto-PARYlierung des Enzyms stattfindet. Das *breast cancer susceptibility protein C terminus*-Element (BRCT-Element) der Domäne trägt zudem zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen bei (Loeffler *et al.* 2011). Der WGR-Domäne, reich an Tryptophan, Glycin und Arginin, kommt eine Kommunikationsfunktion zwischen den einzelnen Domänen des Enzyms und bei der Interaktion mit der DNA zu (zusammengefasst in Langelier und Pascal 2013). Die katalytische Domäne am C-Terminus des Enzyms kann weiter in die helikale Domäne (HD) mit sechs α -Helices und die ADP-Ribosyltransferasen (ART)-Domäne unterteilt werden. Die HD reguliert dabei die Aktivität der PARP-1 durch Destabilisierung der helikalen Struktur (Langelier *et al.* 2012). In der ART-Domäne erfolgt die Bindung des Substrates NAD^+ und die Katalyse der Poly(ADP-Ribosyl)ierung (zusammengefasst in Langelier und Pascal 2013).

2.2.2 Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Die Aktivierung der PARP-1 wird durch DNA-Strangbrüche induziert, welche u.a. im Rahmen von oxidativem Stress, der Replikation oder von DNA-Reparaturmechanismen entstehen können. Die Erkennung der Strangbrüche und die DNA-Bindung erfolgt mit den Zinkfinger-Motiven Zn1 und Zn2. Die räumliche Annäherung der Domänen Zn1, Zn3 und WGR bei der DNA-Anlagerung führt zu einer Destabilisierung der HD-Domäne, wodurch es zu einem drastischen Anstieg der katalytischen Aktivität der ADP-Ribosyltransferase kommt (Langelier *et al.* 2012).

Nach Bindung der PARP-1 an den DNA-Schaden wird das Substrat NAD⁺ von der CAT-Domäne gebunden, welche unter Abspaltung von Nicotinamid die kovalente Verknüpfung der ADP-Ribose-Einheiten an Glutamat- oder Aspartatreste der Akzeptorproteine und an die PARP-1 (Automodifikation) selbst katalysiert. Durch die Verknüpfung weiterer ADP-Ribose-Einheiten kommt es zur Elongation, wodurch Polymerketten mit bis zu 200 Einheiten aufgebaut werden können. In weiteren Verknüpfungsreaktionen können darüber hinaus verzweigte Ketten gebildet werden (zusammengefasst in Bürkle 2005 und Schreiber *et al.* 2006). Die Interaktion der Poly(ADP-Ribose) mit weiteren Proteinen wie z.B. XPA und p53 scheint dabei stark von der Kettenlänge abzuhängen (Fahrer *et al.* 2007). Aufgrund der enthaltenen Phosphate kommt es im Zuge der Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu einer verstärkten negativen Ladung der Akzeptorproteine bzw. der PARP-1. Die dadurch hervorgerufene Dissoziation der PARP-1 ermöglicht anschließend die Anlagerung weiterer Reparaturproteine an die DNA (zusammengefasst in Schuhwerk *et al.* 2017).

Die hydrolytische Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymere erfolgt durch die Enzyme Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) und die ADP-Ribosylproteinlyase (PARPL). Aufgrund der exo- und endoglycosidischen Aktivität der Enzyme erfolgt der Abbau rasch, wodurch PAR eine Halbwertszeit von unter einer Minute besitzt (zusammengefasst in Bonicalzi *et al.* 2005, Nguewa *et al.* 2005).

2.2.3 Funktion der PARP-1 in DNA-Reparaturmechanismen

Durch endogene und exogene Faktoren wie Replikationsfehler, ROS, UV-Strahlung oder genotoxische Substanzen kommt es in humanen Zellen zu mehreren Zehntausend DNA-Schäden pro Tag (Jackson und Bartek 2009). Die PARP-1 sowie weitere Mitglieder dieser Enzymfamilie spielen als Schadenssensoren eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung weiterer Reparaturproteine, der Regulation und dem *crosstalk* mit anderen Signalwegen im Rahmen verschiedener DNA-Reparaturmechanismen.

2.2.3.1 DNA-Einzelstrangbruchreparatur

DNA-Einzelstrangbrüche können direkt durch Umwelteinflüsse wie chemische Agenzien (z.B. H_2O_2), ROS oder indirekt als kontrollierte Zwischenprodukte bei der Replikation, der Basenexzisionsreparatur oder der Nukleotidexzisionsreparatur entstehen. Durch einen Zusammenbruch der Replikationsgabel können nicht reparierte Einzelstrangbrüche in Doppelstrangbrüchen resultieren, was zu einer weiteren Akkumulation an DNA-Schäden und folglich zum Zelltod führen kann. Die DNA-Einzelstrangbruchreparatur (*single-strand break repair*; SSBR) stellt daher einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität dar. Die SSBR kann dabei in vier Schritte eingeteilt werden: Detektion des Strangbruchs, Prozessierung der DNA-Einzelstrangbruchenden, DNA-Synthese und -Ligation. Folgend wird auf die Reparatur der direkt induzierten Einzelstrangbrüche bspw. durch H_2O_2 eingegangen, wodurch es zu Unterbrechungen der kovalenten Bindung des Zucker-Phosphat-Rückgrats kommt.

Die effiziente Detektion der Strangbrüche erfolgt durch die PARP-1 und stellt den initiiierenden Schritt dar. Dabei bindet PARP-1 zunächst an den Einzelstrangbruch und katalysiert die Bildung der Poly(ADP-Ribose), was zur Automodifikation und Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen sowie weiterer Zielproteine führt. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung der Histone führt dabei zu einer Relaxation der Chromatinstruktur und sichert somit den Zugang für die Reparaturproteine. Anschließend kommt es zur Rekrutierung des Stützproteins XRCC1 (*X-ray repair complementing protein 1*), welches bevorzugt mit der automodifizierten PARP-1 interagiert. XRCC1 stabilisiert den Komplex mit weiteren Proteinen, welche die Prozessierung der DNA-Einzelstrangbruchenden, DNA-Synthese und-Ligation katalysieren.

Im Falle der direkt induzierten Einzelstrangbrüche erfolgt die Prozessierung der DNA-Einzelstrangbruchenden durch die Polynukleotidkinase-3'-Phosphatase (PNKP), Apurin-Apyrimidin-Endonuklease 1 (APE1) und Aprataxin (APTX). Hierbei werden die 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen wiederhergestellt, um die nachfolgende DNA-Synthese und Ligation durch Polymerasen und Ligasen zu ermöglichen (zusammengefasst in Caldecott 2008). Durch die Rekrutierung von Reparaturproteinen wie der Polymerase β (Pol β) und der Stimulierung der Kinase und Phosphatase-Aktivität von PNKP kommt dem Stützprotein XRCC1 eine wichtige Funktion während der Prozessierung der DNA-Enden zu.

Nach Wiederherstellung der 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der DNA erfolgt die DNA-Neusynthese. Der Einbau der komplementären Basen, entsprechend des ungeschädigten DNA-Stranges, erfolgt durch DNA-Polymerasen. Im Rahmen der *short-patch* Reparatur werden dabei nur einzelne Nukleotide durch die Pol β eingebaut. Müssen mehr Nukleotide synthetisiert werden, kann dieser Prozess auch unter Beteiligung der Polymerasen δ/ϵ (Pol δ/ϵ) ablaufen. Stimuliert von dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und PARP-1 werden die überstehenden Enden am 5'-Ende anschließend von der *flap* Endonuklease 1 (FEN1) entfernt.

Im finalen Schritt der Reparatur erfolgt die DNA-Ligation im Falle der *long-patch* Reparatur durch die Ligase 1 (LIG1), welche an PCNA bindet. Im Rahmen der *long-patch* Reparatur erfolgt die Verknüpfung der DNA-Enden durch die Ligase 3 α (LIG3 α), welche an XRCC1 gebunden ist (zusammengefasst in Caldecott 2014). In Abbildung 4 ist ein schematischer Überblick der Prozesse im Rahmen der DNA-Einzelstrangbruchreparatur dargestellt.

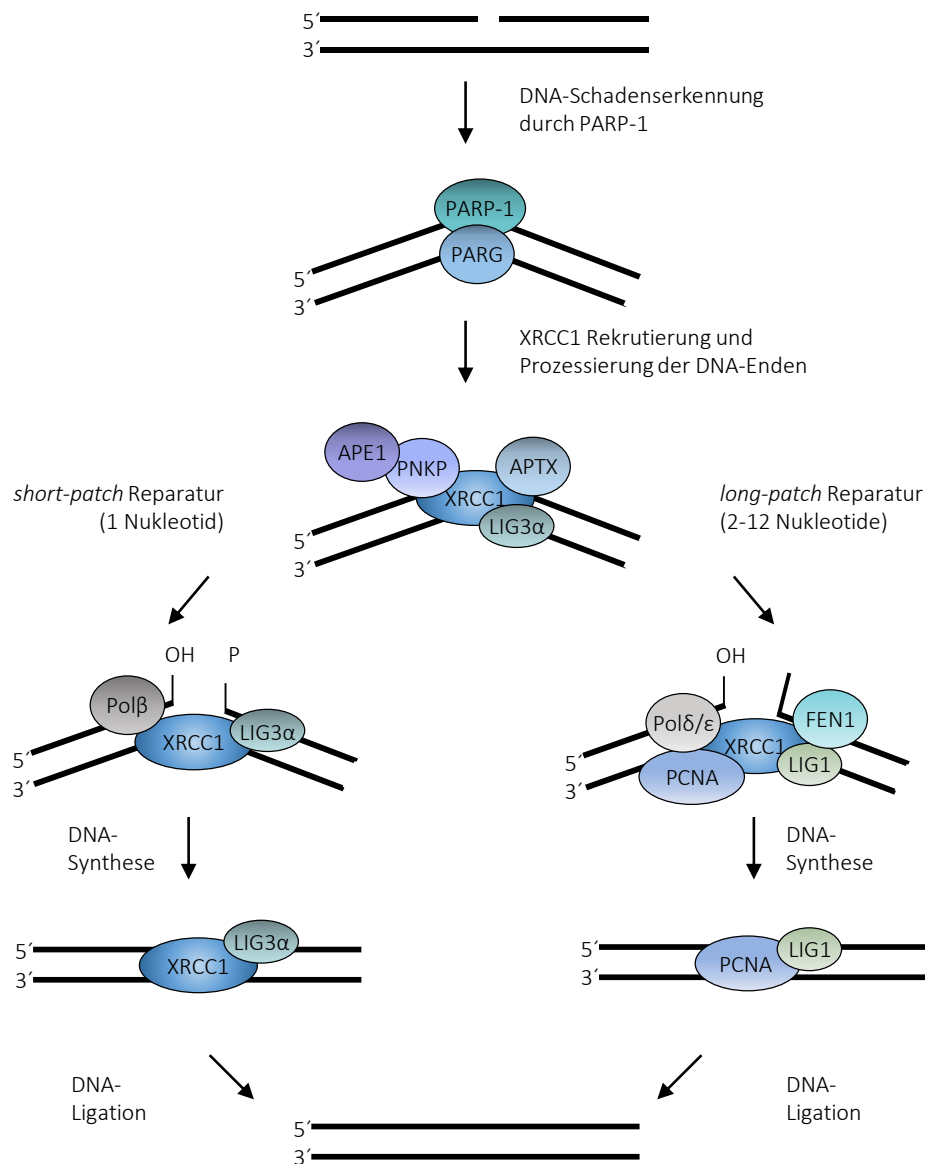


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Prozesse im Rahmen der DNA-Einzelstrangbruchreparatur. Die Detektion der DNA-Schäden erfolgt über die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1). Nach DNA-Bindung katalysiert die PARP-1 die Poly(ADP-Ribosyl)ierung und führt so zur Auto- und Heteromodifikation, wodurch es zur Rekrutierung weiterer Proteine kommt. Die Poly(ADP-Ribose) wird rasch von der Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase abgebaut und die PARP-1 dissoziiert von der DNA. Die Bindung des Stützproteins XRCC1 (*X-ray repair complementing protein 1*) führt folgend zu einer weiteren Anlagerung von Proteinen und zur Prozessierung der DNA-Enden. Je nach Art des Schadens sind die Proteine der *short-patch* oder *long-patch* Reparatur daran beteiligt. Die 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der DNA werden durch die Proteine Apurin-Apyrimidin-Endonuklease 1 (APE1), Polynukleotidkinase-3'-Phosphatase (PNKP) oder Aprataxin (APTX) regeneriert und ermöglichen dadurch die DNA-Neusynthese. Diese erfolgt bei der *short-patch* Reparatur unter Beteiligung der DNA-Polymerase β (Pol β), bei der *long-patch* Reparatur durch die DNA-Polymerase δ (Pol δ) und/oder die DNA-Polymerase ϵ (Pole). Stimuliert durch die PARP-1 entfernen die *flap* Endonuklease 1 (FEN1) und das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) zwei oder mehr Nukleotide der überstehenden DNA-Fragmente im Rahmen der *long-patch* Reparatur. Die DNA-Ligation erfolgt letztlich je nach Mechanismus durch die Ligase 1 (LIG1) oder Ligase 3 α (LIG3 α) (modifiziert nach Caldecott 2008).

2.2.3.2 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Durch die Rekrutierung verschiedener Reparaturproteine und die Vermittlung spezifischer Signalwege kommt der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auch in weiteren DNA-Reparaturprozessen eine wichtige Funktion zu, zumal verschiedene gemeinsame Schnittstellen der Reparaturwege existieren. In diesem Zusammenhang wurde der PARP-1 bereits mehrfach eine Rolle in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DDSB) zugesprochen (Audebert *et al.* 2004, Haince *et al.* 2008, Langelier *et al.* 2011). Die zwei Hauptwege der DDSBR verlaufen über die homologe Rekombination (HR) und das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ). Welcher der beiden Mechanismen vermehrt abläuft ist dabei v.a. von der Zellzyklusphase abhängig. Da im Rahmen der HR das Schwesterchromatid als Matrize für die Reparatur vorliegen muss, findet dieser Reparaturmechanismus ausschließlich in der späten S- und der G2-Phase des Zellzyklus statt. Aufgrund der homologen Sequenzvorlage gilt dieser Reparaturmechanismus als weitgehend „fehlerfrei“. Das NHEJ kann hingegen in jeder Zellzyklusphase stattfinden. Hierbei werden die freien DNA-Enden durch Ligasen verknüpft, wodurch es zu Fehlverknüpfungen, Deletionen sowie Insertionen kommt (zusammengefasst in Christmann *et al.* 2003).

Die Bindung der PARP-1 an den DDSB und die enzymatische Aktivität führt zur einer schnellen Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturproteine. Beispielsweise kommt es nach der Bindung an DDSB und Automodifikation der PARP-1 zur Rekrutierung der Mre11-Nuklease (*meiotic recombination protein 11*). Zusammen mit RAD50 und Nbs1 bilden diese Proteine den MRN-Komplex, welcher durch Resektion der DNA-Enden die Schadensreparatur über die homologe Rekombination (HR) initiiert. Durch die HR werden überwiegend DDSB, welche im Zuge einer Blockade der Replikationsgabel entstehen können oder durch ionisierende Strahlung induziert werden, repariert (zusammengefasst in Beck *et al.* 2014). Bei der Konversion von SSB in DSB, durch Zusammenbruch der Replikationsgabel, scheint die Bindung der PARP-1 an die DNA-Schadenstelle die Assoziation des NHEJ-Komplexes zu minimieren, wodurch die DNA-Reparatur durch die fehlerfreie HR gefördert wird. Die Rolle der PARP-1 bei der NHEJ ist noch nicht abschließend geklärt (Paddock *et al.* 2011, Wang *et al.* 2006). Zudem konnte durch Inhibierung der PARP-1 eine Beteiligung des Enzyms an dem DDSBR-Mechanismus des *alternative end-joining* (alt-NHEJ) nachgewiesen werden. Auch hier ist der genaue Mechanismus noch nicht bekannt. Denkbar wäre dabei eine Rolle der Automodifikation, die als Plattform für die direkte oder indirekte Rekrutierung von alt-NHEJ Reparaturfaktoren dienen könnte (zusammengefasst in Chiruvella *et al.* 2013).

2.2.4 Beteiligung der PARP-1 an Zelltodmechanismen

Durch die Beteiligung an verschiedenen Mechanismen der zellulären Stressantwort kommt der PARP-1 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellvitalität zu. Im Zuge einer gesteigerten Stressintensität z.B. durch ROS, können unter dem regulatorischen Einfluss der PARP-1 verschiedene Mechanismen des Zelltodes eingeleitet werden. Eine Hyperaktivierung des Enzyms nach massiver DNA-Schädigung führt dabei zu einer raschen NAD⁺-Depletion und so zu einem akuten ATP-Mangel, was in einem nekrotischen Zelltod resultiert. Der Verlust der Membranintegrität führt dabei zur Freisetzung des Zellinhaltes, wodurch Entzündungsreaktionen hervorgerufen werden. Die Störungen PAR-vermittelter Signalwege spielt bei der Pathogenese einer Reihe von Erkrankungen wie Diabetes, Krebs, Neurodegeneration und Ischämie eine grundlegende Rolle (zusammengefasst in Ba und Garg 2011).

Auch in den Signalwegen der Apoptose besitzt die PARP-1 regulatorische Funktionen. Im Zuge von genotoxischen Stress kommt es in einem frühen Status der Apoptose dabei zunächst zu einer Aktivierung des Enzyms (Donzelli *et al.* 1997, Rosenthal *et al.* 1997). In dem fortlaufenden Prozess der Apoptose wird die PARP-1 proteolytisch durch Caspasen gespalten. Das C-terminale Spaltprodukt besitzt dabei noch teilweise enzymatische Aktivität, ist jedoch aufgrund des Verlustes der DNA-Bindungsdomäne inaktiv gegenüber DNA-Schäden. Die Inaktivierung des Enzyms schützt zudem vor einem übermäßigen Verbrauch des NAD⁺-Substrates, welches für die ATP-Bereitstellung der energieabhängigen Prozesse der Apoptose essentiell ist (zusammengefasst in Schuhwerk *et al.* 2017).

Auf der Aktivierung der PARP-1 basiert auch der Caspase-unabhängige Zelltodmechanismus Parthanatos. Die Translokation von Poly(ADP-Ribose) aus dem Zellkern in das Cytoplasma führt dabei zur Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Ähnlich des nekrotischen Zelltods kommt es im Rahmen des Parthanatos zu einem Verlust der Membranintegrität, welcher jedoch nicht mit einer vorherigen Zellvergrößerung verbunden ist (zusammengefasst in Fatokun *et al.* 2014).

2.2.5 PARP-1-Inhibitoren in der Krebstherapie

Einer Reihe von Krebserkrankungen liegen Genmutationen entsprechender DNA-Reparaturproteine zugrunde. Im Falle von Brust- und Ovarialtumoren sind hierbei häufig die Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2, welche Schlüsselproteine der HR darstellen, beeinträchtigt. Unter Verwendung von PARP-Inhibitoren soll mit dem therapeutischen Ansatz der synthetischen Letalität eine Genotyp-spezifische Behandlung dieser Tumorarten gelingen. Der Ansatz basiert auf der gezielten Behandlung von Tumoren mit bekannten Reparaturdefekten (zusammengefasst in Lord und Ashworth 2012). In klinischen Studien befinden sich derzeit mehrere PARP-1 Inhibitoren, die in der Gruppe der NAD⁺-Mimetika zusammengefasst werden. Für die Behandlung von Ovarial-, Mammakarzinomen und Eierstockkrebs sind die PARP-Inhibitoren Olaparib, Niraparib und Rucaparib europaweit zugelassen und werden in Form einer Mono- oder Kombinationstherapie

angewandt (EMA, zusammengefasst in Keung et al. 2019). Gemeinsam besitzen diese Substanzen ein Amid-Pharmakophor, was zu einer kompetitiven Hemmung der katalytischen Domäne der PARP-1 führt. Diesbezüglich konnte in HR-dysfunktionalen Zellen eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität durch PARP-1-Inhibitoren festgestellt werden (Bryant *et al.* 2005, Farmer *et al.* 2005). Die Inhibierung der PARP-1 führt dabei aufgrund ihrer Rolle in der DNA-Reparatur zu einer persistenten Akkumulation von DNA-Schäden. Ein postulierter Wirkmechanismus basiert auf der Bildung von PARP-1-DNA-Komplexen durch NAD⁺-Mimetika. Nach Bindung der PARP-1 an natürlich vorkommende DNA-Schäden kann die PARP-1 aufgrund der inhibierten katalytischen Aktivität nicht mehr von der DNA dissoziieren (PARP-1 *trapping*). Der Zusammenbruch der Replikationsgabel an diesen PARP-DNA-Komplexen resultiert schließlich in Doppelstrangbrüchen (Murai *et al.* 2012). HR-profiziente Zellen sind in der Lage diese Schäden zu reparieren, wohingegen die Dysfunktion dieses Reparaturmechanismus zu einem vermehrten Zelltod führt (Bryant *et al.* 2005, Farmer *et al.* 2005). Ein weiterer potentieller Wirkmechanismus basiert auf der Akkumulation von DNA-Schäden durch die Kompensationswirkung der fehlerbehafteten Reparaturmechanismen NHEJ und alt-NHEJ. Diese Reparaturmechanismen werden überwiegend durch Poly(ADP-Ribosyl)ierung beteiligter Proteine supprimiert. Eine Inhibierung der PARP-1 könnte so zu einer gesteigerten Beteiligung dieser Reparaturmechanismen führen (zusammengefasst in Dulaney et al. 2017 und Wang *et al.* 2016). Zu welchen Anteilen die genannten Mechanismen zu der synthetischen Letalität der NAD⁺-Mimetika beitragen ist noch nicht abschließend geklärt.

Ein weiterer Therapieansatz stellt die Inhibierung der PARP-1 unter Verwendung von Gold(I)/(III)-Komplexen dar. Aufgrund der Thiolaffinität des Metalls stellen die Zinkfinger-Motive der DNA-Bindungsdomäne der PARP-1 die Angriffspunkte der Gold-Komplexe dar. Der Austausch der gebundenen Zinkionen durch Goldionen führt hier zur Bildung sogenannter Goldfinger (Jacques *et al.* 2015, Laskay *et al.* 2015, Mendes *et al.* 2011, Wenzel *et al.* 2018). Die damit einhergehende Konformationsänderung dieser Domäne vermindert die DNA-Bindungsaffinität und inhibiert darüber die PARP-1. Da dieser molekulare Mechanismus nicht zu einer vermehrten Bildung von DNA-Schäden durch das erwähnte PARP-1 *trapping* kommt, ist der Einsatz der Gold-Komplexe jedoch auf Kombinationstherapien mit klassischen Krebstherapeutika beschränkt. Eine selektive Interaktion verschiedener Gold-Komplexe mit den PARP-1-spezifischen C₃H₁-Zinkfingern gegenüber C₂H₂ konnte dabei bereits nachgewiesen werden. Die Selektivität ist dabei abhängig von dem Oxidationsstatus des koordinierten Goldions und dem Liganden, welcher über die Stabilität des Komplexes bestimmt (Laskay *et al.* 2015, Wenzel *et al.* 2018). Darüber hinaus geht von einigen Gold-Komplexen eine inhibitorische Wirkung auf die Thioredoxinreduktase, die Glutathionreduktase und Aquaporine aus, was zu *off-target* Effekten führen kann (Citta *et al.* 2016, de Almeida *et al.* 2017). Aufgrund dessen ist die gezielte Synthese neuer selektiver Liganden Bestandteil einiger Studien auf diesem Forschungsgebiet. Eine schematische Darstellung der möglichen Einflüsse von PARP-Inhibitoren auf DNA-Reparaturmechanismen ist in Abbildung 5 gezeigt.

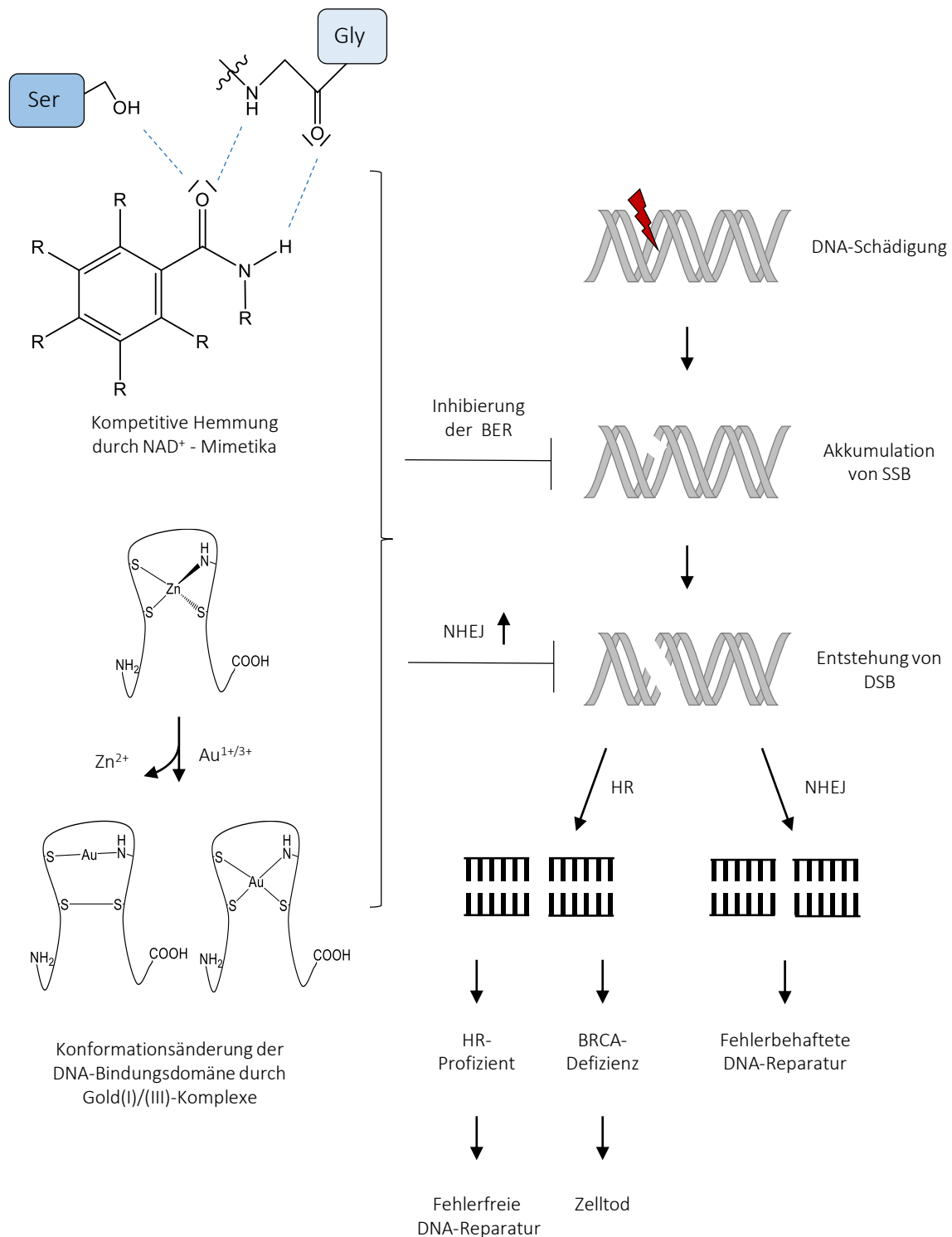


Abbildung 5: Postulierte Mechanismen der zytotoxischen Wirkung von PARP-Inhibitoren und deren Einfluss auf die DNA-Reparatur. Die Inhibierung der PARP-1 findet im Falle von NAD⁺-Mimetika über eine kompetitive Hemmung des katalytischen Zentrums des Enzyms statt, woran die Serin- (Ser) und Glycin- (Gly) Reste beteiligt sind. Demgegenüber können Gold(I)/(III)-Komplexe zu einer Konformationsänderung der DNA-Bindungsdomäne führen. Die PARP-1 Inhibitoren führen so zu einer Hemmung der DNA-Reparatur durch die Basenexzisionsreparatur (BER), wodurch es zu einer zellulären Akkumulation von DNA-Einzelstrangbrüchen kommen kann. Durch Zusammenbruch der Replikationsgabel können diese in DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren. Da die PARP-1 in BRCA-profizienten Zellen die DNA-Reparatur über die homologe Rekombination (HR) begünstigt, führt die Inhibierung zu einer vermehrten Reparatur durch das fehlerbehaftete nicht-homologe *end joining* (NHEJ). Die genomische Instabilität, überwiegend in BRCA-defizienten Zellen, kann so zu einem selektiven Zelltod dieser Zellen führen (modifiziert nach Dulaney *et al.* 2017).

3 Fragestellung

Das hohe Einsatzpotential in medizinischen Anwendungen treibt die Entwicklung Gold-basierter Therapeutika immer weiter voran. Die therapeutischen Eigenschaften der nanopartikulären und löslichen Gold-Formulierungen sind jedoch bezüglich der zugrundeliegenden Wirkmechanismen noch nicht hinreichend untersucht, um eine verantwortungsvolle Nutzen-Risiko-Bewertung abgeben zu können. Um einen Beitrag zu der toxikologischen Charakterisierung zu leisten, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung des zellulären Einflusses Gold-basierter Komponenten, beruhend auf postulierten Wirkmechanismen.

Diesbezüglich soll zunächst eine Synthese etabliert werden, welche sphärische und größenreproduzierbare Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel (Cit-Au NP) hervorbringt. Die Charakterisierung der Cit-Au NP mit Hilfe verschiedener Methoden liefert folgend Aufschluss über die physikochemischen Eigenschaften der Cit-Au NP, um biologische Effekte in den darauffolgenden Zellkulturuntersuchungen genauer zuordnen zu können. Um den Einfluss der Oberflächenmodifizierung auf die Zytotoxizität von Au NP in HeLa S3-Zellen zu untersuchen, werden größenvergleichbare Polyvinylpyrrolidon-stabilisierte Au NP (Pvp-Au NP) in die Untersuchungen miteingebunden. Da für Au NP bereits ein *trojan horse type* Mechanismus postuliert wurde (Sabella *et al.* 2014), werden die Au NP in ausführlichen Löslichkeitsstudien in zellkulturelevanten Medien bezüglich ihrer Ionenfreisetzung untersucht. In verschiedenen Zellkulturuntersuchungen sollen darüber hinaus Erkenntnisse über das toxische Potential und die zelluläre Aufnahme der verwendeten Au NP gewonnen werden. Zusätzlich dient die lösliche Goldverbindung Gold(III)-chlorid (AuCl_3) als Vergleichssubstanz zur Unterscheidung von partikulären Effekten und dem zellulären Einfluss von Goldionen. Der Einfluss der synthetisierten Cit-Au NP und der löslichen Verbindung AuCl_3 auf zelluläre Prozesse wird zudem mit einer quantitativen Hochdurchsatz RT-qPCR auf transkriptioneller Ebene untersucht.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der inhibitorischen Wirkung der Gold(III)-Komplexe $[\text{Au}(1,10\text{-Phenanthroline})_2]\text{Cl}$ (Auphen) und $[\text{Au}(2\text{-Benzylpyridine})_2]\text{Cl}$ (Aubenpy) und den entsprechenden Liganden 1,10-Phenanthroline (Phen) und 2-Benzylpyridine (Benpy) auf die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) in subzellulären und zellulären Testsystemen. Die Verdrängung von Zinkionen aus der DNA-Bindungsdomäne der PARP-1, unter Bildung sogenannter Goldfinger, wird dabei als postulierter Wirkmechanismus der Inhibierung des Enzyms untersucht (Laskay *et al.* 2015, Wenzel *et al.* 2018). Die Komplexe werden dabei in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Roesky (Institut für Anorganische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie) synthetisiert. In einem subzellulären Testsystem mit isolierter PARP-1 werden die Gold-Komplexe sowie die Liganden zunächst auf ihre inhibitorische Wirksamkeit untersucht. Ferner wird eine Beeinflussung der PARP-Aktivität im Rahmen einer zellulären Stressantwort durch Einfluss der Testsubstanzen auf funktioneller und transkriptioneller Ebene in der Modelzelllinie HeLa S3 untersucht. Durch vergleichende Betrachtung der Ergebnisse nach Behandlung mit den Komplexen bzw. den

entsprechenden Liganden, sollen spezifische Mechanismen identifiziert und den Substanzen zugeordnet werden. Mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgt anschließend die Analyse der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen unter Einfluss der Komplexe bzw. Liganden nach H_2O_2 -DNA-Schadensinduktion. Ferner soll mit Hilfe dieser Experimente geklärt werden, ob die Ergebnisse aus den subzellulären Untersuchungen übertragbar auf zelluläre Testsysteme sind. Unter Verwendung einer spezifischen DNA-Oligonukleotidsequenz wird in einem weiteren subzellulären Ansatz die DNA-Bindung isolierter PARP-1 nach Behandlung mit den Komplexen bzw. Liganden untersucht.

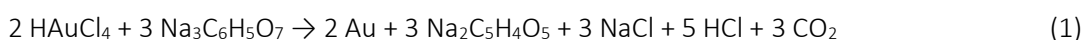
4 Material und Methoden

4.1 Allgemeines

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Instrumente sind im Anhang tabellarisch aufgelistet. Für die Zellkulturuntersuchungen wurden die verwendeten Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien vor Gebrauch sterilfiltriert, hitzeautoklaviert oder heißluftsterilisiert. Für die Zellkulturuntersuchungen wurde unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 gearbeitet.

4.2 Partikelsynthese

Die Partikelsynthese erfolgte nach einer modifizierten Citrat-Standardmethode von Frens und Turkevich (Frens 1973, Turkevich *et al.* 1951). Dieses Verfahren liefert reproduzierbar größendefinierbare Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel (Cit-Au NP). Hierbei führt die Reduktion von Gold(III)-chlorid (Gold(III)-chlorid Trihydrat; $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) durch tri-Natriumcitrat zunächst zur Nukleation und anschließend zum Partikelwachstum (1). Die Reaktion wird mit einem Überschuss an tri-Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$) durchgeführt, welches folglich die Nanopartikel stabilisiert.



Alle verwendeten Glaswaren wurden vor der Synthese gründlich mit Reinigungsmittel und bidestilliertem (bidest.) Wasser gereinigt und anschließend mit Königswasser (HNO_3 (69 %) und HCl (32 %) (v/v : 3/1)) ausgespült. Für jeden Ansatz wurde eine frische Lösung 0,5 mM Gold(III)-chlorid Trihydrat mit bidest. Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde unter ständigem Rühren (1250 rpm) in einem abgedeckten Erlenmeyerkolben bis zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde zügig eine 1 %-ige tri-Natriumcitratlösung im Volumenverhältnis 18 : 1 (0,5 mM HAuCl_4 : 1 % $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$) zugegeben und die entstehende Partikelsuspension für weitere 45 Minuten, unter gleichen Bedingungen, erhitzt. Diese Partikelsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

4.3 Partikelcharakterisierung

Für die Charakterisierung der synthetisierten Cit-Au NP sowie der Polyvinylpyrrolidon-stabilisierten Au NP (Pvp-Au NP) (nanoComposix) wurden verschiedenen physikalische Verfahren angewandt, um die Eigenschaften wie Morphologie, Partikelgrößenverteilung, Agglomerationszustand, und Löslichkeit der Partikel zu bestimmen. Die Herstellerangaben der Charakterisierung der Pvp-Au NP sind in Abbildung 37 im Anhang aufgelistet.

4.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein Kontrastverfahren, bei dem die Ablenkung von Elektronen durch Wechselwirkungen mit einer zu untersuchenden Probe zu einer bildlichen Darstellung führt. Mit Hilfe von TEM-Aufnahmen kann so die Morphologie und die Partikelgrößenverteilung von primären Partikeln bestimmt werden.

Während der Probenvorbereitung wurden die nativen Cit-Au NP-Suspensionen bzw. die Partikelsuspensionen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) verdampft und auf ein TEM-Grid (Kupfernetz mit Kohlefilm; Plano) übertragen. Die Aufnahmen wurden am Laboratorium für Elektronenmikroskopie am Karlsruher Institut für Technologie an einem TEM CM 200 FEG der Firma PHILIPS von Frau H. Störmer angefertigt. Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung wurden die Aufnahmen mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware *paint* und *ImageJ* sowie der Analysensoftware *OriginLab* ausgewertet. Die Auswertung der TEM-Aufnahmen erfolgte in Zusammenarbeit mit Natalie Kartmann im Zuge ihrer Masterarbeit.

Für die Partikelgrößenverteilung der Pvp-Au NP aus TEM-Aufnahmen wurden die Angaben des Herstellers übernommen.

4.3.2 Hydrodynamische Größenverteilung und Zetapotential

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers (D_h) und des Zetapotentials (ZP) der Au NP in Suspension wurden die Partikel mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuungsmethode untersucht. Hierbei wird die zeitliche Veränderung des durch Partikel gestreuten Lichts gemessen, woraus die Partikelgröße abgeleitet werden kann.

Die Bestimmung des D_h und des ZP der Cit- und Pvp-Au NP in der nativen Suspension sowie in Kulturmedium (DMEM mit 10 % FKS) fand unter Verwendung des Zetasizers Nano ZS der Firma Malvern (Herrenberg, Deutschland) statt. Die Messungen mit Cit-Au NP wurden in Zusammenarbeit mit Natalie Kartmann durchgeführt. Alle Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Vor jeder Nutzung wurde mit einem Größen- und Zetapotential-Standard die Funktionalität des Gerätes überprüft. Die Proben wurden in eine Polystyrolküvette (VWR) gegeben und in den Zetasizer Nano ZS überführt. Nach einer Messoptimierung wurden folgende Einstellungen gewählt: *runs* 3, *subruns* 30, Equilibrierzeit 20 s, *backscatter* 173°. Die Interpretation der Daten erfolgte durch die implementierte Zetasizer Nano ZS Dispersion Technology Software (DTS, Version 6.20).

Die ZP-Messungen wurden in einer gefalteten Kapillarzelle (DTS 1061C, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) ausgeführt, welche zuvor mit bidest. Wasser und 96 % Ethanol gespült wurde. Nachdem die Kapillare in das Gerät eingesetzt wurde, wurde mit folgenden Einstellungen gemessen: Equilibrierzeit 20 s, *automatic runs* (10-100).

4.3.3 pH-Wert

Veränderungen des pH-Wertes können in Zellkulturuntersuchungen schnell zu einer Stoffwechsel- und Wachstumsveränderung der entsprechenden Zellen führen. Um dies auszuschließen wurde der pH-Wert der nativen Cit-Au NP und der Cit- und Pvp-Au NP-Suspensionen in DMEM mit 10 % FKS mit dem pH-Meter 3210 (SenTix® Elektrode) der Firma WTW (Weilheim) gemessen.

4.3.4 Löslichkeitsuntersuchungen in zellkulturelevanten Flüssigkeiten

Da die Freisetzung von Ionen aus metallischen Nanopartikeln eine wichtige Rolle in der toxikologischen Wirkung darstellt, wurde die Löslichkeit der Cit-Au NP und Pvp-Au NP in verschiedenen zellkulturelevanten Flüssigkeiten bestimmt. Hierbei wurde der lösliche Goldgehalt nach 1, 4 und 7 Tagen in *phosphate buffered saline* (PBS), DMEM mit 10 % FKS und künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (ALF) bestimmt. Dabei wurden jeweils 10 mL einer 50 µg/mL Cit-Au NP bzw. Pvp-Au NP Suspension in eine Zellkulturflasche aus Polystyrol überführt und für 1, 4 bzw. 7 Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 5 mL der Suspensionen in eine Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin®Turbo 15; Sartorius) überführt und für 1 Stunde bei 3000 g zentrifugiert. Die erfolgreiche Abtrennung der Partikel wurde im Zentrifugat mittels DLS, wie unter 4.3.2 beschrieben, überprüft. Anschließend wurde 1 mL des Zentrifugats in einem Heizschüttler bis zur Trockene eingedampft und wie unter 4.5 beschrieben weiter aufgearbeitet.

Die Löslichkeitsuntersuchungen wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Natalie Kartmann im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.

4.4 Verunreinigung mit Mikroorganismen

Kontaminationen mit Mikroorganismen können bei Stimulationsexperimenten der Zellkulturen zu Artefakten und Fehlinterpretationen führen. Um auszuschließen, dass die partikulären Suspensionen mit Mikroorganismen kontaminiert waren, wurden diese qualitativ auf einen Bakterien- und Pilzbefall und auf Endotoxine untersucht.

Mit Hilfe des Gel-Clot-Verfahrens wurden die Cit- und Pvp-Au NP-Suspensionen und die AuCl₃-Lösung auf Endotoxine getestet. Darüber hinaus wurden die Partikelsuspensionen und die AuCl₃-Lösung in DMEM mit 10 % FKS (antibiotikafrei) für 7 Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert und lichtmikroskopisch auf Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen überprüft.

Sowohl die partikulären Suspensionen als auch die AuCl₃-Lösung erwiesen sich als frei von Endotoxinen, Bakterien und Pilzen.

Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen

Um die für Zellkulturversuche vorgesehenen Inkubationssubstanzen (4.6.1) auf einen möglichen Bakterien- oder Pilzbefall zu untersuchen, erfolgte eine qualitative Kontaminationskontrolle. Im Falle der Au NP wurden Suspensionen der Konzentration 50 µg/mL der entsprechenden Partikel in DMEM mit 10 % FKS (ohne Penicillin-Streptomycin) hergestellt und für 7 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Falle der löslichen Substanzen wurde eine 500 µM-Lösung der entsprechenden Substanzen in DMEM mit 10 % FKS (ohne Penicillin-Streptomycin) getestet. Anschließend wurden die Suspensionen/Lösungen lichtmikroskopisch auf Kontaminationen geprüft. Bei keiner der Inkubationssubstanzen konnte eine Kontamination nachgewiesen werden.

Endotoxintest

Bei dem Test auf Endotoxine gramnegativer Bakterien handelt es sich um den Limulus-Gelertest. Hierbei wird Amöbozyten-Lysat mit demselben Volumen der zu untersuchenden Substanz gemischt. Die Anwesenheit von Endotoxinen führt anschließend zu einer Gelbildung. Der qualitative Endotoxinnachweis wurde mit dem ToxinSensor™ Gel Clot Endotoxin Assay Kit der Firma GenScript (Piscataway) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei erwiesen sich alle Inkubationssubstanzen als frei von Endotoxinen.

4.5 Bestimmung des Goldgehaltes mittels Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ist ein analytisches Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung vieler Elemente. Hierbei wird unter der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes eine atomisierte Probe mit einer elementspezifischen Lichtquelle bestrahlt und die Schwächung des Lichtstrahls hinter der Atomisierungseinheit gemessen. Unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Konzentration des Analyten bestimmt werden.

Um genau definierte Inkubationskonzentrationen der Au NP-Suspensionen herstellen zu können, wurde der Goldgehalt der Cit- und Pvp-Au NP-Suspensionen mit Hilfe der Grafitrohr-AAS (GF-AAS) quantifiziert. Ferner wurde unter Verwendung dieser Methode die zelluläre Aufnahme der Cit- und Pvp-Au NP, AuCl₃ und der Gold(III)-Komplexe in HeLa S3-Zellen untersucht.

Probenvorbereitung und Messparameter

Die Proben wurden in 1 mL Königswasser aufgenommen und bei stufenweiser Temperaturerhöhung (65-95 °C, ΔT 10 °C/1h) verascht. Der Trockenrückstand wurde in 0,2 %-iger HCl aufgenommen und der Goldgehalt mittels GF-AAS ermittelt. Für die quantitative Bestimmung des Goldgehaltes mittels GF-AAS wurde vor jedem Probendurchsatz eine externe Kalibrierung mit einer AAS-Goldstandardlösung in einem Bereich von 5-25 µg/L mit Hilfe des am Messgerät installierten Autosamplers erstellt. Hierbei wurden 20 µL der verdünnten Goldstandardlösung bzw. der Probenlösung und

2 µL eines Matrixmodifiziers (1 g/L Palladium und 0,6 g/L Magnesium in 0,2 % HCl) in das Grafitrohr überführt und nach Ablauf eines spezifischen Temperaturprogramms (siehe Tabelle 1) analysiert. Als Lichtquelle diente eine elementspezifische Gold-Hohlkathodenlampe mit einer Emissionswellenlänge von 242,8 nm.

Bei jedem Probendurchsatz wurden zusätzlich Blindwerte der Verdünnungslösung (0,2 % HCl), sowie externe und interne Standards mitgeführt.

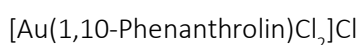
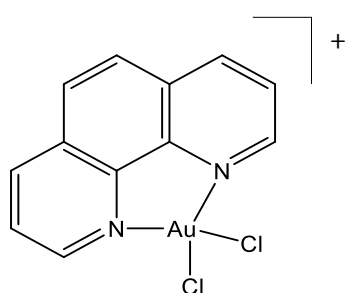
Die Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für die Goldbestimmung mittels GF-AAS erfolgte unter Anleitung von Wera Hubele durch Frau Natalie Kartmann nach DIN 32645 (Anhang, Tabelle 13).

Tabelle 1: Temperaturprogramm der Goldbestimmung mittels GF-AAS.

	Temperatur (°C)	Rampenzeit (s)	Haltezeit (s)	Gasstrom (mL/min)	Trägergas
Trocknung	140	1	30	250	Argon
Trocknung	160	15	30	250	Argon
Pyrolyse	850	5	20	250	Argon
Atomisierung	1800	0	5	0	Argon
Ausheizen	2450	1	3	250	Argon

4.6 Verwendete Gold(III)-Komplexe und Liganden

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Roesky (Institut für Anorganische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie) wurden die für die Inhibitorstudien verwendeten Gold(III)-Komplexe von Dr. Tim Seifert synthetisiert.



Summenformel:

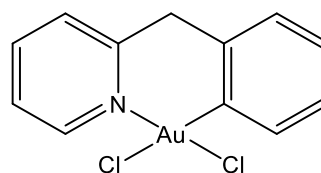


Molekulargewicht:

483,53 g/mol

Bezeichnung:

Auphen



Summenformel:

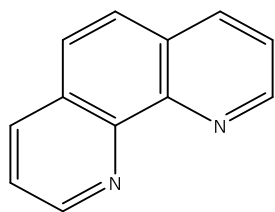


Molekulargewicht:

436,09 g/mol

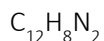
Bezeichnung:

Aubenpy



1,10-Phenanthrolin

Summenformel:

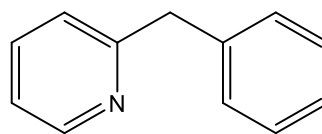


Molekulargewicht:

180,21 g/mol

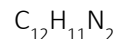
Bezeichnung:

Phen



2-Benzylpyridin

Summenformel:



Molekulargewicht:

169,23 g/mol

Dichte:

0,899 g/mol

Bezeichnung:

Benpy

4.7 Zellkulturexperimente

4.7.1 Zelllinien und Kultivierung

Für die Zellkulturuntersuchungen wurde die humane Zervix-Adenokarzinomzelllinie HeLa S3 verwendet. Diese adhärent als Monolayer wachsende Zelllinie wurde in DMEM mit 10 % FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin in Zellkulturschalen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Während der Kultivierung wurden die Zellen alle 2-3 Tage subkultiviert. Hierfür wurden alle verwendeten Lösungen zuvor in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert und die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch überprüft. Zur Subkultivierung wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, mit 0,28 %-iger Trypsinlösung behandelt und für 2-3 Minuten im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, vereinzelt und die Zellzahl mit Hilfe des elektronischen Zellzählgerätes Casy® TTC (Größenbereich zur Quantifizierung: 12,6-40 µm) bestimmt. Für die folgende Kultivierung wurde eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturschale weitergesetzt.

Für alle Versuchsansätze wurde entsprechend der Größe der Zellkulturschale eine definierte Zellzahl ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgten die Inkubationen wie unter 4.7.3 beschrieben.

4.7.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Die HeLa S3-Zellen wurden in Aliquoten von $2 \cdot 10^6$ Zellen in 1 mL FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) in einem Kryobehälter (-1 °C/Minute) bei -20 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Inkulturnahme wurde das Zellpellet in einem Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein 15 mL Röhrchen mit vorgelegtem Medium überführt und bei 4 °C, 1300 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 10 mL frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumswechsel. Die Zellen wurden nach zwei Subkultivierungen für Versuche verwendet und nicht länger als 20 Passagen alle 2-3 Tage subkultiviert. Um vergleichbare Zelldichten bei den Experimenten zu gewährleisten, wurde die Zellzahl den jeweiligen Zellkulturgefäßen angepasst und entsprach 16 600 Zellen pro cm² Wachstumsfläche.

4.7.3 Inkubationen

Inkubation mit Gold(III)-chlorid, [Au(1,10-Phenanthrolin)Cl₂]Cl, [Au(2-Benzylpyridin)Cl₂], 1,10-Phenanthrolin und 2-Benzylpyridin

Für die Inkubationen mit Gold(III)-chlorid (AuCl₃), Auphen ([Au(1,10-Phenanthrolin)Cl₂]Cl) und Aubenpy ([Au(2-Benzylpyridin)Cl₂]) wurden zunächst definierte Mengen der entsprechenden Substanzen an einer Feinwaage in 1,5 mL Reaktionsgefäße eingewogen. Anschließend wurden AuCl₃ in 1 mL bidest. Wasser bzw. Auphen und Aubenpy in DMSO aufgenommen und in ein steriles Schnappdeckelglas mit vorgelegtem Volumen an bidest. Wasser bzw. DMSO überführt, sodass Stammlösungen von 10 mM für AuCl₃ bzw. 0,5 mM, 2,5 mM, 5 mM und 50 mM (Auphen, Aubenpy) resultierten. Die Liganden 1,10-Phenanthrolin (Phen) und 2-Benzylpyridin (Benpy) wurden analog in DMSO verdünnt. Aus diesen Lösungen wurden die entsprechenden Volumina für die jeweiligen Inkubationskonzentrationen (25-254 µM AuCl₃, 0,5-50 µM Auphen, Phen, Aubenpy, Benpy) direkt in das Kulturmedium pipettiert.

Die H₂O₂-Inkubationslösung wurde vor jedem Versuch aus einer 9,788 mM Stammlösung in bidest. Wasser frisch angesetzt.

Inkubation mit Cit-, und Pvp-Au NP

Die Cit- und Pvp-Au NP lagen in wässriger Suspension vor. Alle Partikelsuspensionen wurden direkt vor Inkubation der Zellen frisch in DMEM mit 10 % FKS hergestellt. Um die Inkubationssuspensionen der Konzentrationen 5, 20 und 50 µg/mL herzustellen, wurden entsprechende Volumina an Zellkulturmedium in ein Polypropylen Schraubgefäß vorgelegt und definierte Volumina der Partikelsuspensionen hinzupipettiert und für 5 Sekunden gevortext.

In Tabelle 2 sind die in den Zellkulturversuchen eingesetzten Konzentrationen der Au NP als volumenbezogene Masse (µg/mL) und als flächenbezogene Masse (µg Partikel/ cm² Wachstumsfläche) angegeben, sowie die molaren Konzentrationen (µmol/L) der Äquivalentdosen an AuCl₃.

Tabelle 2: Übersicht der Au NP Dosisangaben in verschiedenen Umrechnungsarten.

Au [µg/mL]	Au [µg/cm ²]	AuCl ₃ [µmol/L]
5	1	25
20	4	102
50	10	254

4.8 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Zytotoxizität der Cit- und Pvp-Au NP sowie der löslichen Substanzen AuCl_3 , Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy wurde anhand der Zellzahl, der Koloniebildungsfähigkeit und des ATP Gehaltes bestimmt.

4.8.1.1 Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurde die Zellzahl als Kurzzeit- und die Koloniebildungsfähigkeit als Test der subchronischen Toxizität herangezogen.

Versuchsansatz

Für die Bestimmung der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit wurden $0,133 \cdot 10^6$ Zellen in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden mit den jeweiligen Testsubstanzen für 24 Stunden wie unter 4.7.3 beschrieben inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, in einem definierten Volumen Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe des elektronischen Zellzählgerätes Casy® TTC bestimmt. Aus dieser Zellsuspension wurden pro Ansatz in Doppelbestimmung 300 Zellen in eine 60 mm Zellkulturschale mit frischen Nährmedium überführt und für 7-10 Tage unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach der Kultivierungszeit wurden die Zellkolonien mit PBS gewaschen und die Zellen mit eiskaltem Ethanol (96 %) für 5 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Kolonien mit Giemsa-Lösung für einige Stunden. Die Kolonien wurden an einem Koloniezählgerät ausgezählt.

4.8.1.2 Zellulärer ATP-Gehalt

Die Untersuchung des zellulären ATP-Gehaltes kann als Parameter der Viabilität von Zellen im Rahmen von Zytotoxizitätsuntersuchungen herangezogen werden. Der Test beruht auf einem Luciferase-basierten System. Bei der Umsetzung des Substrates Luciferin werden Photonen freigesetzt, welche in Form eines Lumineszenzsignals detektiert werden können.

Versuchsansatz

Zur Bestimmung des ATP-Gehalts wurden die Zellen wie unter 4.8.1.1 beschrieben ausgesät, inkubiert, trypsiniert, in neuem Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 50.000 Zellen/ 100 μL pro Well in eine 96-Well-Platte überführt und für 30 Minuten auf Raumtemperatur temperiert. Die Untersuchung des zellulären ATP-Gehalts wurde anschließend unter Verwendung des CellTiter-Glo® *Luminescent Cell Viability Assays* durchgeführt. Hierfür wurden pro Well 100 μL CellTiter®-Glo Reagenz, welches nach Herstellerangaben angesetzt wurde, zugegeben und die 96-Well-Platte in den NanoQuant Platte der Firma Tecan Group (Crailsheim) eingesetzt. Anschließend wurde die Zellyse unter Schütteln induziert und das Lumineszenzsignal nach 10 Minuten gemessen. Als Negativkontrolle wurde reines DMEM mit 10 % FKS mitgeführt.

4.9 Intrazelluläre Kolokalisation von Cit- und Pvp-Au NP in Lysosomen

Um die intrazelluläre Verteilung der Au NP genauer zu untersuchen, wurden die lysosomalen Kompartimente der Zelle mit dem spezifischen Farbstoff LysoTracker®*Deep Red* angefärbt und anschließend die Kolokalisation der Au NP in diesen Kompartimenten mikroskopisch untersucht.

Versuchsansatz

In einem μ -Slide 8 Well (Ibidi) wurden $0,016 \cdot 10^6$ Zellen pro Kavität ausgesät und für 24 Stunden anwachsen gelassen und wie unter 4.7.3 beschrieben inkubiert. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 50 nM LysoTracker®*Deep Red* (Thermo Fisher Scientific) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und frisches PBS zugeben. Die mikroskopische Untersuchung der intrazellulären Kolokalisation der Au NP in Lysosomen erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit Spinning-Disc Technologie (*Life Cell Axio Observer*; Zeiss). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der ZEN 2 (*blue edition*) Software.

4.10 Zelluläre Aufnahme von Cit-, Pvp-Au NP und AuCl_3

Bei der Untersuchung der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln kommt es leicht zu einer Überbestimmung durch Membran-anhaftende Partikel. Für die Aufnahmeuntersuchungen wurde deshalb ein Behandlungsansatz unter Verwendung einer Ätzlösung aus Jod-Kaliumiodid gewählt. Dabei gehen membranständige Au NP als Goldiodid in Lösung und können so in weiteren Waschschritten abgetrennt werden.

Versuchsansatz

Für die Untersuchung der Aufnahme von Cit-, Pvp-Au NP und AuCl_3 in HeLa S3-Zellen wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät, für 24 Stunden anwachsen gelassen und wie unter 4.7.3 beschrieben inkubiert.

Um membrangebundene Partikel zu entfernen, wurden die Zellen nach den entsprechenden Inkubationszeiten für 2 Minuten mit 10 mL einer 340 μM Jod/Kaliumiodidlösung behandelt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in 5 mL PBS mit 10 % FKS aufgenommen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Röhrchen überführt, zentrifugiert (4 °C, 1300 rpm, 3 Minuten), das Zellpellet mit 5 mL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem PBS aufgenommen, resuspendiert und 4,5 mL in ein neues 15 mL Röhrchen überführt und wiederholt zentrifugiert (die restlichen 0,5 mL wurden für die Zellzahlbestimmungen herangezogen). Das Zellpellet wurde mit 1 mL PBS in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, bei 4 °C, 500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und wie unter 4.5 beschrieben weiter aufgearbeitet und der Goldgehalt mittels GF-AAS bestimmt.

4.11 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Bestimmung zellulärer ROS wurde die fluorogene Sonde CellROX®Green (Absorptions-/Emissionsmaximum: 485/520 nm) verwendet. Die zellpermeable Substanz weist in reduziertem Zustand nur eine schwache Fluoreszenz auf, welche jedoch durch Oxidation stark zunimmt.

Um nur die in vitalen Zellen gebildeten ROS zu erfassen, wurde zur Selektion der gewünschten Zellpopulation eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI) (Absorptions-/Emissionsmaximum: 493/632 nm) durchgeführt. Der Farbstoff PI kann intakte zelluläre Plasmamembranen nicht passieren, lediglich membrangeschädigte werden hiermit gefärbt.

Die beiden Farbstoffe wurden mit einem 488 nm Laser angeregt, wobei das CellROX®Green-Signal nach dem 530/30 nm Bandpassfilter und das PI-Signal nach dem 695/40 nm Bandpassfilter erfasst wurden.

Versuchsansatz

Es wurden $0,133 \cdot 10^6$ Zellen in eine 35 mm Zellkulturschale ausgestreut, 24 Stunden anwachsen gelassen und wie unter 4.7.3 beschrieben inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert und in 1 mL Färbelösung aufgenommen (1 mL Zellkulturmedium, 10 μ L PI (50 μ g/ μ L), 0,8 μ L CellROX (2,5 mM)) und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je Bestimmung 30.000 vereinzelte Zellen am Durchflusszytometer untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine einstündige Behandlung mit 400 μ M *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) mitgeführt. Zur Auswertung wurden die mittleren Fluoreszenzen exponierter Zellen ins Verhältnis zur Fluoreszenz von Negativkontrollen gesetzt, woraus sich eine x-fache Induktion an ROS ergab. Eine repräsentative Darstellung der Gating-Strategie der ROS-Bestimmung ist in Abbildung 6 dargestellt.

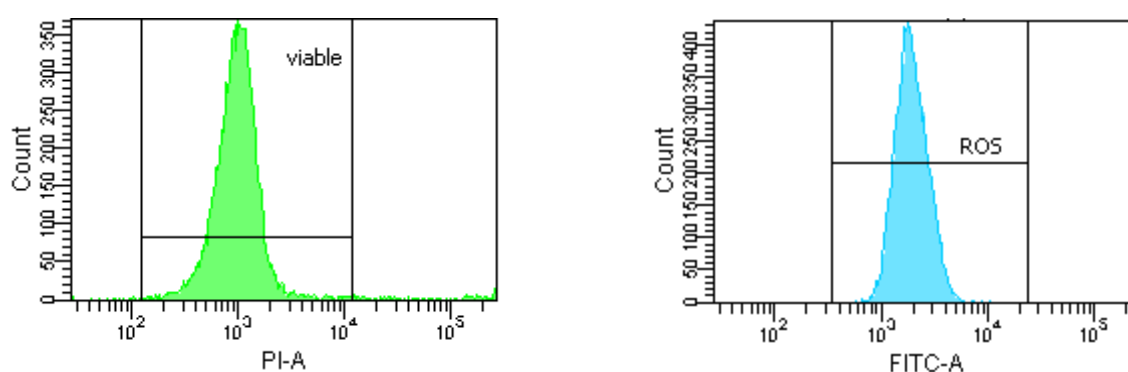


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung der Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Erfassung generierter ROS. Abgebildet ist die selektierte vitale Zellpopulation (links), in welcher unter Verwendung der CellROX®Green Sonde das Fluoreszenzsignal (Exc.: 488 nm; Bandpass: 530/30) für die ROS-Untersuchungen (rechts) gemessen wurde.

4.12 Apoptotische/nekrotische Zellanteile und Zellzyklusphasenverteilung

Die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung sowie der Apoptose und Nekrose erfolgte in einem Ansatz parallel am Durchflusszytometer. Hierbei wurde der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welcher in AT-reichen Regionen doppelsträngiger DNA interkaliert, für die Zellzyklusuntersuchungen verwendet. Annexin V-FITC färbt hingegen Phosphatidylserinreste, welche an die äußere Plasmamembran apoptotischer Zellen transloziert werden. Die Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen erfolgt über eine Gegenfärbung mit PI, einem Farbstoff, der nur in membrangeschädigte Zellen eindringen kann. Somit werden nekrotische Zellen sowohl durch PI als auch Annexin V-FITC angefärbt und können mit einer geeigneten Gating-Strategie von apoptotischen Zellen (nur Annexin V-FITC positiv) unterschieden werden. Eine repräsentative Darstellung eines Histogramms der PI/Annexin V-FITC-Messung bzw. DAPI-Messung ist in Abbildung 7 und 8 dargestellt

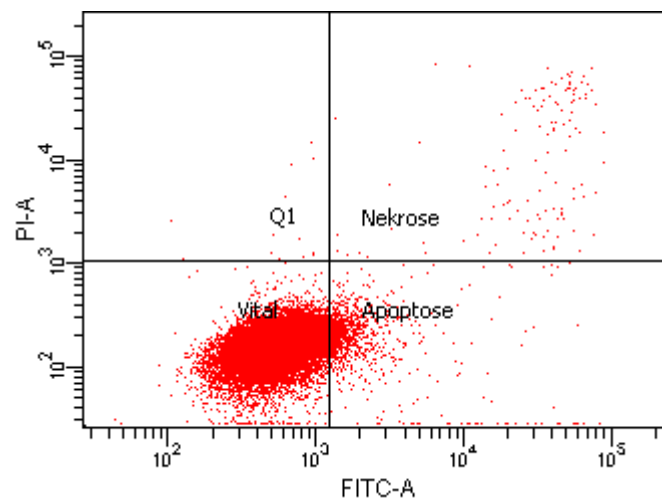


Abbildung 7: Repräsentative Darstellung eines Histogramms zur Bestimmung der Anteile an apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Population vitaler Zellen (PI und FITC negativ) ist im linken unteren Quadranten abgebildet. Apoptotische Zellen weisen ein positives FITC-Signal auf und verschieben die Population in den untern rechten Quadranten. Nekrotische Zellen weisen ein positives PI und FITC-Signal auf und liegen im oberen rechten Quadranten.

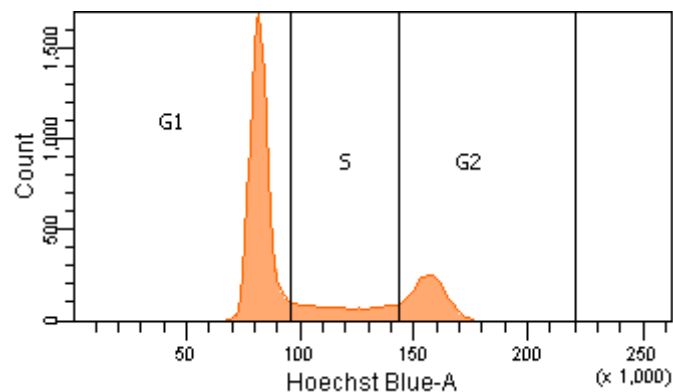


Abbildung 8: Repräsentative Darstellung eines Histogramms der Zellzyklusphasenverteilung von HeLa S3-Zellen. Die DNA des Zellkollektivs wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge wie der Farbstoff Hoechst) ist gegen die Zellzahl aufgetragen. Anhand der Signalintensität erfolgt die Zellzyklusphasenunterscheidung in G1-, S- und G2/M-Phase.

Versuchsansatz

Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden anwachsen gelassen. Die Inkubation der Testsubstanzen erfolgte wie unter 4.7.3 beschrieben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellen in 1 mL frischem Medium aufgenommen. Für die Messung der Anteile an apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden 150 μ L der Zellsuspension mit 200 μ L eines Mastermixes (200 μ L Ringerlösung, 50 μ g/ μ L PI, 1 μ L Annexin V-FITC) in einem Rundbodenröhrchen (Falcon™) vereinigt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C erfolgte die Messung der der Anteile apoptotischer/nekrotischer Zellen am Durchflusszytometer (LRSII Fortessa) (20 000 Events, Exzitation: 488 nm, Emission: 530/30 nm (Annexin V-FITC), 695/40 nm (PI)).

Die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung wurde mit der restlichen Zellsuspension durchgeführt. Diese wurde ebenfalls in ein Rundbodenröhrchen überführt, bei 4°C, 1300 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 1 mL eiskaltem PBS aufgenommen. Unter Schütteln wurden langsam 3 mL 96 %-iges Ethanol zugegeben und die Zellen bei -20°C über Nacht fixiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4 °C, 2000 rpm, 5 Minuten) wurde das Zellpellet in 300 μ L DAPI-Färbelösung aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (30 000 Events, Exzitation: 405 nm, Emission: 450/50 nm).

4.13 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen erfolgten nach der in unserem Arbeitskreis etablierten Hochdurchsatz *RT-qPCR* (HT RT-qPCR) Methode von Fischer *et al.* (2016). Die Auflistung der untersuchten Gene ist im Anhang (Tabelle 12) aufgeführt.

Die Analysen wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Julia Feye im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Versuchsansatz

Für die Genexpressionsanalysen wurden $0,35 \cdot 10^6$ Zellen für die Inkubation mit Au NP und $0,5 \cdot 10^6$ Zellen für die Inkubation mit den löslichen Gold-Komplexen bzw. den Liganden ausgestreut, für 24 Stunden anwachsen gelassen und wie unter 4.7.3 beschrieben inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in 3 mL PBS mit 10 % FKS aufgenommen, in ein 15 mL Röhrchen überführt und bei 4°C, 1300 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 mL PBS aufgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und nochmals bei 4°C, 1300 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung des NucleoSpin® RNA Plus Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um die genomische DNA zu entfernen, wurde die Probe zunächst in 350 µL Lysepuffer aufgenommen, resuspendiert, auf die NucleoSpin gDNA *removal* Säule gegeben und anschließend bei RT, 11000 g für 30 s zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und 100 µL *binding solution* zum Eluat zugegeben. Das Lysat wurde resuspendiert, auf eine RNA-bindende Säule gegeben und zentrifugiert (RT, 11000 g, 20 s). Anschließend wurde die gebundene RNA in drei aufeinander folgenden Waschschritten mit 200 µL Waschpuffer 1 und 600 µL und 250 µL Waschpuffer 2 gereinigt und bei RT, 11000 g für 20 s (nach den ersten beiden Waschschritten) bzw. 2 Minuten (nach drittem Waschschrift) zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt und die gebundene RNA zweimal mit 30 µL RNA-freiem Wasser durch Zentrifugation (RT, 11000 g, 1 Minute) eluiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde am Tag der weiteren Aufarbeitung photometrisch bestimmt. Hierfür wurden 2 µL des Eluats auf eine NanoQuant-Platte gegeben und die Absorption bei 260 nm und 280 nm am Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Group; Crailsheim) bestimmt. Aus dem Absorptionsquotienten konnte zudem die Reinheit der Probe bestimmt werden, welche für die weitere Aufarbeitung einen Wert $\geq 2,0$ aufweisen musste.

cDNA-Synthese

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des qScript *cDNA Synthesis Kit* der Firma QuantaBio nach Herstellerangaben. Je Probe wurden zwei technische Replikate mitgeführt.

Je 1 µg RNA wurden in einem 8-er PCR-Reaktionsgefäß 5 µL Mastermix (1 µL reverse Transkriptase, 4 µL 5X *Reaction Mix*) zugegeben und auf 20 µL Gesamtvolumen pro Kavität mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend gut durchmischt und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Umschreibung in cDNA in einem Thermocycler mit dem in Tabelle 3 gezeigten Temperaturprogramm.

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese.

Temperatur (°C)	Zeit (min)
25	5
42	30
85	5
4	∞

Präamplifikation (*Specific Target Amplification, STA*)

Um eine ausreichende Menge an Matrizen-DNA zu gewährleisten, wurden die Proben mit den entsprechenden Primern in einer vorgeschalteten PCR vervielfältigt. Hierfür wurde zunächst ein *Pooled Primer Mix*, welcher alle Primer der Zielgene enthielt, mit DNA-Suspensionspuffer auf eine Konzentration von 500 nM verdünnt (Lagerung bei -20°C). Pro Kavität wurden 5 µL des in Tabelle 4 angegebenen Ansatzes zu den Proben pipettiert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Präamplifikationsmixes.

Komponente	Volumen (µL)
2X TaqMan PreAmp Master Mix	2,5
Pooled Primer Mix (500 nM)	0,5
PCR-zertifiziertes Wasser	0,75
cDNA Probe	1,25

Pro Präamplifikation wurden zusätzlich Kontrollen ohne cDNA (NTC-STA, *no template control-STA*) und mit nicht umgeschriebener RNA (noRT) mitgeführt. Die Proben wurden gevortext und anschließend zentrifugiert, bevor sie in einem Thermocycler mit dem in Tabelle 5 dargestellten Temperaturprogramm amplifiziert wurden.

Tabelle 5: Temperaturprogramm der *Specific Target Amplification*.

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	-
Denaturierung	95	15 s	12
Annealing und Elongation	60	4 min	12
Endtemperatur	4	∞	-

Exonukleaseverdau

Der Verdau ungebundener Primer erfolgte mit Hilfe einer Exonuklease. Hierfür wurden 1,4 µL PCR-zertifiziertes Wasser, 0,2 µL Exonuklease I *Reaction Buffer* und 0,4 µL Exonuklease I (20 units/µL) zu den präamplifizierten Proben gegeben. Der Verdau verlief mit dem in Tabelle 6 dargestellten Temperaturprogramm in einem Thermocycler. Anschließend wurden die Proben fünffach mit TE-Puffer verdünnt und konnten bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt werden.

Tabelle 6: Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus.

	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Verdau	37	40
Deaktivierung	80	5
Endtemperatur	4	∞

Primerverdünnung und Probenvorbereitung

Die Primerpaare (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) wurden vorab mit 25 µL *Assay Loading Reagent* (2X) und 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer auf 5 µM verdünnt.

Zu den verdauten Proben wurden je 2,5 µL *SsoFAST™EvaGreen®Supermix with Low ROX* (2X) und 0,25 µL *DNA Binding Dye Sample Loading Reagent* (20X) gegeben, resuspendiert und zentrifugiert. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Kontrolle ohne Primerpaar mitgeführt (NRC; *no reaction control*) und eine Kontrolle mit PCR-zertifiziertem Wasser anstelle der Probe (NTC).

96 x 96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Die Vorbereitung und die Beladung des *Dynamic Array IFC (integrated fluidic circuit)* erfolgten nach Herstellerangaben.

Zunächst wurden beide Akkumulatoren des Chips mit dem *Control Line Fluid* befüllt und die Schutzfolie auf der Unterseite des Chips entfernt. Anschließend wurde der Chip in den *IFC Controller HX* gestellt und der Chip durch Spülung der Mikrokanäle mit einem *Prime*-Programm auf die Probenbeladung vorbereitet. Danach wurden innerhalb von 2 Stunden 5 µL der Proben- und Primerreaktionsgemische luftblasenfrei in den Chip pipettiert. Im Zuge des *Load Mix (136X)*-Programmes wurden anschließend die Proben und Primer in den Reaktionskammern gemischt. Vor der Implementierung des Chips in das BioMark™-System wurden anhaftende Staubpartikel mit Hilfe eines Klebenstreifens entfernt. Unter Verwendung des in Tabelle 7 dargestellten Temperaturprogrammes wurde die qPCR durchgeführt.

Tabelle 7: Temperaturprogramm der qPCR.

	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Thermale Durchmischung	70	2400
Thermale Durchmischung	60	30
Hot Start	95	60
Denaturierung	96	5
Annealing und Elongation	60	20
Schmelzkurvenanalyse	60-95 (1 °C/3 s)	-

Datenanalyse

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis*. Eine gleichmäßige Beladung des Chips wurde anhand des passiven Referenzfarbstoffes ROX überprüft. Die für die Analyse herangezogenen *Cycle of Quantification*-Werte (Cq-Werte) der Zielamplifikate wurden mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® bestimmt. Zur Präzisierung der Cq-Werte wurde die in der Software enthaltene Schwellenwert-Methode zur Basislinienkorrektur angewandt. Die Darstellung der Cq-Werte der Proben und der mitgeführten Kontrollen als Heat-Map sowie der Schmelzkurven wurden als Qualitätskontrolle herangezogen. Für die weitere Datenanalyse wurden die Cq-Werte exportiert und mit Hilfe der Software *GenEX* ausgewertet. Nach einer Reihe von Datenverarbeitungsprozessen wurden mit Hilfe der Analysentools *geNorm* und *Normfinder* geeignete Referenzgene selektiert. Die zur Verfügung stehenden Referenzgene umfassten *ACTB*, *BSM*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1*. Die relativen Transkriptmengen wurden nach Anwendung der $\Delta\Delta Cq$ -Methode (Gleichung 1-3) relativ zu einer Kontrolle dargestellt. Die Expressionswerte der Kontrolle wurden dabei auf 1 gesetzt (Livak und Schmittgen 2001, Pfaffl 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird ab einer Verdopplung bzw. Halbierung der Transkriptmenge von einer relevanten Änderung der Expression ausgegangen.

$$\Delta Cq = Cq_{\text{Zielgen}} - Cq_{\text{Referenzgen}} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{Behandlung}} - \Delta Cq_{\text{Kontrolle}} \quad (2)$$

$$\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (3)$$

4.14 PARYlierungs-Aktivität isolierter PARP-1

Die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung der Gold(III)-Komplexe Auphen und Aubenpy sowie den Liganden Phen und Benpy wurde unter Verwendung des Trevigen® *HAT Universal Colorimetric PARP Assay Kit with Histone-Coated Strip Wells* durchgeführt. Hierbei wird der Einbau biotinylierter ADP-Ribose auf immobilisierte Histone durch die PARP-1 mit Hilfe eines HRP (*horseradish Peroxidase*)-Streptavidin-Systems kolorimetrisch detektiert. Die benötigten Puffer und Lösungen wurden nach Herstellerangaben vor jeder Durchführung frisch angesetzt.

Versuchsdurchführung

Um die immobilisierten Histone zu rehydratisieren, wurden je Probe zwei Wells mit 50 µL 1X PARP-Puffer versetzt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 µL der entsprechenden Testsubstanz und 15 µL PARP-HSA Enzymlösung (0,5 U/15 µL) in die Wells pipettiert. Nach Inkubation für 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 25 µL PARP Cocktail/ Well und eine Inkubation für 60 Minuten.

Die Wells wurden anschließend jeweils zweimal mit 1X PBS + 0,1 % Triton X-100 und 1X PBS gewaschen. Es wurden 50 µL/ Well einer 1 : 500 verdünnten Strep-HRP-Lösung zugegeben und für weitere 60 Minuten

inkubiert. Die Wells wurden erneut jeweils zweimal mit 1X PBS + 0,1 % Triton X-100 und 1X PBS gewaschen. Nach Zugabe von 50 µL TACS-Sapphire™ erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL/Well 0,2 M HCl gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

4.15 Bestimmung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenzmethode

Für die Inhibierungsstudien wurde die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenzmethode untersucht. Hierfür wurde die Poly(ADP-Ribosyl)ierung zunächst durch die Inkubation mit H₂O₂ induziert. Die immunfluorimetrische Detektion von Poly(ADP-Ribose)-Ketten (PAR) erfolgte zellulär mit Hilfe des spezifischen Antikörpers 10 H und einem Alexa Fluor®488 gekoppelten Sekundärantikörper.

Versuchsansatz

Für die Bestimmung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenzmethode wurden $0,133 \cdot 10^6$ Zellen in 2 mL Medium in 35 mm Zellkulturschalen mit 18 mm großen Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden anwachsen gelassen. Pro Ansatz wurden DMSO-Kontrollen und Behandlungen mit 5 µM PJ-34 in Doppelbestimmung mitgeführt. PJ34, ein bekannter PARP-1-Inhibitor, diente dabei als Positivkontrolle. Die Inkubation erfolgte wie unter 4.7.3 beschrieben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 Minuten mit 100 µM H₂O₂ inkubiert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen erfolgt mit eiskaltem 100 % Methanol für 5 Minuten. Die fixierten Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Für eine bessere Zugänglichkeit der Antikörper wurden die Zellen für 10 Minuten mit 0,2 %-Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert und dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in 5 % Milchpulver (in PBST) bei 4 °C über Nacht. Die Inkubation mit dem Primärantikörper 10 H (*anti-PAR mouse* monoklonal, 1/800 in Blockierlösung) erfolgte für eine Stunde bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT mit dem Alexa Fluor®488 gekoppelten Sekundärantikörper (*goat anti-mouse* IgG H&L, 1/500 in Blockierlösung) inkubiert. Die Deckgläschen wurden folgend mit *Mounting* Medium (mit DAPI) auf den Objektträgern fixiert.

Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte an einem Axio Imager der Firma Zeiss (Exzitation: 535 nm und 465 nm; Emission: 465 nm und 509 nm). Pro Deckgläschen wurden je 10 Bilder zur Auswertung herangezogen. Die Auswertung des kolokalisierten Fluoreszenzsignals erfolgte mit der AxioVision Software (Rel. 4.9.1) von Zeiss. Das Fluoreszenzsignal wurde relativ zu einer H₂O₂- Kontrolle dargestellt.

Die Untersuchung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenz erfolgte in Zusammenarbeit mit Vanessa C. Schilling und Julia Feye im Zuge ihrer Masterarbeit.

4.16 Quantifizierung von Poly(ADP-Ribose) mittels LC-MS/MS Methode

Eine sensitive Methode zur Ermittlung der zellulären PAR-Einheiten stellt die Quantifizierung mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) dar. Hierbei werden die PAR-Einheiten durch eine alkalische Behandlung von den gekoppelten Makromolekülen abgelöst. Nach einem enzymatischen Verdau können die einzelnen Ribosyladenosineinheiten (R-Ado) mittels LC-MS/MS quantifiziert werden.

Versuchsansatz

Für die Quantifizierung von Ribosyladenosin, wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden anwachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Inkubation wie unter 4.7.3 beschrieben. Je Behandlung wurden drei Bestimmungen pro Ansatz mitgeführt, wobei eine Doppelbestimmung für die Quantifizierung der Poly(ADP-Ribose) herangezogen wurde und eine Behandlung für die Zellzahlbestimmung mitgeführt wurde.

Aufarbeitung und Verdau von DNA, RNA und Proteinen

Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde die Poly(ADP-Ribosyl)ierung mit einer Inkubation von 100 μ M H_2O_2 für 5 Minuten initiiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen, die Zellen auf Eis mit 1,5 mL 20 %-iger Trichloressigsäure (w/v) fixiert, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14 000 g, 5 Minuten, 4 °C) wurde das Zellpellet zweimal mit 500 μ L eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen. Zu den Pellets wurden je 230 μ L 0,5 M KOH pipettiert und für 45 Minuten unter mehrmaligem resuspendieren inkubiert. Zur Neutralisation wurden 75 μ L 3 M MOPS hinzugegeben und zum Verdau der DNA und RNA mit 6,25 μ L 2 M $MgCl_2$, 2,5 μ L 100 mM $CaCl_2$, 12,5 μ L DNase (2 mg/mL; Roche), 2,5 μ L RNase (10 mg/mL; Sigma Aldrich) für 3 Stunden bei 37 °C auf einem Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurde 1,25 μ L Proteinase K (40 mg/mL) zugegeben und bei 37 °C über Nacht auf einem Heizschüttler inkubiert.

Extraktion und Fragmentierung der Poly(ADP-Ribose)

Die Extraktion der Poly(ADP-Ribose) erfolgte mit dem *High pure* miRNA Isolierungskit von Roche. Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau der Poly(ADP-Ribose) mit jeweils 60 μ L 10 mM $MgAc_2$, 60 μ L 250 mM NH_4Ac , 1 μ L alkalische Phosphatase (10 U; Sigma Aldrich), 1 μ L Phosphodiesterase (0,5 U; Affymetrics) und 220 μ L H_2O für 3 h bei 37 °C. Mittels Nanoseparationsfilter (10 kDa; Pall) wurden die Enzyme durch Zentrifugieren (RT, 14 000 g; 20 Minuten) abgetrennt und die Zellextrakte vakuumgetrocknet, in 180 μ L bidest. Wasser aufgenommen und in das LC-MS/MS-System injiziert.

Chromatographische Trennung und Detektion

Unter Verwendung einer Hypersil Gold™ aQ-Säule (150 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 3 µm; Thermo Scientific) erfolgte die chromatographische Trennung an einem Waters 2695 Trennungsmodul bei 30 °C. Das gekoppelte Quattro Micro Massenspektrometer (Waters) lief mit einem positiven ESI-Modus. Das Gradientenprogramm der LC-MS/MS Methode sowie die Parameter des Massenspektrometers sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 8: Gradientenprogramm der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Poly(ADP-Ribose).

Zeit (min)	A (%) 8 mM NH ₄ Ac	B (%) Acetonitril	Flussrate [mL/min]
0	98,5	1,5	0,4
20	98,5	1,5	0,4
25	30	70	0,4
28	30	70	0,4
30	98,5	1,5	0,4
35	98,5	1,5	0,4

Tabelle 9: MS-Bedingungen.

Source	Value	Analyser	Value
Capillary	0,5	LM 1 resolution	15
Cone (V)	27	HM 1 resolution	15
Extractor (V)	2	Ion energy 1	0,5
RF lens (V)	0,1	Entrance	2
Source temperature (°C)	120	Collision	25
Desolvation temperature (°C)	400	Exit	1
Cone gas flow (L/Hr)	90	LM 2 resolution	15
Desolvation gas flow	1000	HM 2 resolution	15
		Ion energy 2	1
		Multiplier	300

4.17 Western Blot-Analyse der PARP-1

Ob es bei der Inkubation mit den Gold(III)-Komplexen und den Liganden zu einer Spaltung der PARP-1 im Zuge von Apoptosesignalwegen kommt, wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dafür wurde das Proteinextrakt der Kontrollen und der behandelten Zellen auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert. Die PARP-1 wurde anschließend mit dem spezifischen Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper chemiluminometrisch detektiert.

Versuchsansatz

Für die Proteinanalyse mittels Western-Blot wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro 100 mm Zellkulturschale ausgestreut, für 24 Stunden anwachsen gelassen und wie unter 4.7.3 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, in 5 mL PBS mit 10 % FKS aufgenommen, in ein 15 mL Röhrchen überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 3 Minuten, 4 °C). Das Zellpellt wurde mit 1 mL PBS in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und wieder zentrifugiert.

Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellpellets wurden in jeweils 50 µL Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100; 10 µL Protease-Inhibitor (10x)) resuspendiert und für 30 Minuten auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde bei 14 000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das überstehende Proteinextrakt in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Für die photometrische Proteinbestimmung nach *Bradford* wurde vor jeder Probenmessung eine äquidistante 5-Punkt-Kalibrierung mit Bovinem Serumalbumin zwischen 0,01 mg/mL und 0,075 mg/mL erstellt. Von den Kalibrierlösungen sowie von den Proteinextrakten wurden pro Kavität einer 96-Well-Platte 20 µL und 180 µL *Bradford*-Reagenzmix (Verdünnung 1 : 3,5 in bidest. Wasser (v/v)) pipettiert. Nach 30 Sekunden Schütteln wurde die Absorption bei 595 nm an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät der Firma Tecan Group (Crailsheim) gemessen.

SDS-PAGE und Westernblot

Die Auftrennung des Proteinextraktes erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 %-iges Trenngel und 4 %-iges Sammelgel; Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Zunächst wurden pro Probe 50 µg Protein/20 µL mit 5 µL Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben und ein Proteingrößenmarker auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 5 Minuten bei 80 V und 45-60 Minuten bei 180 V.

Für den Proteintransfer wurde die PVDF-Membran für 10 s in Methanol und anschließend für mindestens 10 Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert. Der Tank-Blot wurde nach Herstellangaben zusammengebaut. Der Blot erfolgte bei 30 V und 4 °C über Nacht.

Immundetektion

Die Membran wurde für 1 Stunde in Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in PBST) unter Schwenken geblockt und anschließend mit dem spezifischen Primärantikörper (1 : 500 in Blockierlösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in PBST gewaschen und mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1 : 500 in Blockierlösung). Nach erneuten Waschschritten erfolgte die Detektion unter Verwendung des *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit*. Nach 1 Minute wurde die Chemilumineszenz am Luminescent Image Analyzer LAS-3000 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Aida Image Analyzer.

Als Ladekontrolle diente α -Tubulin (1 : 500 in Blockierlösung) und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (1 : 500 in Blockierlösung), welche wie eben beschrieben inkubiert wurden.

4.18 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay

Die Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen erfolgte mittels elektrophoretischem Mobilitäts-Shiftassay (EMSA). Hierbei wird die Laufweitenverschiebung eines Protein-DNA-Komplexes im Vergleich zu einer reinen DNA-Probe, nach Trennung auf einem Polyacrylamidgel, ermittelt. Unter Verwendung von spezifischen biotinylierten doppelsträngigen-DNA Oligonukleotiden (ds-ON; *forked* Oligoduplexstruktur) können diese unter Verwendung eines HRP-gekoppelten Streptavidin-Konjugats, nach einem Blotting, auf einer Nylonmembran detektiert werden. Die Versuchsdurchführung erfolgte anhand einer publizierten Vorschrift (Rank *et al.* 2016).

Versuchsdurchführung

Das isolierte Protein PARP-1 (Trevigen) wurde in einer Konzentration 100 nM zunächst für 10 Minuten mit den entsprechenden Substanzen in einem 1,5 mL Reagiergefäß inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 fmol der ds-ON [5'-Biotin-(TTT)₅-(TTAGGG)₄GCATGCACTAC-3' und 5'-GTAGTGCATG(CCCTAA)₄-(TTT)₅ 3'] in EMSA Puffer (40 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM DTT, 4 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA, 0,1 % NP-40) bei RT (Gesamtvolumen 20 μ L) und eine Inkubation von 20 Minuten. Danach wurden 5 μ L 10x Ladepuffer zugegeben (40 % Glycerin, 0,05 % OrangeG und 0,05 % Bromphenolblau) und die Proben auf ein 5 %-iges TBE-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt für 45 Minuten bei 100 V in 0,5X TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 M EDTA). Der Blot des Gels erfolgte ebenfalls in 0,5X TBE-Puffer auf eine Nylonmembran bei 80 V, 500 mA für 40 Minuten. Diese wurde für das *crosslinking* der DNA für 1 Stunde bei 90 °C in einem Trockenschrank hitzebehandelt. Die Membran wurde anschließend für 1 Stunde in 5 %-igem M-TNT (5 % Milchpulver in 0,1 M Tris-HCl, 0,15 NaCl, 0,05 % Tween-20) geblockt und dreimal für 5 Minuten in TNT gewaschen. Darauf folgend wurde die Membran für 1 Stunde mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat (1 : 1000 in TNT) inkubiert, nochmals dreimal 5 Minuten in TNT gewaschen und die Probenbanden unter Verwendung des *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit* detektiert. Nach

1 Minute wurde die Chemilumineszenz am *Luminescent Image Analyzer* LAS-3000 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Aida Image Analyzer.

4.19 Statistik

Im Rahmen der statistischen Auswertung, wurde ab drei unabhängigen Stichproben (Versuchen) auf Varianzhomogenität mit dem Levene-Test getestet. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) wurde festgestellt ob Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Stichproben vorlagen. Bei Varianzhomogenität wurde als Post-hoc-Analyse der Dunnett's T-Test, im Falle von Varianzheterogenität der Dunnett's T3-Test angewandt. Sollten die Unterschiede zwischen nur zwei Stichproben analysiert werden, wurden die Unterschiede mittels T-Test untersucht. $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse, welche im Rahmen dieser Dissertation erhoben wurden, werden in dem folgenden Kapitel zusammenfassend dargestellt und diskutiert. Im ersten Teil wird dabei auf die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Citrat (Cit)- und Polyvinylpyrrolidon (Pvp)-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (Au NP) und der löslichen Verbindung AuCl_3 eingegangen. Die Charakterisierung sowie die Zellkulturexperimente mit den Substanzen sind in den Kapiteln 5.1.1 bis 5.2.5 dargestellt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der Einfluss ausgewählter Gold(III)-Komplexe und den entsprechenden Liganden auf die PARP-Aktivität mit den Ergebnissen aus verschiedenen subzellulären Versuchen sowie Zellkulturuntersuchungen diskutiert (Kapitel 5.3.1 bis 5.3.9).

5.1 Partikelcharakterisierung

Die Cit-Au NP wurden nach einer modifizierten Methode von Turkevich und Frens (Frens 1973, Turkevich *et al.* 1951) synthetisiert. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden charakterisiert. Die Ergebnisse der Charakterisierung sind in den Kapiteln 5.1.1 bis 5.1.3 dargestellt. Darüber hinaus wurde in Zellkulturexperimenten die Zytotoxizität und die zelluläre Aufnahme von Cit-Au NP, Pvp-Au NP und AuCl_3 untersucht (Kapitel 5.2.1 bis 5.2.4). Weiterführend wurde der Einfluss der Cit-Au NP und AuCl_3 auf transkriptioneller Ebene untersucht und miteinander verglichen (Kapitel 5.2.5).

5.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Bestimmung der Form, Größe und Größenverteilung der synthetisierten Cit-Au NP, mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), wurde die native Partikelsuspension auf kleine Kupfer-Gitternetze übertragen und elektronenmikroskopisch abgebildet. Zusätzlich zu den Aufnahmen der nativen Partikelsuspension wurden Aufnahmen einer Stammlösung in DMEM mit 10 % FKS der Konzentration $50 \mu\text{g/mL}$ Cit-Au NP ausgewertet, um Aussagen über eine mögliche Agglomeratbildung der Partikel treffen zu können. Eine Auswahl an TEM Aufnahmen ist in Abbildung 9 gezeigt. Für die Pvp-Au NP wurden die TEM-Angaben des Herstellers übernommen (Anhang, Abbildung 37).

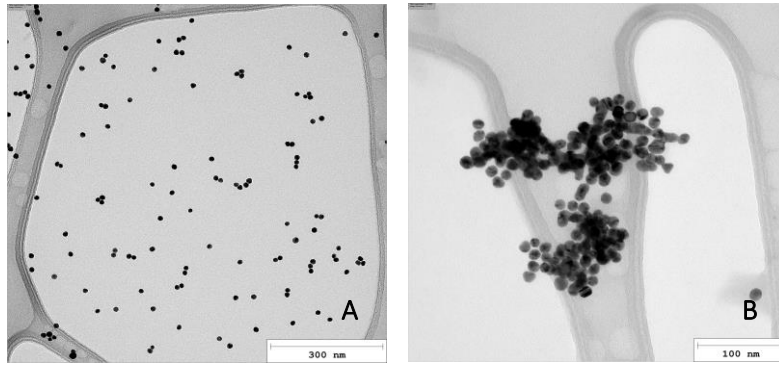


Abbildung 9: Repräsentative TEM-Aufnahmen der nativen Cit-Au NP Partikelsuspension (A) und einer Stammlösung der Konzentration 50 µg/mL in DMEM mit 10 % FKS (B).

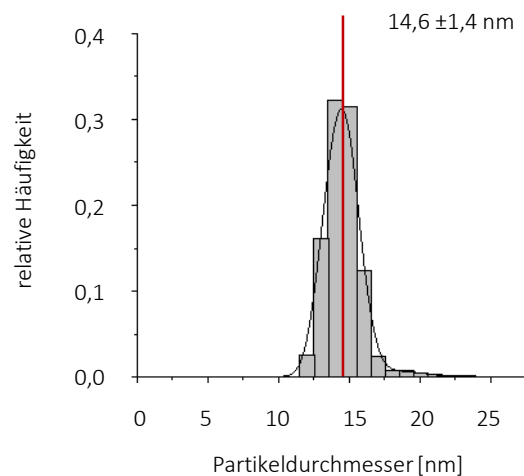


Abbildung 10: Größenverteilung der Cit-Au NP in nativer Suspension. Dargestellt ist der Mittelwert der Durchmesser von ≥ 1000 Partikeln aus zwei Synthesansätzen $\pm$ SD.

Die repräsentativen TEM-Aufnahmen der nativen Partikelsuspension (Abbildung 9 A) zeigten gleichmäßig verteilte Einzelpartikel mit vorwiegend sphärischer Gestalt. Lediglich ein geringer Teil lag in Partikelverbänden vor und zeigte Facetten. Die quantitative Auswertung der Aufnahmen ergab einen mittleren Partikeldurchmesser von $14,6 \pm 1,4$ nm in der nativen Partikelsuspension (Abbildung 10). Die schmal verlaufende Partikelverteilung deutet auf eine homogene Partikelgrößenverteilung hin, weshalb von monodispersen Partikeln in der nativen Partikelsuspension ausgegangen wird. Die Partikel der Suspensionen in DMEM mit 10 % FKS (Abbildung 9 B) lagen überwiegend in Partikelverbänden vor und wiesen eine Neigung zur Agglomeration auf, welche jedoch auch auf Trocknungsartefakte zurückgeführt werden könnten. Die primäre Partikelgröße blieb durch das proteinhaltige Medium unbeeinflusst und lag bei $14,7 \pm 1,8$ nm (Anhang, Abbildung 38).

Laut Herstellerangaben lag die Größe der Pvp-Au NP, abgeleitet aus einer Partikelgrößenverteilung aus TEM-Aufnahmen, bei $12,6 \pm 1,4$ nm (Anhang, Abbildung 37).

Da die Partikel für Zellkulturuntersuchungen in Medien mit Additiven wie Salzen, Aminosäuren und Proteinen vorliegen, die eine Agglomeratbildung stark begünstigen, wurden die nativen partikulären Suspensionen und Partikelsuspensionen in DMEM mit 10 % FKS zusätzlich mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht.

5.1.2 Hydrodynamische Größenverteilung und Zetapotential

Um das Dispersions- und Aggregationsverhalten einer partikulären Suspension genauer zu untersuchen, eignen sich hydrodynamische Methoden wie die dynamische Lichtstreuung. Hierbei wird die Suspension mit einem Laser bestrahlt. Über die gemessenen Intensitäten der Streufluktuation des Lichtes wird die Größe der enthaltenen Partikel abgeleitet. Grundlage für diese Messmethode ist die Brown'sche Bewegung der Partikel aufgrund zufälliger Kollisionen mit anderen Bestandteilen der Suspension. Die Geschwindigkeit ist hierbei von der Partikelgröße sowie der Temperatur und Viskosität des Suspensionsmittels abhängig. Die Beziehung zwischen der Partikelgröße und der Geschwindigkeit ist in der Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben, mit welcher der hydrodynamische Durchmesser berechnet wird. Die Bestimmung der hydrodynamischen Größenverteilung mittels DLS eignet sich jedoch nur für monodisperse Suspensionen. Bereits geringe Mengen an größeren Partikelfractionen beeinflussen die Lichtstreuungsintensität drastisch und können so zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Eine weitere Kenngröße, die mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung bestimmt werden kann, ist der Dispersitätsindex, ein Maß für die Homogenität einer Suspension. Sie ist eine dimensionslose Zahl und wird in Werten zwischen 0 und 1 angegeben. Hierbei beschreibt ein Wert von 1 eine polydisperse Partikelsuspension, welche aus einer breiten Verteilung unterschiedlich großer Partikel besteht und der Wert 0 eine monodisperse Suspension mit homogener Partikelgröße. Der Grenzwert einer monodispersen Suspension liegt laut den Geräteangaben des Herstellers bei $\leq 0,5$ (Malvern 2013).

Bei der Charakterisierung von Nanopartikeln stellt das Zetapotential eine weitere wichtige Messgröße für die Stabilität eines kolloidalen Systems dar. Die zugrundeliegende Messtechnik wird als Laser-Doppler-Anemometrie bezeichnet. Hierbei wird mit Hilfe eines Lasers die elektrophoretische Mobilität eines Partikels in einem angelegten elektrischen Feld gemessen. Eine durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisierte Suspension gilt als stabil, wenn das Zetapotential Werte von ≤ -30 mV oder ≥ 30 mV annimmt. Hier überwiegen die repulsiven Kräfte zwischen den Partikeln und verhindern eine Partikelagglomeration (Malvern 2013). Dieser Richtwert gilt jedoch nicht für sterisch stabilisierte Partikelsuspensionen. Zudem können hohe Dichteunterschiede des flüssigen Mediums und der darin verteilten Partikel zu einer Instabilität der Suspension durch Sedimentation führen.

Für die Partikelcharakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung wurde die native Partikelsuspension der Cit- bzw. Pvp- Au NP sowie Partikelsuspensionen der Konzentrationen 5, 20 und 50 $\mu\text{g/mL}$ in DMEM mit 10 % FKS, welche für die folgenden Zellkulturuntersuchungen eingesetzt wurden, untersucht.

Hierbei wurden der hydrodynamische Durchmesser (D_h), der Dispersitätsindex (DI), das Zetapotential (ZP) und der pH-Wert der entsprechenden Suspensionen bestimmt (Tabelle 10 und 11).

Tabelle 10: Darstellung des hydrodynamischen Durchmessers (D_h), Dispersitätsindexes (DI), Zetapotentials (ZP) und des pH-Werts der nativen Cit- und Pvp-Au NP Suspensionen. Die Angaben des D_h , DI und ZP basieren auf den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Bestimmungen $\pm$ SD.

	D_h (nm) $\pm$ SD	DI $\pm$ SD	ZP (mV) $\pm$ SD	pH-Wert
Cit-Au NP	17,8 $\pm$ 1,8	0,26 $\pm$ 0,21	-36,2 $\pm$ 1,5	5,6 $\pm$ 0,6
Pvp-Au NP	33,0 $\pm$ 1,7	0,29 $\pm$ 0,01	-21,1 $\pm$ 2,9	5,1 $\pm$ 0,4

Der D_h der nativen Cit-Au NP-Suspensionen betrug im Mittel 17,8 nm mit einem DI von 0,26. Die Pvp-Au NP wiesen einen D_h von 33,0 nm auf, mit einem DI von 0,29. Nach Herstellerangaben für DLS-Messungen (Malvern 2013) kann somit von weitgehend monodispersen Suspensionen der nativen Cit- und Pvp-Au NP in wässriger Lösung ausgegangen werden. Ermittelt aus TEM-Aufnahmen wiesen die Pvp-Au NP und Cit-Au NP vergleichbare Größen auf. Aus den Ergebnissen der DLS-Messungen gehen jedoch deutliche Größenunterschiede der Au NP hervor, welche auf die unterschiedlichen Stabilisatoren zurückgeführt werden. Bei Citrat handelt es sich um ein relativ kleines Molekül, welches durch seine negative Ladung zu einer elektrostatischen Abstoßung und so zur Stabilisierung der Partikel in wässriger Lösung führt. Polyvinylpyrrolidon hingegen stellt ein großes Polymer (40 kDa) dar, worauf der vergrößerte D_h im Vergleich zu den Cit-Au NP zurückzuführen ist. Durch Assoziation an der Partikeloberfläche sorgt Pvp für eine sterische Stabilisierung der Au NP. Die unterschiedliche Stabilisierung der Partikel spiegelt sich auch im Zetapotential wider. Die Cit-Au NP weisen in wässriger Lösung ein Zetapotential von -36,2 mV auf und deuten somit auf eine stabile native Suspension und eine negative Partikeloberflächenladung der Cit-Au NP hin. Die Pvp-Au NP wiesen hingegen ein höheres Zetapotential von -21,1 mV auf. Da die Zetapotentialangaben einer stabilen Partikelsuspension (≤ -30 mV oder ≥ 30 mV) nicht für sterisch stabilisierte NP gültig sind, wird trotz des erhöhten Zetapotentials der Pvp-Au NP von einer stabilen Suspension ausgegangen.

Den größten Einfluss auf das Zetapotential nimmt der pH-Wert, welcher bei der nativen Cit-Au NP-Suspension bei 5,6, der Pvp-Au NP-Suspension bei 5,1 lag. PH-Wert Modifikationen gehen mit einer geänderten Anzahl an Ladungsträgern einher, wodurch sich die Oberflächenladung der Partikel ändert und somit die Stabilität der Suspension beeinflusst werden kann. Eine Abnahme der repulsiven Kräfte (elektrostatisch oder sterisch) zwischen den Partikeln kann so zu einer Agglomeration führen.

Tabelle 11: Darstellung des D_h , DI, ZP und des pH-Werts der Cit- und Pvp- Au NP Suspensionen in DMEM mit 10 % FKS. Die Angaben des D_h , DI und ZP basieren auf den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Bestimmungen $\pm$ SD.

	c ($\mu\text{g/mL}$)	D_h (nm) $\pm$ SD	DI $\pm$ SD	ZP (mV) $\pm$ SD	pH-Wert
DMEM mit 10 % FKS	0	$67,0 \pm 20,8$	$0,59 \pm 0,05$	$-12,9 \pm 0,9$	8,8
Cit-Au NP	5	$54,6 \pm 2,1$	$0,51 \pm 0,03$	$-12,5 \pm 2,7$	8,7
	20	$41,1 \pm 4,2$	$0,47 \pm 0,08$	$-13,0 \pm 1,8$	8,9
	50	$30,4 \pm 2,0$	$0,36 \pm 0,07$	$-13,3 \pm 1,7$	8,8
Pvp-Au NP	5	$39,5 \pm 2,0$	$0,60 \pm 0,05$	$-13,5 \pm 1,4$	8,8
	20	$38,4 \pm 1,6$	$0,56 \pm 0,01$	$-13,4 \pm 1,9$	8,8
	50	$37,0 \pm 1,4$	$0,50 \pm 0,01$	$-14,9 \pm 1,2$	8,9

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Partikelsuspensionen in DMEM mit 10 % FKS dargestellt. Verglichen mit dem D_h der nativen Partikelstammlösungen der Cit-Au NP, führte die Suspendierung der Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS zu einer deutlichen Zunahme des D_h um mehr als das Doppelte bei allen getesteten Konzentrationen. Hingegen stieg der D_h der Pvp-Au NP mit zunehmender Partikelkonzentration lediglich moderat an. Der Zusatz von Proteinen oder Seren wie fetalem Kälberserum zu Nährmedien führt zur Formierung einer sogenannten Proteinkorona, die den Anstieg des D_h der NP in DMEM mit 10 % FKS verursacht (Maiorano *et al.* 2010, Sabella *et al.* 2011). Mit steigender Partikelkonzentration von 5-50 $\mu\text{g/mL}$ zeigte sich bei den Cit-Au NP eine Abnahme des D_h von $54,5 \pm 2,1$ nm auf $30,4 \pm 2,0$ nm, welcher vermutlich auf die Verdünnung des Kulturmediums durch die citrathaltige Partikelsuspension zurückzuführen ist. Dabei könnten die stabilisierenden Eigenschaften von Citrat zu einer Verstärkung der repulsiven Kräfte an der Oberfläche der Partikel und so zu einer Abnahme des D_h führen. Auch der Abnahmetrend des DI (0,51-0,36) mit steigender Partikelkonzentration (5-50 mg/mL) deutet auf diesen stabilisierenden Effekt des enthaltenen Citrats hin. Der Verdünnungsfaktor der Cit-Au NP Suspension bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ betrug im Durchschnitt 3,2.

Der D_h der Pvp-Au NP in DMEM mit 10 % FKS lag im Mittel bei 38,3 nm und zeigte keine Änderung mit steigender Partikelkonzentration. Auch der DI zeigte nur eine leichte Reduktion von 0,6 auf 0,5 an. Der Verdünnungsfaktor der Partikelsuspension mit der Konzentration 50 $\mu\text{g/mL}$ lag hier bei 103,6. Wie bereits erwähnt, stellt Polyvinylpyrrolidon ein großes Polymer (40 kDa) dar, welches über Van-der-Waals-Kräfte an der Partikeloberfläche assoziiert vorliegt und so für eine sterische Stabilisierung der Partikel sorgt. Citrat weist hingegen eine schwächere Assoziation an die Au NP-Oberfläche auf und bietet dadurch einen geringeren stabilisierenden Effekt auf die Partikel in salzhaltigen Lösungen. Darüber hinaus kommt es bei Cit-Au NP

aufgrund der schwachen Oberflächenbindung schnell zu Ligandenaustauschreaktionen mit Proteinen oder anderen Liganden, wohingegen die Pvp-Stabilisierung in einer Vielfalt an Lösungsmitteln eine stabile Oberflächenzusammensetzung aufweist (Dinkel *et al.* 2016, Zhang *et al.* 1996). In Abbildung 11 ist eine schematische Darstellung der Cit- bzw. Pvp- Au NP abgebildet.

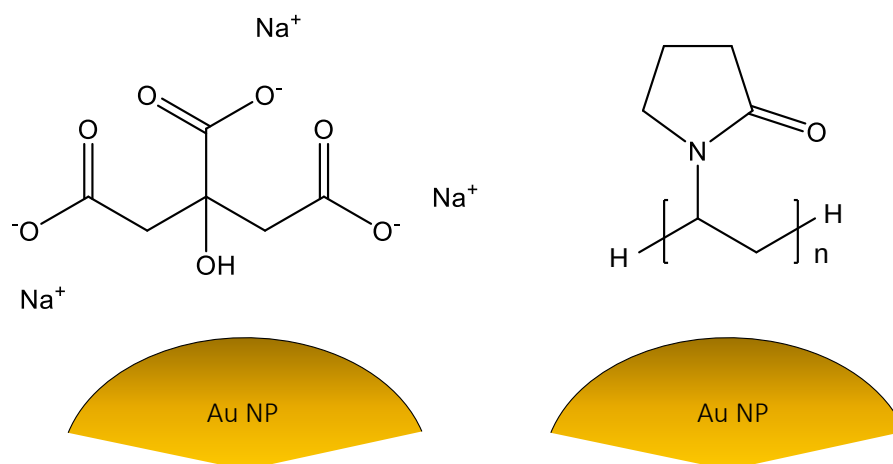


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Citrat- bzw. Polyvinylpyrrolidon-stabilisierten Gold-Nanopartikel. Das tri-Natriumcitrat dient während der Au NP Synthese nach Turkevich als Reduktionsmittel und als elektrostatischer Stabilisator (links). Das Polymer Polyvinylpyrrolidon führt zu einer sterischen Stabilisierung der Au NP (rechts).

Das Zetapotential der nativen Partikelsuspensionen lag bei -36,2 mV (Cit-Au NP) und -21,1 mV (Pvp-Au NP). Unabhängig von der Partikelkonzentration stieg das Zetapotential der Cit- und Pvp-Au NP suspendiert in DMEM mit 10 % FKS an und entsprach dem Wert des reinen Kulturmediums von -13 mV. Grund hierfür könnte eine gebildete Proteinkorona an der Oberfläche der Partikel sein. Diese dominiert nachweislich das Zetapotential von Partikeln in proteinhaltigen Medien (Sabella *et al.* 2011, Strojan *et al.* 2017). Verglichen mit dem pH-Wert des reinen Kulturmediums (8,8) zeigte die Verdünnung der Partikelsuspensionen in DMEM mit 10 % FKS keinen Einfluss auf den pH-Wert, zumal das enthaltene Natriumhydrogencarbonat-Puffersystem pH-Wert-Schwankungen des *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* im Bereich 6,2 - 8,6 regulieren kann.

Mit Hilfe einer modifizierten Citrat-Standardmethode nach Turkevich und Frens konnten in Bezug auf die Partikelgrößenverteilung, das Zetapotential und den pH-Wert, reproduzierbar Cit-Au NP in wässriger Lösung synthetisiert werden. Die Massenkonzentration an enthaltenem Gold wurde für jede Charge mit Hilfe der Grafitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (GF-AAS) ermittelt und betrug durchschnittlich $160 \pm 35 \mu\text{g/mL}$. Aus TEM-Aufnahmen gingen für die Cit- und Pvp-AuNP (nach Herstellerangaben) vergleichbare Größen hervor. Die Größenunterschiede der Au NP, welche sich aus den DLS-Messungen ergaben, werden dabei auf die divergenten Stabilisatoren Citrat und Polyvinylpyrrolidon zurückgeführt. Für die Cit-Au NP zeigte sich ein Trend zur Agglomeration in DMEM mit 10 % FKS, welcher vermutlich durch die gesteigerte Menge an Citrat bei steigenden Cit-Au NP Konzentrationen wieder rückläufig war. Im Falle der Pvp-Au NP zeigte sich kein Einfluss der Partikelkonzentration auf den D_h in DMEM mit 10 % FKS. Das Zetapotential der Cit- und Pvp-Au NP in

DMEM mit 10 % FKS wurde durch die gebildete Proteinkorona dominiert und lag bei dem Wert des reinen Zellkulturmediums.

5.1.3 Löslichkeit von Cit- und Pvp-Au NP in zellkulturrelevanten Flüssigkeiten

Die zelluläre Freisetzung von Ionen aus metallischen Partikeln, welche über Endozytosemechanismen aufgenommen wurden, wird als *trojan horse type* Mechanismus bezeichnet. Die partikelenthaltenden, internalisierten Vesikel werden hierbei in der Zelle zu sauren Kompartimenten, den Lysosomen (pH 4,5), prozessiert. Dabei kann die Löslichkeit der enthaltenen Metall-basierten Partikel drastisch gesteigert werden, wodurch es zu einer vermehrten Freisetzung reaktiver Metallionen kommt, welche maßgeblich das toxikologische Profil der Partikel prägen (Cronholm *et al.* 2013, Sabella *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017).

Um mögliche biologische Effekte der untersuchten Substanzen auf die partikuläre oder ionische Spezies zurückführen zu können, wurde die Freisetzung von Goldionen aus den Cit- und Pvp-Au NP unter Zellkulturbedingungen untersucht. Die Löslichkeitsuntersuchungen wurden dabei in Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin), *phosphate buffered saline* (PBS) und künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (*artificial lysosomal fluid*; ALF) durchgeführt. Hierfür wurden die Partikelsuspensionen der Konzentration 50 µg/mL für 1, 4 und 7 Tage unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert und die enthaltenen Partikel durch mehrfaches Zentrifugieren bei 3000 und 14000 g abgetrennt. Die Suspensionsmittelüberstände wurden im Anschluss auf die vollständige Partikelabtrennung mittels DLS überprüft und auf ihren Goldgehalt mittels GF-AAS untersucht.

In den Löslichkeitsuntersuchungen zeigten sich die Cit- und Pvp-Au NP in den untersuchten Lösungen als biobeständig. Nach 1, 4 und 7 Tagen wurden weder in DMEM mit 10 % FKS, PBS noch in ALF gelöste Anteile der Au NP in den Suspensionsmittelüberständen der Cit- und Pvp-Au NP mittels GF-AAS nachgewiesen. In der Studie von Di Bucchiano *et al.* (2014) wurde ebenfalls keine Freisetzung von Ionen aus den Cit-Au NP in Zellkulturmedium (MEM *minimal essential medium* mit 10 % FKS) nachgewiesen. Demgegenüber zeigten die in der Studie von Sabella *et al.* (2014) verwendeten Au NP eine zeitabhängige Freisetzung von Goldionen in Citratpuffer (pH 4,5) nach 48 Stunden. Die in dieser Studie verwendeten 4 nm großen Au NP waren mit einem Mix aus 11-Mercaptoundekan-Sulfonsäure und Octanethiol bzw. 2,7-Dimethyl-Oktanethiol beschichtet. Auch Ponti *et al.* (2009) konnten einen geringen Gehalt von $\leq 0,5$ % freigesetzter Ionen aus Pvp-Au NP (8 nm) nachweisen. Ein möglicher Grund für das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten könnten die unterschiedliche Größe und Oberflächenzusammensetzung der in den Studien verwendeten Au NP darstellen. Daraus könnte eine unterschiedliche Freisetzung an Goldionen resultieren. Ferner wäre eine Verschleppung von Goldionen aufgrund einer unvollständigen Reaktion bei der Partikelsynthese denkbar.

Da im Rahmen der dargestellten Untersuchungen keine gelösten Anteile an Gold nachgewiesen werden konnten, werden die Cit- und Pvp-Au NP in den weiteren Zellkulturuntersuchungen als biobeständig

angesehen. Mögliche biologische Effekte können damit ausschließlich auf die unlöslichen Partikel zurückgeführt werden.

5.2 Zellkulturuntersuchungen mit Cit-, Pvp-Au NP und AuCl_3

Bei der Risikobewertung von Nanomaterialien liefern Ergebnisse aus Zellkulturuntersuchungen wichtige Hinweise über die toxikologischen Eigenschaften der nanoskaligen Materialien. Unter Berücksichtigung der physikalisch-chemischen Charakteristika können daraus Rückschlüsse über die biologische Aktivität der Materialien und mögliche Wirkmechanismen gezogen werden. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Untersuchungen zur Bestimmung der Zytotoxizität von Cit- und Pvp-Au NP in HeLa S3-Zellen durchgeführt. Als lösliche Referenzsubstanz wurde AuCl_3 in äquivalenten Konzentrationen mitgeführt, um Aussagen über die Partikel- bzw. Ionenspezies-vermittelten Effekte treffen zu können. Als Kurzzeitparameter wurde sowohl die Lebendzellzahl und der ATP-Gehalt nach 24-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Substanzen bestimmt. Die Koloniebildungsfähigkeit diente als Maß der längerfristigen Toxizität auf HeLa S3-Zellen.

Ferner wurde die Aufnahmekinetik der Cit- und Pvp-Au NP in HeLa S3-Zellen untersucht. Als Referenzsubstanz wurde bei allen Untersuchungen die wasserlösliche Verbindung AuCl_3 in geeigneten Konzentrationen mitgeführt, welche der Stoffmengenkonzentration an Au^{3+} der Partikel-Inkubationssuspensionen bei vollständiger Löslichkeit entsprechen.

5.2.1 Einfluss auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Cit-, Pvp-Au NP und AuCl_3 sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Inkubationen mit 5, 20 und 50 $\mu\text{g/mL}$ Au NP zeigten keinen Effekt auf die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen. Sowohl die Zellzahl als auch die Koloniebildungsfähigkeit (bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle) lagen bei allen Inkubationen um 100 %. Demgegenüber bewirkten die Inkubationen mit vergleichbaren molaren Konzentrationen an wasserlöslichem AuCl_3 eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl sowie der Koloniebildungsfähigkeit, welche bei der Inkubation mit 254 μM AuCl_3 bei 63 % bzw. 67 % der unbehandelten Kontrolle lag.

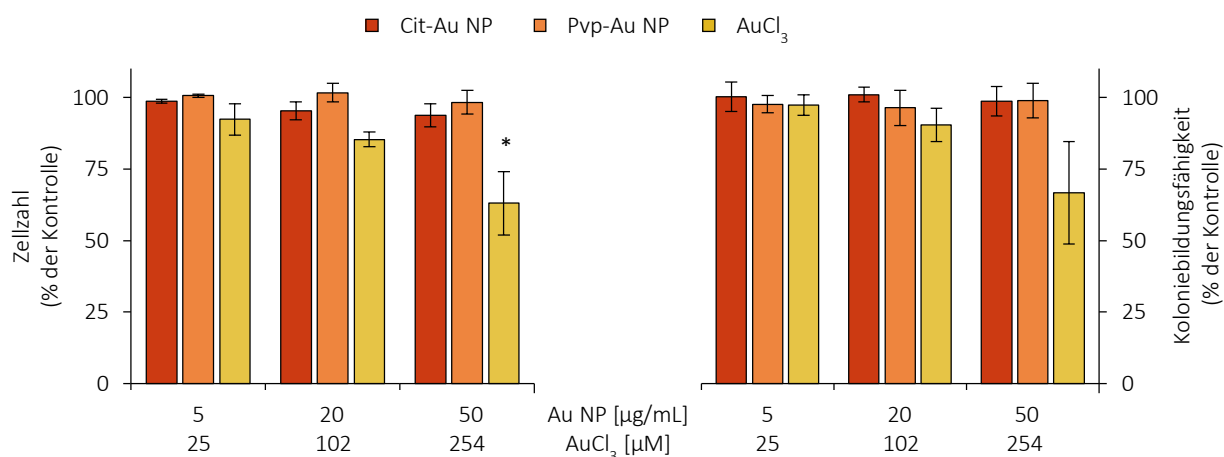


Abbildung 12: Einfluss von Cit- und Pvp-stabilisierten Au NP bzw. AuCl₃ auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen behandelt, gezählt und für die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit weitergesetzt. 50 µg/mL Au NP entsprechen 254 µM Au³⁺ im Falle kompletter Löslichkeit. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (*p ≤ 0,05).

Die zytotoxische Wirkung von Au NP wurde bereits mehrfach untersucht. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten dabei die biologischen Effekte unterschiedlich großer und oberflächenmodifizierter Au NP in zellulären Testsystemen. Die Untersuchungsergebnisse der Studien erscheinen jedoch kontrovers. Dabei zeigte sich nach Inkubation mit größenvergleichbaren Cit-Au NP (18 nm bzw. 15 nm) kein Einfluss auf die metabolische Aktivität der untersuchten Zellen (Aueviriyavit *et al.* 2014, Connor *et al.* 2005). Auch in der Studie von Ponti *et al.* (2009) wurde kein Effekt einer Inkubation mit Pvp-Au NP auf die Koloniebildungsfähigkeit beobachtet. Demgegenüber stehen Studien, die eine Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit, eine verminderte Zellviabilität und -vitalität nach Inkubation mit Au NP feststellten. Die Effekte wurden dabei auf die Größe und Oberflächenmodifikation der Au NP als auch auf die verwendeten Zelllinien zurückgeführt (Bajak *et al.* 2015, Choi *et al.* 2012, Coradeghini *et al.* 2013, Pan *et al.* 2007). Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Au NP, Zelllinien sowie der divergenten Versuchsparameter in den Untersuchungen kann keine allgemeingültige Aussage über die Zytotoxizität von Au NP getroffen werden.

Im Gegensatz zu dem kontrovers diskutierten toxikologischen Profil der nanopartikulären Form von Gold weisen lösliche Goldverbindungen eine homogenere Datenlage auf. Die Arbeitsgruppen um Steinborn (2017) und Suwalsky (2010) zeigten in Zellkulturuntersuchungen den Einfluss von AuCl₃ auf die metabolische Aktivität mittels MTT-Test. Aufgrund der Redoxaktivität und der hohen Affinität gegenüber schwefel- und selenhaltigen Verbindungen weisen freie Goldionen ein gesteigertes toxisches Potential gegenüber der partikulären Form in zellulären Systemen auf, welche oftmals als inert bezeichnet werden (Connor *et al.* 2005, Takahashi *et al.* 1994, zusammengefasst in Umair *et al.* 2016). Da es sich bei den Chloro-Liganden um gute Abgangsgruppen handelt, wird davon ausgegangen, dass diese im Zuge der Inkubation freigesetzt werden. Demnach würden die Goldionen „frei“ vorliegen. Im Vergleich zu den unlöslichen Au NP scheint somit nur von der ionischen Metallspezies ein zytotoxisches Potential auszugehen. Bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen der

zytotoxischen Wirkung könnte die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und darüber vermittelte Signalwege und die Interaktion der Goldionen mit einer Reihe von Proteinen wie der Thioredoxinreduktase eine Rolle spielen (zusammengefasst in Yeo *et al.* 2018 und Bindoli *et al.* 2009, Hartwig 2013).

5.2.2 Einfluss auf den zellulären ATP-Gehalt

Um den Einfluss der Au NP und der löslichen Goldverbindung AuCl_3 auf einen anderen Endpunkt zu untersuchen, wurde der ATP-Gehalt von HeLa S3-Zellen untersucht. Die erfassten zellulären Gehalte nach 24-stündiger Inkubation sind in Abbildung 13 dargestellt und beziehen sich auf eine unbehandelte Kontrolle.

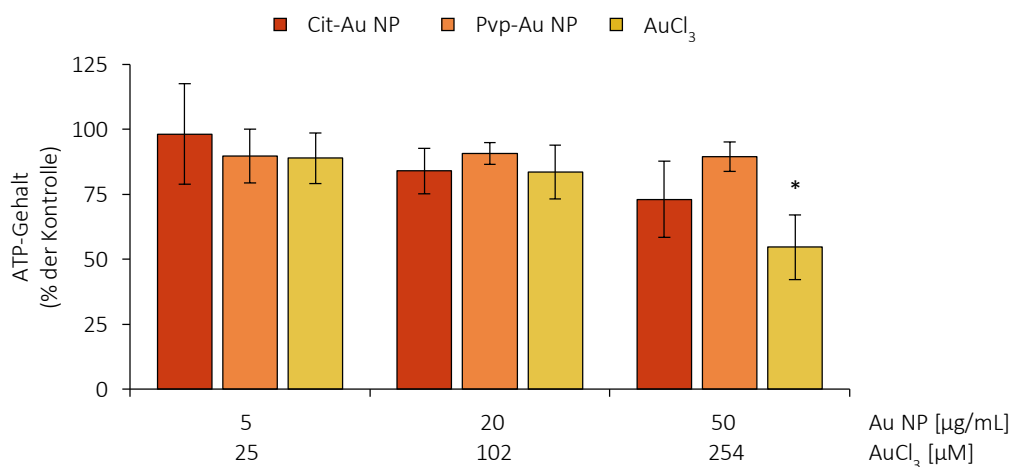


Abbildung 13: Einfluss von Cit-Au NP, Pvp-Au NP und AuCl_3 auf den ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und der zelluläre ATP-Gehalt luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (* $p \leq 0,05$).

Durch die Inkubation mit Cit-Au NP kam es zu einer konzentrationsabhängigen jedoch moderaten Depletion des ATP-Gehaltes auf 73 % der Kontrolle bei einer Inkubation mit 50 µg/mL. Für die Pvp-Au NP konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Der ATP-Gehalt lag bei allen getesteten Konzentrationen bei 90 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Inkubation mit löslichem AuCl_3 zeigte hier wie bereits in den vorangegangenen Zytotoxizitätsuntersuchungen den größten Effekt. Der ATP-Gehalt sank bei der höchsten getesteten Konzentration von 254 µM signifikant auf 55 % der Kontrolle.

Ein verminderter zellulärer ATP-Gehalt deutet auf einen beeinträchtigten Energiehaushalt der Zellen hin. Da die Mitochondrien für die Energiebereitstellung verantwortlich sind, könnte eine Beeinträchtigung dieser Organellen durch die Inkubationen mit den entsprechenden Substanzen vorliegen.

Der Einfluss von Cit-Au NP auf den zellulären ATP-Gehalt ist in der Literatur bereits beschrieben (Choi *et al.* 2012, Lindeque *et al.* 2018) und wird auf eine Störung der mitochondrialen Funktion, welche im Zuge von oxidativem Stress auftreten kann, zurückgeführt. Die Induktion von oxidativem Stress durch lösliche Metallverbindungen und ihren nanopartikulären Pendants wie z.B. Kupfer ist bekannt und wurde auch für Au NP sowie lösliche Goldverbindungen beschrieben (Omata *et al.* 2006, Sabella *et al.* 2014, Semisch *et al.*

2014, Strauch *et al.* 2017). Dabei können direkte Mechanismen wie z.B. Fenton-ähnliche Reaktionen oder indirekte Mechanismen wie die Depletion von Antioxidantien wie Glutathion zu einer Generierung von ROS führen (zusammengefasst in Manke *et al.* (2013) und Valko *et al.* (2006)). Diese sind in Lage zelluläre Makromoleküle wie Lipide, Proteine oder auch DNA zu schädigen und bilden darüber die Basis des zytotoxischen Potentials einiger Metalle. Ein weiterer Grund für die Abnahme des ATP-Gehaltes könnte ein gesteigerter Energieverbrauch der Zellen sein, da sowohl die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel über Endozytose sowie die Ansäuerung der Lysosomen durch eine Protonenpumpe unter ATP-Verbrauch ablaufen. Uboldi *et al.* (2009) deuteten zudem darauf hin, dass überschüssiges Citrat aus der Partikelsynthese zu einer Reduktion der Zellviabilität und Zellproliferation in humanen Alveolarzellen führen kann. Bei den Untersuchungen des zellulären ATP-Gehaltes wurden diesbezüglich Behandlungen mit einer Citratlösung in denselben Volumina wie die Inkubationen mit Cit-Au NP mitgeführt, wie sie zur Reduktion im Rahmen der Partikelsynthese eingesetzt wurden. Dabei wurde kein Einfluss von Citrat auf den ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen festgestellt (Anhang, Abbildung 41).

Wie bereits in den vorangegangenen Zytotoxizitätsuntersuchungen gezeigt, geht von der löslichen Metallverbindung AuCl_3 ein gesteigertes Reaktionspotential aus. Die beobachtete ATP-Depletion könnte dabei auf einer Generierung von ROS und einer mitochondrialen Schädigung beruhen. Da es unter den hier gewählten Inkubationsbedingungen zu keiner Freisetzung von Goldionen aus den verwendeten Au NP kam (Kapitel 5.1.3), werden die beobachteten Effekte bei der Inkubation mit den Au NP auf Oberflächen-vermittelte Effekte der NP zurückgeführt. Um zu überprüfen, ob der toxischen Wirkung von AuCl_3 in HeLa S3-Zellen ein gesteigertes ROS-Level zugrunde liegt, wurde die ROS-Generierung nach Inkubation mit AuCl_3 und den biobeständigen Au NP untersucht.

5.2.3 Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Generierung von ROS und andere Marker für oxidativen Stress können auf zellulärer Ebene mit diversen Analysenmethoden untersucht werden. Hierbei können beispielsweise ROS direkt über die Reaktionen mit fluorogenen Substanzen bestimmt oder der Oxidationsstatus von Zellen indirekt über den Gehalt an endogenen Antioxidantien wie Glutathion ermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine redoxsensitive Fluoreszenzsonde für die Erfassung von ROS verwendet. Als Positivkontrolle für die Induktion von ROS, wurde eine einstündige Behandlung mit $400\ \mu\text{M}$ *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) mitgeführt. Die Referenzsubstanz bildet im Vergleich zu Wasserstoffperoxid stabile Alkylradikale und führt zudem durch eine Depletion des zellulären Glutathiongehaltes nachweislich zu oxidativem Stress (Davies 1989, Denis *et al.* 1983, Kucera *et al.* 2014).

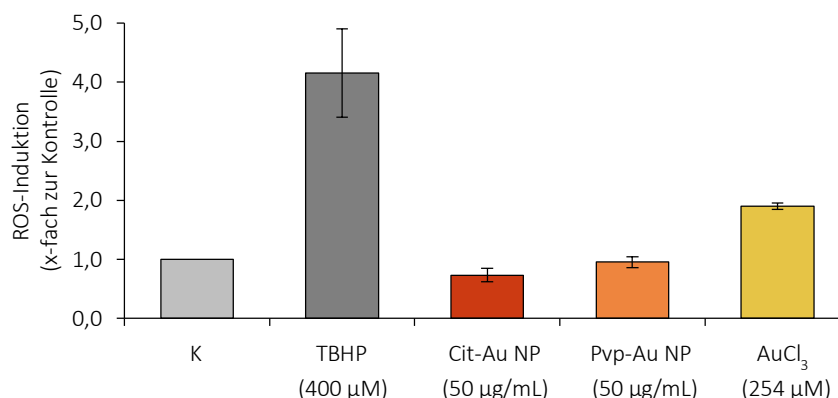


Abbildung 14: Bestimmung der ROS-Induktion in HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Cit-Au NP, Pvp-Au NP oder AuCl₃ mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend die ROS-Induktion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Positivkontrolle für die Induktion von ROS diente eine einstündige Behandlung mit 400 µM TBHP. Die Behandlungen wurden auf eine Negativkontrolle (K) bezogen, deren mittlere Fluoreszenz auf 1 normiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen $\pm$ Range/2.

Die TBHP-Positivkontrolle führte zu einer 4,2-fachen ROS-Induktion, bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle. Die 24-stündigen Inkubationen mit 50 µg/mL Cit- bzw. Pvp-Au NP führten zu keiner ROS-Induktion in HeLa S3-Zellen. Hingegen zeigte die Inkubation mit 254 µM AuCl₃ einen Anstieg auf das 1,9-fache.

Die Behandlung von HeLa S3-Zellen mit den biobeständigen Cit-Au NP und Pvp-Au NP führte im Zuge dieser Methode zu keiner detektierbaren Generierung von ROS. Eine gesteigerte ROS-Induktion scheint den Untersuchungen zufolge lediglich von der löslichen Goldverbindung AuCl₃ auszugehen. Da sich die Cit- und Pvp-Au NP in den Löslichkeitsuntersuchungen als biobeständig erwiesen (Kapitel 5.1.3), kann zudem eine Generierung von ROS über direkte Mechanismen ausgeschlossen werden. In Bezug auf die lösliche Verbindung AuCl₃ wäre hingegen eine Generierung von ROS über direkte und indirekte Mechanismen denkbar.

Die zelluläre Generierung von ROS nach Inkubation mit Au NP wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während in einigen Studien ein deutlicher Anstieg des zellulären ROS-Levels beobachtet und als primärer Mechanismus der Zytotoxizität postuliert wurde (Li *et al.* 2010, Mateo *et al.* 2014, Pan *et al.* 2009, Sabella *et al.* 2011), zeigte sich in der Studie der Forschungsgruppe um Aueviriyavit (2014) kein Einfluss von Au NP auf die Induktion von ROS, den Glutathiongehalt oder das mitochondriale Membranpotential in Caco-2 Zellen. Für Gold(III)-Verbindungen werden laut Literatur überwiegend indirekte Mechanismen zur Generierung von oxidativem Stress diskutiert. Mechanismen, wie die Depletion des zellulären Glutathion-Levels könnten dabei zu dem beobachteten Anstieg zellulärer ROS führen. Die nachweislich hohe Affinität von Goldionen zu Thiolgruppen stützt diese Hypothese (Zou *et al.* 2015). Eine Störung der zellulären antioxidativen Abwehr könnte so zu oxidativem Stress führen und für die unter Kapitel 5.2.1 und 5.2.2 beschriebenen zytotoxischen Effekte von AuCl₃ verantwortlich sein. Ferner ist für eine Reihe von Gold(III)-Komplexen die Hemmung der Thioredoxinreduktase bekannt, ein Enzym welches zusammen mit Thioredoxin protektive Funktionen als

Antioxidationsystem bei der zellulären Redoxregulation einnimmt (zusammengefasst in Bertrand *et al.* 2018, Arnér und Holmgreen 2000).

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Effekte der löslichen und partikulären Komponenten auf einer unterschiedlichen zellulären Akkumulation basieren, wurde die Aufnahme von AuCl_3 , Cit-Au NP und Pvp-Au NP in HeLa S3-Zellen untersucht. Dabei wurde zunächst die Aufnahme der Au NP in HeLa S3-Zellen mikroskopisch untersucht. In konzentrations- und zeitabhängigen Versuchen wurde anschließend der zelluläre Goldgehalt nach Inkubation mit AuCl_3 , Cit-Au NP und Pvp-Au NP analysiert, um Aussagen über die Aufnahmekinetik treffen zu können.

5.2.4 Zelluläre Aufnahme

Die verschiedenen Aufnahmemechanismen, welche der zellulären Internalisierung nanoskaliger Partikel zugrunde liegen können, sind bedeutend für die biologischen Effekte der entsprechenden NP. Sie definieren das Ausmaß, die intrazelluläre Verteilung und somit das Interaktionspotential der NP mit zellulären Bestandteilen. Neben den physikochemischen Eigenschaften der NP sind hierbei auch die Zelltypen entscheidend, zumal für die Internalisierung derselben Partikel unterschiedliche Mechanismen genutzt werden können (zusammengefasst in Behzadi *et al.* 2017).

Für den Nachweis der zellulären Aufnahme und intrazellulären Lokalisation der Cit-Au NP und Pvp-Au NP wurden HeLa S3-Zellen lichtmikroskopisch nach 24-stündiger Inkubation mit den Au NP untersucht. Unter Verwendung eines selektiven Fluoreszenzmarkers zur Färbung von Lysosomen wurde darüber hinaus die intrazelluläre Kolokalisation mit lysosomalen Kompartimenten untersucht. Repräsentative Bilder der mikroskopischen Untersuchung der Aufnahme von Cit- bzw. Pvp-Au NP in HeLa S3-Zellen sind in Abbildung 15 dargestellt.

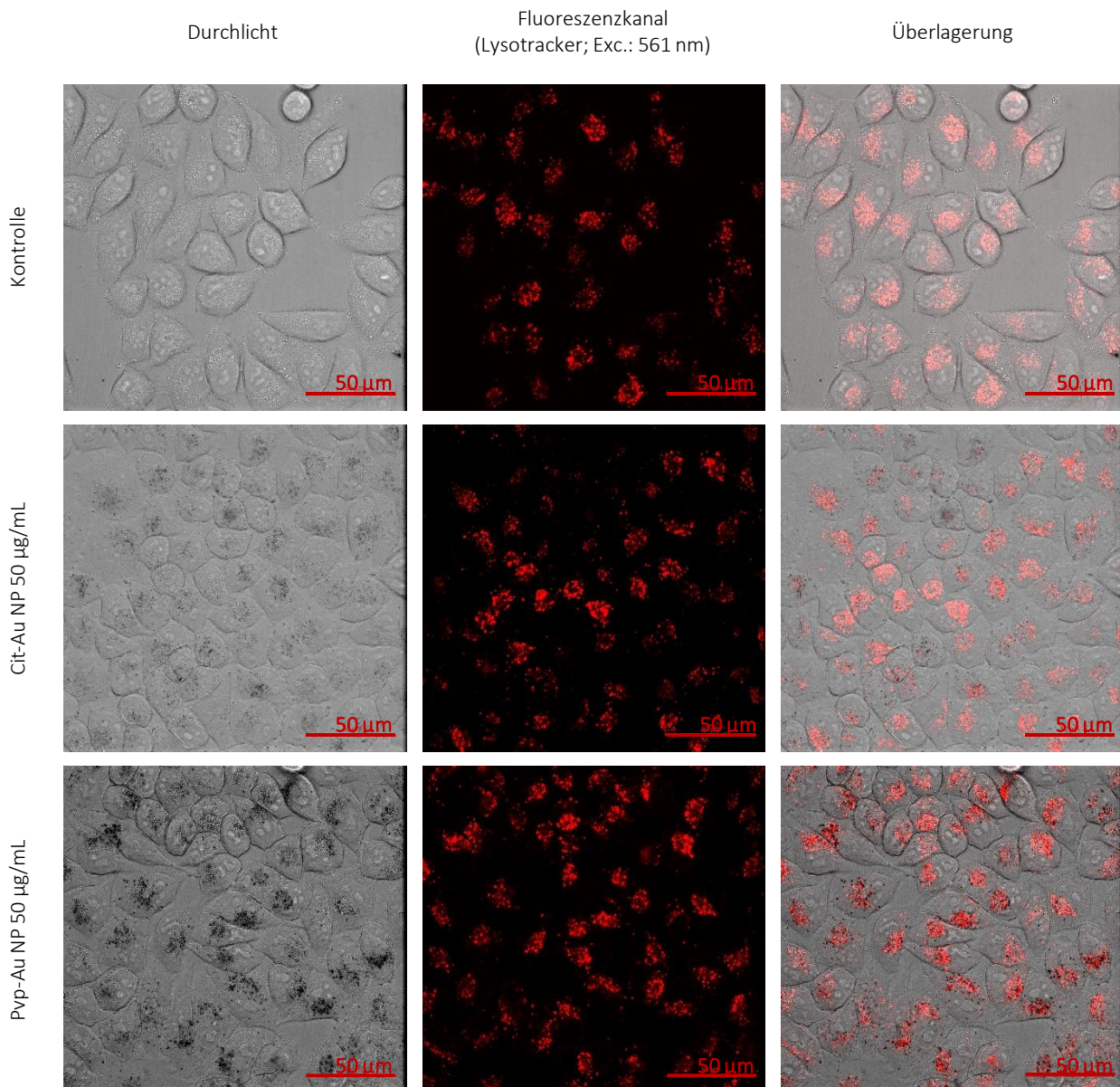


Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen von HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 µg/mL Cit- bzw. Pvp-Au NP und Färbung der Lysosomen. Dargestellt sind die Durchlichtaufnahmen, die Fluoreszenzaufnahmen (Excitation: 561 nm) der mit LysoTracker®Deep Red gefärbten Lysosomen sowie der überlagerten Bilder einer unbehandelten Kontrolle und den Inkubationen mit 50 µg/mL Cit- bzw. Pvp-Au NP.

Die Aufnahmen belegten deutlich die zelluläre Aufnahme der Cit- und Pvp-Au NP in HeLa S3-Zellen. Diese lagen überwiegend als größere Agglomerate kolokalisiert mit lysosomalen Kompartimenten vor, was die Aufnahme über Endozytosemechanismen vermuten lässt. Darüber hinaus war nur ein sehr geringfügiger Teil membranständiger Au NP zu beobachten. Bei der optischen Auswertung waren keine Au NP im Zellkern der HeLa S3-Zellen erkennbar.

Die zelluläre Aufnahme sowie die subzelluläre Verteilung von Au NP in Lysosomen wurde bereits in verschiedenen Zelllinien gezeigt (Fede *et al.* 2015, Huo und Xia 2018, Tan und Onur 2018). Die Aufnahme scheint dabei von der Form, Größe und Oberflächenmodifikation der Au NP sowie von der untersuchten Zelllinie abhängig zu sein (Arnida *et al.* 2010, Choi *et al.* 2017, Fraga *et al.* 2013, Vetten *et al.* 2013). Aus

verschiedenen Studien geht hervor, dass mit Au NP exponierte Zellen weniger mit einzelnen Partikeln wechselwirken, sondern vielmehr mit Partikelverbänden oder kleinen Agglomeraten. Vermutet wird, dass eine Mindestgröße für die Initiation der Internalisierung notwendig ist. Zudem kommt es während der zellulären Akkumulation der Au NP zu einer Agglomeration in den endosomalen Vesikeln (Fede *et al.* 2015, Shang *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015). Dies könnte der Grund sein, weshalb kaum membranständige Partikel im Rahmen dieser Untersuchungen beobachtet wurden, zumal die Auflösung des verwendeten Mikroskops eine Abbildung von Objekten ab einer Größe von etwa 250 nm zulässt. Einzelne Partikel der hier verwendeten Cit-Au NP oder Pvp-Au NP wären hiermit nicht abbildbar.

Auch die Aufnahme in den Zellkern ist abhängig von der Größe und Oberflächenmodifikation der Partikel. Der Eintritt in den Zellkern erfolgt über sogenannte Kernporen, welche einen Durchmesser von bis zu 39 nm aufweisen können, weshalb sich kleinere Partikel als kerngängiger erweisen (Gu *et al.* 2009, Panté und Kann 2002). Mit Hilfe der Bildauswertungssoftware ZEN 2 erfolgte eine ungefähre Abschätzung der Größe der lysosomalen Vesikel bzw. der enthaltenen Partikelagglomerate, welche Durchmesser von circa 2-3 μm aufwiesen (Anhang, Abbildung 39). Mit dieser Größe könnten die Partikelagglomerate auch nach Freisetzung aus den Lysosomen nicht die Kernporen passieren, weshalb keine Partikel im Zellkern nachgewiesen werden konnten.

Um weitere Aussagen über die Aufnahme der Au NP in HeLa S3-Zellen treffen zu können, wurden konzentrations- und zeitabhängige Aufnahmeuntersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen für 1, 4 oder 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cit-, Pvp-Au NP bzw. AuCl_3 inkubiert und anschließend der zelluläre Goldgehalt mittels GF-AAS ermittelt. Hierbei wurde untersucht, ob es bei der 24-stündigen Inkubation der Testsubstanzen zu einer Sättigung der Aufnahme kommt. Eine unterschiedliche Goldakkumulation nach Behandlung mit der löslichen Verbindung AuCl_3 und den Au NP könnte zudem in unterschiedlichen zytotoxischen Effekten resultieren.

Um nur die internalisierten Partikel zu erfassen und eine Überbestimmung durch membranhaftende Partikel weitestgehend zu vermeiden, wurden die HeLa S3-Zellen vor der Aufarbeitung mit einer Ätzlösung aus Jod/Kaliumiodid (0,34 mM I_2 / 2,04 mM KI) behandelt (Cho *et al.* 2009). Um die zelluläre Aufnahme der Cit- und Pvp-Au NP mit der löslichen Goldverbindung AuCl_3 zu vergleichen, wurden äquivalente Konzentrationen der Au NP sowie AuCl_3 eingesetzt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 16 dargestellt.

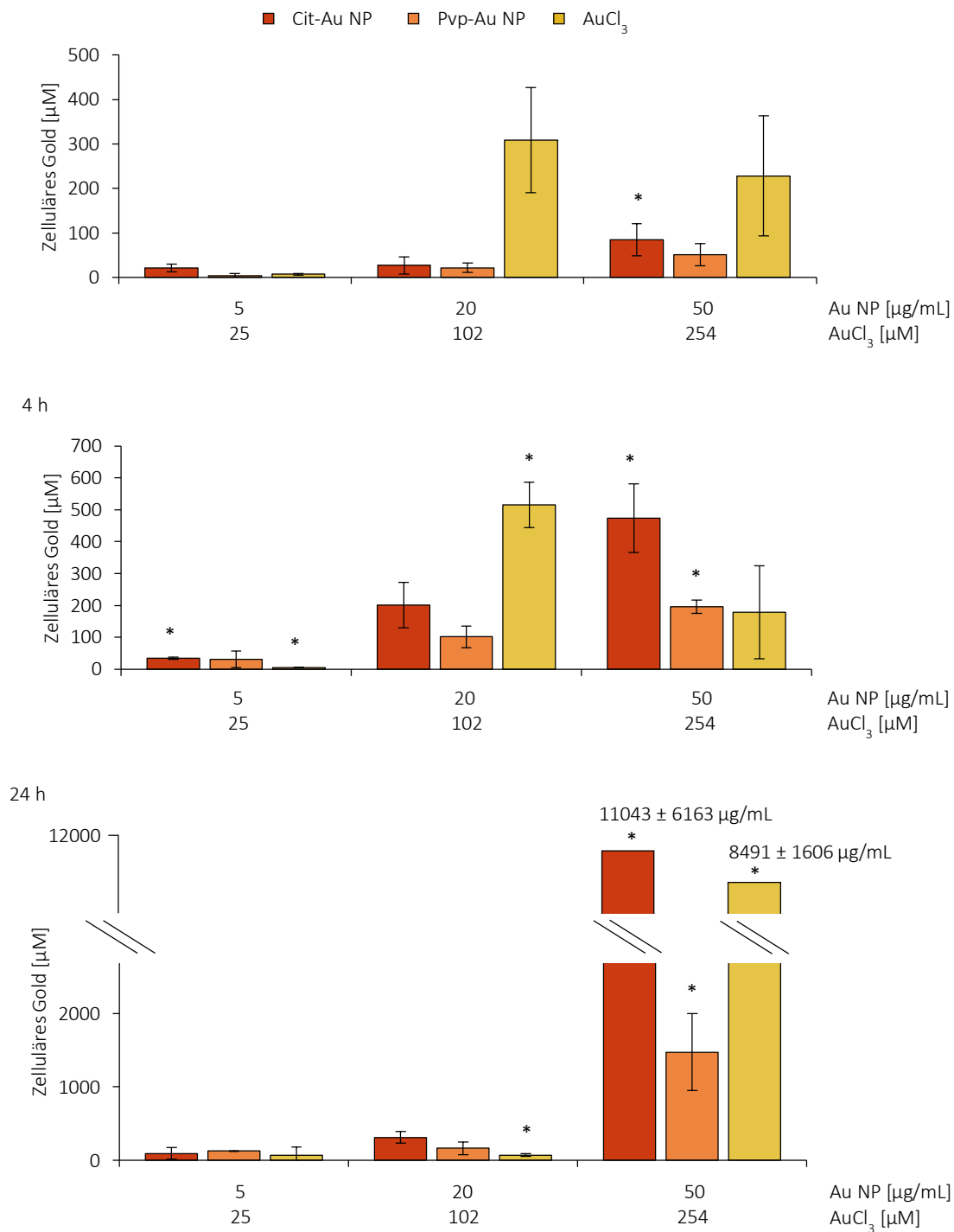


Abbildung 16: Intrazellulärer Goldgehalt von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Cit- und Pvp-Au NP. HeLa S3-Zellen wurden für 1 (A), 4 (B), und 24 Stunden (C) mit Cit-, Pvp-Au NP oder AuCl₃ inkubiert. Um die membrangebundenen Au NP zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit einer Ätzlösung (Jod/Kaliumiodid) behandelt. Die Quantifizierung des zellulären Goldgehaltes erfolgte mittels GF-AAS. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (*p ≤ 0,05).

Für die Cit-Au NP und Pvp-Au NP wurde eine ausgeprägte zeit- und konzentrationsabhängige Akkumulation in HeLa S3-Zellen festgestellt. Hierbei zeigte sich eine gesteigerte Aufnahme der Cit-Au NP, welche im Mittel in dem zweifachen zellulären Goldgehalt der Behandlung mit Pvp-Au NP resultierte. Der zelluläre Goldgehalt nach 1- und 4-stündiger Behandlung mit 50 µg/mL stieg dabei von 85 µM (1 Stunde) auf 474 µM (4 Stunden)

im Falle der Cit-Au NP bzw. von 51 μM auf 196 μM im Falle der Pvp-Au NP an. Nach 24-stündiger Inkubation mit 50 $\mu\text{g/mL}$ der Au NP wurden zelluläre Goldgehalte im millimolaren Bereich ermittelt. Hier betrug der Goldgehalt nach Inkubation mit Cit-Au NP sogar annähernd das 10-fache der Pvp-Au NP Behandlung und lag bei 11 mM. Im Verlauf der 24-stündigen Behandlung mit Au NP wurde kein plateauähnlicher Verlauf der Aufnahme beobachtet.

Für die lösliche Referenzsubstanz zeigte sich ein stark von den Partikeln abweichendes Aufnahmemuster. Die 24-stündige Inkubation mit 25 μM AuCl_3 führte dabei zu vergleichsweise moderaten Goldgehalten von 70 μM . Demgegenüber konnten bei Behandlung mit 102 μM massive Goldakkumulationen bei der 1- und 4-stündigen Inkubation nachgewiesen werden, wobei Goldgehalte von 309 μM bzw. 516 μM erfasst wurden. Selbige Behandlung zeigte nach 24 Stunden einen deutlich reduzierten Gehalt von 71 μM auf. Bei der Behandlung mit 254 μM AuCl_3 für 1 bzw. 4 Stunden wurden gegenüber der Inkubation mit 102 μM geringere zelluläre Goldgehalte festgestellt, welche 228 μM bzw. 179 μM betrugen. Nach 24-stündiger Inkubation mit 254 μM AuCl_3 wurden, wie bei den partikulären Goldverbindungen, Konzentrationen im millimolaren Bereich bestimmt, welche im Mittel bei 8,5 mM lagen.

Die hier beobachtete konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme der Au NP geht aus weiteren Studien hervor, welche die Aufnahme von Au NP untersuchten (Cho *et al.* 2009, Fraga *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2017). Die Aufnahme über Mechanismen der Endozytose wurde dabei mehrfach postuliert (Ng *et al.* 2015, Wang *et al.* 2015). Huo und Xia (2018) untersuchten zudem die intrazelluläre Verteilung der Au NP und konnten den größten Anteil an internalisierten Au NP in endolysosomalen Kompartimenten nachweisen. Zusammen mit den vorangegangenen mikroskopischen Untersuchungen, aus welchen der Nachweis mit Lysosomen kolokalisierter Cit- und Pvp-Au NP hervorgeht, bekräftigen diese Ergebnisse die Annahme der Aufnahme der hier untersuchten Au NP über Endozytose.

Eine gesteigerte zelluläre Aufnahme von Cit-Au NP gegenüber Pvp-Au NP wurde auch von Mohamed *et al.* (2017) in Endothelzellen der Rinderaorta beschrieben. Ein möglicher Grund hierfür könnte die stärkere Stabilisierung der Pvp-Au NP durch das Polymer sein. Cit-Au NP gehen vergleichsweise schnell Ligandenaustauschreaktionen mit Thiol- oder Amin-haltigen Verbindungen ein (Guerrini *et al.* 2018, Stobiecka *et al.* 2010), wodurch es zu einer gesteigerten Agglomeration und Sedimentation der Partikel im Rahmen der Zellkulturuntersuchungen kommen könnte. Dies würde zu einer vermehrten Interaktion der Au NP mit Membranbestandteilen der HeLa S3-Zellen führen und die gesteigerte Akkumulation der Cit-Au NP erklären. Die sterische Abschirmung durch das oberflächengebundene Polyvinylpyrrolidon könnte die Au NP in DMEM mit 10 % FKS stabilisieren und zu einer verminderten Aufnahme führen.

Der Mechanismus für die zelluläre Aufnahme der löslichen Referenzsubstanz AuCl_3 ist in der Literatur nicht abschließend beschrieben. Im Rahmen von Inhibierungsstudien untersuchten Spreckelmeyer *et al.* (2018) die Beteiligung verschiedener Transporter an der Akkumulation eines Gold(III)-Komplexes in der humanen

Ovarialkarzinomzelllinie A2780. Dabei scheinen die Aufnahmetransporter OCT2 (organischer Kationentransporter 2) sowie CTR1 (Kupfertransporter 1) weniger beteiligt zu sein. Laut den Untersuchungen dieser Studie scheinen die ATP-abhängigen Effluxpumpen ATP7A und ATP7B (ATP7A/B) eine übergeordnete Rolle bei der zellulären Akkumulation von Gold(III) zu spielen. Die Regulation von ATP7A/B findet sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf der Ebene posttranslationaler Modifikationen des entsprechenden Proteins statt. Hierbei wurde gezeigt, dass es bei einer induzierten zellulären Kupferüberladung zu einer gesteigerten Expression der Transkriptmenge von ATP7A/B kommen kann, um einer Kupferakkumulation entgegenzuwirken (Lenartowicz *et al.* 2016). Diesbezüglich könnte es im Rahmen einer Überladung der Zellen mit Goldionen möglicherweise zu einer gesteigerten Transkription der Gene ATP7A/B und Translokation der entsprechenden Proteine in die Zellmembran kommen. Folglich könnte dieser Mechanismus zu einem erhöhten Efflux an Goldionen führen und die Abnahme des zellulären Goldgehaltes nach 24-stündiger Inkubation mit 102 μM begründen. Da es bei der 24-stündigen Inkubation mit 254 μM AuCl_3 zu zytotoxischen Effekten in HeLa S3-Zellen kam (Kapitel 5.2.1 und 5.2.2), wäre darüber hinaus eine Beeinträchtigung zellulärer Stoffwechselprozesse denkbar. Ein Verlust der Membranintegrität könnte dabei zu der massiven Goldakkumulation führen.

Zusammenfassend konnte für die Cit- und Pvp-Au NP eine konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme in HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden. Da die partikulären Verbindungen nachweislich in lysosomalen Kompartimenten nach 24-stündiger Inkubation vorlagen (Abbildung 15), wird die Aufnahme über Mechanismen der Endozytose angenommen. Cit-Au NP wiesen dabei eine gesteigerte Internalisierung gegenüber Pvp-Au NP auf. Ein Ligandenaustausch von Citrat an der Partikeloberfläche könnte hier zur vermehrten Sedimentation und gesteigerten zellulären Akkumulation der Cit-Au NP führen. Ferner scheint aufgrund der divergenten Zeitabhängigkeit der Goldakkumulationen die Internalisierung partikulärer bzw. löslicher Goldkomponenten auf unterschiedlichen Transportmechanismen zu basieren. Im Falle der Au NP führte die massive Goldakkumulation jedoch zu keinen adversen Effekten in den Zytotoxizitätsuntersuchungen, wohingegen die lösliche Metallverbindung AuCl_3 bereits bei geringeren Konzentrationen einen Einfluss auf HeLa S3-Zellen zeigte. Bei vergleichbarer zellulärer Goldakkumulation scheint somit lediglich von der löslichen Goldverbindung AuCl_3 ein gesteigertes zytotoxisches Potential auszugehen, vermittelt über die reaktive Ionenspezies.

Um zu überprüfen ob die massive Goldakkumulation spezifische zelluläre Signalwege beeinflusst, wurde nachfolgend mit Hilfe einer Hochdurchsatz RT-qPCR (HT RT-qPCR) Methode das Genexpressionsprofil exponierter HeLa S3-Zellen untersucht. Ein Überblick zu den Untersuchungsergebnissen ist in Abbildung 17 in Form einer Heatmap dargestellt.

5.2.5 Genexpressionsanalyse

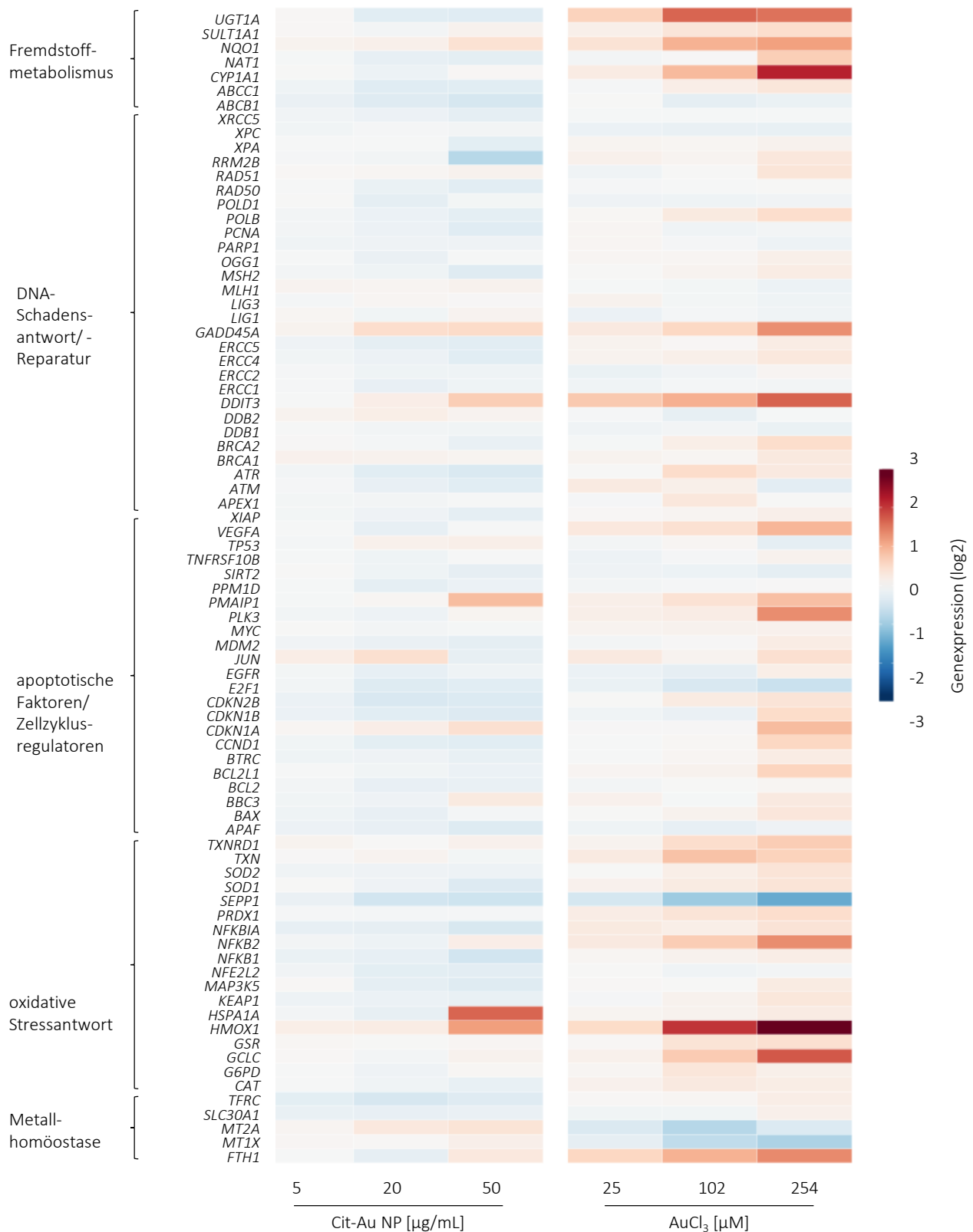


Abbildung 17: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Cit, Pvp-Au NP bzw. AuCl₃ auf die Genexpression in HeLa S3-Zellen. Dargestellt sind die Gencluster der HT RT-qPCR in Form einer Heatmap. Dabei steht Rot für eine Hochregulierung und Blau für eine Herunterregulation der entsprechenden Gene.

Die Verwendung einer HT RT-qPCR Methode erlaubt quantitative Analysen der Expression verschiedenster Gene, worüber Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen von Substanzen gezogen werden können. Die für diese Arbeit angewandte Methode erlaubt es, simultan je 95 Gene in 96 Proben zu bestimmen und wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich bei der Untersuchung weiterer partikulärer Verbindungen wie Kupferoxid angewandt (Strauch *et al.* 2017). Mit dem verwendeten Primerset konnten dabei Gene, welche im Zusammengang mit zellulären Prozessen wie der oxidativen Stressantwort, der Metallhomöostase, des Zellzyklus und der Apoptose, der DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie des Fremdstoffmetabolismus stehen, untersucht werden.

Im Folgenden wird nur auf die Gene eingegangen, welche nach der 24-stündigen Inkubation mit Cit-Au NP oder AuCl_3 in HeLa S3-Zellen eine Verdopplung oder Halbierung ihrer Transkriptmenge aufwiesen (Abbildung 18 bis 21). Im Rahmen der Genexpressionsuntersuchungen mittels HT RT-qPCR-Methode zeigte sich in dem getesteten Konzentrationsbereich von 5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kein relevanter Einfluss der Cit-Au NP auf die Transkriptmenge der getesteten Gene. Bei der Behandlung mit AuCl_3 konnte jedoch bei 12 der 95 getesteten Gene eine relevante Änderung der Genexpression festgestellt werden. Dabei wiesen 11 Gene eine gesteigerte und lediglich eines eine verminderte Expression auf. Die am deutlichsten hochregulierten Gene stehen im Zusammenhang mit der oxidativen Stressantwort und dem Fremdstoffmetabolismus.

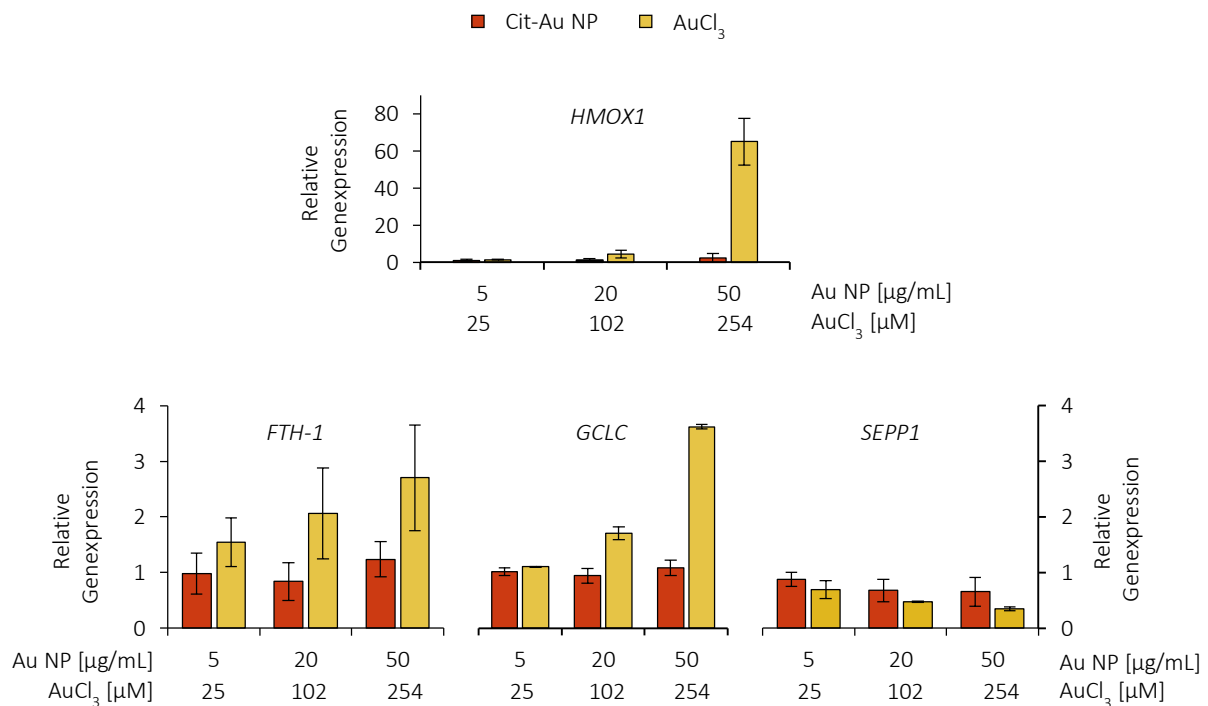


Abbildung 18: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl_3 auf Gene der oxidativen Stressantwort. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Die Behandlungen wurden auf eine Negativkontrolle bezogen, deren Expressionswert auf 1 gesetzt wurde. Abgebildet sind die Gene mit relevanter Expressionsänderung (*FTH1*, *GCLC*, *HMOX1*, *SEPP1*). Man beachte die unterschiedliche Skalierung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Werten, aus zwei unabhängigen Versuchen $\pm$ Range/2.

Das Gencluster der oxidativen Stressantwort (Abbildung 18) wies vier Gene mit relevanter Änderung der Transkriptmenge auf. Dabei zeigte sich bei *FTH1*, *GCLC* und *HMOX1* eine konzentrationsabhängige Induktion, wohingegen die Transkription von *SEPP1* eine Repression nach Inkubation mit AuCl_3 aufwies.

Die Expression des Gens *FTH1* (*ferritin heavy polypeptide 1*) stieg nach Behandlung mit $254 \mu\text{M}$ AuCl_3 bis auf das 2,7-fache an. Das Gen *FTH1* codiert für die schwere Untereinheit des Ferritins, einem Eisen-bindenden Protein, welches durch seine Ferroxidase-Aktivität Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und speichert. Ferritin kommt bei der zellulären Eisenhomöostase eine wichtige Rolle bei der Regulation des labilen Eisen-Pools zu. Eine Dysfunktion dieser Regulation kann hierbei während der Fenton-Reaktion in einer übermäßigen Generierung von ROS resultieren. Im Rahmen der oxidativen Stressantwort wird die Induktion von Ferritin auf mRNA- und Proteinebene reguliert (Lee *et al.* 2009, Orino *et al.* 2001). Eine Reihe von Genen des Eisenhaushaltes steht dabei unter der Kontrolle des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Kerins und Ooi 2018). Eine gesteigerte Expression von *FTH-1* nach Inkubation mit AuCl_3 könnte somit aus einer Aktivierung von Nrf2, durch die unter 5.2.3 dargestellte Induktion von ROS resultieren oder auf eine Interaktion von Gold mit dem zellulären Eisenhaushalt hinweisen.

Für das Gen *GCLC* (*Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit*) wurde nach Behandlung mit $254 \mu\text{M}$ eine Induktion um das 3,6-fache festgestellt. Das Gen codiert für die katalytische Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase, welche bei der Synthese von Glutathion, einem der wichtigsten zellulären Antioxidantien, beteiligt ist. Die Regulation der Genexpression erfolgt durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nrf2, AP-1 und NF- κB über eine Signaltransduktion im Zuge von oxidativem Stress, worauf eine gesteigerte Expression von *GCLC* zurückgeführt werden könnte (zusammengefasst in Lu 2013).

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen zeigte lediglich *SEPP1* (Selenoprotein P1) eine Reprimierung nach Behandlung mit AuCl_3 an. Die Transkriptmenge betrug nach Inkubation mit $254 \mu\text{M}$ das 0,4-fache der Negativkontrolle. Das Gen *SEPP1* codiert für ein Selenoprotein, welches als extrazelluläres Antioxidans und als Selenquelle in extrahepatischen Geweben fungieren kann. In der Promotorregion des Gens kann es zu einer Interaktion mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommen, weshalb ihm eine Rolle in inflammatorischen Prozessen zugeschrieben wird (zusammengefasst in Burk und Hill 2009). Zudem nehmen Selenoproteine, wie auch Nrf2, regulatorische Funktionen im Rahmen der zellulären Redox-Homöostase ein. Von einer verminderten *SEPP1*-Expression in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Au NP wurde von Bajak *et al.* 2015 berichtet. Eine durch Gold beeinflusste Selenhomöostase wurde dabei als mögliche Ursache angenommen. Zudem besitzt der zelluläre Selenstatus eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung von Nrf2, wobei eine Defizienz zur Einleitung Nrf2-vermittelter Abwehrmechanismen führen kann (Brigelius-Flohé und Kipp 2013). Die 24-stündige Inkubation mit AuCl_3 führte ab $102 \mu\text{M}$ zu einer deutlichen Induktion von *HMOX1* (Hämoxygenase 1) um den Faktor 4,5 und stieg bei der Behandlung mit $254 \mu\text{M}$ weiter bis auf das 65-fache an. Im Rahmen der zellulären Stressantwort spielt die Induktion von *HMOX1* eine zentrale Rolle und kann

durch eine Reihe von Stimuli u.a. oxidativer Stress und Zytokine ausgelöst werden. Das codierte Enzym Hämoxygenase 1 baut im Rahmen des Häm-Katabolismus Häm zu Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid und Eisen(III) ab. Die Regulation verläuft überwiegend auf transkriptioneller Ebene unter der Beteiligung verschiedener redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie Nrf2, AP-1 und NF- κ B, welche über eine Reihe von Signalwegen bei erhöhtem oxidativem Stresslevel aktiviert werden (zusammengefasst in Waza *et al.* 2018). Eine Metall-vermittelte Induktion des *HMOX1*-Gens wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe für verschiedene Metalle wie Kupfer, Arsen und Zink nachgewiesen (Hufnagel 2019, Niemand 2018, Strauch *et al.* 2017, Wedler 2018).

Die drastische Induktion des Gens *HMOX1* weist zusammen mit der in Kapitel 5.2.3 dargestellten ROS-Induktion auf eine erhebliche oxidative Stresslage von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit 254 μ M AuCl_3 hin.

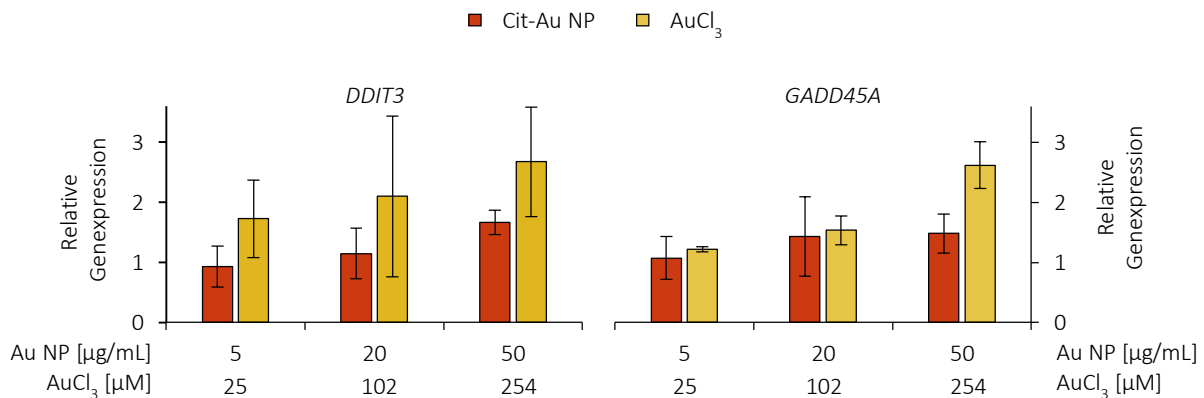


Abbildung 19: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl_3 auf Gene der DNA-Schadensantwort. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Die Behandlungen wurden auf eine Negativkontrolle bezogen, deren Expressionswert auf 1 gesetzt wurde. Abgebildet sind die Gene mit relevanter Expressionsänderung (*DDIT3*, *GADD45A*). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Werten, aus zwei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Cit-Au NP und AuCl_3 kam es zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Expression der Gene *DDIT3* (*DNA damage-inducible transcript 3*) und *GADD45A* (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein*), welche im Rahmen der DNA-Schadensantwort reguliert werden. Bei der höchsten getesteten Konzentration stiegen die relativen Transkriptmengen im Falle der löslichen Goldverbindung AuCl_3 um das 2,7- und 2,6-fache an. Die Inkubationen mit Cit-Au NP führten dabei nur zu einem leichten Anstieg, lagen jedoch bei den getesteten Konzentrationen unterhalb der Relevanzgrenze der Transkriptmengen.

Das Gen *DDIT3*, auch bekannt als *CHOP* oder *GADD153*, kodiert für einen multifunktionalen Transkriptionsfaktor, welcher bei der zellulären Stressantwort einen Zellzyklusarrest initiieren oder Signalwege der Apoptose einleiten kann. Die Induktion auf transkriptioneller Ebene scheint dabei unter der Aktivierung von Proteinkinasen (*Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK)*, *Inositol-requiring Enzyme 1 (Ire1)*) und der Beteiligung von Transkriptionsfaktoren wie ATF4 (*activating transcription factor 4*), ATF6 und XBP-1 (*X-box binding protein*) abzulaufen (zusammengefasst in Chen *et al.* 2018, Oyadomari und Mori 2004). Die Induktion von *DDIT3* findet dabei v.a. im Rahmen der Signaltransduktion der *unfolded protein response*

(UPR) bei zellulärem Stress des Endoplasmatischen Retikulums statt. Hierbei führt die Detektion einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine über verschiedenen Sensoren zunächst zur Einleitung der UPR, wobei vermehrt Chaperone zur korrekten Proteinfaltung gebildet werden und der Abbau fehlgefalteter Proteine gesteigert wird. Bei übermäßigem zellulärem Stress kann DDIT-3-vermittelt die Apoptose eingeleitet werden. Da es im Zuge von oxidativem Stress zu einer Fehlfaltung von Proteinen durch Oxidierung kommen kann, sind auch die zellulären Signalwege der oxidativen Stressantwort und der UPR miteinander gekoppelt (Rakhit *et al.* 2002).

GADD45A (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 alpha*) gehört zur Familie der *GADD*-Gene, welche im Zuge der Zellzyklusregulation oder in Folge von genotoxischem Stress sowohl p53-abhängig oder unabhängig induziert werden können. Das *GADD45A*-Protein kann durch die Interaktion mit anderen Proteinen, u.a. Cdc2 (*cyclin-dependend kinase 1*), p38-Kinase oder PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) Einfluss auf zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus, Apoptose oder die DNA-Reparatur ausüben (zusammengefasst in Liebermann und Hoffman 2008, Zhan 2005).

Die Induktion von *DDIT-3* und *GADD45A* wird ebenfalls auf das Vorliegen einer oxidativen Stresssituation nach der Inkubation mit AuCl_3 zurückgeführt.

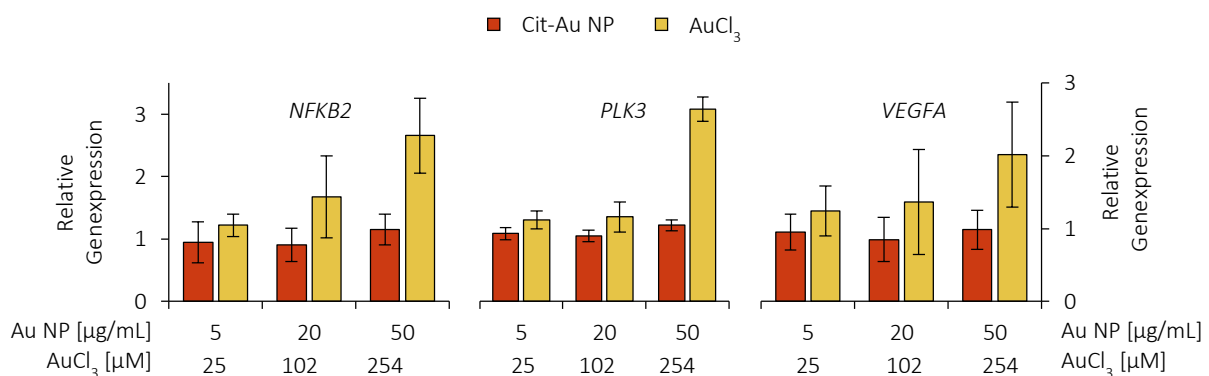


Abbildung 20: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl_3 auf Gene der Apoptoseregulation. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Die Behandlungen wurden auf eine Negativkontrolle bezogen, deren Expressionswert auf 1 gesetzt wurde. Abgebildet sind die Gene mit relevanter Expressionsänderung (*NFKB2*, *PLK3*, *VEGFA*). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Werten, aus zwei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD.

Die Expressionen der Apoptose-regulierenden Gene *NFKB2*, *PLK3* und *VEGFA* zeigten eine konzentrationsabhängige Induktion nach Inkubation mit AuCl_3 (Abbildung 20), wobei die mRNA-Transkriptmengen bis auf das 2,7-fache anstiegen.

NFKB2 codiert für eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), welcher Gene im Verlauf von Entzündungs- und Immunreaktionen reguliert. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt beispielsweise über Zytokine oder Liganden der TNFR (*tumor necrcrosis factor receptor*)-Superfamilie, worüber Signalwege der Zellzyklusregulation, Apoptose sowie Zelldifferenzierung eingeleitet werden können (zusammengefasst in Liu *et al.* 2017). Die Transkription von *NFKB2* ist dabei durch das codierte Protein NF- κ B selbstreguliert (Liptay *et al.* 1994). Auch die Aktivierung durch ROS konnte bereits nachgewiesen werden, wobei dieser Mechanismus

zelllinienabhängig zu sein scheint (zusammengefasst in Schoonbroodt und Piette 2000). Aufgrund der ROS-induzierenden Wirkung von AuCl_3 (Kapitel 5.2.3) wird eine redoxabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B angenommen, wodurch es aufgrund der Selbstregulation zu einer gesteigerten Expression von *NFKB2* kommt.

Bei dem von *PLK3* (*polo-like kinase 3*) codierten Protein handelt es sich um eine Serin/Threonin Kinase, welche wichtige Funktionen bei der Zellzyklusregulation einnimmt. Verschiedene Stimuli wie Hormone, Zytokine oder auch zellulärer Stress regulieren die Expression dabei überwiegend auf Transkriptionsebene (zusammengefasst in Pagès und Pouyssegur 2005). Zudem wird dem PLK3 Protein eine Rolle bei der Aktivierung von p53 durch oxidativen Stress zugesprochen (Xie *et al.* 2001).

Das Gen *VEGFA* (*vascular endothelial growth factor A*) codiert für ein Protein der Familie der VEGF-Wachstumsfaktoren, welche unter physiologischen Bedingungen die Angiogeneese stimulieren können (zusammengefasst in Ng *et al.* 2006). Die Regulation erfolgt über verschiedene Transkriptionsfaktoren, u.a. auch NF- κ B, woraus die synchrone Induktion der Gene abgeleitet werden könnte (Kiriakidis *et al.* 2003).

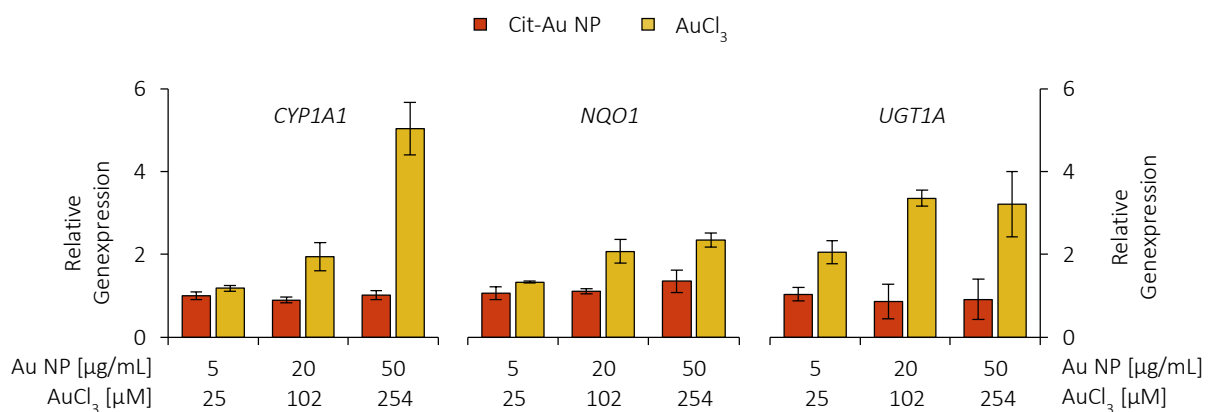


Abbildung 21: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl_3 auf Gene des Fremdstoffmetabolismus. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Die Behandlungen wurden auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen, deren Expressionswert auf 1 gesetzt wurde. Abgebildet sind die Gene mit relevanter Expressionsänderung (*CYP1A1*, *NQO1*, *UGT1A*). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Werten, aus zwei unabhängigen Versuchen $\pm$ Range/2.

Im Gencluster des Fremdstoffmetabolismus zeigten *CYP1A1*, *NQO1* und *UGT1A* einen konzentrationsabhängigen Anstieg der mRNA Transkriptmenge nach Inkubation mit AuCl_3 (Abbildung 21). Hierbei wurde bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 254 μM eine Steigerung um das 5- (*CYP1A1*), 2,4- (*NQO1*) und 3,2-fache (*UGT1*) festgestellt.

Die genannten Gene codieren für Proteine, welche für Detoxifizierungsreaktionen im Zuge des Xenobiotika-Metabolismus von zentraler Bedeutung sind. Hierbei werden Fremdstoffe durch die Monooxygenierung durch Cytochrom P450-1A1 (codiert durch *CYP1A1*) während des Phase-I-Metabolismus zunächst funktionalisiert, wodurch anschließende Entgiftungsreaktionen (u.a. Glucuronidierung, Acetylierung) erleichtert werden (zusammengefasst in Androutsopoulos *et al.* 2009). Die Glucuronidierung von Xenobiotika durch die UDP-Glucuronosyltransferasen-1-Familie (codiert von *UGT1A*) erhöht die Wasserlöslichkeit der

Metaboliten und damit die renale und biliäre Exkretion. Der NAD(P)H-Chinondehydrogenase-1 (codiert von *NQO1*) kommt bei der Elektronenübertragung der Atmungskette eine wichtige Rolle zu.

Bei den Genen *CYP1A1* und *UGT1A* handelt es sich um klassische Ah-Rezeptor (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) regulierte Gene. Demgegenüber steht *NQO1* unter der Kontrolle von Nrf2, welcher als redoxsensitiver Transkriptionsfaktor eine Reihe von Genen im Zuge der oxidativen Stressantwort reguliert (zusammengefasst in Anwar-Mohamed *et al.* 2009, Ross und Siegel 2017, Yueh und Tukey 2007). Jedoch konnte bereits eine funktionelle Interaktion von Nrf2 und dem Ah-Rezeptor nachgewiesen werden, wodurch es zu einem *crosstalk* der regulierten Gene kommen könnte (Kalthoff *et al.* 2010).

Die Aktivierung von Nrf2 nach Inkubation mit Gold(I)-chlorid sowie weiterer Metalle wurde bereits nachgewiesen (Simmons *et al.* 2011). Über einen sogenannten *crosstalk* können verschiedene Signalwege miteinander gekoppelt werden, wodurch es zu funktionellen Überlappungen der regulierten Gene kommen kann. Darüber hinaus konnte eine Metall-induzierte Aktivierung des Ah-Rezeptors für Arsen, Cadmium und Chrom nachgewiesen werden (Elbekai und El-Kadi 2007). Die räumliche Nähe der Promotorregionen XRE (*xenobiotic response element*) des Ah-Rezeptors und ARE (*antioxidant response element*) von Nrf2 scheint dabei in einer Verknüpfung der beiden Signalwege zu resultieren und könnte dadurch zu einer Induktion des Ah-Rezeptor regulierten Gens *CYP1A1* führen (Anwar-Mohamed *et al.* 2009).

Zusammenfassend konnte für die Cit-Au NP trotz hoher zellulärer Akkumulation kein relevanter Einfluss auf die Genexpression der mit Hilfe der HT RT-qPCR Methode untersuchten Gene in HeLa S3-Zellen festgestellt werden. Demgegenüber stehen Untersuchungsergebnisse der Forschungsgruppe um Bajak *et al.* (2015), welche nach der Behandlung von Caco-2 Zellen mit vergleichbaren Konzentrationen von 5 nm großen Cit-Au NP eine Induktion Nrf2 kontrollierter Gene wie Metallothionein und Hämoxigenase zeigten. Die Beobachtungen werden dabei auf das Vorliegen von oxidativem Stress bzw. einer durch Au NP gestörten Selenhomöostase zurückgeführt. Auch Li *et al.* (2010) konnten, basierend auf ihren Untersuchungen, oxidativen Stress als einen zugrundeliegenden Wirkmechanismus der Zytotoxizität von Au NP in Zellkulturexperimenten identifizieren. Da es ausgehend von den Cit-Au NP in dem getesteten Konzentrationsbereich von 5-50 µg/mL lediglich zu moderaten Effekten auf den ATP-Gehalt kam, stützen die Genexpressionsanalysen das Ergebnis, wonach von Cit-Au NP aufgrund ihrer biobeständigen Eigenschaft nur ein geringes zytotoxisches Potential ausgeht. Die Diskrepanz zwischen den hier dargestellten Untersuchungsergebnissen und den Literaturdaten wird auf die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften wie die Löslichkeit und Oberflächenmodifizierung der Au NP und die verwendeten Zelllinien zurückgeführt.

Die Behandlungen mit der löslichen Substanz AuCl₃ zeigten im Gegensatz zu der partikulären Verbindung Cit-Au NP nach 24-stündiger Inkubation in HeLa S3-Zellen einen deutlichen Einfluss auf die Expression

verschiedener Gencluster der HT RT-qPCR-Methode. Hierbei zeigten sich 12 Gene konzentrationsabhängig beeinflusst, welche den Clustern des Fremdstoffmetabolismus, der oxidativen Stressantwort, der DNA-Schadensantwort und der Apoptoseregulation angehören. Im Gencluster der oxidativen Stressantwort zeigte die *HMOX1* eine massive Induktion um das 65-fache bei der höchsten getesteten Konzentration an. Mit Ausnahme der Repression von *SEPP1* wiesen die weiteren beeinflussten Gene gesteigerte Transkriptmengen auf. In den Genexpressionsanalysen zeigten sich darüber hinaus überwiegend Gene beeinflusst, welche unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 stehen, u.a. *HMOX1*, *GCLC* oder *NQO1*. Die Aktivierung von Nrf2 erfolgt durch die Dissoziation des gebundenen Elements Keap-1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*), welches unter physiologischen Bedingungen den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau von Nrf2 veranlasst. Im Rahmen von oxidativem Stress kommt es zur Modifikation der sensitiven SH-Gruppen des Repressorproteins Keap-1, was zu einer Konformationsänderung des Proteins und zur Dissoziation von Nrf2 führt. Der Transkriptionsfaktor bindet nach Translokation in den Zellkern an das *antioxidant response element* (ARE) und kann so die Transkription verschiedener Zielgene regulieren (zusammengefasst in Ma 2013). Über die Kopplung verschiedener zellulärer Signalwege können darüber hinaus Gene, welche nicht direkt von Nrf2 reguliert sind, beeinflusst werden, wodurch es zu der beobachteten Induktion von Genen des Fremdstoffmetabolismus (*CYP1A1*, *UGT1A*) kommen könnte.

Unter Berücksichtigung der unter Kapitel 5.2.3 dargestellten ROS-Induktion, wird eine oxidative Stresslage als Ursache für das geänderte Genexpressionsprofil von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit AuCl_3 angenommen. Hierbei könnte es neben der Aktivierung von Nrf2 zu oxidativen Zellschäden und einer Induktion der Apoptose kommen. Die Forschungsgruppe um Lum *et al.* (2006) zeigte ebenfalls mit Hilfe von Genexpressionsanalysen eine Induktion von Apoptose- und Zellzyklus-regulierender Gene, nach Behandlung von renalen Zellen der Ratte mit einer Gold(III)-Porphyrin-Verbindung.

5.3 Inhibitorische Wirkung ausgewählter Gold(III)-Komplexe auf die PARP-Aktivität

Die inhibitorische Wirkung einiger Gold(I)- und (III)-Komplexe auf die PARylierungs-Aktivität der PARP-1 konnte in subzellulären Systemen bereits gezeigt werden (zusammengefasst in Bertrand *et al.* 2018, Rubbiani *et al.* 2014). Ein möglicher Mechanismus der Inhibierung könnte dabei die Verdrängung der Zn^{2+} -Ionen in den Zinkfingerstrukturen der PARP-1 durch $\text{Au}^{1+/3+}$ -Ionen darstellen. Die Formierung sogenannter Goldfinger könnte zu einer verminderten DNA-Bindungsaffinität führen und so die inhibierte PARylierungs-Aktivität begründen (zusammengefasst in Abbehausen 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Gold-Komplexe hinsichtlich ihres Inhibierungspotentials der PARP-1 untersucht. Basierend auf Voruntersuchungen (Daten nicht dargestellt) in einem subzellulären Testsystem erwiesen sich dabei die Gold(III)-Komplexe $[\text{Au}(1,10\text{-Phenanthroline})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (Auphen) und $[\text{Au}(2\text{-Benzylpyridine})\text{Cl}_2]$ (Aubenpy) als potentielle PARP-1 Inhibitoren und wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Neben dem subzellulären System wurden die ausgewählten Komplexe Auphen und Aubenpy sowie die entsprechenden Liganden Phen und Benpy weiterführend hinsichtlich ihres Einflusses auf die PARP-Aktivität in HeLa S3-Zellen untersucht. Zur mechanistischen Aufklärung der Inhibierung wurde die Bindung isolierter PARP-1 an DNA im Rahmen eines elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays untersucht.

5.3.1 Untersuchung der PARP-1-Aktivität im subzellulären Testsystem

Für erste Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von PARP-1 unter Einfluss der Testsubstanzen wurde ein subzelluläres System gewählt. Unter Verwendung einer isolierten PARP-1 wurde hierbei der Einbau biotinylierter ADP-Ribose auf immobilisierte Histone kolorimetrisch bestimmt. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde ein definierter Konzentrationsbereich getestet, um daraus Inkubationskonzentrationen für die anschließenden Zellkulturuntersuchungen abzuleiten. Als Positivkontrolle wurde PJ-34, ein bekannter Inhibitor der PARP-1, in einer Konzentration von $5\text{ }\mu\text{M}$ mitgeführt (Magan *et al.* 2012, Olausson *et al.* 2013). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

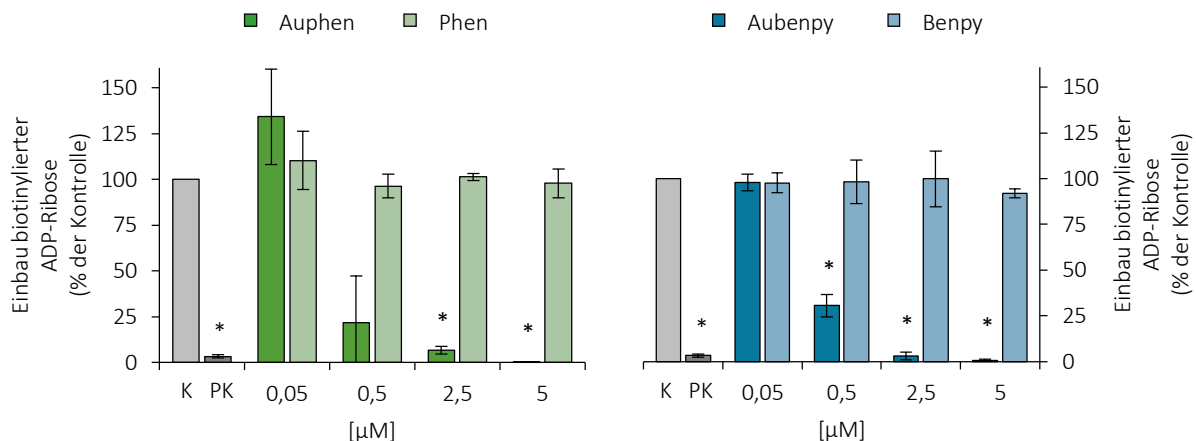


Abbildung 22: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf den Einbau biotinylierter ADP-Ribose isolierter PARP-1. Die isolierte PARP-1 wurde für 10 min mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend der Einbau biotinylierter ADP-Ribose kolorimetrisch bestimmt. PJ-34 diente als Positivkontrolle (PK) und wurde in der Konzentration von 5 µM mitgeführt. Als Kontrolle wurde der Einbau biotinylierter ADP-Ribose durch die unbehandelte PARP-1 herangezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 (Behandlungen mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy) und T-Test (Behandlung mit PJ-34) Post-Hoc-Test (* $p \leq 0,05$).

Die Inkubationen mit den Gold(III)-Komplexen Auphen und Aubenpy führten zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der isolierten PARP-1. Der Einfluss der Komplexe auf den Einbau biotinylierter ADP-Ribose war dabei beinahe identisch. Die Inkubationen mit Auphen und Aubenpy führten ab 0,5 µM zu einer deutlichen Inhibition der PARP-1-Aktivität. Der Einbau biotinylierter ADP-Ribose lag dabei noch bei 22 % bzw. 31 % der Kontrolle. Bei der Inkubation mit 2,5 µM Auphen bzw. Aubenpy konnte eine Restaktivität der isolierten PARP-1 von 7 % bzw. 3 % nachgewiesen werden. Ab einer Behandlung mit 5 µM konnte kein Einbau biotinylierter ADP-Ribose mehr erfasst werden. Die entsprechenden Liganden Phen und Benpy wiesen in dem getesteten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Aktivität der isolierten PARP-1 auf. Im Vergleich zur Kontrolle wurde der Einbau biotinylierter ADP-Ribose, bei Behandlung mit der Vergleichssubstanz Substanz PJ-34, auf 3 % reduziert.

Die inhibitorischen Wirkungen der Gold(III)-Komplexe Auphen und Aubenpy sowie von PJ-34 auf die PARylierungs-Aktivität isolierter PARP-1 wurden bereits in der Literatur beschrieben und dienten als Ausgangspunkt für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit. Konkret wurden unter Verwendung desselben Testsystems für Auphen und Aubenpy mittlere inhibitorische Konzentrationen von 6,7 nM bzw. 1,3 nM bestimmt (Bertrand *et al.* 2015, Mendes *et al.* 2011). In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe zeigte sich unter Verwendung desselben subzellulären Testsystems ebenfalls eine deutliche Reduktion der PARP-1-Aktivität unter dem Einfluss vergleichbarer Konzentrationen von PJ-34 (Wedler 2018).

Die Inhibierungsmechanismen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der betroffenen Domäne der PARP-1. Während der PARP-Inhibitor PJ-34 mit dem Substrat NAD^+ um die katalytische Domäne der PARPs konkurriert (Sethi und Jain 2014), stellen die Zinkfinger-Motive bei der Inhibition durch Gold-basierte Komplexe in der DNA-Bindungsdomäne wahrscheinliche Angriffspunkte dar. Ein Austausch der gebundenen Zn^{2+} -Ionen mit

Au¹⁺ bzw. Au³⁺-Ionen kann dabei zu Strukturdeformationen dieser Domäne führen, wodurch die DNA-Bindungsaffinität herabsetzt und somit die PARylierungs-Aktivität gehemmt werden könnte. Dieser postulierte Mechanismus wurde für Auphen und Aubenpy bisher nur in subzellulären Testsystemen und mit Modellpeptiden mit Zinkfingerstrukturen der PARP-1 (C₃H₁) untersucht (Laskay *et al.* 2015, Mendes *et al.* 2011, Wenzel *et al.* 2018). Für die Liganden liegen in Bezug auf eine mögliche PARP-1-Inhibierung keine entsprechenden Literaturdaten vor. Da es sich bei den Liganden 1,10-Phenanthrolin und 2-Benzylpyridin jedoch um Metallchelatoren handelt, könnte eine Komplexierung der Zinkionen zu einer Inhibierung der PARP-1 führen. In Untersuchungen von Cooper *et al.* (2009) zeigte sich in diesem Zusammenhang eine Inhibierung einer Deubiquitinase durch die Komplexierung der enthaltenen Zinkionen im aktiven Zentrum des Enzyms durch Phen. Unter Verwendung des subzellulären Testsystems zeigte sich in unseren Untersuchungen jedoch kein Einfluss der Liganden auf den Einbau biotinylierter ADP-Ribose durch die PARP-1 in dem subzellulären Testsystem, so dass eine direkte Konkurrenz der Liganden mit Zink der Zink-bindenden Domänen von PARP-1 ausgeschlossen werden kann.

Weiterführend wurde mit verschiedenen Analysemethoden untersucht, ob sich die inhibitorische Wirksamkeit der Komplexe auch in einem zellulären Testsystem nachweisen lässt. Hierfür wurde zunächst die Aufnahme von Auphen und Aubenpy in HeLa S3-Zellen untersucht.

5.3.2 Zelluläre Aufnahme von Auphen und Aubenpy

Die Inhibierung isolierter PARP-1 unter dem Einfluss der Gold(III)-Komplexe Auphen und Aubenpy konnte im vorherigen Kapitel (5.3.1) in einem subzellulären Testsystem gezeigt werden. Die Ausbildung sogenannter Goldfinger führt dabei zu einer Deformation dieser Domäne und so möglicherweise zur Inhibierung des Enzyms (Wenzel *et al.* 2018). Der Nachweis dieser Goldfinger mit massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgte bisher jedoch nur subzellulär, unter Verwendung von Modellpeptiden in verschiedenen Puffersystemen. Die Matrix aus Zellkultur-basierten Untersuchungen weist im Vergleich zu definierten Puffersystemen eine viel komplexere Zusammensetzung aus Proteinen, Aminosäuren, Salzen und weiteren zellulären Bestandteilen auf. Allein die Vielzahl an Proteinen bietet damit weitere potentielle Zielmoleküle für die Gold(III)-Komplexe bzw. Goldionen, wodurch deren zelluläre Selektivität gegenüber der PARP-1 sinken kann, wie auch die zur Inhibition benötigte Goldkonzentration. Daher wurde zunächst der zelluläre Goldgehalt in HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 5 µM Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy mit Hilfe der GF-AAS bestimmt. Dabei wurde überprüft, ob die verwendeten Gold(III)-Komplexe zellulär aufgenommen werden bzw. ob es zu Unterschieden in der zellulären Akkumulation kommt. Die ermittelten Goldgehalte nach Behandlung mit Auphen und Aubenpy sind Abbildung 23 zu entnehmen. Die Behandlungen mit den Liganden wiesen kein zelluläres Gold auf (Anhang, Abbildung 43).

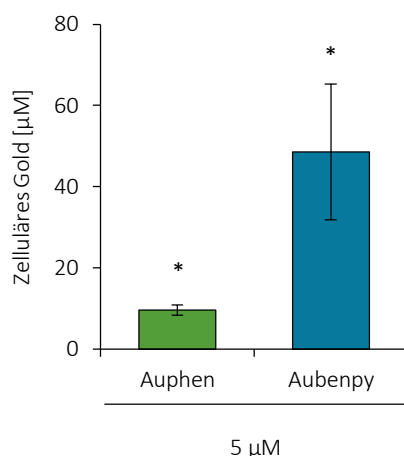


Abbildung 23: Intrazellulärer Goldgehalt von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen und Aubenpy. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 µM Auphen bzw. Aubenpy inkubiert. Die Quantifizierung des zellulären Goldgehaltes erfolgte mittels GF-AAS. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach T-Test (* $p \leq 0,05$).

Nach 24-stündiger Inkubation mit 5 µM Auphen bzw. Aubenpy konnten zelluläre Goldgehalte im mikromolaren Bereich in HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Behandlung mit Auphen zeigte sich eine gesteigerte Goldakkumulation nach Behandlung mit Aubenpy um das Fünffache. Die Goldgehalte beliefen sich dabei auf 10 µM bzw. 48 µM.

Die zelluläre Aufnahme Metall-basierter Komplexe kann über verschiedene Mechanismen wie die passive Diffusion, den passiven Transport durch Kanal- oder Carrierproteine und die Endozytose erfolgen. Die Aufnahme über passive Diffusion verläuft dabei energieunabhängig, entlang eines Konzentrationsgradienten und ist stark von der Struktur, Ladung und Lipophilie der Verbindung abhängig (zusammengefasst in Puckett *et al.* 2010). In diesem Zusammenhang wurde eine gesteigerte zelluläre Aufnahme von Au(I)-Komplexen mit lipophilen Liganden im Vergleich zu weniger lipophilen Derivaten der Liganden festgestellt (Liu *et al.* 2008). Bisher befassten sich jedoch nur wenige Studien mit der Untersuchung der zellulären Aufnahmemechanismen von Gold-basierten Komplexen. In diesem Zusammenhang wurde die zelluläre Aufnahme des Komplexes Auphen (mit Hexafluorophosphatanion; PF_6^-) und dem freien Liganden 1,10-Phenanthrolin bereits nachgewiesen (Krishnamurti *et al.* 1980, Palanichamy *et al.* 2012). Im Rahmen von Aufnahmeuntersuchungen von Spreckelmeyer *et al.* (2018) wurde ferner unter Einsatz eines Derivats des Komplexes Auphen die Beteiligung der ATP-abhängigen Effluxpumpen ATP7A und ATP7B (ATP7A/B) an dem Membrantransport von Gold(III)-Komplexen vorgeschlagen.

Die gesteigerte zelluläre Gold-Akkumulation nach Inkubation mit Aubenpy verglichen mit Auphen könnte auf den strukturellen Unterschieden und den damit verbundenen chemischen Eigenschaften der Komplexe basieren. Der Ligand 2-Benzylpyridin weist im Vergleich zu 1,10-Phenanthrolin einen höheren logP-Wert auf, welcher als Maß der Lipophilie von Substanzen herangezogen wird. Hieraus könnte eine gesteigerte Akkumulation des Komplexes Aubenpy resultieren (PubChem-Database). Ferner ist die Stabilität von

Gold(III)-Komplexen unter Zellkulturbedingungen stark von den entsprechenden Liganden abhängig. In diesem Zusammenhang wurde in massenspektrometrischen Analysen nach Inkubation von Zinkfinger-Modellpeptiden mit Auphen eine Freisetzung des Liganden Phen und der Chloro-Liganden sowie die Reduktion von Au^{3+} zu Au^{1+} beobachtet (Laskay *et al.* 2015). Das zentrale Goldion im Komplex Aubenpy scheint im Gegensatz zu Auphen durch den Liganden 2-Benzylpyridin in seiner Oxidationsstufe +3 stabilisiert zu werden (Wenzel *et al.* 2018). In der Annahme, dass der Komplex Aubenpy unter Zellkulturbedingungen stabilisiert ist, es jedoch zu einer Freisetzung des Liganden Phen kommt, könnten unterschiedliche Aufnahmemechanismen von Aubenpy und den „freien“ Goldionen aus Auphen für die unterschiedliche Akkumulation verantwortlich sein. Die Goldionen könnten dabei möglicherweise über Ionenkanäle in die Zelle aufgenommen werden. Für den neutralen Komplex Aubenpy wäre eine passive Diffusion als Transportmechanismus denkbar, die zu der gesteigerten zellulären Akkumulation von Gold führen könnte.

Zusammenfassend führte die Inkubation mit den Gold(III)-Komplexen Auphen und Aubenpy zu einer Goldakkumulation in HeLa S3-Zellen. Dabei zeigte sich eine gesteigerte Akkumulation nach Behandlung mit Aubenpy, welche möglicherweise auf die Stabilität der Komplexe zurückgeführt werden könnte. Weiterführend wurde untersucht, ob es infolge dieser Akkumulation zu einer toxischen Wirkung in HeLa S3-Zellen kommt.

5.3.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Um den Einfluss der Gold(III)-Komplexe Auphen, Aubenpy sowie den entsprechenden Liganden Phen und Benpy auf die PARylierungs-Aktivität auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde anschließend die Zytotoxizität der Testsubstanzen in HeLa S3-Zellen bestimmt. Aus den Zytotoxizitätsdaten sollte ein geeigneter Konzentrationsbereich abgeleitet werden, in welchem eine induzierte Spaltung der PARP-1 im Zuge der Apoptose ausgeschlossen werden konnte, welche zu falsch positiven Ergebnissen bei den Inhibierungsstudien führen könnte. Der Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen ist in Abbildung 24 dargestellt.

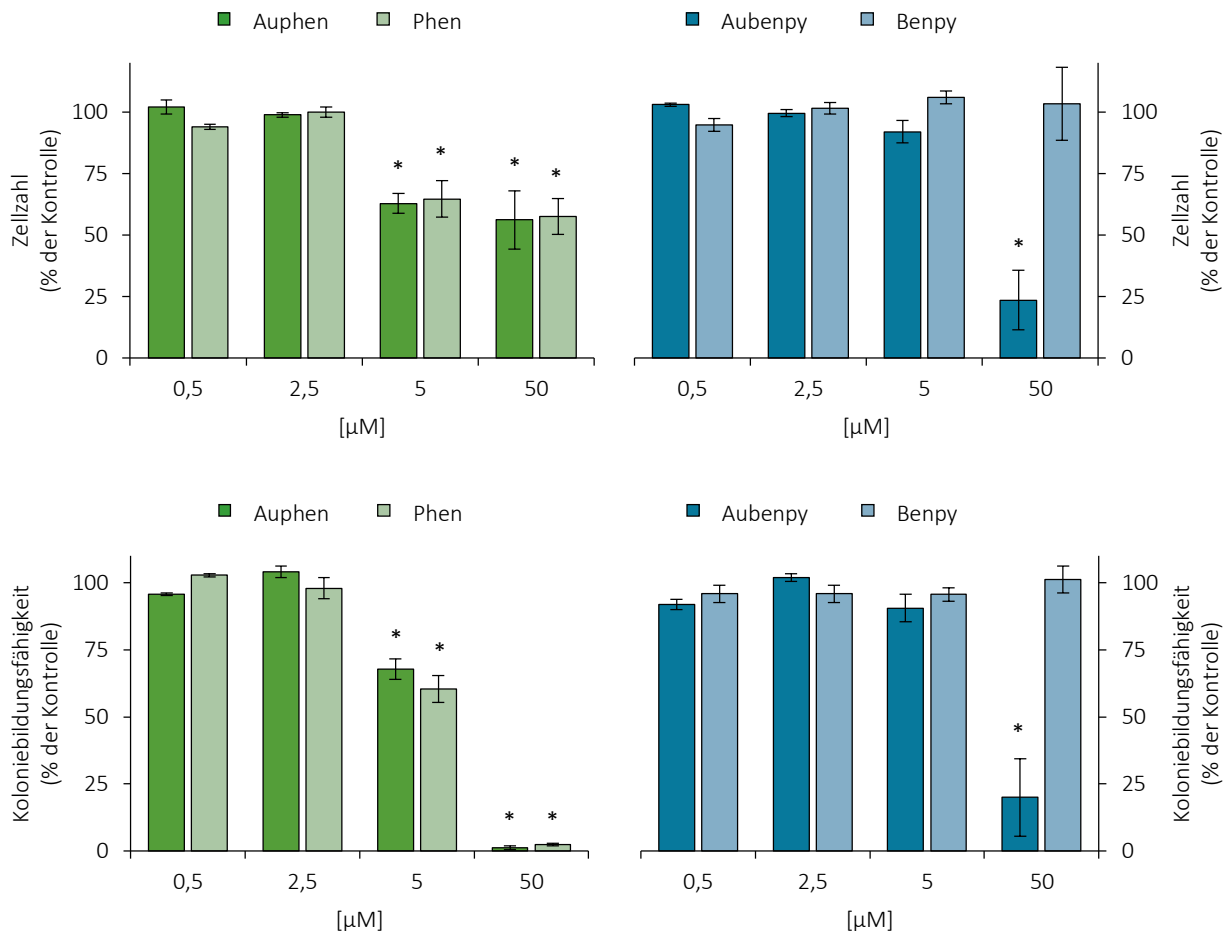


Abbildung 24: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen behandelt, gezählt und für die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit weitergesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs Werten, aus mindestens drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (* $p \leq 0,05$).

Die Inkubation mit dem Gold(III)-Komplex Auphen und dem entsprechenden Liganden Phen zeigten einen vergleichbaren konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Zellzahl und auf die Koloniebildungsfähigkeit in HeLa S3-Zellen. Ab einer Konzentration von 5 μM sank die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit auf circa 65 %. Die Behandlungen mit 50 μM führten zu einer weiteren Abnahme der Zellzahl auf circa 55 % und einem kompletten Verlust der Koloniebildungsfähigkeit. Das Substanzpaar Aubenpy und Benpy wies einen abweichenden Verlauf auf die getesteten Zytotoxizitätsparameter auf. Bei Behandlungen mit 5 μM wurde dabei eine moderate Senkung der Zellzahl und der Koloniebildungsfähigkeit auf circa 90 % beobachtet. Die Inkubation mit 50 μM führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl und der Koloniebildungsfähigkeit auf 20 % der Kontrolle. Der entsprechende Ligand wies in dem getesteten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf diese Endpunkte auf.

Von einer vergleichbaren zytotoxischen Wirkung des Gold(III)-Komplexes Auphen und des Liganden Phen berichtete Messori *et al.* (2000). In dieser Studie zeigten ebenfalls vergleichbare Konzentrationen (Auphen 3,8 μM und Phen 3,7 μM) eine ähnliche Reduktion der Zellzahl der humanen ovarial Karzinomzelllinie

A2780. In dieser Studie wird zudem auf eine geringere Stabilisierung durch den Liganden Phen als beispielsweise durch Polyamin-Liganden hingewiesen. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, konnte eine Freisetzung der Liganden aus dem Auphen-Komplex in einem subzellulären Testsystem bereits gezeigt werden (Laskay *et al.* 2015, Wenzel *et al.* 2018). Eine Freisetzung des Liganden würde die vergleichbaren Effekte, bezogen auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von Auphen und Phen, erklären. Somit könnte Phen unabhängig vom Goldkomplex mit zellulären Bestandteilen interagieren und möglicherweise zur Komplexbildung anderer Metallionen zur Verfügung stehen. Durch die Bindung anderer physiologisch bedeutsamer Metalle wie beispielsweise Kupfer, Zink oder Eisen könnten weitere relevante Komplexverbindungen entstehen, welche im Falle von Kupfer nachweislich eine DNA-Bindungsfähigkeit sowie eine Nukleaseaktivität aufweisen, worin möglicherweise ihr zytotoxisches Potential begründet liegt (Anbu *et al.* 2013, Lu *et al.* 2003, Naletova *et al.* 2018, Sigman *et al.* 1996).

In der Studie von Bertrand *et al.* (2015) wurde der Einfluss von Aupenpy auf verschiedene Zelllinien untersucht. In allen getesteten Zelllinien konnten dem Komplex dabei bereits im unteren mikromolaren Bereich antiproliferative Eigenschaften nachgewiesen werden. Der Ligand wurde hier nicht separat untersucht. Ein Derivat von 2-Benzylpyridin zeigte jedoch in einer weiteren Studie um Grau *et al.* (2018) ebenfalls keine zytotoxische Wirkung in HeLa Zellen. Das zentrale Goldion im Komplex Aupenpy scheint im Gegensatz zu Auphen durch den Liganden 2-Benzylpyridin in seiner Oxidationsstufe +3 stabilisiert zu werden. Da der freie Ligand Benpy keinen Einfluss auf die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit in HeLa S3-Zellen aufwies, wird vermutet, dass die zytotoxische Wirkung von Aupenpy nicht auf dem Komplexbildner beruht. Vielmehr scheint das komplexierte Goldion diese Effekte zu vermitteln.

Um den Einfluss der Gold(III)-Komplexe sowie der entsprechenden Liganden zu präzisieren wurden weitere Untersuchungen in Bezug auf die Zellvitalität vorgenommen. Hierbei wurde der zelluläre ATP-Gehalt nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen analysiert. Die Ergebnisse sind Abbildung 25 zu entnehmen.

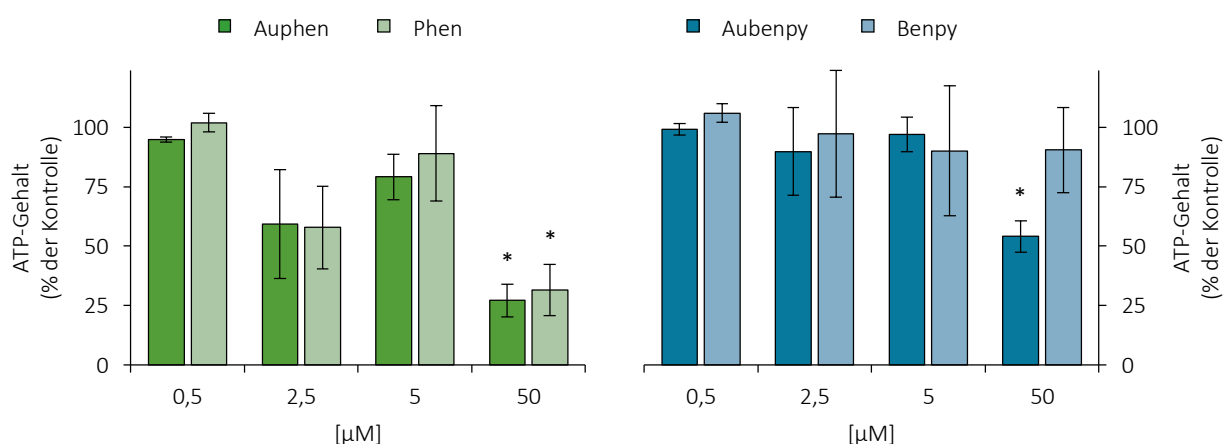


Abbildung 25: Einfluss von Auphen, Aupenpy, Phen und Benpy auf den ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und der zelluläre ATP-Gehalt luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (* $p \leq 0,05$).

Nach Inkubation mit Auphen und Phen wurde in HeLa S3-Zellen bei einer Konzentration von 2,5 μM eine deutliche ATP-Depletion beobachtet. Der ATP-Gehalt betrug dabei noch circa 20 % der Kontrolle. Die depletierende Wirkung zeigte sich bei 5 μM wieder rückläufig. Der ATP-Gehalt nach Behandlung mit Auphen und Phen lag hier bei circa 80 % bzw. 90 % der Kontrolle. Die Behandlungen mit 50 μM dieses Substanzpaares wiesen nur noch einen Gehalt von circa 30 % der Kontrolle auf. Unter dem Einfluss von Aupenpy wurde bis 5 μM lediglich eine moderate Abnahme des zellulären ATP-Gehalts verzeichnet. Bei der höchsten Konzentration von 50 μM zeigte sich jedoch eine deutliche Reduktion auf 54 % der Kontrolle. Der entsprechende Ligand Benpy führte in dem getesteten Konzentrationsbereich lediglich zu einer moderaten Senkung des ATP-Gehaltes auf 90 %.

Wie bereits in den vorangegangenen Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigte das Substanzpaar Auphen und Phen ein vergleichbares Dosis-Wirkungs-Muster bezüglich des ATP-Gehaltes in HeLa S3-Zellen. Der zelluläre ATP-Gehalt und seine Veränderung repräsentieren den Energiebedarf von Zellen. Eine hohe zelluläre Belastung durch energieverbrauchende Prozesse, wie bspw. Signalwege der Apoptose können dabei zu einem Anstieg des ATP-Gehaltes führen (Zamaraeva *et al.* 2005). Ob der rückläufige Anstieg des ATP-Gehaltes bei 5 μM Auphen und Phen diesem Sachverhalt zugrunde liegt, wurde nachfolgend anhand der Anteile an apoptotischen sowie nekrotischen Zellen untersucht (Kapitel 5.3.4).

Im Gegensatz zu dem Substanzpaar Auphen und Phen zeigten die Untersuchungen mit Aupenpy und Benpy nur einen moderaten Einfluss auf den zellulären ATP-Gehalt bei Konzentrationen bis 5 μM . Der deutliche Rückgang des Gehaltes nach einer Behandlung mit 50 μM Aupenpy spiegelt die Ergebnisse der Untersuchungen der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit wider und verdeutlicht das zytotoxische Potential des Komplexes.

Aufgrund des Einflusses der Komplexe Auphen und Aupenpy sowie des Liganden Phen auf den zellulären ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen kann von einer Beteiligung der Mitochondrien an der zytotoxischen Wirkung ausgegangen werden. Neben der Energiebereitstellung nehmen Mitochondrien auch durch ihre regulatorische Funktion eine bedeutende Rolle beim apoptotischen Zelltod ein. Hierbei kann beispielsweise im Zuge der intrinsischen Apoptose-Signalkette ein gesteigertes Level an ROS zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran führen. Hierbei kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, wodurch Caspasen aktiviert werden, welche durch einen gezielten Proteinabbau und eine Signalübertragung im Zuge der Caspasenkaskade, die Apoptose einleiten (zusammengefasst in Tait und Green 2012).

Zusammengefasst konnte bezüglich der Zytotoxizität ein fast identisches Dosis-Wirkungs-Muster für den Gold(III)-Komplex Auphen und den Liganden Phen nachgewiesen werden. Je nach betrachtetem Endpunkt zeigte sich ab 2,5 μM bzw. 5 μM ein Einfluss beider Substanzen auf HeLa S3-Zellen. Aufgrund der nachweislich geringen Stabilität des Komplexes unter reduzierenden Bedingungen könnte es unter Zellkulturbedingungen zu einer Freisetzung des Liganden Phen kommen. Durch Komplexbildung anderer Metalle wie z.B. Kupfer

könnte der Ligand Phen weitere reaktive Komplexe bilden und so zu vergleichbaren biologischen Effekten wie der Gold(III)-Komplex Auphen führen. Im Vergleich dazu weisen die Behandlungen mit dem Komplex Aubenpy bis 5 μM deutlich geringere zytotoxische Effekte auf. Für den entsprechenden Liganden Benpy wurde bis 50 μM keine zytotoxische Wirkung verzeichnet.

Auf Basis der ermittelten Zytotoxizitätsdaten wurden für die weiterführenden Untersuchungen in HeLa S3-Zellen die Konzentrationen 0,5, 2,5 und 5 μM für die Gold(III)-Komplexe und die entsprechenden Liganden getestet. Um zu prüfen, ob die Substanzen auch in einem zellulären System eine inhibitorische Wirkung auf die PARP-Aktivität ausüben, wurde die Poly(ADP-Ribosyl)ierung unter Einfluss der Substanzen in HeLa S3-Zellen untersucht. Zudem wurde die PARP-1-Bindung an DNA in einem weiteren subzellulären Testsystem untersucht. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln (5.3.4 und 5.3.5) dargestellt.

5.3.4 Einfluss auf die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Bei Verwendung des subzellulären Testsystems erwiesen sich die Gold(III)-Komplexe Auphen und Aubenpy bereits ab einer Konzentration von 0,5 μM als effektive PARP-1 Inhibitoren (Kapitel 5.3.1). Ob es jedoch auch in Zellkultur-basierten Experimenten zu einer Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen kommt, wurde bisher noch nicht untersucht. Aufgrund dessen wurde hier erstmals der Einfluss von Auphen, Aubenpy sowie den Liganden Phen und Benpy auf die PARP-1 in HeLa S3-Zellen analysiert.

Bestimmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenz

Unter Verwendung einer Immunfluoreszenzmethode wurde zunächst untersucht, ob es bei der Behandlung von HeLa S3-Zellen mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy zu einer Beeinflussung der H_2O_2 -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung kommt. Die zelluläre Aufnahme der Testsubstanzen, die Translokation in den Zellkern sowie die Interaktion mit weiteren zellulären Makromolekülen könnten hierbei die inhibitorische Wirksamkeit stark beeinflussen.

Im Rahmen der Untersuchung wurden die Poly(ADP-Ribose)-Ketten unter Verwendung des spezifischen Antikörpers 10 H in fixierten Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und einer 5-minütigen Behandlung mit H_2O_2 , zur DNA-Schadensinduktion, detektiert. Als Vergleichssubstanz wurde der PARP-Inhibitor PJ-34 mitgeführt. Die Ergebnisse sowie exemplarische Abbildungen der Immunfluoreszenzbilder sind in Abbildung 26 und 27 dargestellt.

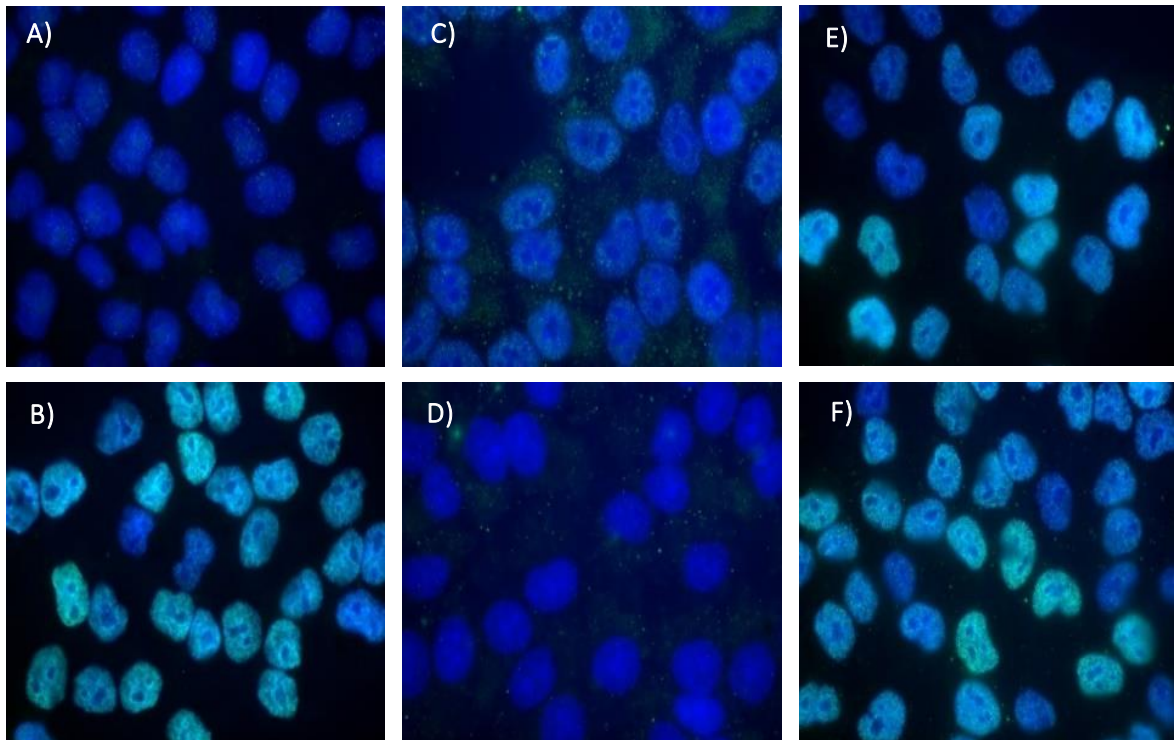


Abbildung 26: Repräsentative Abbildungen der immunfluorimetrischen Detektion von Poly(ADP-Ribose)-Ketten in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Auphen, Aubenpy, Phen, Benpy und PJ-34. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 µM der Testsubstanzen inkubiert. Die DNA-Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM H₂O₂ für 5 Minuten. Dargestellt sind die überlagerten Bilder im DAPI- (Exz.: 405 nm) und EGFP-Kanal (Exz.: 488 nm) der Behandlungen: A) Negativkontrolle, B) H₂O₂-Kontrolle, C) Auphen (5 µM), D) Phen (5 µM), E) Aubenpy (5 µM), F) Benpy (5 µM).

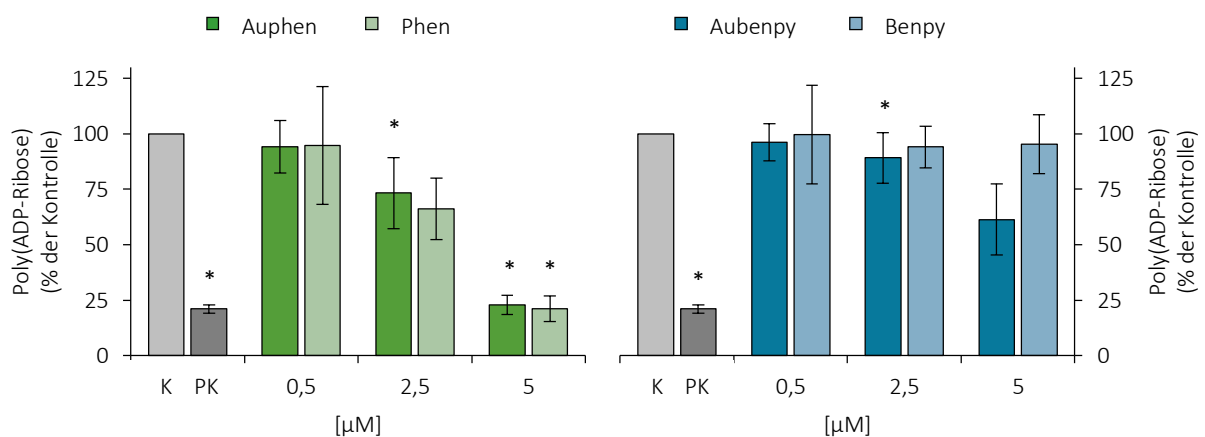


Abbildung 27: Quantitative Auswertung der immunfluorimetrischen Analyse der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Auphen, Aubenpy, Phen, Benpy. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Die DNA-Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM H₂O₂ für 5 Minuten. Die Behandlungen wurden auf eine mit DMSO und H₂O₂ behandelten Kontrolle (K) bezogen. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung mit 5 µM PJ-34 (PK). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens sechs Werten, aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T (Behandlungen mit Auphen, Phen), Dunnett-T3 (Behandlungen mit Aubenpy, Benpy), T-Test (Behandlung mit PJ-34) Post-Hoc-Test (*p ≤ 0,05).

Nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5 µM der Gold(III)-Komplexe bzw. der Liganden zeigte sich kein Einfluss auf die H₂O₂-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen. Bezüglich der Behandlungen mit Auphen bzw. Phen konnte jedoch ab 2,5 µM sowohl für den Komplex als auch für den Liganden gleichermaßen eine

konzentrationsabhängige Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung nachgewiesen werden. Die Inkubationen mit 2,5 μM und 5 μM Auphen bzw. Phen zeigten dabei einen Rückgang der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf knapp 70 % bzw. 20 %. Im Vergleich dazu wies der Komplex Aubenpy bei gleichen Inkubationskonzentration eine geringere Abnahme der durch H_2O_2 -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf. Bezogen auf die H_2O_2 -Kontrolle lag die Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei der Behandlung mit 2,5 μM und 5 μM bei 90 % bzw. 60 %. Der entsprechende Ligand Benpy wies unter Berücksichtigung der Standardabweichung in dem getesteten Konzentrationsbereich keinen Effekt auf. Die Inkubationen der Testsubstanzen ohne H_2O_2 -Schadensinduktion wiesen keine gesteigerte Poly(ADP-Ribosyl)ierung im Vergleich zur Kontrolle auf (Daten nicht dargestellt). Die Vergleichssubstanz PJ-34 führte bei einer Konzentration von 5 μM zu einem deutlich verminderten Anteil an Poly(ADP-Ribose) auf 21 %, bezogen auf die H_2O_2 -Kontrolle.

Mit Hilfe der immunfluorimetrischen Detektion konnte eine Inhibierung der H_2O_2 -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch die Gold-Komplexe Auphen, Aubenpy und den Liganden Phen in HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte für diese Substanzen erstmals in einem zellulären Testsystem. Der Einfluss verschiedener Gold(III)-Verbindungen auf die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 wurde bisher nur subzellulär untersucht. Hierbei konnte im Proteinextrakt der Brustkrebszelllinie MCF7 eine Reduktion der PARP-1-Aktivität auf 11 % nach zellulärer Behandlung mit nanomolaren Konzentrationen an Auphen nachgewiesen werden (Mendes *et al.* 2011). Der Ligand wurde hierbei nicht separat getestet. Auch Aubenpy erwies sich bereits im nanomolaren Bereich als potenter PARP-1-Inhibitor in einem subzellulären Testsystem (Bertrand *et al.* 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Ergebnisse weisen demnach auf eine zelluläre Wirkung von Auphen, Aubenpy und Phen hin. Die Inhibierung der H_2O_2 -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch PJ-34 ist bereits bekannt und wurde in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits dargestellt (Wedler 2018). Anders als die Gold-Komplexe wirkt PJ-34 als kompetitiver Inhibitor, welcher mit NAD^+ um die Bindungsstelle der katalytischen Domäne der PARPs konkurriert und damit zu einer Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung führen kann.

Da unter Verwendung des spezifischen Antikörpers 10 H nur PAR-Polymere ab einer gewissen Kettenlänge detektiert werden können, wurde zusätzlich der zelluläre Gehalt an Poly(ADP-Ribose) nach enzymatischem Verdau mittels LC-MS/MS-Methode quantifiziert. Hierbei kann der Baustein Ribosyladenosin der Poly(ADP-Ribosyl)-Polymere unabhängig der Kettenlänge untersucht werden.

Quantifizierung von Ribosyladenosin mittels LC-MS/MS

Die massenspektrometrische Methode von Martello und Kollegen stellt eine wesentlich sensitivere Methode zur Untersuchung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung als die Immunfluoreszenz-Methode dar (Martello *et al.* 2013). Dabei werden die Poly(ADP-Ribose)-Ketten durch enzymatischen Verdau in einzelne Ribosyladenosin-Einheiten zerlegt, welche anschließend quantifiziert werden können. Die Quantifizierung von Ribosyladenosin mittels LC-MS/MS-Methode erfolgte nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen und 5-minütiger H₂O₂-Schadensinduktion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt

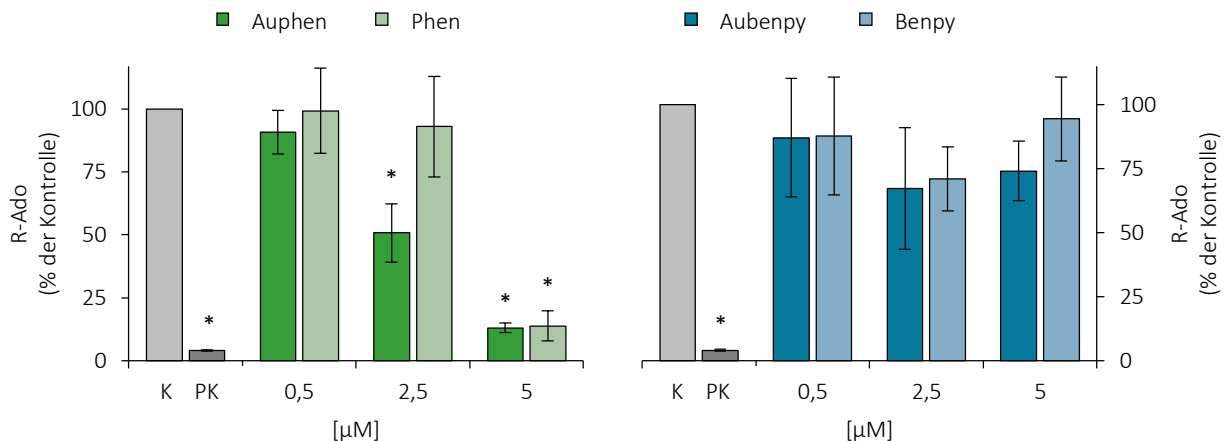


Abbildung 28: Zellulärer Gehalt an Ribosyladenosin in HeLa S3 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy. Die DNA-Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM H₂O₂ für 5 Minuten. Die Behandlungen wurden auf die H₂O₂-Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens sechs Werten, aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 (Behandlungen mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy), T-Test (Behandlung mit PJ-34) Post-Hoc-Test (*p ≤ 0,05).

Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Gold(III)-Komplex Auphen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der H₂O₂-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen. Der Gehalt an Ribosyladenosin lag nach der Behandlung mit 2,5 µM bei circa 50 % der Kontrolle und sank bei der Behandlung mit 5 µM weiter auf 10 % ab. Die Gehalte nach Behandlungen mit 0,5 µM und 5 µM Phen entsprachen den Gehalten nach Behandlung mit denselben Konzentrationen an Auphen. Die Behandlung mit 2,5 µM Phen wies jedoch im Vergleich zu 2,5 µM Auphen einen deutlich höheren Ribosyladenosin-Gehalt von 93 % auf. Im Vergleich zu dem Komplex Auphen wies Aubenpy in dem getesteten Konzentrationsbereich einen deutlich geringeren Effekt auf die H₂O₂-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen auf. Der Gehalt sank nach Behandlung mit 2,5 µM bzw. 5 µM Aubenpy auf circa 70 % und 75 % der Kontrolle. Der entsprechende Ligand Benpy reduzierte bei 2,5 µM ebenfalls den Gehalt auf circa 70 %, wohingegen die Behandlung mit 5 µM einen Gehalt von 95 % der Kontrolle aufwies. Ein nahezu kompletter Rückgang der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf 4 % der Kontrolle zeigte sich bei der Behandlung mit PJ-34 (5 µM).

Die Inkubationen von HeLa S3-Zellen mit den Substanzen ohne H₂O₂-Behandlung induzierten keine Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Daten nicht dargestellt).

Ein postulierter Mechanismus der PARP-1 Inhibierung durch Gold-Komplexe beruht auf einer Formierung sogenannter Goldfinger. Dabei kommt es in den Zinkfinger-Motiven der DNA-Bindungsdomäne der PARP-1 zu einem Austausch von Zn^{2+} mit $\text{Au}^{3+/1+}$. Infolgedessen kommt es zu einer Konformationsänderung dieser Domäne und so zu einer verminderten Bindungsaffinität der PARP-1 an DNA-Schäden. Der Ionenaustausch von Zn^{2+} mit $\text{Au}^{3+/1+}$ wurde in einem subzellulären Testsystem für die Komplexe Auphen und Aubenpy, unter Verwendung eines Modellpeptids mit der Sequenz des N-terminalen Zinkfingers der PARP-1 (C_3H_1), bereits gezeigt. Unter Anwesenheit eines weiteren Modellpeptids mit einer Zinkfingerstruktur (C_2H_2) und weiteren Proteinen wiesen die Komplexe dabei sogar eine spezifische Bindungspräferenz zu den C_3H_1 -koordinierten Zinkfinger-Motiven auf. Während die Formierung der Goldfinger bei Auphen unter der Freisetzung des Phen-Liganden und einer Reduktion von Au^{3+} zu Au^{1+} verlief, wurde Aubenpy durch den Liganden 2-Benzylpyridin in seiner Oxidationsstufe +3 stabilisiert (Wenzel *et al.* 2018).

Mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode konnte für den Gold(III)-Komplex Auphen eine konzentrationsabhängige Reduktion des zellulären Ribosyladenosin-Gehaltes nach H_2O_2 -Schadensinduktion in HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Methode stehen hier im Einklang mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzmethode. Da es jedoch in den Voruntersuchungen ab $5\text{ }\mu\text{M}$ sowohl auf funktioneller und transkriptioneller Ebene nachweislich zu einer Apoptoseinduktion kam (Kapitel 5.3.4 und 5.3.9) ist eine Beeinflussung der PARP-1 im Zuge apoptotischer Signalwege ab dieser Konzentration nicht auszuschließen. Zudem könnte die beobachtete ATP-Depletion bei der Behandlung mit $2,5\text{ }\mu\text{M}$ Auphen bzw. Phen bereits auf Signalwege der Apoptose hindeuten (Kapitel 5.3.3). Durch eine Hyperaktivierung der PARP-1 kann es dabei zu einem vermehrten NAD^+ -Verbrauch und folgend zu einer deutlichen ATP-Depletion kommen. Diese zelluläre Energiekrise resultiert vorwiegend in einem nekrotischen Zelltod (Alano *et al.* 2010). Die Untersuchungsergebnisse bei Behandlung mit $2,5\text{ }\mu\text{M}$ Auphen bzw. Phen deuten jedoch weder auf funktioneller noch auf transkriptioneller Ebene auf eine Beteiligung des nekrotischen Zelltods hin. Aufgrund dessen wird die ATP-Depletion auf andere energieverbrauchende Prozesse durch den Einfluss von Auphen und Phen auf HeLa S3-Zellen zurückgeführt. Denkbar wäre dabei ein gesteigerter ATP-Verbrauch im Rahmen des Efflux der Substanzen durch ATP-abhängige Transporter.

Unter Verwendung der immunfluorimetrischen Methode wurde für Auphen und Phen eine vergleichbare Abnahme der der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen beobachtet. Nach der Analyse des zellulären Ribosyladenosin-Gehaltes mittels LC-MS/MS ergab sich bei der Behandlung mit $2,5\text{ }\mu\text{M}$ Phen jedoch eine Diskrepanz zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenzmethode. Mit Hilfe der immunfluorimetrischen Methode wurde dabei eine Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf knapp 70 % beobachtet, hingegen blieb der Ribosyladenosingehalt mit 93 % der Kontrolle beinahe unverändert. Da die Behandlung mit Phen alleine nicht zu einer Induktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung führte, kann die Zunahme des Ribosyladenosingehaltes aufgrund einer DNA-schädigenden Wirkung des Liganden ausgeschlossen werden.

Möglich wäre hier ein Einfluss von Phen auf die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose). Die vermehrte Bildung verkürzter Ketten würde dabei einen geringeren Effekt auf den zellulären Ribosyladenosin-Gehalt aufweisen, unter Verwendung des Antikörpers 10 H wären diese PAR-Ketten hingegen nicht mehr detektierbar. Dabei bleibt ungeklärt, ob Phen als freier Ligand mit den zellulären PARPs interagiert oder in Form eines Komplexes nach Chelatierung eines weiteren Metalls. Bei der Behandlung mit Auphen könnte die Freisetzung des Liganden Phen ebenfalls in einer Beeinflussung der Poly(ADP-Ribose)-Kettenlänge resultieren, worauf die ähnlichen Ergebnisse der Immunfluoreszenzmethode zurückzuführen wären. Der deutlich verringerte Ribosyladenosingehalt von 50 % der Kontrolle nach Behandlung mit 2,5 μM Auphen, könnte wie in den vorangegangenen subzellulären Untersuchungen (Kapitel 5.3.1) auf einer Metall-spezifischen Wirkung des Komplexes basieren. Der Austausch von Zn^{2+} mit $\text{Au}^{3+/1+}$ in den Zinkfinger-Motiven der PARPs könnte folglich zu einer Inhibierung des Enzyms führen und somit den verringerten Ribosyladenosingehalt erklären.

Bei der Behandlung mit Aubenpy konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode eine konzentrationsabhängige jedoch moderate Inhibierung der H_2O_2 induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung festgestellt werden. Der freie Ligand zeigte unter Verwendung dieser Methode keinen Einfluss (Abbildung 27). Mittels LC-MS/MS-Methode, wurde jedoch bei den Inkubationen mit 0,5 μM und 2,5 μM Aubenpy bzw. Benpy ein vergleichbarer Rückgang des Ribosyladenosin-Gehaltes auf circa 90 % und 70 % der Kontrolle verzeichnet. Die Behandlungen mit 5 μM wiesen hingegen keinen Einfluss des Liganden Benpy auf, führten jedoch im Falle von Aubenpy zu einer Reduktion des Gehaltes auf 75 %. Aufgrund der hohen Standardabweichung wies die Reduktion des Ribosyladenosingehaltes jedoch bei diesen Behandlungen keine Signifikanz auf. Aufgrund der Zytotoxizitätsuntersuchungen des Substanzpaares Aubenpy/Benpy, wird nicht von einer Beeinflussung der PARP-Aktivität im Rahmen von Zelltodmechanismen in HeLa S3-Zellen ausgegangen (Kapitel 5.3.3). Zudem wurde wie auch im Falle von Auphen eine spezifische Inhibierung der PARP-1-Aktivität durch den Komplex Aubenpy beobachtet (Kapitel 5.3.1). Aufgrund dessen wird der verminderte Ribosyladenosingehalt bei der Behandlung mit 5 μM Aubenpy auf eine Inhibierung der PARP-Aktivität zurückgeführt, welche ebenfalls auf dem postulierten Mechanismus der Formierung von Golfingern basieren könnte.

Zusammenfassend konnte für die Komplexe Auphen, Aubenpy und den Liganden Phen eine Senkung der H_2O_2 -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenz- und LC-MS/MS-Methode nachgewiesen werden (Abbildung 27 und 28). Der Ligand Benpy wies im subzellulären als auch im zellulären Testsystem keinen Einfluss auf die PARP-Aktivität auf. Unter Berücksichtigung der subzellulären Untersuchung (Kapitel 5.3.1) konnte den Gold(III)-Komplexen eine spezifische Inhibierung der PARP-1-Aktivität nachgewiesen werden. Die Liganden zeigten dabei keinen Einfluss auf die PARP-1-Aktivität. Im Falle des Komplexes Aubenpy wird die Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen auf eine direkte Wechselwirkung des Gold-Komplexes mit der PARP zurückgeführt. Auch der Komplex Auphen scheint in dem subzellulären Testsystem, durch eine direkte Wechselwirkung mit der PARP-1, eine inhibitorische Wirkung ausüben zu

können. In HeLa S3-Zellen scheint jedoch auch der Ligand Phen auf diese Enzymaktivität Einfluss zu nehmen. Die Komplexierung weiterer Metalle durch Phen könnte dabei zu reaktiven Verbindungen führen und bei der Inhibierung des Enzyms eine Rolle spielen. Zudem könnte im Rahmen von Zelltodmechanismen eine Beeinflussung der PARP-Aktivität stattfinden. Diesbezüglich wurden weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung der zellulären Wirkmechanismen der Substanzen durchgeführt (Kapiteln 5.3.6 bis 5.3.9).

5.3.5 Einfluss auf die DNA-Bindung isolierter PARP-1

Die inhibierende Wirkung der Substanzen Auphen, Aubenpy und Phen auf die PARP-Aktivität wurde mit Hilfe der vorangegangenen Untersuchungen in HeLa S3-Zellen nachgewiesen. Für die Gold(III)-Komplexe wird dabei der Austausch von Zn^{2+} mit $\text{Au}^{1+/3+}$ in den Zinkfingern als zugrundeliegender Mechanismus der Inhibierung postuliert (Laskay *et al.* 2015, Wenzel *et al.* 2018). Dabei könnte eine Deformation der DNA-Bindungsdomäne zu einer verminderten Bindung des Enzyms an die DNA führen. Für den Liganden Phen wird aufgrund der Ergebnisse aus den Zellkulturuntersuchungen eine biologische Aktivierung des Liganden durch Komplexierung weiterer Metalle vermutet, welche ebenfalls die PARP-Aktivität beeinflussen könnten. Basierend auf dieser Annahme würde der Ligand in einem subzellulären Testsystem keinen Einfluss auf die PARP-1 aufweisen.

Um zu überprüfen, ob die Bindung isolierter PARP-1 nach Inkubation mit den Testsubstanzen beeinflusst ist, wurde ein elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay als weiteres subzelluläres Testsystem gewählt. Hierfür wurde die isolierte PARP-1 des in Kapitel 5.3.1 verwendeten Testsystems mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend die Bindung an eine biotinylierte doppelsträngige-DNA-Oligonukleotidsequenz (dsDNA-ON) untersucht. Eine repräsentative Darstellung einer Nylonmembran nach Blot ist in Abbildung 29 dargestellt.

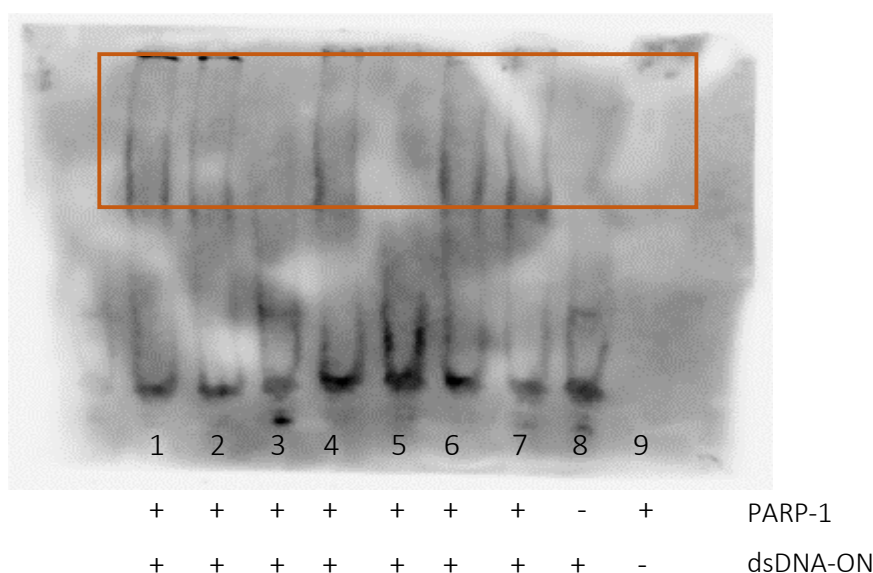


Abbildung 29: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf die Bindung von PARP-1 an doppelsträngige *forked*-DNA-Oligonukleotide. Die isolierte PARP-1 wurde für zehn Minuten mit 250 μM der Testsubstanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der dsDNA-Oligonukleotide (ON) und die elektrophoretische Auftrennung der Proben in einem 5 % Polyacrylamid-Gel. Auftragung: 1) Positivkontrolle, 2) DMSO, 3) Auphen, 4) Phen, 5) Aubenpy, 6) Benpy, 7) Positivkontrolle, 8) Kontrolle dsDNA-ON, 9) Kontrolle PARP-1. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung der dsDNA-ON (Abbildung 28, Auftragung 8) wies eine Bande mit leichtem Bandenschweif im unteren Bereich des Gels auf. Bei der Kontrollauftragung des Enzyms PARP-1 (Abbildung 29, Auftragung 9) wurde keine Bande detektiert. Nach Inkubation der dsDNA-ON mit PARP-1 (Positivkontrolle) konnte die Bildung des PARP-DNA-Komplexes durch den Bandenschweif in dem gekennzeichneten Bereich im Gel detektiert werden (Auftragung 1 und 7). Der PARP-DNA-Komplex wird dabei aufgrund der geringeren Mobilität gegenüber ungebundenen dsDNA-ON bei der elektrophoretischen Trennung im Gel retardiert, wodurch es zu der Schweifbildung kommt. Bei den Behandlungen der PARP-1 mit den Gold(III)-Komplexen Auphen und Aubenpy (Auftragung 3 und 5) war kein Bandenschweif zu erkennen, was auf eine verminderte Bildung des PARP-DNA-Komplexes schließen lässt. Die Behandlungen mit den entsprechenden Liganden hingegen wiesen in dem gekennzeichneten Bereich einen Schweif auf Höhe der Positivkontrolle auf und könnte auf das Vorliegen des PARP-DNA-Komplexes hindeuten.

Die Inkubationen der isolierten PARP-1 mit den Gold(III)-Komplexen und den dsDNA-ON wiesen eine veränderte elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu der unbehandelten PARP-1 und den dsDNA-ON der Positivkontrolle auf. Hingegen zeigten die Liganden in diesem Versuchsansatz, wie auch in dem Testsystem in Kapitel 5.3.1, keinen Einfluss auf die PARP-1. Für den Liganden Benpy bestätigte sich diese Annahme auch in den Zellkulturuntersuchungen. Eine biologische Aktivierung des Liganden Phen durch Komplexierung anderer Metalle unter Zellkulturbedingungen könnte wie bereits erwähnt zu der Diskrepanz der subzellulären und zellulären Untersuchungsergebnisse führen.

Mit Hilfe des elektrophoretischen Mobilitäts-Shiftassays konnten keine quantitativen Aussagen über die verminderte Bindung der PARP-1 an die dsDNA-ON nach Behandlung mit Auphen und Aubenpy getroffen werden. Die Ergebnisse bieten lediglich Anlass zur Annahme, dass es bei der Behandlung mit den Gold(III)-Komplexen Auphen und Aubenpy zu einer veränderten Bindung der PARP-1 kommt, worauf die Inhibierung basieren könnte.

In weiteren Studien über den Einfluss verschiedener Gold(I)-Komplexe auf die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B konnte eine verminderte Affinität nach Behandlung mit den Substanzen nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion der Au(I)-Ionen mit Cysteinresten in der DNA-Bindungsdomäne der Transkriptionsfaktoren scheint dabei in einer verminderten Bindungsaffinität zu resultieren (Handel *et al.* 1995, Yang *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1999).

5.3.6 Apoptotische/nekrotische Zellanteile und Zellzyklusphasenverteilung

Der programmierte Zelltod spielt eine fundamentale Rolle bei der biologischen Entwicklung eines Organismus und weist auch bei der Zellselektion zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität auf zellulärer Ebene eine essentielle Bedeutung auf. Die Initiierung der möglichen Signalwege kann sowohl extrinsisch über Todesrezeptoren als auch intrinsisch über apoptotische Stimuli, wie ein gesteigertes Level an ROS oder DNA-Schäden, erfolgen (zusammengefasst in Tait und Green 2012). Die Apoptose-induzierende Wirkung

einiger Metall-basierter Komplexe ist bekannt und wird im Falle von Cisplatin effektiv bei der Krebstherapie genutzt (zusammengefasst in Frezza et al. 2010).

Ob die beobachteten zytotoxischen Effekte von Auphen und Phen (Kapitel 5.3.3) auf einer Induktion der Apoptose basieren, wurde folgend mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 30). Die Aufrechterhaltung der Membranintegrität vitaler und apoptotischer Zellen sowie der Nachweis von Phosphatidylserin an der äußeren Plasmamembran apoptotischer Zellen bilden dabei die Grundlage der Differenzierung mittels PI/Annexin V-FITC Färbung dieser Zellpopulationen.

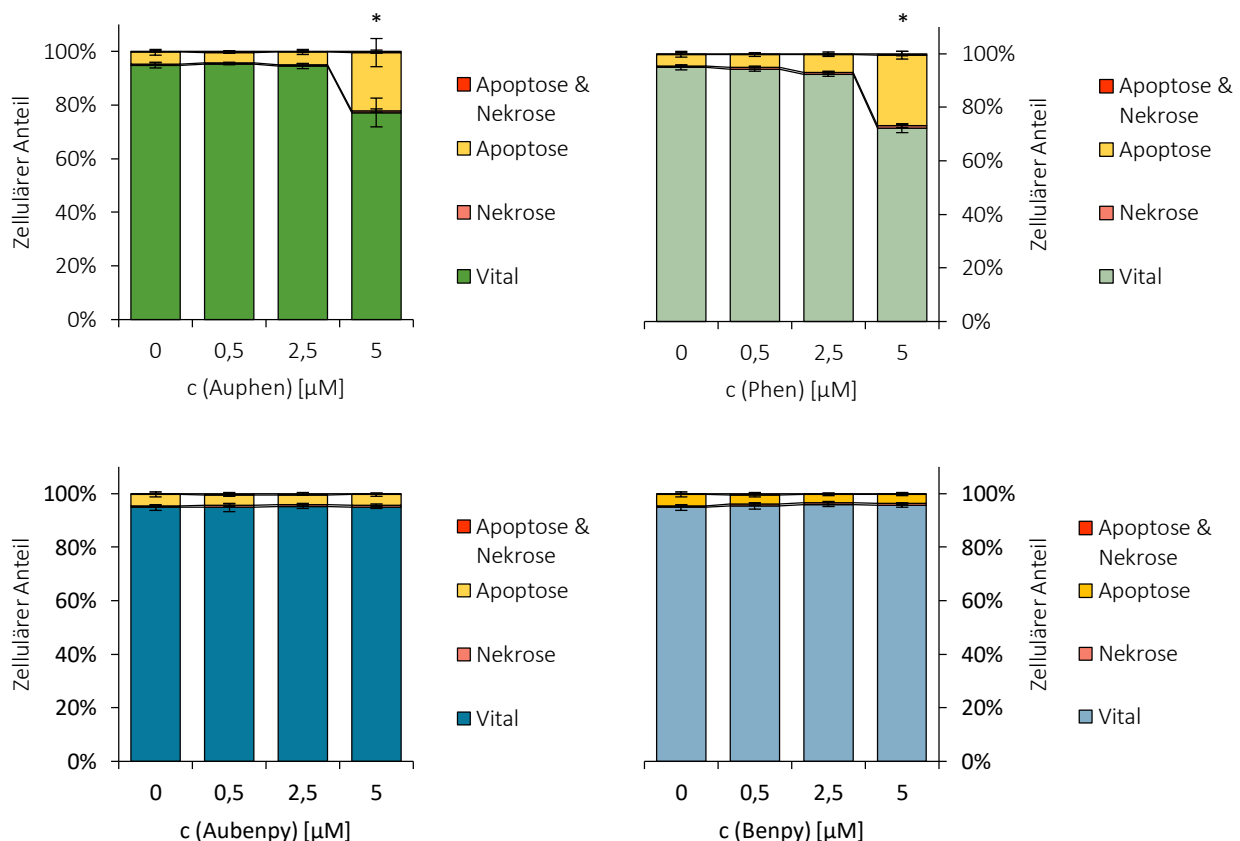


Abbildung 30: Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen nach 24-stündiger Inkubation von HeLa S3-Zellen mit Auphen, Phen Aubenpy bzw. Benpy . Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und die Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Hilfe einer Annexin V-FITC/PI Färbung am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten, aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (* $p \leq 0,05$).

Die unbehandelte Kontrolle wies einen Anteil von 95 % vitaler Zellen auf, einen Zellanteil von 4,3 % apoptotischer Zellen und < 1 % Nekrose sowie Apoptose/Nekrose positiver Zellanteile. Das Substanzpaar Auphen und Phen führte nach 24-stündiger Inkubation von HeLa S3-Zellen bei einer Konzentration von 5 μ M zu einem gesteigerten Anteil apoptotischer Zellen von circa 25 %. In Bezug auf die Kontrolle wurde dabei kein Anstieg des Anteils an nekrotischen bzw. spät apoptotischen Zellen in dem getesteten Konzentrationsbereich verzeichnet. Bei den Behandlungen mit Aubenpy und Benpy konnte kein Anstieg der Anteile apoptotischer oder nekrotischer Zellen nachgewiesen werden.

Durch den Nachweis apoptotischer Körper und einer gesteigerten Caspase 3-Aktivität in der humanen Lungenepithelzelllinie A549, führen Bostancioglu *et al.* (2012) die zytotoxische Wirkung des Gold(III)-Komplexes Auphen auf eine mitochondrial vermittelte Apoptose zurück und stützen die in Abbildung 30 dargestellten Untersuchungsergebnisse. Der Ligand Phen wurde bei dieser Studie nicht separat getestet. In den Untersuchungen weiterer Forschungsgruppen zeigte Phen jedoch eine Hemmung der Zellproliferation und der DNA-Synthese in verschiedenen Zelllinien (Byrnes *et al.* 1992, Deegan *et al.* 2007, Krishnamurti *et al.* 1980). Demgegenüber stehen weitere Untersuchungsergebnisse, aus welchen kein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung von humanen Leberkarzinomzellen mit Phen hervorgeht (Cai *et al.* 2007). Unter der Annahme, dass es wie von Laskay *et al.* (2015) und Wenzel *et al.* (2018) in Zell-freier Lösung gezeigt, unter Zellkulturbedingungen zu einer Freisetzung des Liganden Phen aus dem Komplex kommt, könnte die Chelatierung weiterer Metalle wie Kupfer zu reaktiven Verbindungen führen. Diese könnten für die beobachteten zytotoxischen Effekte verantwortlich sein. Diesbezüglich ist eine oxidative DNA-Spaltung durch Phen-Komplexe mit Kupfer bereits bekannt, welche zu einer Induktion der Apoptose führen könnte (zusammengefasst in Bencini und Lippolis 2010).

Die zytotoxischen Effekte, in Bezug auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit, lassen sich somit im Falle von Auphen und Phen auf eine Apoptose-Induktion zurückführen. Ein nekrotischer Zelltod scheint bei der Zytotoxizität der Substanzen in HeLa S3-Zellen nicht beteiligt zu sein. Demgegenüber konnte im Falle von Aubenpy und Benpy in dem getesteten Konzentrationsbereich keine Induktion der Apoptose oder Nekrose festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Untersuchungen in Kapitel 5.3.2 und 5.3.3 scheint im Vergleich zu Auphen von Aubenpy trotz vermehrter zellulärer Akkumulation ein geringeres zytotoxisches Potential auszugehen. Für das Substanzpaar Aubenpy und Benpy liegen nach bestem Wissen keine Daten zur Untersuchung der Apoptose aus der Literatur vor.

Da es im Rahmen der Metall-induzierten Stressantwort zu einer Beeinflussung regulatorischer Signalwege der Apoptose oder auch der Zellproliferation kommen kann, wurde anschließend der Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellzyklusphasenverteilung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

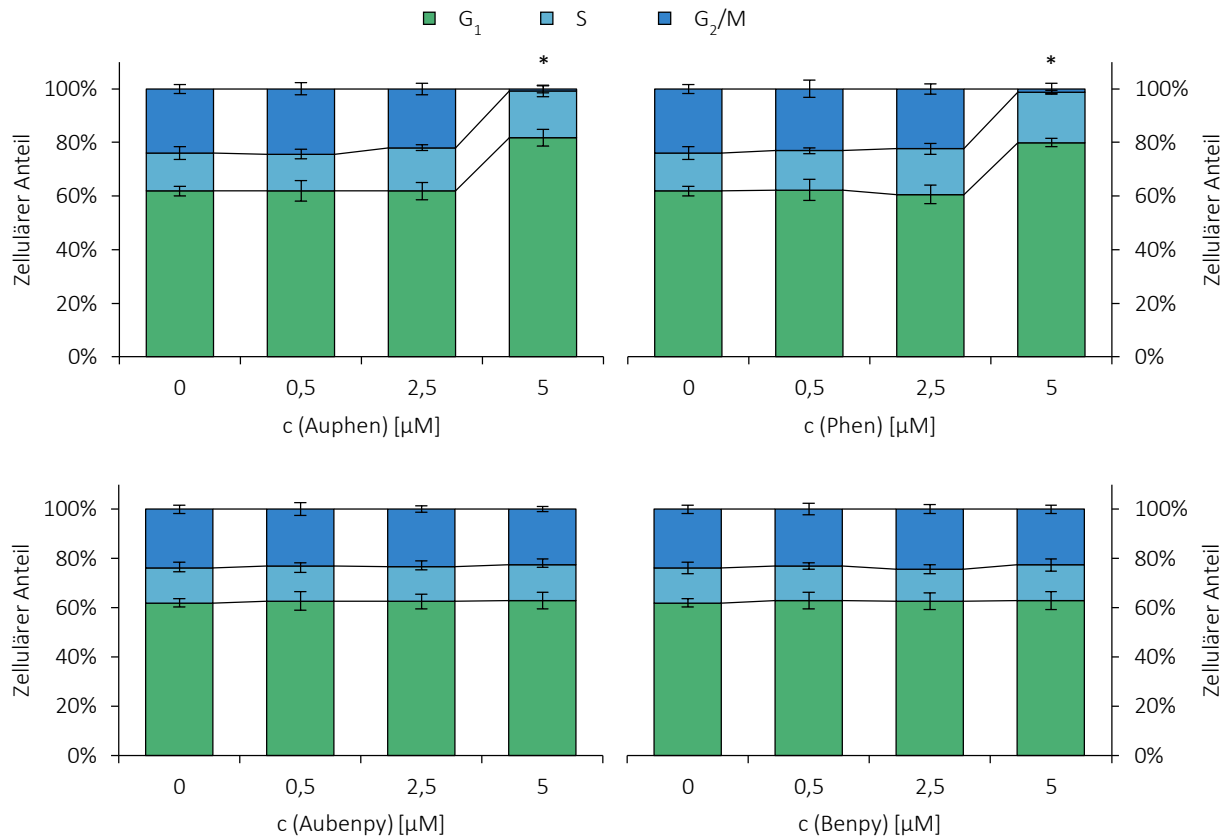


Abbildung 31: Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen bzw. Benpy. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und die Zellzyklusphasenverteilung nach DAPI-Färbung der DNA am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten, aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten, aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (* $p \leq 0,05$).

Die Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen teilte sich in unbehandelten HeLa S3-Zellen wie folgt auf: 60 % G₁-Phase, 15 % S-Phase und 25 % G_{2/M}-Phase. Nach 24-stündiger Behandlung mit Auphen bzw. Phen konnte ab einer Konzentration von 5 µM ein Anstieg des G₁-Phasenanteils auf 80 % verzeichnet werden. Der G_{2/M}-Phasenanteil sank dabei simultan von 24 % auf 1 %, wohingegen der S-Phasenanteil weitestgehend unbeeinflusst bei circa 15 % lag. Die Behandlungen mit dem Substanzpaar Aubenpy/Benpy wiesen in dem getesteten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung auf.

Die 24-stündige Behandlung mit 5 µM Auphen bzw. Phen führte in HeLa S3-Zellen zu einem G₁-Phasenarrest. In diesem Zusammenhang konnte bereits eine gesteigerte Aktivität von p53 durch einen Gold(III)-Porphyrin-Komplex sowie Phen und ein weiteres Phen-Derivat nachgewiesen werden, was die hier dargestellte Induktion des G₁-Phasenarrests stützt (Sun *et al.* 1997, Tu *et al.* 2009, Wang *et al.* 2016a). Im Rahmen der Metall-induzierten Stressantwort kommt dem Tumorsuppressorprotein p53, als zentrale Steuereinheit der Zellproliferation, eine wichtige Rolle zu. Im Zuge der p53-vermittelten Antwort kann über nachgeschaltete Proteine wie p21 ein G₁-Zellzyklusarrest ausgelöst werden oder bei zu starker zellulärer Schädigung die Induktion der proapoptotischen Gene *BAX* und *PUMA* eingeleitet werden. Die Regulation von

p53 findet dabei vorwiegend auf Proteinebene, durch eine stabilisierende Phosphorylierung statt (zusammengefasst in Phatak und Muller 2015). Da die beteiligten Proteine in der späten G₁-Phase auch eine tragende Rolle bei der Einleitung der Apoptose einnehmen, könnte der Arrest im Zuge eines frühen Status der Apoptose stattfinden. Wie in den vorherigen Untersuchungen zeigte sich auch hier ein vergleichbares Dosis-Wirkungsmuster der Behandlungen mit Auphen und Phen, was die Freisetzung des Liganden weiter vermuten lässt. Somit könnte der beobachtete G₁-Phasenarrest bei der Behandlung mit Auphen auf den Liganden zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch hier die Chelatbildung mit weiteren Metallen, die für die biologischen Effekte verantwortlich sein könnten. In diesem Zusammenhang wurde nach Behandlung mit einem Kupfer-Phen Komplex eine spezifisch in der G₁-Phase induzierte Apoptose in humanen Leberkarzinomzellen nachgewiesen (Zhou *et al.* 2002).

Zusammenfassend konnte ein gesteigerter Anteil apoptotischer Zellen nach Inkubation mit 5 μ M des Substanzpaares Auphen/Phen nachgewiesen werden. Der Zellzyklusarrest in der G₁-Phase könnte im Rahmen eines frühen Status der Apoptose induziert werden. Für Aubenpy und Benpy konnte in diesen Untersuchungen keine Induktion der Apoptose oder ein Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung festgestellt werden. Basierend auf Literaturdaten könnten die beobachteten Effekte auf p53-vermittelten Signalwegen im Zuge einer zellulären Stressantwort beruhen. Im Rahmen der p53-vermittelten Apoptose, könnte die Aktivierung von Caspasen zu einer Spaltung der PARP-1 und damit zu einer Inaktivierung des Enzyms führen. Hierdurch wären die zellulären Inhibierungsuntersuchungen beeinflusst. Um falsch positive Ergebnisse durch eine gesplattene PARP-1 ausschließen zu können, wurde die PARP-1 mittels Wester Blot-Analyse untersucht.

5.3.7 Untersuchung der Spaltung der PARP-1

Da es in den vorherigen Untersuchungen zu einer Apoptoseinduktion nach 24-stündiger Behandlung mit 5 μ M Auphen und Phen kam (Kapitel 5.3.6), wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht, ob es im Zuge der Apoptose zu einer Spaltung der PARP-1 kommt. Hierfür wurden die Proteinextrakte der 24-stündigen Behandlungen mit 5 μ M Auphen, Aubenpy, Benpy oder Phen mittels Western Blot-Analyse untersucht. In Abbildung 32 ist eine repräsentative Abbildung einer Membran dargestellt.

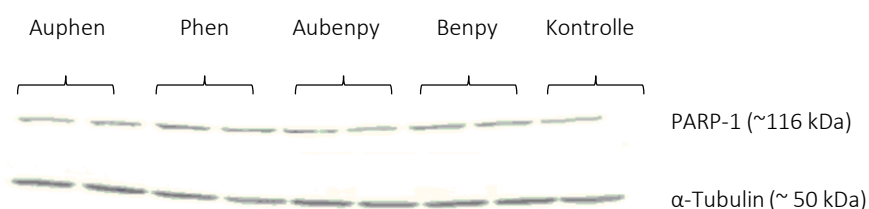


Abbildung 32: Western Blot-Analyse der PARP-1 in HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy. Die Zellen wurden für 24-Stunden mit 5 μ M der entsprechenden Substanzen inkubiert und anschließend eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Das Protein α -Tubulin (~50 kDa) diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung einer PVDF-Membran. Der Versuch wurde jeweils in Doppelbestimmung, in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Nach der Proteinuntersuchung mittels Western Blot konnte keine Spaltung der PARP-1 nach 24-stündiger Inkubation mit 5 μ M der Testsubstanzen nachgewiesen werden. Die Proteinbande der PARP-1 lag nach spezifischer Antikörperfärbung bei 116 kDa und entspricht der molaren Masse des PARP-1 Enzyms. Entsprechende C- und N-terminale Spaltfragmente der PARP-1 würden molare Massen von 89 und 24 kDa aufweisen und hätten ebenfalls mit dem hier verwendeten Antikörper detektiert werden können.

Obwohl keine Spaltung der PARP-1 nachgewiesen wurde, kann aufgrund der Apoptoseinduktion (Kapitel 5.3.6) durch Behandlung mit 5 μ M Auphen bzw. Phen eine Beeinflussung der PARP1-Aktivität durch Caspasen nicht vollständig ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang wurde von Bostancioglu *et al.* (2012) ein Anstieg der Caspase 3-Aktivität nach Inkubation mit Auphen beobachtet. Die Spaltung der PARP-1 durch Caspasen führt dabei direkt zu einer drastischen Abnahme der katalytischen Aktivität des Enzyms. Hierbei scheinen die N-terminalen Spaltfragmente zusätzlich eine inhibitorische Wirkung auf die katalytische Aktivität noch intakter PARP-1 auszuüben (D'Amours *et al.* 2001). So könnte es bereits vor einer mittels Western Blot detektierbaren Spaltung, im Rahmen einer Apoptoseinduktion, zu einer Beeinträchtigung der PARP-1-Aktivität kommen. Bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse der zellulären PARP-Inhibierung nach Behandlungen mit 5 μ M Auphen bzw. Phen wird dieser mögliche Mechanismus berücksichtigt. Da im Falle der Behandlungen mit Auphenpy und Benpy kein vermehrter Anteil apoptotischer Zellen erfasst wurde (Kapitel 5.3.6) und auch die Western Blot-Untersuchung keine gesplante PARP-1 zeigte (Abbildung 32), wird nicht von einer Beeinträchtigung der PARP-1-Aktivität im Zuge einer Apoptoseinduktion durch dieses Substanzpaar ausgegangen.

Eine Metall-induzierte Apoptose wird häufig mit oxidativem Stress assoziiert (zusammengefasst in Hartwig 2013, Lee *et al.* 2012, Leonard *et al.* 2004). Da die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies für eine Reihe von Gold-Verbindungen aus der Literatur bekannt ist (zusammengefasst in Bertrand *et al.* 2018), wurde überprüft, ob der Einfluss von Auphen und Phen auf einem gesteigerten ROS-Level in HeLa S3-Zellen basiert.

5.3.8 Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

Ein gesteigertes Level an reaktiven Sauerstoffspezies kann bspw. im Rahmen einer Fenton-ähnlichen Reaktion oder durch die Depletion von Glutathion und anderen zellulären Antioxidantien generiert werden und dadurch die Einleitung proapoptotischer Signaltransduktionsketten bewirken (zusammengefasst in Hartwig 2013, Redza-Dutordoir und Averill-Bates 2016, Pulido und Parrish 2003).

Die ROS-Induktion nach Behandlung mit den Substanzpaaren Auphen/Phen bzw. Auphenpy/Benpy, wurde mit Hilfe der redoxsensitiven Sonde CellROX®Green untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 33 dargestellt.

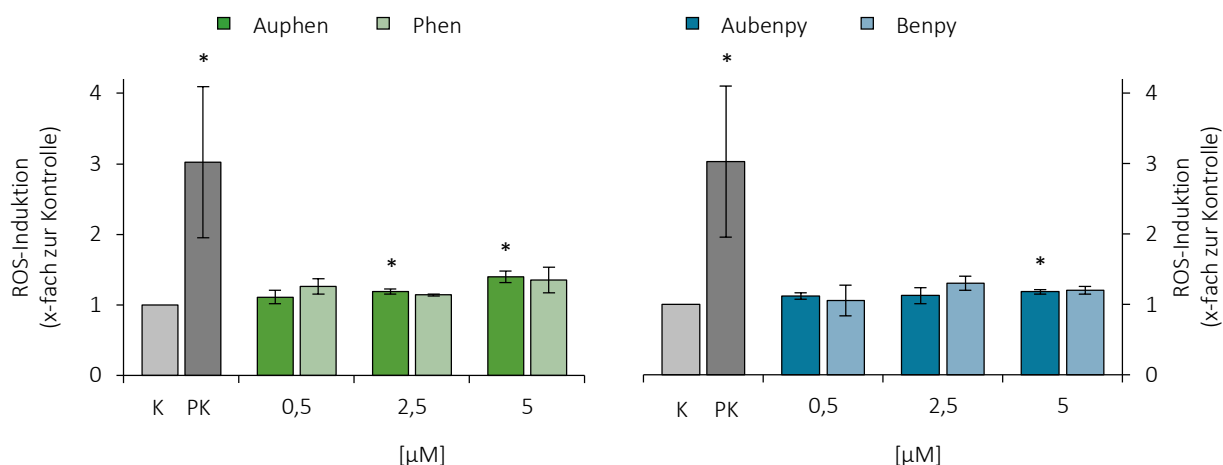


Abbildung 33: Bestimmung der ROS-Induktion in HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend die ROS-Induktion am Durchflusszytometer analysiert. Als Positivkontrolle für die Induktion von ROS diente eine einstündige Behandlung mit 400 µM TBHP. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit den Gold(III)-Komplexen $\pm$ SD und zwei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Liganden $\pm$ R/2, welche jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Die Inkubationen mit den Substanzen Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy zeigten im Rahmen der Untersuchung einen geringfügigen Trend der ROS-Induktion. Nach Behandlung mit 5 µM Auphen bzw. Phen wurde eine erhöhte ROS-Induktion um das 1,4-fache der Kontrolle erfasst. Das Substanzpaar Aubenpy/Benpy wies eine geringere Induktion um das 1,2-fache der Kontrolle auf.

Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies ist für eine Reihe von Gold(III)-Komplexen aus der Literatur bekannt. Hierbei scheinen weniger direkte als indirekte Mechanismen, wie die Inhibierung der Thioredoxinreduktase (TrxR), eine wichtige Rolle zu spielen (zusammengefasst in Bertrand *et al.* 2018). Zusammen mit Thioredoxin (Trx) nimmt die TrxR wichtige protektive Funktionen als Antioxidationsystem bei der zellulären Redoxregulation und der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionen ein. Das TrxR/Trx-System vermag dabei verschiedene Zielmoleküle zu reduzieren (zusammengefasst in Arnér und Holmgren 2000). Eine Dysfunktion bzw. Inhibierung des Enzyms kann somit zu oxidativem Stress führen (Lee *et al.* 2019). Aufgrund der hohen Affinität von Goldverbindungen gegenüber Thiol- und Selenolgruppen scheint das aktive Zentrum der TrxR, welches ein Selenocysteinrest aufweist, als Angriffspunkt der Inhibierung zu fungieren (Bindoli *et al.* 2009, zusammengefasst in Casini 2008).

Aufgrund der Ergebnisse der ROS-Induktion konnte eine oxidative Stresslage nicht eindeutig als Ursache der Apoptoseinduktion und des G₁-Phasenarrests nach Inkubation mit Auphen und Phen (Kapitel 5.3.6) identifiziert werden. Die Behandlungen mit Aubenpy und Benpy wiesen ebenfalls keine gesteigerte ROS-Induktion auf. Um genauere Erkenntnisse über die Wirkmechanismen der Komplexe und den Liganden zu gewinnen, wurde der Einfluss der Gold(III)-Komplexe und der entsprechenden Liganden auf transkriptioneller Ebene in HeLa S3-Zellen untersucht. Da die Behandlungen mit Auphen bzw. Phen in den vorangegangenen Untersuchungen vergleichbare Effekte in HeLa S3-Zellen zeigten (Kapitel 5.3.3 und 5.3.6),

wurde weiterführend untersucht, ob von den Komplexen ein Metall-spezifischer Einfluss ausgeht, unabhängig von den Liganden.

5.3.9 Genexpressionsanalyse

Für das Substanzpaar Auphen/Phen konnte auf funktioneller Ebene eine Apoptoseinduktion und ein G₁-Phasenarrest in HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 5.3.6). Die Beeinflussung des Zellzyklus und die Einleitung der Apoptose können über diverse zelluläre Signalwege vermittelt werden. Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen und zur Untersuchung Komplex-spezifischer Wirkungen, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 34 dargestellt.

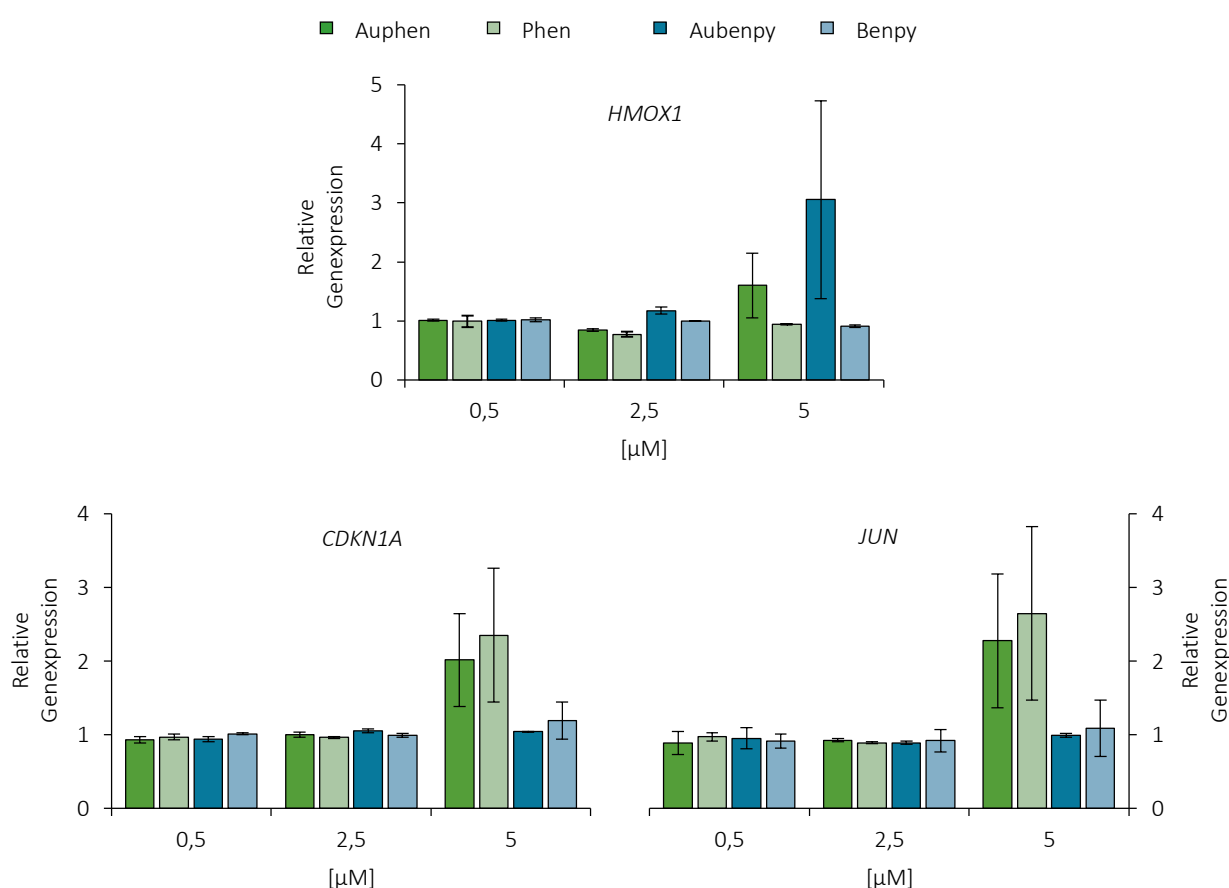


Abbildung 34: Einfluss von Auphen, Aupenpy, Phen und Benpy auf die Genexpression von *HMOX1*, *CDKN1A* und *JUN* in HeLa S3-Zellen. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Abgebildet sind die Gene mit relevanter Expressionsänderung (*CDKN1A*, *JUN*, *HMOX1*). Die Behandlungen wurden auf eine DMSO-Kontrolle bezogen, deren Expressionswert auf 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Werten aus zwei unabhängigen Versuchen ± Range/2.

Im Rahmen der Genexpressionsuntersuchungen zeigten lediglich drei Gene eine relevante Änderung der Transkriptmenge nach Behandlung mit den Gold(III)-Komplexen und den Liganden an. Im Rahmen der Gene der oxidativen Stressantwort zeigte sich eine Metall-spezifische Induktion der *HMOX1* durch Behandlung mit den Komplexen Auphen und Aupenpy, wohingegen die Liganden Phen und Benpy zu keiner veränderten Transkriptmenge in HeLa S3-Zellen führten. Das Gencluster der Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Gene

wies nach Inkubation mit Auphen bzw. Phen eine Induktion von *CDKN1A* und *JUN* auf. Das Substanzpaar Aupenpy/Benpy zeigte hier keinen Einfluss.

Die Transkriptmenge der *HMOX1* stieg nach Behandlung mit 5 μ M Auphen bzw. Aupenpy auf das 1,6- bzw. 3-fache der Kontrolle an, wohingegen die Liganden Phen und Benpy nicht zu einer veränderten Genexpression führten. Die gesteigerte Induktion der *HMOX1* durch Aupenpy könnte auf der vermehrten Goldakkumulation in HeLa S3-Zellen beruhen (Kapitel 5.3.2). Wie bereits in Kapitel 5.2.5 erwähnt, wird die Hämoxygenase-1 auf transkriptioneller Ebene u.a. von AP-1, Nrf2 und NF- κ B reguliert und gilt als Biomarker einer zellulären Stressantwort. Obwohl es nach Behandlung mit Auphen nicht zu einer relevanten Änderung der Genexpression kam, wird die Induktion der *HMOX1* auf einen spezifisch durch die Komplexe Auphen und Aupenpy vermittelten Effekt zurückgeführt. Somit scheinen die Gold(III)-Komplexe, unabhängig vom entsprechenden Liganden, Signalwege einer oxidativen Stressantwort in HeLa S3-Zellen beeinflussen zu können. Unter Berücksichtigung der gesteigerten Transkriptmenge von *JUN* nach Behandlung mit Auphen und Phen könnte die Induktion der *HMOX1* im Falle von Auphen und Phen auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zurückgeführt werden. Eine Beteiligung des Proteins c-Jun, als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Induktion der *HMOX1*, wurde bereits in Muskelzellen der Aorta von Ratten gezeigt (Wiesel *et al.* 2000). Eine gesteigerte Transkriptmenge der *HMOX1* wurde in Zellkulturuntersuchungen weiterer Arbeitsgruppen nach Behandlung mit verschiedenen Gold(I)-Verbindungen beobachtet. Die Induktion der *HMOX1* wird dabei als Kompensationseffekt der Inhibierung der TrxR durch Gold(I) betrachtet und auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zurückgeführt (Kataoka *et al.* 2001, Mostert *et al.* 2003). In Anbetracht der vermuteten Freisetzung des Liganden Phen aus Auphen und der Reduktion von Au^{3+} zu Au^{1+} könnte der erwähnte Mechanismus auch auf den Gold(III)-Komplex Auphen übertragbar sein. Verschiedene Gold(I)- und (III)-Verbindungen scheinen darüber hinaus durch die Beeinflussung der DNA-Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren einen Effekt auf das Genexpressionsprofil ausüben zu können. So konnte eine verringerte DNA-Bindungsaffinität von NF- κ B und AP-1 unter dem Einfluss verschiedener Goldverbindungen festgestellt werden, welche auf die hohe Thiolaffinität von Gold zurückgeführt wird (Handel *et al.* 1995, Yang *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1999). Da die Expression des Gens *HMOX1* von mehreren Transkriptionsfaktoren reguliert wird, ist eine Inhibierung der DNA-Bindung entsprechend regulierender Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 nicht auszuschließen.

Nach Inkubation mit 5 μ M Auphen bzw. Phen stieg die Transkriptmenge des Gens *CDKN1A* auf das Doppelte an. Geringere Konzentrationen des Substanzpaares zeigten keinen Einfluss. Das Gen *CDKN1A* codiert für das Inhibitorprotein p21, welches die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) 2 und 4 während des Zellzyklus beeinflussen und so zu einem G₁-Phasenarrest führen kann. Die Expression dieses Gens wird über das Tumorsuppressorprotein p53 im Rahmen der zellulären Stressantwort reguliert (zusammengefasst in Pietenpol und Stewart 2002). Die Induktion von *CDKN1A* stützt demnach die Ergebnisse

der Zellzyklusuntersuchungen nach Behandlung mit den Testsubstanzen (Kapitel 5.3.6). Dabei konnte nach Behandlung mit Auphen bzw. Phen ein G₁-Phasenarrest in HeLa S3-Zellen festgestellt werden. Nach der Behandlung mit Aubenpy und Benpy wurde hingegen kein Einfluss auf die Zellzyklusverteilung und die Genexpression von *CDKN1A* in HeLa S3-Zellen verzeichnet. Die Genexpressionsdaten werden von weiteren Forschungsergebnissen gestützt, wonach für einen Gold(III)-Porphyrin-Komplex und einen Cobalt(II)-Komplex mit Phen-Derivat Liganden ebenfalls eine Induktion von *CDKN1A* nachgewiesen und mit einer Apoptoseinduktion assoziiert wurde (Luís *et al.* 2014, Lum *et al.* 2013).

Ab einer Konzentration von 5 µM führten die Behandlungen mit Auphen bzw. Phen zu einer Induktion des Gens *JUN* um das 2,3- und 2,6-fache. Bei der Inkubation mit Aubenpy bzw. Benpy wurde hingegen keine veränderte Transkription dieses Gens beobachtet. Das Gen *JUN*, kodierend für die c-Jun Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1 (*activating protein 1*) und kann durch eine Reihe von Stimuli, u.a. oxidativer Stress, induziert werden (Abate *et al.* 1990). AP-1 basiert auf einer variablen Dimerisierung verschiedener Jun-Proteine mit weiteren Proteinen wie Fos oder ATF (*activating transcription factor*). Die Zusammensetzung der Dimere bestimmt dabei über die Aktivierung von AP-1 und damit die Regulation der Zielgene. Hierrüber können u.a. verschiedene Gene der Zellproliferation und Apoptose reguliert werden. Aufgrund der steigernden Wirkung auf die Zellproliferation wird c-Jun als Protoonkogen bezeichnet (zusammengefasst in Kappelmann *et al.* 2014). Jedoch scheint von c-Jun auch eine proapoptotische Wirkung ausgehen zu können. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine verlängerte Expressionszeit von *JUN* zu einer Hemmung von p21 führt, wodurch die p53-vermittelte Apoptose begünstigt wird (Shaulian *et al.* 2000). Eine Induktion der Apoptose wurde auch bei einer Überexpression von c-Jun in Fibroblasten von Mäuseembryonen nachgewiesen (Bossy-Wetzel *et al.* 1997). Die gesteigerte Expression von *JUN* nach Behandlung mit Auphen bzw. Phen könnte somit folglich zu der in Kapitel 5.3.6 dargestellten Apoptoseinduktion führen und wie bereits erwähnt auf die Aktivierung von AP-1 auf transkriptioneller Ebene hindeuten.

Zusammenfassend konnte für Auphen und Phen ab einer Konzentration von 5 µM eine Induktion der Gene *CDKN1A* und *JUN* festgestellt werden. Die entsprechenden Genprodukte nehmen dabei regulatorische Funktionen im Rahmen der Signalwege der Apoptose und Zellproliferation ein. Durch das von *CDKN1A* codierte Protein p21, kann im Rahmen einer zellulären Stressantwort eine Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase eingeleitet werden. Die Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchungen (Kapitel 5.3.4) bestätigen diesen Befund auf funktioneller Ebene, durch einen Anstieg des G₁-Phasenanteils nach Inkubation mit 5 µM Auphen bzw. Phen. Die Behandlungen mit Aubenpy bzw. Benpy wiesen keine relevante Änderung der Transkriptmenge der Gene *CDKN1A* und *JUN* auf. Die gesteigerte Expression von *JUN* deutet auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 hin. Als Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1 kann c-Jun (codiert von *JUN*) proliferationssteigernd wirken (zusammengefasst in Kappelmann *et al.* 2014). Eine verlängerte Genexpressionszeit von *JUN* kann

jedoch durch die Inhibierung von p21 proapoptotisch wirken (Shaulian *et al.* 2000). Ferner wurde eine Metall-spezifische Induktion des Gens *HMOX1* nach Inkubation mit den Gold(III)-Komplexen Auphen und Aubenpy nachgewiesen. Der Effekt fiel dabei für den Komplex Aubenpy deutlicher aus und könnte auf die gesteigerte zelluläre Goldakkumulation zurückgeführt werden (Kapitel 5.3.2). Aufgrund der u.a. durch AP-1 kontrollierten Regulation von *HMOX1*, wird die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors angenommen. Die entsprechenden Liganden führten dabei nicht zu einer veränderten Transkriptmenge. Somit scheint in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit den Gold(III)-Komplexen Auphen und Aubenpy eine spezifische Stressantwort abzulaufen, die auf das komplexierte Gold zurückgeführt wird.

6 Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit zwei unterschiedlichen Aspekten zellulärer Effekte goldhaltiger Verbindungen. Der erste Teil konzentrierte sich dabei auf Gold-basierte Nanopartikel (Au NP) und deren biologische Effekte in Abhängigkeit von den oberflächengebundenen Stabilisierungsagenzien Citrat (Cit) und Polyvinylpyrrolidon (Pvp). Hierfür wurde zunächst eine Synthese zur reproduzierbaren Herstellung von sphärischen und 15 nm großen Cit-Au NP etabliert, welche im Anschluss mit verschiedenen physikalisch-chemischen Verfahren charakterisiert wurden. Die quantitative Auswertung der TEM-Aufnahmen ergab dabei einen mittleren Partikeldurchmesser von $14,6 \pm 1,4$ nm der Cit-Au NP in der nativen Partikelsuspension. Aufgrund der schmal verlaufenden Partikelverteilung konnte von einer weitestgehend homogenen Partikelgröße der sphärischen und facettenarmen Cit-Au NP ausgegangen werden. Die Suspendierung in DMEM mit 10 % FKS hatte auf die primäre Partikelgröße keine Auswirkung. Als Referenzpartikel für die Zellkulturuntersuchungen wurden größenvergleichbare, mit Polyvinylpyrrolidon sterisch stabilisierte Au NP gewählt (laut TEM-Angaben des Herstellers: $12,6 \pm 1,4$ nm). Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurden die nativen Cit- und Pvp-Au NP Suspensionen und Partikelsuspensionen der Konzentrationen 5, 20, und 50 $\mu\text{g/mL}$ in DMEM mit 10 % FKS untersucht. Für die native Suspension der Cit-Au NP ergab sich daraus ein hydrodynamischer Durchmesser (D_h) von $17,8 \pm 1,8$ nm, mit einem Zetapotential (ZP) von $-36,2 \pm 1,5$ mV. Die Pvp-Au NP wiesen einen D_h von $33,0 \pm 1,7$ nm mit einem ZP von $21,1 \pm 2,9$ auf. Die Größenunterschiede der hydrodynamischen Durchmesser der Au NP wurden auf die unterschiedlichen Stabilisatoren zurückgeführt. Das Stabilisierungsreagenz Citrat ist dabei nur schwach an der Partikeloberfläche gebunden und verleiht den Partikeln eine negative Ladung. Diese spiegelte sich in dem negativen ZP wider, wodurch die Cit-Au NP in wässriger Lösung elektrostatisch stabilisiert wurden. Polyvinylpyrrolidon hingegen stellt ein großes neutrales Polymer dar, welches durch die Assoziation an der Partikeloberfläche für eine sterische Stabilisierung der Au NP sorgt. Durch Suspendierung der Au NP in DMEM mit 10 % FKS stieg der D_h im Falle der Pvp-Au NP nur leicht auf circa 38 nm an. Demgegenüber verdoppelte sich der D_h der Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS, wobei eine Abnahme des D_h mit steigender Konzentration zu beobachten war. Der Zusatz von Proteinen oder Seren wie fetalem Kälberserum in Nährmedien führt zur Formierung einer sogenannten Proteinkorona, die den Anstieg des D_h der Au NP in DMEM mit 10 % FKS verursacht (Maiorano *et al.* 2010, Sabella *et al.* 2011). Grundsätzlich deuteten die Untersuchungsergebnisse mittels dynamischer Lichtstreuung auf eine instabilere Suspension der Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS hin und wird auf die schwache Oberflächenbindung von Citrat zurückgeführt. Dabei kann es schnell zu Ligandenaustauschreaktionen mit Proteinen oder anderen Liganden kommen, wohingegen mit Pvp-stabilisierte Au NP in einer Vielfalt an Lösungsmitteln eine stabile Oberflächenzusammensetzung aufweisen (Dinkel *et al.* 2016, Zhang *et al.* 1996).

Die zelluläre Freisetzung von Ionen aus Metall-basierten NP durch die lysosomale Ansäuerung (pH 4,5) ist unter dem Synonym des *trojan horse type* Mechanismus aus der Literatur bekannt und führt nachweislich zu einer gesteigerten Toxizität der NP (Brunner *et al.* 2006, Handel *et al.* 1995, Studer *et al.* 2010). Dieser Mechanismus wurde von Sabella *et al.* (2014) auch für Au NP postuliert. In diesem Zusammenhang wurde in Löslichkeitsuntersuchungen der lösliche Anteil der Au NP in DMEM mit 10 % FKS, Phosphat-gepufferter Salzlösung und künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (pH 4,5) bestimmt. Dabei konnten auch nach 7 Tagen keine gelösten Ionen aus den Cit- und Pvp-Au NP nachgewiesen werden, weshalb die Partikel bezüglich ihrer Löslichkeit als biobeständig betrachtet werden. Die Diskrepanz zu den Untersuchungsergebnissen der Forschungsgruppe um Sabella geht dabei möglicherweise auf die unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen der Au NP zurück.

In Zellkultur-basierten Experimenten wurde anschließend die Zytotoxizität der Cit- und Pvp-Au NP sowie der löslichen Verbindung AuCl_3 nach 24-stündiger Inkubation in HeLa S3-Zellen untersucht und miteinander verglichen. Die lösliche Goldverbindung AuCl_3 diente in den Zellkulturuntersuchungen als Vergleichssubstanz zur Unterscheidung der Partikel- bzw. Ionen-vermittelten Effekten. Als Parameter für eine akut toxische und subchronische Wirkung wurden die Zellzahl, die Koloniebildungsfähigkeit und der zelluläre ATP-Gehalt als Kriterien für die Zytotoxizität herangezogen. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich dabei an weiteren Zellkulturuntersuchungen zum Einsatz spezifischer Au NP in der photothermischen Tumorthherapie (Sotiriou *et al.* 2014). Die Pvp-Au NP wiesen bei Konzentrationen von bis zu 50 $\mu\text{g/mL}$ keinen Einfluss auf die genannten Parameter auf. Auch nach den Behandlungen mit Cit-Au NP zeigte sich lediglich eine moderate ATP-Depletion in HeLa S3-Zellen. Aufgrund der biobeständigen Eigenschaften der Partikel, kann dieser Einfluss auf Oberflächen-vermittelte Effekte zurückgeführt werden. Nach Inkubationen äquivalenter Konzentrationen von AuCl_3 , konnte hingegen ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die untersuchten Parameter verzeichnet werden. Die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit wurden bei der höchsten getesteten Konzentration von 254 μM AuCl_3 auf circa 65 % herabgesenkt. Der zelluläre ATP-Gehalt reduzierte sich dabei um die Hälfte. Im Vergleich zu der partikulären Form scheint von den reaktiven Metallionen aus AuCl_3 ein gesteigertes zytotoxisches Potential auszugehen.

In der Literatur wird die toxische Wirkung von Au NP kontrovers diskutiert. Während einige Forschungsgruppen keine akut toxische Wirkung ausgehend von Cit- und Pvp-Au NP in zellulären Testsystemen nachweisen konnten (Aueviriyavit *et al.* 2014, Connor *et al.* 2005, Dragoni *et al.* 2012, Ponti *et al.* 2009), lieferten weitere Studien Ergebnisse, aus denen eine verminderte Zellviabilität und -vitalität nach Inkubation mit Au NP hervorgeht (Bajak *et al.* 2015, Choi *et al.* 2012, Coradeghini *et al.* 2013, Pan *et al.* 2007). Die Effekte wurden dabei sowohl auf die Größe und Oberflächenmodifikation der Au NP als auch auf die verwendeten Zelllinien zurückgeführt. Aufgrund der Unterschiede der verwendeten Au NP, Zelllinien sowie der Versuchsparameter im Rahmen der Studien, sind endgültige Aussagen über die Zytotoxizität von Au NP nur schwer möglich.

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Zytotoxizität der löslichen Verbindung AuCl_3 im Vergleich zu den Au NP auf einer unterschiedlichen zellulären Akkumulation der Substanz beruht, wurden Aufnahmeuntersuchungen in HeLa S3-Zellen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Internalisierung der Au NP mit Hilfe mikroskopischer Aufnahmen untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation mit $50 \mu\text{g/mL}$ konnten die Cit- bzw. Pvp-Au NP agglomeriert in den Lysosomen von HeLa S3-Zellen lokalisiert werden. Dies lässt die Aufnahme über Endozytosemechanismen, wie bereits von Ng *et al.* (2012) und Wang *et al.* (2015) gezeigt, vermuten. Zudem wurden bei der optischen Auswertung keine Au NP im Zellkern nachgewiesen. Im Rahmen von konzentrations- und zeitabhängigen Aufnahmeuntersuchungen der Cit-, Pvp-Au NP und AuCl_3 wurde anschließend der zelluläre Goldgehalt nach Inkubation äquivalenter Konzentrationen der Au NP und AuCl_3 mit Hilfe der GF-AAS bestimmt. Um nur die internalisierten Partikel zu erfassen und eine Überbestimmung durch membranhaftende Partikel weitestgehend zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Aufarbeitung mit einer Ätzlösung aus Jod/Kaliumiodid behandelt (Cho *et al.* 2009). Für die Cit-Au NP und Pvp-Au NP ergab sich im Rahmen der quantitativen Aufnahmeuntersuchungen eine ausgeprägte zeit- und konzentrationsabhängige Akkumulation in HeLa S3-Zellen. Hierbei zeigte sich eine gesteigerte Aufnahme der Cit-Au NP gegenüber den Pvp-Au NP, die ebenfalls von der Forschungsgruppe um Mohamed (2017) beschrieben wurde. Einen möglichen Grund hierfür stellt die stärkere Stabilisierung von Au NP durch Polyvinylpyrrolidon im Vergleich zu Citrat dar, wodurch es zu einer verminderten Sedimentation kommen könnte. In den submersen Versuchsansätzen würde es dadurch zu einer geringeren Partikel-Zell-Interaktion und so zu einer geringeren Aufnahme kommen. Für die lösliche Referenzsubstanz AuCl_3 zeigte sich ein stark von den Partikeln abweichendes Aufnahmemuster. Der Membrantransport schien in den ersten vier Stunden ab Konzentrationen von $102 \mu\text{M}$ weitestgehend ausgelastet zu sein. Zwischen der ein- und vierstündigen Behandlung stieg der zelluläre Goldgehalt dabei nur geringfügig. Ab $254 \mu\text{M}$ AuCl_3 wurden zu diesen Inkubationszeitpunkten geringere zelluläre Gehalte erfasst, was mit einer einsetzenden zytotoxischen Wirkung von AuCl_3 zusammenhängen könnte. Nach 24-stündiger Inkubation wurden wie bei den Behandlungen mit $50 \mu\text{g/mL}$ Au NP zelluläre Goldgehalte im millimolaren Bereich erfasst. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung der 24-stündigen Behandlung mit $254 \mu\text{M}$ könnte ein gestörter zellulärer Stoffwechsel zu der massiven Goldakkumulation führen. Der Mechanismus der zellulären Aufnahme der löslichen Referenzsubstanz AuCl_3 ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, ATP-abhängige Effluxpumpen scheinen jedoch bei dem Membrantransport von Gold(III)-Verbindungen eine Rolle spielen zu können (Spreckelmeyer *et al.* 2018). Obwohl die 24-stündigen Behandlungen mit den Au NP und AuCl_3 zu einer vergleichbaren zellulären Goldakkumulation im millimolaren Bereich führte, geht von der wasserlöslichen Verbindung AuCl_3 ein gesteigertes zytotoxisches Potential aus.

Da oxidativer Stress maßgeblich zu den toxischen Eigenschaften einer Reihe von Metall-basierten Komponenten beiträgt, wurde die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in HeLa S3-Zellen unter Verwendung einer redoxsensitiven Fluoreszenzsonde nach Behandlung mit Cit- und Pvp-Au NP sowie AuCl_3

untersucht. Bezogen auf die Kontrolle kam es im Falle von AuCl_3 zu einer Verdopplung des ROS-Levels in HeLa S3-Zellen, wohingegen die Behandlungen mit den biobeständigen Cit- bzw. Pvp-Au NP keinen Einfluss zeigten. Bezüglich der AuCl_3 Behandlung sind aufgrund der Redoxaktivität und der Thiolaffinität der Metallionen direkte und indirekte Mechanismen bei der ROS-Generierung denkbar (zusammengefasst in Bertrand *et al.* 2018, Takahashi *et al.* 1994). Die Literaturdaten in Bezug auf die Induktion von oxidativem Stress durch Au NP erscheinen widersprüchlich. Während einige Studien einen deutlichen Anstieg des zellulären ROS-Levels verzeichneten und die Induktion von oxidativem Stress als primären Mechanismus der Toxizität von Au NP postulieren (Li *et al.* 2010, Mateo *et al.* 2014, Pan *et al.* 2009, Sabella *et al.* 2011), konnte die Forschungsgruppe um Aueviriyavit (2014) keine oxidative Stresslage in Caco-2 Zellen nachweisen.

Zur weiteren Aufklärung der beteiligten zellulären Prozesse im Rahmen der zytotoxischen Wirkung von AuCl_3 wurden nachfolgend Genexpressionsanalysen mit Hilfe einer Hochdurchsatz RT-qPCR Methode durchgeführt. Für eine bessere Einschätzung der durch Partikel bzw. Ionen vermittelten Effekte wurden dabei Behandlungen mit Cit-Au NP bzw. äquivalenten Konzentrationen von AuCl_3 untersucht und miteinander verglichen. Mit dem verwendeten Primerset wurden dabei 95 Gene, welche im Zusammenhang mit zellulären Prozessen wie der oxidativen Stressantwort, der Metallhomöostase, des Zellzyklus und der Apoptose, der DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie des Fremdstoffmetabolismus stehen, untersucht. Eine Verdopplung bzw. Halbierung der Transkriptmenge wurde dabei als relevante Änderung betrachtet. Nach 24-stündiger Inkubation mit Konzentrationen von 5-50 $\mu\text{g/mL}$ konnte für die Cit-Au NP trotz hoher zellulärer Akkumulation kein relevanter Einfluss auf die Expression der mittels HT RT-qPCR untersuchten Gene in HeLa S3-Zellen festgestellt werden. Bei den Behandlungen mit AuCl_3 zeigten jedoch 12 Gene eine relevante Änderung der Transkriptmengen an. Die am deutlichsten hochregulierten Gene standen im Zusammenhang mit der oxidativen Stressantwort und dem Fremdstoffmetabolismus. Die Transkriptmenge des Gens *HMOX1* (Hämoxygenase 1) stieg bei der Behandlung mit AuCl_3 deutlich bis auf das 65-fache der Kontrolle an und verdeutlichte weiter das Potential dieser Metallverbindung zur Induktion von oxidativem Stress. Ferner kam es zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der Gene *FTH1* (ferritin heavy polypeptide 1) und *GCLC*, wohingegen die Expression des Gens *SEPP1* (Selenoprotein P) nach Inkubation mit AuCl_3 reprimiert wurde. Die genannten Gene stehen alle u.a. unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 bzw. haben im Falle des Genproduktes von *Sepp1* eine regulatorische Funktion auf dessen Aktivierung. Als redoxsensitiver Transkriptionsfaktor reguliert Nrf2 eine Reihe von Genen im Zuge der oxidativen Stressantwort (Yueh und Tukey 2007). Aufgrund der Induktion der durch Nrf2 regulierten Gene, wird eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch die gesteigerte Generierung von ROS bei der Behandlung von HeLa S3-Zellen mit AuCl_3 postuliert. Gestützt wird diese Annahme durch die Studie von Simmons *et al.* (2011), aus der ebenfalls eine Aktivierung von Nrf2 nach Inkubation mit Gold(I)-chlorid hervorgeht. Die Induktion von redoxregulierten Genen nach zellulärer Behandlung mit Au NP wurde von einer Reihe von Forschungsgruppen bereits nachgewiesen (Bajak *et al.* 2015,

Chandran *et al.* 2017, Pan *et al.* 2009), konnte jedoch durch die Genexpressionsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Durch die Behandlung mit AuCl_3 wurde ferner die Expression der Gene *DDIT3* und *GADD45A*, welche im Rahmen der DNA-Schadensantwort reguliert werden, beeinflusst. Der Anstieg der Transkriptmengen dieser Gene könnte dabei auf ein genotoxisches Potential von AuCl_3 hindeuten. Auch die Apoptose-regulierenden Gene *NFKB2*, *PLK3* und *VEGFA* zeigten unter Einfluss von AuCl_3 einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Transkriptmengen. Die Expression von *NFKB2* ist dabei durch das codierte Protein NF- κ B selbstreguliert (Liptay *et al.* 1994). Aufgrund der ROS-Induktion durch AuCl_3 wird eine redoxabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B angenommen, wodurch es aufgrund der Selbstregulation zu einer gesteigerten Expression von *NFKB2* kommt. Auch das Gen *PLK3* wird als Folge von oxidativem Stress auf Transkriptionsebene reguliert. Der codierten Serin/Threonin Kinase kommen dabei wichtige Funktionen bei der Zellzyklusregulation zu (zusammengefasst in Pagès und Pouysségur 2005). Die Genregulation durch NF- κ B begründet dabei die simultane Induktion von *VEGFA*, welches für einen Wachstumsfaktor der VEGF-Familie codiert (zusammengefasst in Ng *et al.* 2006). Aufgrund der Induktion der Apoptose-regulierenden Gene ist ein über Apoptose vermittelter Zelltod im Rahmen der zytotoxischen Wirkung wahrscheinlich und wurde für weitere Gold(III)-Verbindungen bereits nachgewiesen (Bostancioglu *et al.* 2012, Che *et al.* 2003). Bezüglich der Gene des Fremdstoffmetabolismus zeigten *CYP1A1*, *NQO1* und *UGT1A* einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Transkriptmenge nach Inkubation mit AuCl_3 . Die Regulation der Genexpression findet auf transkriptioneller Ebene im Falle von *CYP1A1* und *UGT1* über den Ah-Rezeptor statt, wohingegen *NQO1* von Nrf2 kontrolliert wird. Die Induktion von *NQO1* stützt damit weiter die These der Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Durch eine funktionelle Interaktion des Ah-Rezeptors und Nrf2 konnten weitere Forschungsgruppen einen *crosstalk* dieser Transkriptionsfaktoren nachweisen (Kalthoff *et al.* 2010). Eine Überschneidung der transkriptionellen Regulation von Genen des Fremdstoffmetabolismus und der oxidativen Stressantwort wären in diesem Zusammenhang denkbar und könnte die Induktion der Gene *CYP1A1* und *UGT1* erklären.

Basierend auf den dargestellten Untersuchungen scheint von den „freien“ Goldionen aus AuCl_3 im Vergleich zu den unlöslichen Cit-Au NP und Pvp-Au NP ein deutlich gesteigertes toxisches Potential auszugehen. Obwohl die 24-stündigen Behandlungen mit äquivalenten Konzentrationen von Cit-Au NP bzw. AuCl_3 in einer massiven Goldakkumulation resultierten, wurden in den Zellkulturuntersuchungen, lediglich ausgehend von der löslichen Verbindung eindeutige Effekte auf HeLa S3-Zellen beobachtet.

In Abbildung 35 sind die Untersuchungsergebnisse mit den Cit-, Pvp-Au NP und der löslichen Verbindung AuCl_3 schematisch dargestellt.

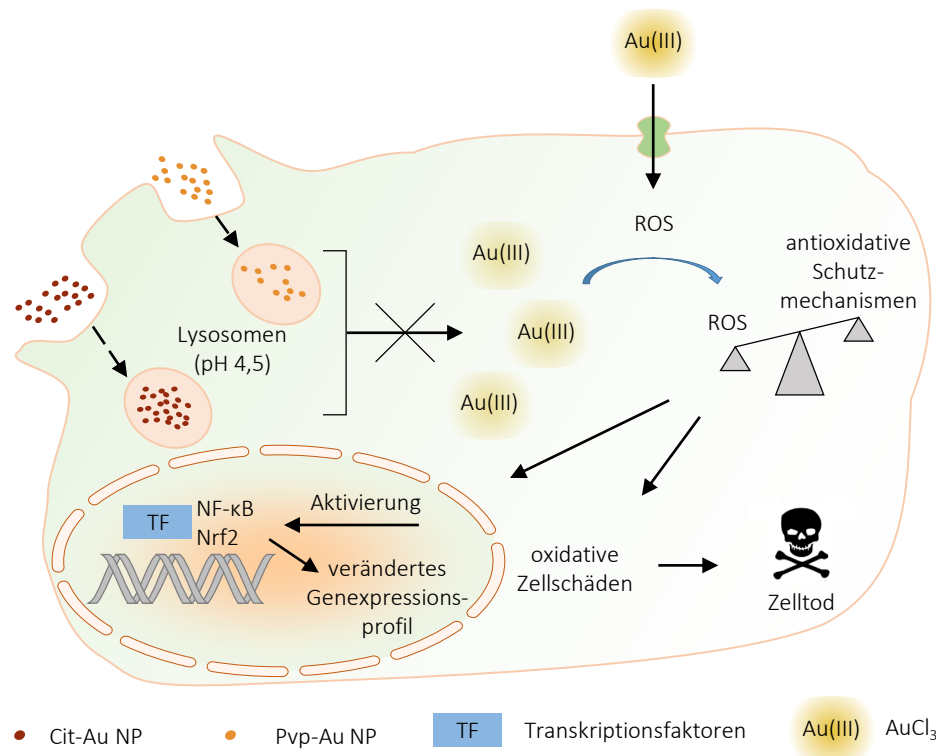


Abbildung 35: Wirkmechanismus von Cit- und Pvp-Au NP und AuCl_3 in HeLa S3-Zellen auf Basis der Untersuchungsergebnisse. Die Aufnahme von Cit-, Pvp-Au NP und AuCl_3 führt zu einer starken Goldakkumulation in HeLa S3-Zellen und erfolgt im Falle der Partikel über endozytotische Mechanismen. Intrazellulär liegen die Partikel kolokalisiert mit Lysosomen vor. Aufgrund der Biobeständigkeit der Partikel, kommt es hier nur zu geringen Effekten. Im Gegensatz dazu weisen die gelösten Ionen aus AuCl_3 ein gesteigertes Potential zur Induktion von oxidativem Stress auf, worauf die zytotoxische Wirkung der Substanz zurückgeführt wird. Postuliert wird im Rahmen des Wirkmechanismus eine Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf2, worauf das veränderte Genexpressionsprofil zurückgeführt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Gold(III)-Komplexe $[\text{Au}(\text{1,10 Phenanthrolin})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (Auphen) und $[\text{Au}(\text{2-Benzylpyridin})\text{Cl}_2]$ (Aubenpy) sowie die entsprechenden Liganden bezüglich einer inhibitorischen Wirkung auf die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) untersucht. Die Versuche fanden dabei in subzellulären und zellulären Testsystemen statt.

Der postulierte Mechanismus der PARP-1-Inhibierung durch Goldkomplexe beruht auf dem Austausch von Zn^{2+} mit $\text{Au}^{1+/3+}$ in den Zinkfinger-Motiven der DNA-Bindungsdomäne des Enzyms. Dabei kommt es zur Formierung sogenannter Goldfinger, die zur Deformation der Domäne und so zu einer veränderten Bindungsaffinität der PARP-1 an geschädigte DNA führt. Der Nachweis der Goldfinger und der inhibitorischen Wirkung von Auphen und Aubenpy auf die PARP-1 erfolgte bisher allerdings nur in subzellulären Untersuchungen und mit Modellpeptiden (Laskay *et al.* 2015, Mendes *et al.* 2011, Wenzel *et al.* 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PARP-Aktivität sowohl am isolierten Enzym wie auch in HeLa S3-Zellen untersucht.

Zunächst wurden die Gold(III)-Komplexe und die Liganden in einem subzellulären Testsystem, bei dem der Einbau biotinylierter Poly(ADP-Ribose) durch die isolierte PARP-1 erfasst wird, bezüglich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit auf das Enzym untersucht. Dabei zeigte sich bereits ab $0,5 \mu\text{M}$ Auphen bzw. Aubenpy eine deutliche Abnahme der PARP-1-Aktivität um circa 80 % bzw. 70 % und ab $5 \mu\text{M}$ ein vollständiger Verlust der Enzymaktivität. Hingegen wiesen die Liganden Phen und Benpy in dem getesteten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die PARP-1-Aktivität auf. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde die inhibitorische Wirkung der Komplexe Auphen und Aubenpy auch von Mendes (2011) und Bertrand (2015) bereits im niedrigen nanomolaren Bereich beschrieben und somit bestätigt. Die Liganden wurden dabei in den genannten Publikationen allerdings nicht separat getestet.

Um die Übertragbarkeit der subzellulären Untersuchungsergebnisse auf zellkulturbasierte Experimente zu überprüfen, wurde die PARP-Aktivität unter Einfluss von Auphen, Aubenpy und den Liganden erstmals in einem zellulären Testsystem untersucht. Als Modell diente die Zelllinie HeLa S3, die DNA-Schadensinduktion zur Aktivierung der PARP-1 erfolgte durch eine H_2O_2 -Behandlung. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde dabei mit Hilfe einer immunfluorimetrischen Methode zur Detektion der Poly(ADP-Ribose)-Ketten (PAR-Ketten) quantifiziert. Zudem wurde der Gehalt an Ribosyladenosin mit Hilfe einer LC-MS/MS-Methode analysiert (Martello *et al.* 2013). Im Falle des Gold(III)-Komplexes Auphen konnte unter Verwendung beider Methoden eine vergleichbare und konzentrationsabhängige Reduktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung nachgewiesen werden. Bei der immunfluorimetrischen Detektion der PAR-Ketten kam es bei der höchsten getesteten Konzentration von $5 \mu\text{M}$ zu einem Rückgang der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf 20 %. Der Ribosyladenosin-Gehalt sank dabei auf circa 10 % der Kontrolle. Unter Verwendung der immunfluorimetrischen Methode wurde allerdings bei den Behandlungen mit dem Liganden Phen eine vergleichbare Inhibierung, wie nach Inkubation mit Auphen beobachtet. Hier führten die Inkubationen mit $2,5 \mu\text{M}$ bzw. $5 \mu\text{M}$ des Substanzpaares zu einer

Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf circa 70 % bzw. 20 %. Bei der Analyse mittels LC-MS wiesen die Behandlungen mit 2,5 μM bzw. 5 μM Auphen einen deutlich reduzierten Ribosyladenosin-Gehalt von 50 % bzw. 10 % auf. Der Ligand zeigte hingegen bei einer Konzentration von 2,5 μM keinen Einfluss auf den Ribosyladenosin-Gehalt, reduzierte den Gehalt jedoch bei 5 μM ebenfalls auf 10 %. Basierend auf den Ergebnissen der subzellulären Untersuchungen, wird die divergente Reduktion des Ribosyladenosin-Gehaltes nach Behandlung mit 2,5 μM Auphen bzw. Phen auf eine Gold-spezifische Wirkung des Komplexes zurückgeführt. Der Austausch von Zn^{2+} mit $\text{Au}^{3+/1+}$ in den Zinkfingern der DNA-Bindungsdomäne könnte dabei maßgeblich zu der Inhibierung der PARP-Aktivität beitragen und zu dem deutlich verringerten Gehalt an Ribosyladenosin bei der Behandlung mit 2,5 μM Auphen führen. Darüber hinaus ist aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der mittels Immunfluoreszenz und LC-MS/MS bestimmten PARP-Aktivität nach Behandlungen mit 2,5 μM Phen ein Einfluss des Liganden auf die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose) denkbar. Eine vermehrte Bildung verkürzter Ketten würde dabei einen geringeren Effekt auf den zellulären Ribosyladenosin-Gehalt aufweisen, wohingegen die verkürzten Ketten im Rahmen der Immunfluoreszenzmethode nicht mehr durch den Antikörper detektiert werden könnten.

Die Behandlungen mit Aubenpy führten in den zellulären Untersuchungen der PARP-Aktivität zu einer moderaten Inhibierung der H_2O_2 -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Mit Hilfe der immunfluorimetrischen Methode wurde bei den Behandlungen mit 2,5 μM bzw. 5 μM eine Reduktion auf 90 % bzw. 60 % beobachtet. Im Rahmen der LC-MS/MS-Analyse wurden die zellulären Ribosyladenosin-Gehalte bei diesen Konzentrationen des Komplexes auf 70 % bzw. 75 % reduziert. Der freie Ligand Benpy zeigte in dem getesteten Konzentrationsbereich, unter Anwendung der immunfluorimetrischen Methode, keinen Einfluss auf die PARP-Aktivität. Im Rahmen der LC-MS/MS-Analyse wurde jedoch eine Reduktion des Ribosyladenosin-Gehaltes bei 2,5 μM auf circa 70 % beobachtet. Basierend auf den subzellulären Untersuchungen, aus welchen auch für Aubenpy eine spezifische Inhibierung der PARP-Aktivität hervorgeht und den Ergebnissen der immunfluorimetrischen Methode, wird der verminderter Ribosyladenosin-Gehalt im Falle von Aubenpy auf eine Inhibierung der PARP-Aktivität in HeLa S3-Zellen zurückgeführt. Im Falle des entsprechenden Liganden Benpy wird angenommen, dass sich die Unterschiede der Untersuchungsergebnisse aus den Standardabweichungen der LC-MS/MS-Methode ergeben.

Um den für Auphen und Aubenpy postulierten Wirkmechanismus der PARP-1-Inhibierung zu überprüfen, wurde die Bindungsaffinität isolierter PARP-1 an spezifische doppelsträngige DNA-Oligonukleotide (dsDNA-ON) mit *forked*-Struktur in einem weiteren subzellulären Ansatz untersucht. Die Bildung eines PARP-1-DNA-Komplexes führt dabei zu einer verminderten Mobilität der dsDNA-ON im elektrischen Feld und wird durch eine Bandenverschiebung angezeigt. Im Rahmen der Untersuchung wurde dabei ein verändertes Laufmuster der Banden nach Behandlung der PARP-1 mit Auphen bzw. Aubenpy, beobachtet. Die Inkubationen der isolierten PARP-1 mit den entsprechenden Liganden wiesen dabei keine

Bandenverschiebung auf. In Anbetracht der Ergebnisse aus den vorangegangenen subzellulären Inhibierungsuntersuchungen mit isolierter PARP-1 deuten die Ergebnisse somit auf eine verminderte Bindungsaffinität der PARP-1 nach Behandlung mit den Gold(III)-Komplexen hin.

Da die PARP-Aktivität auch durch eine toxische Wirkung der Substanzen beeinflusst werden kann, wurde die Zytotoxizität der Gold(III)-Komplexe und der Liganden in der Modellzelllinie HeLa-S3 untersucht. Zudem wurden mit Genexpressionsanalysen Rückschlüsse über die zellulären Wirkmechanismen der Substanzen gewonnen. Insbesondere wurde dabei eine mögliche Apoptose-induzierende Wirkung der Substanzen untersucht, welche zur Beeinflussung der zellulären Inhibitorstudien führen könnte. Eine Spaltung der PARP-1 durch die Aktivierung von Caspasen könnte in diesem Zusammenhang beispielsweise zu falsch positiven Ergebnissen der Untersuchungen führen.

In den Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Auphen bzw. Phen ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit beobachtet. Der Einfluss auf diese Endpunkte zeigte sich für beide Substanzen gleichermaßen. Die Behandlungen mit 5 μM und 50 μM wiesen dabei noch circa 50 % der Zellzahl der Kontrolle auf, wobei ein vollständiger Verlust der Koloniebildungsfähigkeit bei 50 μM zu verzeichnen war. Auch die Untersuchung des zellulären ATP-Gehaltes zeigte ein vergleichbares Dosis-Wirkungsmuster der Substanzen Auphen und Phen. Nach Inkubation mit 2,5 μM der Substanzen sank der ATP-Gehalt zunächst, zeigte jedoch einen rückläufigen Anstieg nach Inkubation mit 5 μM , welcher auf Prozesse im Rahmen apoptotischer Signalwege zurückgeführt wurde. Eine Apoptoseinduktion kann dabei zu einem zeitweiligen Anstieg des zellulären ATP-Levels führen (Zamaraeva *et al.* 2005). Die vergleichbaren Einflüsse von Auphen und Phen auf die Zellzahl, Koloniebildungsfähigkeit und den zellulären ATP-Gehalt könnten im Zusammenhang mit einer Freisetzung des Liganden stehen. Die Freisetzung des 1,10-Phenanthrolinliganden und der Chloroliganden aus Auphen wurde in zellfreien Modellversuchen bereits mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden gezeigt. Dabei konnte eine Reduktion von Au^{3+} zu Au^{1+} nachgewiesen werden (Laskay *et al.* 2015, Wenzel *et al.* 2018). Eine Komplexierung anderer Metalle wie z.B. Kupfer durch den freien Liganden Phen, könnte dabei zu einer zellulären Metalldefizienz oder der Formierung biologisch aktiver Verbindungen führen, welche ihrerseits toxische Wirkungen aufweisen könnten. Für eine Reihe von Kupfer-Phen Komplexen ist in diesem Zusammenhang bereits eine toxische Wirkung aus Zellkulturuntersuchungen bekannt (Cai *et al.* 2007, Sigman *et al.* 1996). Zudem berichteten Messori *et al.* (2000) von einer vergleichbaren zytotoxischen Wirkung des Gold(III)-Komplexes Auphen und des Liganden Phen in einer humanen ovarial Karzinomzelllinie. Darüber hinaus zeigte der freie Ligand Phen in den Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen eine antiproliferative Wirkung auf verschiedene Zelllinien (Byrnes *et al.* 1992, Deegan *et al.* 2007, Krishnamurti *et al.* 1980). Demgegenüber stehen die Untersuchungsergebnisse von Cai *et al.* (2007), die keine Apoptose-induzierende Wirkung des freien Liganden nachweisen konnten.

Der Gold(III)-Komplex Aubenpy wies bis zu Konzentrationen von 5 μM keine zytotoxische Wirkung auf, obwohl dieser im Vergleich zu Auphen vermehrt in HeLa S3-Zellen akkumulierte. Bei der Behandlung mit 50 μM konnte jedoch ein deutlicher Einfluss auf die Zellzahl, die Koloniebildungsfähigkeit und den ATP-Gehalt von HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden. Der entsprechende Ligand wies in dem getesteten Konzentrationsbereich kein zytotoxisches Potential auf. Demgegenüber zeigte Aubenpy im Rahmen der Studie von Bertrand *et al.* (2015) bereits im niedrigen mikromolaren Bereich antiproliferative Eigenschaften in verschiedenen Zelllinien. Der Ligand wurde hier nicht separat untersucht. In einer weiteren Studie um Grau *et al.* (2018) zeigte ein Derivat von 2-Benzylpyridin ebenfalls keine zytotoxische Wirkung in HeLa Zellen. Da der freie Ligand Benpy in den Zytotoxizitätsuntersuchungen keinen Einfluss zeigte, wird vermutet, dass die toxische Wirkung von Aubenpy nicht ausschließlich auf dem Komplexbildner beruht. Vielmehr scheint das komplexierte Goldion diese Effekte zu vermitteln. Nach Wenzel *et al.* (2018) scheint das zentrale Goldion im Komplex Aubenpy im Gegensatz zu Auphen durch den Liganden 2-Benzylpyridin in seiner Oxidationsstufe +3 stabilisiert zu werden. In Anbetracht der geringeren toxischen Wirkung von AuCl_3 auf HeLa S3-Zellen, trotz fünfmal höheren Konzentrationen, scheint die Stabilität und der Oxidationsstatus von Gold-Verbindungen im Zusammenhang mit der toxischen Wirkung zu stehen. Die Goldionen aus AuCl_3 könnten diesbezüglich unter Zellkulturbedingungen zu Au^{1+} reduziert werden, zumal es sich bei den Chloroliganden um gute Abgangsgruppen handelt.

Um die Beteiligung des Apoptose-vermittelten Zelltods an der toxischen Wirkung von Auphen und Phen zu überprüfen, wurden die Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Methode analysiert. Ergänzend wurde der Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen untersucht. Die Untersuchungen zeigten nach Inkubation mit Auphen bzw. Phen einen gleichermaßen gesteigerten Anteil apoptotischer Zellen von 25 % nach Behandlung mit 5 μM der jeweiligen Substanz. Dabei wurden in den Zellpopulationen keine Anteile nekrotischer Zellen erfasst. Im Rahmen der Zellzyklusuntersuchungen wurde zudem ein G_1 -Zellzyklusphasenarrest nach Inkubation mit 5 μM Auphen bzw. Phen beobachtet, welcher mit einer p53-vermittelten Induktion der Apoptose in Verbindung gebracht werden könnte. Ergänzend dazu zeigte sich in den Genexpressionsuntersuchungen eine relevante Steigerung der Transkriptmenge der Gene *CDKN1A* und *JUN*, welche im Zusammenhang mit der Apoptose- und Zellzyklusregulation stehen. Auch weitere Forschungsgruppen konnten eine Induktion von *CDKN1A* in murinen und humanen Krebszellen durch einen Gold(III)-Porphyrin-Komplex bzw. einen Cobalt(II)-Komplex mit Phen-Derivat Liganden nachweisen (Luís *et al.* 2014, Lum *et al.* 2013). Die zytotoxische Wirkung von Auphen und Phen kann somit auf eine Apoptoseinduktion zurückgeführt werden.

Im Zuge apoptotischer Signalwege kann es zu einer Aktivierung von Caspasen kommen, die zu einer Spaltung der PARP-1 führen. Aufgrund dessen wurde das Extrakt behandelter HeLa S3-Zellen mittels Western Blot

hinsichtlich einer PARP-Spaltung untersucht. Dabei konnten keine spezifischen Spaltprodukte des Enzyms nach Behandlung mit 5 μM der Testsubstanzen festgestellt werden. Jedoch wurde von der Arbeitsgruppe um Bostancioglu (2012) ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität nach Inkubation mit Auphen beobachtet. Die N-terminalen Spaltfragmente scheinen dabei eine inhibitorische Wirkung auf die katalytische Aktivität intakter PARP-1 auszuüben (D'Amours et al. 2001). Eine Beeinflussung der PARP-Aktivität durch Caspasen, im Rahmen der zellulären PARP-Inhibierungsuntersuchungen, kann deshalb im Falle von Auphen und Phen aufgrund der gezeigten Apoptoseinduktion nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In dem getesteten Konzentrationsbereich von 0,5-5 μM konnte nach Inkubation mit Aubenpy bzw. des Liganden Benpy kein Anstieg der apoptotischen oder nekrotischen Zellanteile nachgewiesen werden. Ferner wurde kein Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung festgestellt. Auch auf Genexpressionsebene konnte nach Inkubation der Substanzen kein verändertes Expressionsprofil der Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Gene in HeLa S3-Zellen festgestellt werden. Aufgrund dessen wird im Falle von Aubenpy und Benpy nicht von einer Beeinflussung der PARP-Aktivität im Rahmen von Zelltodmechanismen ausgegangen.

In den Genexpressionsuntersuchungen wurde darüber hinaus eine gesteigerte Transkriptmenge der *HMOX1* nach Inkubation mit den Komplexen verzeichnet. Die entsprechenden Liganden zeigten dabei keinen Einfluss auf die Genexpression. Im Falle von Auphen lag die Expression des Gens mit 1,6 knapp unterhalb der festgelegten Relevanzgrenze. Jedoch konnte ein leicht gesteigertes ROS-Level in HeLa S3-Zellen nachgewiesen werden, was auf ein oxidatives Stresspotential hindeutet. Die Behandlung mit Aubenpy führte hingegen zu einer Verdreifachung der Expression der *HMOX1*. Mit Hilfe der redoxsensitiven Fluoreszenzsonde konnte jedoch kein erhöhtes ROS-Level erfasst werden. Obwohl die Behandlung mit Auphen nicht zu einer relevanten Änderung der Genexpression führte, wird die Induktion der *HMOX1* auf eine spezifische Wirkung der komplexierten Goldionen von Auphen und Aubenpy zurückgeführt. Eine Induktion der *HMOX1* wurde auch nach Behandlung mit diversen Gold(I)-Verbindungen in Zellkulturuntersuchungen beobachtet und als Kompensationseffekt einer Inhibierung der Thioredoxinreduktase durch Au(I) betrachtet und auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zurückgeführt (Kataoka et al. 2001, Mostert et al. 2003). Als Biomarker einer zellulären Stressantwort deutet die Induktion des Gens *HMOX1* auf ein oxidatives Stresspotential hin. Im Falle von Aubenpy scheint dieser Effekt in einem subzytotoxischen Bereich zu liegen. In Anbetracht der vergleichbaren Wirkung von Auphen und Phen scheinen die enthaltenen Goldionen des Komplexes in Bezug auf die Toxizität keine übergeordnete Rolle zu spielen, vielmehr scheint der Ligand die Zytotoxizität des Komplexes zu prägen. Wie bereits erwähnt, könnte die Komplexbildung weiterer Metalle durch Phen zu biologisch aktiven Verbindungen führen, die zu der toxischen Wirkung des Liganden beitragen. Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Gold(III)-Komplexen und den Liganden ist in Abbildung 36 A) und B) schematisch dargestellt.

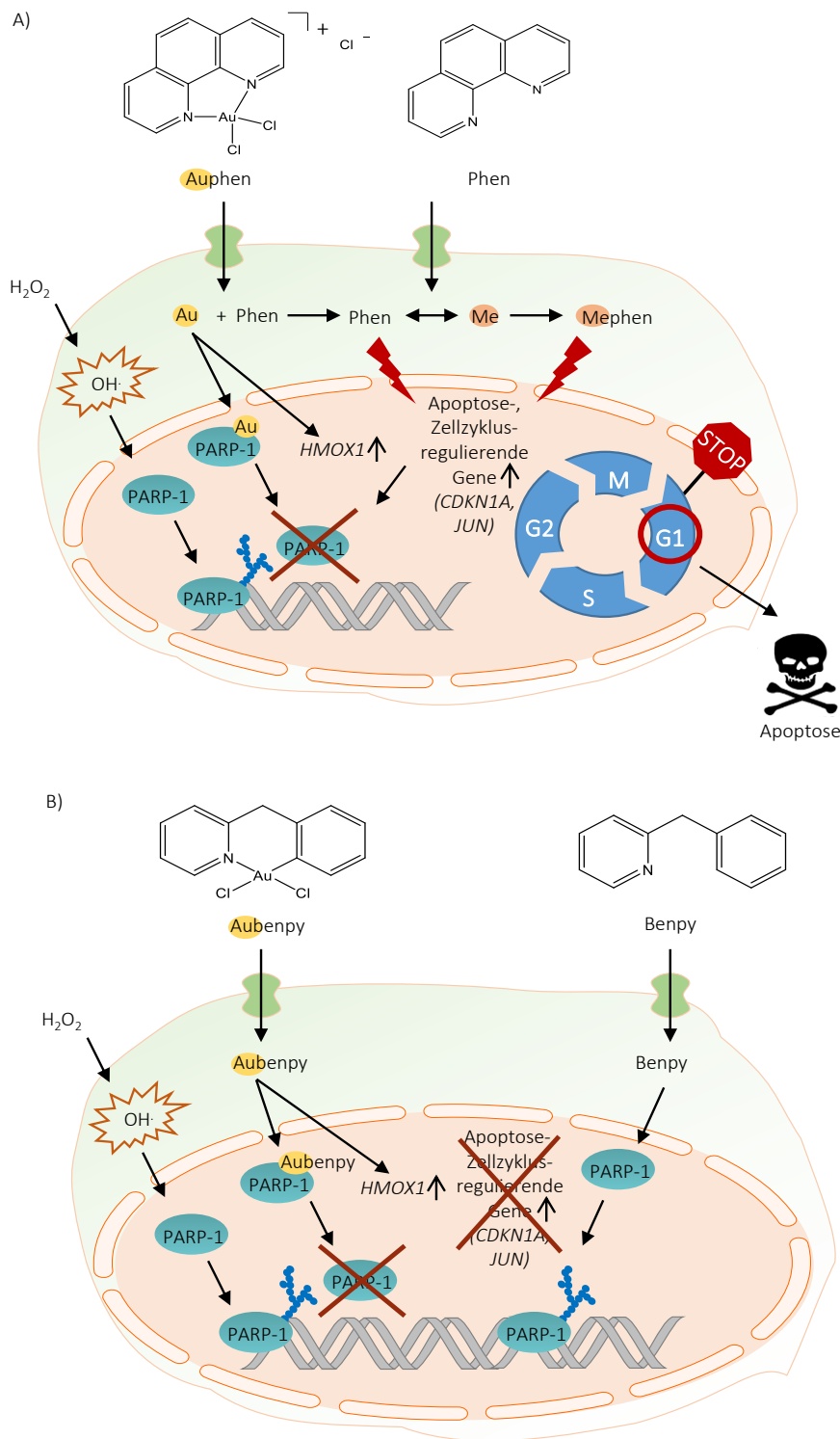


Abbildung 36: Postulierter Wirkmechanismus von Auphen, Phen (A) und Aubenpy, Benpy B) auf die PARP-Aktivität in HeLa S3-Zellen auf Basis der Untersuchungsergebnisse. Unter physiologischen Bedingungen führt der Einfluss von H_2O_2 zur Induktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung, überwiegend durch die PARP-1 katalysiert. Die Komplexe Auphen bzw. Aubenpy weisen auf zellulärer Ebene eine inhibierende Wirkung auf die PARP-Aktivität auf. Der Einfluss der Komplexe könnte dabei zu einer Beeinträchtigung der Bindung der PARP-1 an die DNA führen, basierend auf dem Austausch der Zinkionen in der DNA-Bindungsdomäne des Enzyms. Der Ligand Phen führt in HeLa S3-Zellen ebenfalls zu einer Inhibierung der PARP-Aktivität, was auf eine biologische Aktivierung durch Komplexbildung intrazellulärer Metalle wie z.B. Kupfer zurückzuführen sein könnte. Durch Induktion der Apoptose scheint das Substanzpaar Auphen/Phen zudem durch indirekte Mechanismen Einfluss auf die zelluläre PARP-Aktivität zu nehmen. Der Ligand Benpy beeinflusst die zelluläre PARP-Aktivität nicht und wies wie auch Aubenpy keine zytotoxische Wirkung in dem getesteten Konzentrationsbereich auf.

Zusammenfassend konnte mit den Untersuchungsergebnissen der vorgelegten Arbeit ein deutlich gesteigertes zytotoxisches Potential, ausgehend von reaktiven Ionen aus AuCl_3 , im Vergleich zu biobeständigen Cit- und Pvp-Au NP nachgewiesen werden. Trotz massiver Goldakkumulation der partikulären Goldverbindungen scheinen die biobeständigen Cit- und Pvp-Au NP in HeLa S3-Zellen keine toxischen Wirkungen zu vermitteln. Bezüglich des Wirkmechanismus von AuCl_3 konnte auf funktioneller und transkriptioneller Ebene eine Induktion von oxidativem Stress nachgewiesen werden, welche maßgeblich zu den biologischen Effekten in HeLa S3-Zellen beiträgt.

Im Rahmen der Untersuchungsergebnisse wurde darüber hinaus das Inhibierungspotential der Gold(III)-Komplexe Auphen und Aubenpy sowie der Liganden Phen und Benpy auf die PARP-Aktivität erstmals in einem zellulären System dargestellt. Beide Komplexe zeigten sich sowohl in subzellulären und zellulären Untersuchungen in der Lage, die PARP-Aktivität zu inhibieren. Mit den Daten aus den subzellulären Untersuchungen und der Genexpressionsanalyse in HeLa S3-Zellen, kann zudem von einer Metall-spezifischen Wirkung der Komplexe unabhängig von den entsprechenden Liganden ausgegangen werden. Im Falle von Auphen wird jedoch vermutet, dass der Ligand Phen im Rahmen der Apoptoseinduktion zu der inhibitorischen Wirkung auf zellulärer Ebene beiträgt. Die Stabilität der Komplexe unter Zellkulturbedingungen scheint somit ein wichtiger Faktor für die Wirkung der Substanzen in zellulären Testsystemen darzustellen. Folglich konnte mit Hilfe der Untersuchungen gezeigt werden, dass die Ergebnisse aus subzellulären Untersuchungen nicht direkt übertragbar auf zellbasierte Testsysteme sind.

7 Literaturverzeichnis

- Abate, C., L. Patel, F. Rauscher und T. Curran, 1990: Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*, 249, 1157-1161.
- Abbehausen, C., 2019: Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds - an update. *Metallomics*, 11, 15-28.
- Alano, C. C., P. Garnier, W. Ying, Y. Higashi, T. M. Kauppinen und R. A. Swanson, 2010: NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30, 2967-2978.
- Altaf, M., M. Monim-Ul-Mehboob, A. N. Kawde, G. Corona, R. Larcher, M. Ogasawara, N. Casagrande, M. Celegato, C. Borghese, Z. H. Siddik, D. Aldinucci und A. A. Isab, 2017: New bipyridine gold(III) dithiocarbamate-containing complexes exerted a potent anticancer activity against cisplatin-resistant cancer cells independent of p53 status. *Oncotarget*, 8, 490-505.
- Anbu, S., K. Asaithambi, E. Alegria, G. Mathan und M. Kandaswamy, 2013: Effect of 1,10-phenanthroline on DNA binding, DNA cleavage, cytotoxic and lactate dehydrogenase inhibition properties of Robson type macrocyclic dicopper(II) complex.
- Androutsopoulos, V. P., A. M. Tsatsakis und D. A. Spandidos, 2009: Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9, 187.
- Anwar-Mohamed, A., R. H. Elbekai und A. O. S. El-Kadi, 2009: Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5, 501-521.
- Arnér, E. S. J. und A. Holmgren, 2000: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6102-6109.
- Arnida, A. Malugin und H. Ghandehari, 2010: Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *J Appl Toxicol*, 30, 212-217.
- Audebert, M., B. Salles und P. Calsou, 2004: Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 279, 55117-55126.
- Aueviriyavit, S., D. Phummiratch und R. Maniratanachote, 2014: Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells--induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles. *Toxicol Lett*, 224, 73-83.
- Ba, X. und N. J. Garg, 2011: Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases. *The American Journal of Pathology*, 178, 946-955.
- Bai, P., 2015: Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell*, 58, 947-958.
- Bajak, E., M. Fabbri, J. Ponti, S. Gioria, I. Ojea-Jimenez, A. Collotta, V. Mariani, D. Gilliland, F. Rossi und L. Gribaldo, 2015: Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles. *Toxicol Lett*, 233, 187-199.

- Balasubramanian, S. K., J. Jittiwat, J. Manikandan, C.-N. Ong, L. E. Yu und W.-Y. Ong, 2010: Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, 31, 2034-2042.
- Behzadi, S., V. Serpooshan, W. Tao, M. A. Hamaly, M. Y. Alkawareek, E. C. Dreaden, D. Brown, A. M. Alkilany, O. C. Farokhzad und M. Mahmoudi, 2017: Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev*, 46, 4218-4244.
- Bencini, A. und V. Lippolis, 2010: 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coordination Chemistry Reviews*, 254, 2096-2180.
- Bertrand, B., S. Spreckelmeyer, E. Bodio, F. Cocco, M. Picquet, P. Richard, P. Le Gendre, C. Orvig, M. A. Cinellu und A. Casini, 2015: Exploring the potential of gold(III) cyclometallated compounds as cytotoxic agents: variations on the C^N theme. *Dalton Trans*, 44, 11911-11918.
- Bertrand, B., M. R. M. Williams und M. Bochmann, 2018: Gold(III) Complexes for Antitumor Applications: An Overview. *Chemistry*, 24, 11840-11851.
- Bindoli, A., M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini und L. Messori, 2009: Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 1692-1707.
- Bonicalzi, M. E., J. F. Haince, A. Droit und G. G. Poirier, 2005: Poly-ADP-ribosylation in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62, 739-750.
- Bossy-Wetzel, E., L. Bakiri und M. Yaniv, 1997: Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *The EMBO journal*, 16, 1695-1709.
- Bostancioglu, R. B., K. Isik, H. Genc, K. Benkli und A. T. Koparal, 2012: Studies on the cytotoxic, apoptotic and antitumoral effects of Au(III) and Pt(II) complexes of 1, 10-phenanthroline on V79 379A and A549 cell lines. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27, 458-466
- Brigelius-Flohé, R. und A. P. Kipp, 2013: Chapter Four - Selenium in the Redox Regulation of the Nrf2 and the Wnt Pathway. In: E. Cadenas und L. Packer (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press
- Brunner, T. J., P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink und W. J. Stark, 2006: In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. *Environmental Science & Technology*, 40, 4374-4381
- Bryant, H. E., N. Schultz, H. D. Thomas, K. M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N. J. Curtin und T. Helleday, 2005: Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434, 913-917.
- Burk, R. F. und K. E. Hill, 2009: Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790, 1441-1447.
- Byrnes, R. W., W. E. Antholine und D. H. Petering, 1992: Interactions of 1,10-phenanthroline and its copper complex with Ehrlich cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 12, 457-469.
- Cai, X., N. Pan und G. Zou, 2007: Copper-1,10-Phenanthroline-Induced Apoptosis in Liver Carcinoma Bel-7402 Cells Associates with Copper Overload, Reactive Oxygen Species Production, Glutathione Depletion and Oxidative DNA Damage. *BioMetals*, 20, 1-11.
- Caldecott, K. W., 2008: Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 9, 619.

- Caldecott, K. W., 2014: DNA single-strand break repair. *Experimental Cell Research*, 329, 2-8.
- Canton, I. und G. Battaglia, 2012: Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*, 41, 2718-2739.
- Chandran, P., J. E. Riviere und N. A. Monteiro-Riviere, 2017: Surface chemistry of gold nanoparticles determines the biocorona composition impacting cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in human endothelial cells. *Nanotoxicology*, 11, 507-519.
- Che, C.-M., R. W.-Y. Sun, W.-Y. Yu, C.-B. Ko, N. Zhu und H. Sun, 2003: Gold(iii) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chemical Communications*, 1718-1719.
- Chen, A. C., L. Burr und M. A. McGuckin, 2018: Oxidative and endoplasmic reticulum stress in respiratory disease. *Clinical & translational immunology*, 7, e1019.
- Chen, X. und C. Gao, 2017: Influences of size and surface coating of gold nanoparticles on inflammatory activation of macrophages. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 160, 372-380.
- Chen, Y. H., C. Y. Tsai, P. Y. Huang, M. Y. Chang, P. C. Cheng, C. H. Chou, D. H. Chen, C. R. Wang, A. L. Shiau und C. L. Wu, 2007: Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model. *Molecular pharmaceutics*, 4, 713-722.
- Chiruvella, K. K., Z. Liang und T. E. Wilson, 2013: Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012757.
- Chithrani, B. D. und W. C. Chan, 2007: Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*, 7, 1542-1550.
- Chithrani, B. D., A. A. Ghazani und W. C. Chan, 2006: Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*, 6, 662-668.
- Cho, E. C., J. Xie, P. A. Wurm und Y. Xia, 2009: Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Letters*, 9, 1080-1084.
- Choi, K., J. E. Riviere und N. A. Monteiro-Riviere, 2017: Protein corona modulation of hepatocyte uptake and molecular mechanisms of gold nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*, 11, 64-75.
- Choi, S. Y., S. Jeong, S. H. Jang, J. Park, J. H. Park, K. S. Ock, S. Y. Lee und S. W. Joo, 2012: In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*, 26, 229-237.
- Choudhury, D., P. L. Xavier, K. Chaudhari, R. John, A. K. Dasgupta, T. Pradeep und G. Chakrabarti, 2013: Unprecedented inhibition of tubulin polymerization directed by gold nanoparticles inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Nanoscale*, 5, 4476-4489.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos und B. Kaina, 2003: Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193, 3-34.
- Citta, A., V. Scalcon, P. Göbel, B. Bertrand, M. Wenzel, A. Folda, M. P. Rigobello, E. Meggers und A. Casini, 2016: Toward anticancer gold-based compounds targeting PARP-1: a new case study. *RSC Advances*, 6, 79147-79152.

- Connor, E. E., J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy und M. D. Wyatt, 2005: Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1, 325-327.
- Cooper, E. M., C. Cutcliffe, T. Z. Kristiansen, A. Pandey, C. M. Pickart und R. E. Cohen, 2009: K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *The EMBO journal*, 28, 621-631.
- Coradeghini, R., S. Gioria, C. P. Garcia, P. Nativo, F. Franchini, D. Gilliland, J. Ponti und F. Rossi, 2013: Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol Lett*, 217, 205-216.
- Cronholm, P., H. L. Karlsson, J. Hedberg, T. A. Lowe, L. Winnberg, K. Elihn, I. O. Wallinder und L. Moller, 2013: Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small*, 9, 970-982.
- D'Amours, D., F. R. Sallmann, V. M. Dixit und G. G. Poirier, 2001: Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *Journal of Cell Science*, 114, 3771-3778.
- Davies, M. J., 1989: Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochemical Journal*, 257, 603-606.
- de Almeida, A., A. F. Mosca, D. Wragg, M. Wenzel, P. Kavanagh, G. Barone, S. Leoni, G. Soveral und A. Casini, 2017: The mechanism of aquaporin inhibition by gold compounds elucidated by biophysical and computational methods. *Chem Commun (Camb)*, 53, 3830-3833.
- Deegan, C., M. McCann, M. Devereux, B. Coyle und D. A. Egan, 2007: In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), [Ag₂(phen)₃(mal)]x2H₂O, [Cu(phen)₂(mal)]x2H₂O and [Mn(phen)₂(mal)]x2H₂O (malH₂=malonic acid) using human cancer cells. *Cancer letters*, 247, 224-233.
- Denis, C., H. Dieter, G. Peter und S. Helmut, 1983: Decreased Flux through Pyruvate Dehydrogenase by Thiol Oxidation during t-Butyl Hydroperoxide Metabolism in Perfused Rat Liver. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*.
- Di Bucchianico, S., M. R. Fabbri, S. Cirillo, C. Ubaldi, D. Gilliland, E. Valsami-Jones und L. Migliore, 2014: Aneuploidogenic effects and DNA oxidation induced in vitro by differently sized gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 9, 2191-2204.
- Dickerson, E. B., E. C. Dreaden, X. Huang, I. H. El-Sayed, H. Chu, S. Pushpanketh, J. F. McDonald und M. A. El-Sayed, 2008: Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer letters*, 269, 57-66.
- Dinkel, R., B. Braunschweig und W. Peukert, 2016: Fast and Slow Ligand Exchange at the Surface of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120, 1673-1682.
- Donaldson, K., P. J. A. Borm, G. Oberdorster, K. E. Pinkerton, V. Stone und C. L. Tran, 2008: Concordance Between In Vitro and In Vivo Dosimetry in the Proinflammatory Effects of Low-Toxicity, Low-Solubility Particles: The Key Role of the Proximal Alveolar Region. *Inhalation Toxicology*, 20, 53-62.
- Donzelli, M., C. Negri, A. Mandarino, L. Rossi, E. Prosperi, I. Frouin, R. Bernardi, A. Burkle und A. Ivana Scovassi, 1997: Poly(ADP-ribose) synthesis: a useful parameter for identifying apoptotic cells. *The Histochemical Journal*, 29, 831-837.

- Dragoni, S., G. Franco, M. Regoli, M. Bracciali, V. Morandi, G. Sgaragli, E. Bertelli und M. Valoti, 2012: Gold nanoparticles uptake and cytotoxicity assessed on rat liver precision-cut slices. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 128, 186-197.
- Dulaney, C., S. Marcrom, J. Stanley und E. S. Yang, 2017: Poly(ADP-ribose) polymerase activity and inhibition in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 63, 144-153.
- Elbekai, R. H. und A. O. El-Kadi, 2007: Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicol Lett*, 172, 106-119.
- EMA, European Medicines Agency.
https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Human?search_api_views_fulltext=parp-1 (accessed on July 18, 2019).
- Fahrer, J., R. Kranaster, M. Altmeyer, A. Marx und A. Bürkle, 2007: Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Research*, 35, e143-e143.
- Farmer, H., H. McCabe, C. J. Lord, A. H. J. Tutt, D. A. Johnson, T. B. Richardson, M. Santarosa, K. J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N. M. B. Martin, S. P. Jackson, G. C. M. Smith und A. Ashworth, 2005: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, 917-921.
- Fatokun, A. A., V. L. Dawson und T. M. Dawson, 2014: Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171, 2000-2016.
- Fede, C., I. Fortunati, V. Weber, N. Rossetto, F. Bertasi, L. Petrelli, D. Guidolin, R. Signorini, R. De Caro, G. Albertin und C. Ferrante, 2015: Evaluation of gold nanoparticles toxicity towards human endothelial cells under static and flow conditions. *Microvasc Res*, 97, 147-155.
- Fischer, B. M., D. Neumann, A. L. Piberger, S. F. Risnes, B. Koberle und A. Hartwig, 2016: Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Arch Toxicol*, 90, 2745-2761.
- Fraga, S., H. Faria, M. E. Soares, J. A. Duarte, L. Soares, E. Pereira, C. Costa-Pereira, J. P. Teixeira, M. de Lourdes Bastos und H. Carmo, 2013: Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *J Appl Toxicol*, 33, 1111-1119.
- Frens, G., 1973: Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241, 20.
- Frezza, M., S. Hinda, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco und Q. P. Dou, 2010: Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr Pharm Design*, 16, 1813-1825.
- Gao, W., K. Xu, L. Ji und B. Tang, 2011: Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicol Lett*, 205, 86-95.
- Grau, J., C. Renau, A. B. Caballero, A. Caubet, M. Pockaj, J. Lorenzo und P. Gamez, 2018: Evaluation of the metal-dependent cytotoxic behaviour of coordination compounds. *Dalton Transactions*, 47, 4902-4908.
- Gu, Y. J., J. Cheng, C. C. Lin, Y. W. Lam, S. H. Cheng und W. T. Wong, 2009: Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 237, 196-204.

- Guerrini, L., A. R. Alvarez-Puebla und N. Pazos-Perez, 2018: Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials*, 11.
- Guo, J., K. Rahme, Y. He, L. L. Li, J. D. Holmes und C. M. O'Driscoll, 2017: Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. *Int J Nanomedicine*, 12, 6131-6152.
- Guo, L., X. Zhou und D.-H. Kim, 2011: Facile fabrication of distance-tunable Au-nanorod chips for single-nanoparticle plasmonic biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2246-2251.
- Haince, J. F., D. McDonald, A. Rodrigue, U. Dery, J. Y. Masson, M. J. Hendzel und G. G. Poirier, 2008: PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem*, 283, 1197-1208.
- Hamblin, M. R., J. L. Miller, I. Rizvi, H. G. Loew und T. Hasan, 2003: Pegylation of charged polymer-photosensitizer conjugates: effects on photodynamic efficacy. *Br J Cancer*, 89, 937-943.
- Handel, M. L., C. K. Watts, A. deFazio, R. O. Day und R. L. Sutherland, 1995: Inhibition of AP-1 binding and transcription by gold and selenium involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4497-4501.
- Hartwig, A., 2013: Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 63-72.
- Huang, X., I. H. El-Sayed, W. Qian und M. A. El-Sayed, 2007: Cancer Cells Assemble and Align Gold Nanorods Conjugated to Antibodies to Produce Highly Enhanced, Sharp, and Polarized Surface Raman Spectra: A Potential Cancer Diagnostic Marker. *Nano Letters*, 7, 1591-1597.
- Hufnagel, M. W., 2019: Untersuchungen zur Toxizität von nanopartikelhaltigen Aerosolen nach Exposition über ein air-liquid interface. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Huo, D. und Y. Xia, 2018: Quantifying the Sub-Cellular Distributions of Gold Nanospheres Taken Up by Cells through Stepwise, Site-Selective Etching. *Chemistry*, 24, 8513-8518.
- Jackson, S. P. und J. Bartek, 2009: The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071-1078.
- Jacques, A., C. Lebrun, A. Casini, I. Kieffer, O. Proux, J. M. Latour und O. Seneque, 2015: Reactivity of Cys4 zinc finger domains with gold(III) complexes: insights into the formation of "gold fingers". *Inorg Chem*, 54, 4104-4113.
- Kalthoff, S., U. Ehmer, N. Freiberg, M. P. Manns und C. P. Strassburg, 2010: Interaction between oxidative stress sensor Nrf2 and xenobiotic-activated aryl hydrocarbon receptor in the regulation of the human phase II detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *J Biol Chem*, 285, 5993-6002.
- Kappelmann, M., A. Bosserhoff und S. Kuphal, 2014: AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *European Journal of Cell Biology*, 93, 76-81.
- Kataoka, K., H. Handa und M. Nishizawa, 2001: Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds. *J Biol Chem*, 276, 34074-34081.
- Kerins, M. J. und A. Ooi, 2018: The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis. *Antioxidants & redox signaling*, 29, 1756-1773.

- Keung, M. Y. T., Y. Wu und J. V. Vadgama, 2019: PARP Inhibitors as a Therapeutic Agent for Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancers. *Journal of clinical medicine*, 8.
- Kiriakidis, S., E. Andreacos, C. Monaco, B. Foxwell, M. Feldmann und E. Paleolog, 2003: VEGF expression in human macrophages is NF- κ B-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF- κ B inhibitor I κ B α and a kinase-defective form of the I κ B kinase 2. *Journal of Cell Science*, 116, 665-674.
- Krishnamurti, C., L. A. Saryan und D. H. Petering, 1980: Effects of ethylenediaminetetraacetic acid and 1,10-phenanthroline on cell proliferation and DNA synthesis of Ehrlich ascites cells. *Cancer research*, 40, 4092-4099.
- Kucera, O., R. Endlicher, T. Rousar, H. Lotkova, T. Garnol, Z. Drahota und Z. Cervinkova, 2014: The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 752506.
- Kumar, D., I. Mutreja, K. Chitcholtan und P. Sykes, 2017: Cytotoxicity and cellular uptake of different sized gold nanoparticles in ovarian cancer cells. *Nanotechnology*, 28, 475101.
- Kwon, S., M. Fan, A. T. Cooper und H. Yang, 2008: Photocatalytic Applications of Micro- and Nano-TiO₂ in Environmental Engineering. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38, 197-226.
- Langelier, M. F. und J. M. Pascal, 2013: PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Current opinion in structural biology*, 23, 134-143.
- Langelier, M. F., J. L. Planck, S. Roy und J. M. Pascal, 2011: Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J Biol Chem*, 286, 10690-10701.
- Langelier, M. F., J. L. Planck, S. Roy und J. M. Pascal, 2012: Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science*, 336, 728-732.
- Laskay, U. A., C. Garino, Y. O. Tsybin, L. Salassa und A. Casini, 2015: Gold finger formation studied by high-resolution mass spectrometry and in silico methods. *Chem Commun (Camb)*, 51, 1612-1615.
- Laux, P., J. Tentschert, C. Riebeling, A. Braeuning, O. Creutzenberg, A. Epp, V. Fessard, K.-H. Haas, A. Haase, K. Hund-Rinke, N. Jakubowski, P. Kearns, A. Lampen, H. Rauscher, R. Schoonjans, A. Störmer, A. Thielmann, U. Mühle und A. Luch, 2018: Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*, 92, 121-141.
- Lee, D., I. M. Xu, D. K. Chiu, J. Leibold, A. P. Tse, M. H. Bao, V. W. Yuen, C. Y. Chan, R. K. Lai, D. W. Chin, D. F. Chan, T. T. Cheung, S. H. Chok, C. M. Wong, S. W. Lowe, I. O. Ng und C. C. Wong, 2019: Induction of Oxidative Stress Through Inhibition of Thioredoxin Reductase 1 Is an Effective Therapeutic Approach for Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69, 1768-1786.
- Lee, H. M., S. M. Jin, H. M. Kim und Y. D. Suh, 2013: Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy: a perspective on the current status. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 5276-5287.
- Lee, J.-C., Y.-O. Son, P. Pratheeshkumar und X. Shi, 2012: Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 742-757.
- Lee, J.-H., H. Jang, E.-J. Cho und H.-D. Youn, 2009: Ferritin binds and activates p53 under oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389, 399-404.

- Lenartowicz, M., T. Moos, M. Ogorek, T. G. Jensen und L. B. Moller, 2016: Metal-Dependent Regulation of ATP7A and ATP7B in Fibroblast Cultures. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 68.
- Li, J. J., D. Hartono, C. N. Ong, B. H. Bay und L. Y. Yung, 2010: Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 5996-6003.
- Li, J. J., S. L. Lo, C. T. Ng, R. L. Gurung, D. Hartono, M. P. Hande, C. N. Ong, B. H. Bay und L. Y. Yung, 2011: Genomic instability of gold nanoparticle treated human lung fibroblast cells. *Biomaterials*, 32, 5515-5523.
- Liebermann, D. A. und B. Hoffman, 2008: Gadd45 in stress signaling. *Journal of molecular signaling*, 3, 15.
- Lindeque, J. Z., A. Matthyser, S. Mason, R. Louw und C. J. F. Taute, 2018: Metabolomics reveals the depletion of intracellular metabolites in HepG2 cells after treatment with gold nanoparticles. *Nanotoxicology*, 12, 251-262.
- Liptay, S., R. M. Schmid, E. G. Nabel und G. J. Nabel, 1994: Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 7695-7703.
- Liu, J. J., P. Galettis, A. Farr, L. Maharaj, H. Samarasinha, A. C. McGechan, B. C. Baguley, R. J. Bowen, S. J. Berners-Price und M. J. McKeage, 2008: In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 303-310.
- Liu, T., L. Zhang, D. Joo und S. C. Sun, 2017: NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25, 402-408.
- Loeffler, P. A., M. J. Cuneo, G. A. Mueller, E. F. DeRose, S. A. Gabel und R. E. London, 2011: Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Structural Biology*, 11, 37.
- Lu, L. P., M. L. Zhu und P. Yang, 2003: Crystal structure and nuclease activity of mono(1,10-phenanthroline) copper complex. *J Inorg Biochem*, 95, 31-36.
- Lu, S. C., 2013: Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3143-3153.
- Lu, W., C. Xiong, G. Zhang, Q. Huang, R. Zhang, J. Z. Zhang und C. Li, 2009: Targeted photothermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog-conjugated hollow gold nanospheres. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15, 876-886.
- Luís, D. V., J. Silva, A. I. Tomaz, R. F. M. de Almeida, M. Larguinho, P. V. Baptista, L. M. D. R. S. Martins, T. F. S. Silva, P. M. Borralho, C. M. P. Rodrigues, A. S. Rodrigues, A. J. L. Pombeiro und A. R. Fernandes, 2014: Insights into the mechanisms underlying the antiproliferative potential of a Co(II) coordination compound bearing 1,10-phenanthroline-5,6-dione: DNA and protein interaction studies. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19, 787-803.
- Lum, C. T., A. S.-T. Wong, M. C. M. Lin, C.-M. Che und R. W.-Y. Sun, 2013: A gold(III) porphyrin complex as an anti-cancer candidate to inhibit growth of cancer-stem cells. *Chemical Communications*, 49, 4364-4366.

- Lum, C. T., Z. F. Yang, H. Y. Li, R. Wai-Yin Sun, S. T. Fan, R. T. P. Poon, M. C. M. Lin, C.-M. Che und H. F. Kung, 2006: Gold(III) compound is a novel chemocytotoxic agent for hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 118, 1527-1538.
- Ma, Q., 2013: Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 401-426.
- Magan, N., R. J. Isaacs und K. M. Stowell, 2012: Treatment with the PARP-inhibitor PJ34 causes enhanced doxorubicin-mediated cell death in HeLa cells. *Anti-cancer drugs*, 23, 627-637.
- Maiorano, G., S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M. A. Malvindi, R. Cingolani und P. P. Pompa, 2010: Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein–Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. *ACS nano*, 4, 7481-7491.
- Malvern, 2013: Zetasizer Nano Series User Manual. MAN0485 Issue 1.1.
- Manke, A., L. Wang und Y. Rojanasakul, 2013: Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*, 2013, 15.
- Martello, R., A. Mangerich, S. Sass, P. C. Dedon und A. Burkle, 2013: Quantification of cellular poly(ADP-ribosyl)ation by stable isotope dilution mass spectrometry reveals tissue- and drug-dependent stress response dynamics. *ACS Chem Biol*, 8, 1567-1575.
- Marzano, C., V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli und M. P. Rigobello, 2007: Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free radical biology & medicine*, 42, 872-881.
- Mateo, D., P. Morales, A. Avalos und A. I. Haza, 2014: Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol Mech Methods*, 24, 161-172.
- Mateo, D., P. Morales, A. Ávalos und A. I. Haza, 2015: Comparative cytotoxicity evaluation of different size gold nanoparticles in human dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Nanoscience*, 10, 1401-1417.
- Mendes, F., M. Groessl, A. A. Nazarov, Y. O. Tsybin, G. Sava, I. Santos, P. J. Dyson und A. Casini, 2011: Metal-based inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase--the guardian angel of DNA. *J Med Chem*, 54, 2196-2206.
- Messori, L., F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell und P. Zanello, 2000: Gold(III) Complexes as Potential Antitumor Agents: Solution Chemistry and Cytotoxic Properties of Some Selected Gold(III) Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 3541-3548.
- Mindell, J. A., 2012: Lysosomal acidification mechanisms. *Annual review of physiology*, 74, 69-86.
- Mohamed, T., S. Matou-Nasri, A. Farooq, D. Whitehead und M. Azzawi, 2017: Polyvinylpyrrolidone-coated gold nanoparticles inhibit endothelial cell viability, proliferation, and ERK1/2 phosphorylation and reduce the magnitude of endothelial-independent dilator responses in isolated aortic vessels. *Int J Nanomedicine*, 12, 8813-8830.
- Mostert, V., K. E. Hill und R. F. Burk, 2003: Loss of activity of the selenoenzyme thioredoxin reductase causes induction of hepatic heme oxygenase-1. *FEBS letters*, 541, 85-88.
- Murai, J., S.-y. N. Huang, B. B. Das, A. Renaud, Y. Zhang, J. H. Doroshow, J. Ji, S. Takeda und Y. Pommier, 2012: Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer research*, 72, 5588.

- Naletova, I., C. Satriano, A. Curci, N. Margiotta, G. Natile, G. Arena, D. La Mendola, V. G. Nicoletti und E. Rizzarelli, 2018: Cytotoxic phenanthroline derivatives alter metallostasis and redox homeostasis in neuroblastoma cells. *Oncotarget*, 9, 36289-36316.
- Ng, C. T., F. M. Tang, J. J. Li, C. Ong, L. L. Yung und B. H. Bay, 2015: Clathrin-mediated endocytosis of gold nanoparticles in vitro. *Anat Rec (Hoboken)*, 298, 418-427.
- Ng, Y.-S., D. Krilleke und D. T. Shima, 2006: VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research*, 312, 527-537.
- Nguewa, P. A., M. A. Fuertes, B. Valladares, C. Alonso und J. M. Pérez, 2005: Poly(ADP-Ribose) Polymerases: Homology, Structural Domains and Functions. Novel Therapeutical Applications. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88, 143-172.
- Niemand, R. K., 2018: Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und damit assoziierte zelluläre Signalwege. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Noel, C., J. C. Simard und D. Girard, 2016: Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro*, 31, 12-22.
- Oh, N. und J. H. Park, 2014: Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*, 9 Suppl 1, 51-63.
- Oh, S. Y., N. S. Heo, S. Shukla, H.-J. Cho, A. T. E. Vilian, J. Kim, S. Y. Lee, Y.-K. Han, S. M. Yoo und Y. S. Huh, 2017: Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of Salmonella typhimurium in pork meat. *Scientific Reports*, 7, 10130.
- Olaussen, K. A., J. Adam, E. Vanhecke, P. Vielh, R. Pirker, L. Friboulet, H. Popper, A. Robin, F. Commo, J. Thomale, L. Kayitalire, M. Filipits, T. Le Chevalier, F. Andre, E. Brambilla und J. C. Soria, 2013: PARP1 impact on DNA repair of platinum adducts: preclinical and clinical read-outs. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 80, 216-222.
- Omata, Y., J. B. Lewis, P. E. Lockwood, W. Y. Tseng, R. L. Messer, S. Bouillaguet und J. C. Wataha, 2006: Gold-induced reactive oxygen species (ROS) do not mediate suppression of monocytic mitochondrial or secretory function. *Toxicology in Vitro*, 20, 625-633.
- Orino, K., L. Lehman, Y. Tsuji, H. Ayaki, S. V. Torti und F. M. Torti, 2001: Ferritin and the response to oxidative stress. *The Biochemical journal*, 357, 241-247.
- Oyadomari, S. und M. Mori, 2004: Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation*, 11, 381-389.
- Paddock, M. N., A. T. Bauman, R. Higdon, E. Kolker, S. Takeda und A. M. Scharenberg, 2011: Competition between PARP-1 and Ku70 control the decision between high-fidelity and mutagenic DNA repair. *DNA Repair*, 10, 338-343.
- Pagès, G. und J. Pouyssegur, 2005: Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors*. *Cardiovascular Research*, 65, 564-573.
- Paino, I. M., V. S. Marangoni, C. de Oliveira Rde, L. M. Antunes und V. Zucolotto, 2012: Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett*, 215, 119-125.

- Palanichamy, K., N. Sreejayan und A. C. Ontko, 2012: Overcoming cisplatin resistance using gold(III) mimics: anticancer activity of novel gold(III) polypyridyl complexes. *J Inorg Biochem*, 106, 32-42.
- Pan, Y., A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon und W. Jahnen-Dechent, 2009: Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 5, 2067-2076.
- Pan, Y., S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau und W. Jahnen-Dechent, 2007: Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3, 1941-1949.
- Panté, N. und M. Kann, 2002: Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 425-434.
- Park, E. J., J. Yi, Y. Kim, K. Choi und K. Park, 2010: Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol In Vitro*, 24, 872-878.
- Peng, H. und I. A. Chen, 2019: Rapid Colorimetric Detection of Bacterial Species through the Capture of Gold Nanoparticles by Chimeric Phages. *ACS nano*, 13, 1244-1252.
- Pfaffl, M. W., 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Phatak, V. M. und P. A. J. Muller, 2015: Metal toxicity and the p53 protein: an intimate relationship. *Toxicology Research*, 4, 576-591.
- Pietenpol, J. A. und Z. A. Stewart, 2002: Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181-182, 475-481.
- Ponti, J., R. Colognato, F. Franchini, S. Gioria, F. Simonelli, K. Abbas, C. Ubaldi, C. James Kirkpatrick, U. Holzwarth und F. Rossi, 2009: A quantitative in vitro approach to study the intracellular fate of gold nanoparticles: from synthesis to cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 3, 296-306.
- PubChem-Database, PubChem Database. 2-Benzylpyridine, CID=7581, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Benzylpyridine>, PubChem Database. 1,10-Phenanthroline, CID=1318, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_10-Phenanthroline (accessed on June 15, 2019)
- Puckett, C. A., R. J. Ernst und J. K. Barton, 2010: Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Transactions*, 39, 1159-1170.
- Pulido, M. D. und A. R. Parrish, 2003: Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation research*, 533, 227-241.
- Qian, W., X. Huang, B. Kang und M. A. El-Sayed, 2010: Dark-field light scattering imaging of living cancer cell component from birth through division using bioconjugated gold nanoprobe. *Journal of biomedical optics*, 15, 046025.
- Rakhit, R., P. Cunningham, A. Furtos-Matei, S. Dahan, X. F. Qi, J. P. Crow, N. R. Cashman, L. H. Kondejewski und A. Chakrabartty, 2002: Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 277, 47551-47556.
- Rambanapasi, C., R. J. Zeevaart, H. Buntting, C. Bester, D. Kotze, R. Hayeshi und A. Grobler, 2016: Bioaccumulation and Subchronic Toxicity of 14 nm Gold Nanoparticles in Rats. *Molecules*, 21.

- Rank, L., S. Veith, E. C. Gwosch, J. Demgenski, M. Ganz, M. C. Jongmans, C. Vogel, A. Fischbach, S. Buerger, J. M. Fischer, T. Zubel, A. Stier, C. Renner, M. Schmalz, S. Beneke, M. Groettrup, R. P. Kuiper, A. Burkle, E. Ferrando-May und A. Mangerich, 2016: Analyzing structure-function relationships of artificial and cancer-associated PARP1 variants by reconstituting TALEN-generated HeLa PARP1 knock-out cells. *Nucleic Acids Res*, 44, 10386-10405.
- Redza-Dutordoir, M. und D. A. Averill-Bates, 2016: Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2977-2992.
- Rojanathanes, R., A. Sereemasapun, N. Pimpha, V. Buasorn, P. Ekawong und V. Wiwanitkit, 2008: Gold nanoparticle as an alternative tool for a urine pregnancy test. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 47, 296-299.
- Rosenthal, D. S., R. Ding, C. M. G. Simbulan-Rosenthal, J. P. Vaillancourt, D. W. Nicholson und M. Smulson, 1997: Intact Cell Evidence for the Early Synthesis, and Subsequent Late Apopain-Mediated Suppression, of Poly(ADP-ribose) during Apoptosis. *Experimental Cell Research*, 232, 313-321.
- Ross, D. und D. Siegel, 2017: Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. *Frontiers in physiology*, 8, 595.
- Rubbiani, R., L. Salassa, A. de Almeida, A. Casini und I. Ott, 2014: Cytotoxic gold(I) N-heterocyclic carbene complexes with phosphane ligands as potent enzyme inhibitors. *ChemMedChem*, 9, 1205-1210.
- Sabella, S., V. Brunetti, G. Vecchio, A. Galeone, G. Maiorano, R. Cingolani und P. P. Pompa, 2011: Toxicity of citrate-capped AuNPs: an in vitro and in vivo assessment. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 6821-6835.
- Sabella, S., R. P. Carney, V. Brunetti, M. A. Malvindi, N. Al-Juffali, G. Vecchio, S. M. Janes, O. M. Bakr, R. Cingolani, F. Stellacci und P. P. Pompa, 2014: A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6, 7052-7061.
- Sager, T. M. und V. Castranova, 2009: Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: comparison to ultrafine titanium dioxide. *Particle and Fibre Toxicology*, 6, 15.
- Schoonbroodt, S. und J. Piette, 2000: Oxidative stress interference with the nuclear factor- κ B activation pathways. *Biochemical Pharmacology*, 60, 1075-1083.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J. C. Ame und G. de Murcia, 2006: Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 517-528.
- Schuhwerk, H., R. Atteya, K. Siniuk und Z. Q. Wang, 2017: PARPing for balance in the homeostasis of poly(ADP-ribosyl)ation. *Semin Cell Dev Biol*, 63, 81-91.
- Semisch, A., J. Ohle, B. Witt und A. Hartwig, 2014: Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Part Fibre Toxicol*, 11, 10.
- Sethi, R. und S. Jain, 2014: *PARP-A novel therapeutic target to treat cancer and inflammatory diseases*.
- Shang, L., K. Nienhaus, X. Jiang, L. Yang, K. Landfester, V. Mailander, T. Simmet und G. U. Nienhaus, 2014: Nanoparticle interactions with live cells: Quantitative fluorescence microscopy of nanoparticle size effects. *Beilstein J Nanotechnol*, 5, 2388-2397.

- Shaulian, E., M. Schreiber, F. Piu, M. Beeche, E. F. Wagner und M. Karin, 2000: The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, 103, 897-907.
- Sigman, D. S., R. Landgraf, D. M. Perrin und L. Pearson, 1996: Nucleic acid chemistry of the cuprous complexes of 1,10-phenanthroline and derivatives. *Metal ions in biological systems*, 33, 485-513.
- Simmons, S. O., C. Y. Fan, K. Yeoman, J. Wakefield und R. Ramabhadran, 2011: NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Current chemical genomics*, 5, 1-12.
- Singh, P., S. Pandit, V. R. S. S. Mokkapati, A. Garg, V. Ravikumar und I. Mijakovic, 2018: Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19, 1979.
- Sotiriou, G. A., F. Starsich, A. Dasargyri, M. C. Wurnig, F. Krumeich, A. Boss, J.-C. Leroux und S. E. Pratsinis, 2014: Photothermal Killing of Cancer Cells by the Controlled Plasmonic Coupling of Silica-Coated Au/Fe₂O₃ Nanoaggregates. *Advanced Functional Materials*, 24, 2818-2827.
- Spreckelmeyer, S., M. van der Zee, B. Bertrand, E. Bodio, S. Sturup und A. Casini, 2018: Relevance of Copper and Organic Cation Transporters in the Activity and Transport Mechanisms of an Anticancer Cyclometallated Gold(III) Compound in Comparison to Cisplatin. *Front Chem*, 6, 377.
- Stobiecka, M., J. Deeb und M. Hepel, 2010: Ligand exchange effects in gold nanoparticle assembly induced by oxidative stress biomarkers: Homocysteine and cysteine. *Biophysical Chemistry*, 146, 98-107.
- Strauch, B. M., R. K. Niemand, N. L. Winkelbeiner und A. Hartwig, 2017: Comparison between micro- and nanosized copper oxide and water soluble copper chloride: interrelationship between intracellular copper concentrations, oxidative stress and DNA damage response in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*, 14, 28.
- Strojan, K., A. Leonardi, V. B. Bregar, I. Krizaj, J. Svete und M. Pavlin, 2017: Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PLoS One*, 12, e0169552.
- Studer, A. M., L. K. Limbach, L. Van Duc, F. Krumeich, E. K. Athanassiou, L. C. Gerber, H. Moch und W. J. Stark, 2010: Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 197, 169-174.
- Sun, Y., J. Bian, Y. Wang und C. Jacobs, 1997: Activation of p53 transcriptional activity by 1,10-phenanthroline, a metal chelator and redox sensitive compound. *Oncogene*, 14, 385-393.
- Swindall, A. F., J. A. Stanley und E. S. Yang, 2013: PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers*, 5, 943-958.
- Tait, S. W. G. und D. R. Green, 2012: Mitochondria and cell signalling. *Journal of Cell Science*, 125, 807.
- Takahashi, K., P. Griem, C. Goebel, J. Gonzalez und E. Gleichmann, 1994: The Antirheumatic Drug Gold, a Coin With Two Faces: Au(I) and Au(III). Desired and Undesired Effects on the Immune System. *Metal-based drugs*, 1, 483-496.
- Tan, G. und M. A. Onur, 2018: Cellular localization and biological effects of 20nm-gold nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 106, 1708-1721.
- Tu, S., R. Wai-Yin Sun, M. C. M. Lin, J. Tao Cui, B. Zou, Q. Gu, H.-F. Kung, C.-M. Che und B. C. Y. Wong, 2009: Gold (III) porphyrin complexes induce apoptosis and cell cycle arrest and inhibit tumor growth in colon cancer. *Cancer*, 115, 4459-4469.

- Turkevich, J., P. C. Stevenson und J. Hillier, 1951: A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.
- Uboldi, C., D. Bonacchi, G. Lorenzi, M. I. Hermanns, C. Pohl, G. Baldi, R. E. Unger und C. J. Kirkpatrick, 2009: Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol*, 6, 18.
- Umair, M., I. Javed, M. Rehman, A. Madni, A. Javeed, A. Ghafoor und M. Ashraf, 2016: Nanotoxicity of Inert Materials: The Case of Gold, Silver and Iron. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 19, 161-180.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic und M. Mazur, 2006: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Vetten, M. A., N. Tlotleng, D. Tanner Rascher, A. Skepu, F. K. Keter, K. Boodhia, L. A. Koekemoer, C. Andraos, R. Tshikhudo und M. Gulumian, 2013: Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. *Part Fibre Toxicol*, 10, 50.
- Wang, D., S. Peng, A. R. Amin, M. A. Rahman, S. Nannapaneni, Y. Liu, D. M. Shin, N. F. Saba, J. F. Eichler und Z. G. Chen, 2016a: Antitumor Activity of 2,9-Di-Sec-Butyl-1,10-Phenanthroline. *PLoS One*, 11, e0168450.
- Wang, F., Y. C. Wang, S. Dou, M. H. Xiong, T. M. Sun und J. Wang, 2011: Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS nano*, 5, 3679-3692.
- Wang, M., W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang und G. Iliakis, 2006: PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research*, 34, 6170-6182.
- Wang, S.-H., C.-W. Lee, K.-C. Shen, F.-G. Tseng und P.-K. Wei, 2015: Dose dependent distribution and aggregation of gold nanoparticles within human lung adeno-carcinoma cells. *RSC Advances*, 5, 98309-98317.
- Wang, S. H., C. W. Lee, A. Chiou und P. K. Wei, 2010: Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J Nanobiotechnology*, 8, 33.
- Wang, Y.-Q., P.-Y. Wang, Y.-T. Wang, G.-F. Yang, A. Zhang und Z.-H. Miao, 2016b: An Update on Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors: Opportunities and Challenges in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 9575-9598.
- Wedler, N., 2018: Untersuchungen zur Aktivierung von PARP-1 und Wechselwirkung mit toxischen Metallverbindungen. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Wenzel, M. N., S. M. Meier-Menches, T. L. Williams, E. Ramisch, G. Barone und A. Casini, 2018: Selective targeting of PARP-1 zinc finger recognition domains with Au(iii) organometallics. *Chem Commun (Camb)*, 54, 611-614.
- Wiesel, P., L. C. Foster, A. Pellacani, M. D. Layne, C. M. Hsieh, G. S. Huggins, P. Strauss, S. F. Yet und M. A. Perrella, 2000: Thioredoxin facilitates the induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. *J Biol Chem*, 275, 24840-24846.
- Xia, Q., H. Li, Y. Liu, S. Zhang, Q. Feng und K. Xiao, 2017: The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 105, 710-719.

- Xie, S., Q. Wang, H. Wu, J. Cogswell, L. Lu, M. Jhanwar-Uniyal und W. Dai, 2001: Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J Biol Chem*, 276, 36194-36199.
- Yang, J. P., J. P. Merin, T. Nakano, T. Kato, Y. Kitade und T. Okamoto, 1995: Inhibition of the DNA-binding activity of NF-kappa B by gold compounds in vitro. *FEBS letters*, 361, 89-96.
- Yoshida, S.-i., T. Kato, S. Sakurada, C. Kurono, J.-P. Yang, N. Matsui, T. Soji und T. Okamoto, 1999: Inhibition of IL-6 and IL-8 induction from cultured rheumatoid synovial fibroblasts by treatment with aurothioglucose. *International Immunology*, 11, 151-158.
- Yueh, M. F. und R. H. Tukey, 2007: Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. *J Biol Chem*, 282, 8749-8758.
- Zamaraeva, M. V., R. Z. Sabirov, E. Maeno, Y. Ando-Akatsuka, S. V. Bessonova und Y. Okada, 2005: Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell death and differentiation*, 12, 1390-1397.
- Zhan, Q., 2005: Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569, 133-143.
- Zhang, X. D., H. Y. Wu, D. Wu, Y. Y. Wang, J. H. Chang, Z. B. Zhai, A. M. Meng, P. X. Liu, L. A. Zhang und F. Y. Fan, 2010: Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomedicine*, 5, 771-781.
- Zhang, Z., B. Zhao und L. Hu, 1996: *PVP Protective Mechanism of Ultrafine Silver Powder Synthesized by Chemical Reduction Processes*, p. 105-110.
- Zhong, L., Y. Yu, H.-z. Lian, X. Hu, H. Fu und Y.-j. Chen, 2017: Solubility of nano-sized metal oxides evaluated by using in vitro simulated lung and gastrointestinal fluids: implication for health risks. *Journal of Nanoparticle Research*, 19, 375.
- Zhou, H., C. Zheng, G. Zou, D. Tao und J. Gong, 2002: G(1)-phase specific apoptosis in liver carcinoma cell line induced by copper-1,10-phenanthroline. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 678-684.
- Zou, T., C. T. Lum, C. N. Lok, J. J. Zhang und C. M. Che, 2015: Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chem Soc Rev*, 44, 8786-8801.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Aufnahmemechanismen der Endozytose und intrazelluläre Prozessierung der internalisierten Partikel sowie mögliche Mechanismen der ROS-Generierung durch lösliche und unlösliche Metall-basierte Nanopartikel.....	11
Abbildung 2: Überblick über die biochemischen Funktionen der PARP-1.	13
Abbildung 3: Struktureller Aufbau der PARP-1.....	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Prozesse im Rahmen der DNA-Einzelstrangbruchreparatur.....	17
Abbildung 5: Postulierte Mechanismen der zytotoxischen Wirkung von PARP-Inhibitoren und deren Einfluss auf die DNA-Reparatur.	21
Abbildung 6: Repräsentative Darstellung der Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Erfassung generierter ROS.	34
Abbildung 7: Repräsentative Darstellung eines Histogramms zur Bestimmung der Anteile an apoptotischen und nekrotischen Zellen.	35
Abbildung 8: Repräsentative Darstellung eines Histogramms der Zellzyklusphasenverteilung von HeLa S3-Zellen.....	35
Abbildung 9: Repräsentative TEM-Aufnahmen der nativen Cit-Au NP Partikelsuspension (A) und einer Stammlösung der Konzentration 50 µg/mL in DMEM mit 10 % FKS (B).....	48
Abbildung 10: Größenverteilung der Cit-Au NP in nativer Suspension.....	48
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Citrat- bzw. Polyvinylpyrrolidon-stabilisierten Gold-Nanopartikel	52
Abbildung 12: Einfluss von Cit- und Pvp-stabilisierten Au NP bzw. AuCl ₃ auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen	55

Abbildung 13: Einfluss von Cit-Au NP, Pvp-Au NP und AuCl ₃ auf den ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen.)	56
Abbildung 14: Bestimmung der ROS-Induktion in HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Cit-Au NP, Pvp-Au NP oder AuCl ₃ mittels Durchflusszytometrie	58
Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen von HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 µg/mL Cit- bzw. Pvp-Au NP und Färbung der Lysosomen	60
Abbildung 16: Intrazellulärer Goldgehalt von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Cit- und Pvp-Au NP	62
Abbildung 17: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Cit, Pvp-Au NP bzw. AuCl ₃ auf die Genexpression in HeLa S3-Zellen	65
Abbildung 18: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl ₃ auf Gene der oxidativen Stressantwort.	66
Abbildung 19: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl ₃ auf Gene der DNA-Schadensantwort.....	68
Abbildung 20: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl ₃ auf Gene der Apoptoseregulation.	69
Abbildung 21: Einfluss von Cit-Au NP und AuCl ₃ auf Gene des Fremdstoffmetabolismus.	70
Abbildung 22: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf den Einbau biotinylierter ADP-Ribose isolierter PARP-1	74
Abbildung 23: Intrazellulärer Goldgehalt von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen und Aubenpy	76
Abbildung 24: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen.	78
Abbildung 25: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf den ATP-Gehalt in HeLa S3-Zellen	79
Abbildung 26: Repräsentative Abbildungen der immunfluorimetrischen Detektion von Poly(ADP-Ribose)-Ketten in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Auphen, Aubenpy, Phen, Benpy und PJ-3	82

Abbildung 27: Quantitative Auswertung der immunfluorimetrischen Analyse der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Auphen, Aubenpy, Phen, Benpy. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert.....	82
Abbildung 28: Zellulärer Gehaltes an Ribosyladenosin nach 24-stündiger Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy.....	84
Abbildung 29: Einfluss von Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf die Bindung von PARP-1 an doppelsträngige <i>forked</i> -DNA-Oligonukeotide.....	87
Abbildung 30: Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen nach 24-stündiger Inkubation von HeLa S3-Zellen mit Auphen, Phen Aubenpy bzw. Benpy	89
Abbildung 31: Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen bzw. Benpy.....	91
Abbildung 32: Western Blot-Analyse der PARP-1 in HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy	92
Abbildung 33: Bestimmung der ROS-Induktion in HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy mittels Durchflusszytometrie	94
Abbildung 34: Einfluss Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy auf die Gene <i>HMOX1</i> , <i>CDKN1A</i> und <i>JUN</i>	95
Abbildung 35: Wirkmechanismus von Cit- und Pvp-Au NP und AuCl ₃ in HeLa S3-Zellen auf Basis der Untersuchungsergebnisse.....	104
Abbildung 36: Postulierter Wirkmechanismus von Auphen, Phen (A) und Aubenpy, Benpy B) auf die PARP-Aktivität in HeLa S3-Zellen auf Basis der Untersuchungsergebnisse	110
Abbildung 37: Kopie der Herstellerangaben der Pvp-Au NP Charakterisierung.....	145
Abbildung 38: Größenverteilung der Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS.	147

Abbildung 39: Größenbestimmung der lysosomalen Partikel nach Aufnahme von Cit- (A) und Pvp-Au NP (B) in HeLa S3-Zellen.	148
Abbildung 40: Einfluss einer 0,06 % tri-Natriumcitratlösung auf die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit in HeLa S3-Zellen	148
Abbildung 41: Einfluss einer 0,06 % tri-Natriumcitratlösung auf den ATP-Gehalt von HeLa S3-Zellen.	149
Abbildung 42: Einfluss einer Iod/Kaliumiodid-Ätzlösung zur Abtrennung Membran-anhaftender Cit- und Pvp-Au NP auf den zellulären Goldgehalt	149
Abbildung 43: Zellulärer Goldgehalt von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy.....	150

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALF	<i>artificial lysosomal fluid</i>
APE1	Apurin-Apyrimidin-Endonuklease 1
APS	Ammoniumpersulfat
APTX	Aprataxin
ATP	Adenosintriphosphat
Aubenpy	[Au(2-Benzylpyridin)Cl ₂]
Au NP	Gold-Nanopartikel
Auphen	[Au(1,10-Phenanthrolin)Cl ₂]Cl
Au	Gold
BER	Basenexzisionsreparatur
Benpy	2-Benzylpyridin
bidest.	bidestilliertes Wasser
BRCT	<i>breast cancer C-terminal domain</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CDKN	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren
c-DNA	komplementäre DNA
Cit	tri-Natriumcitrat
Cq	<i>Cycle of Quantification</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI),
DDSBR	DNA-Doppelstrangbruchreparatur
D _h	Hydrodynamischer Durchmesser
DI	Dispersitätsindex
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-ON	doppelsträngige-DNA Oligonukleotide
EMSA	elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay
FEN1	<i>flap</i> Endonuklease 1
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

FSC	Vorwärtsstreulicht
gDNA	genomische DNA
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie
Gly	Glycin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish</i> Peroxidase
HT RT-qPCR	Hochdurchsatz <i>real time-quantitative polymerase chain reaction</i>
Lig1	DNA Ligase 1
Lig3α	DNA Ligase 3α
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NLS	Kernlokalisationssequenz
NP	Nanopartikel
NRC	<i>no reaction control</i>
NTC	<i>no template control</i>
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PARPL	ADP-Ribosylproteinlyase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline with Tween 20</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Phen	1,10-Phenanthrolin
PI	Propidiumiodid
PJ-34	N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-dimethylamino)acetamide
PKcs	<i>proliferation cell nuclear antigen</i>
PNKP	Polynukleotidkinase-3'-Phosphatase
Polβ	Polymerase β
Polδ/	Polymerase δ
Pole	Polymerase ε
Pvp	Polyvinylpyrrolidon
R-Ado	Ribosyladenosin

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SER	Serin
SH	Thiol
SSB	<i>single strand break</i> ; DNA-Einzelstrangbruch
SSBR	<i>single strand break repair</i> ; DNA-Einzelstrangbruchreparatur
SSC	Seitwärtsstreulicht
Strep	Streptavidin
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TPPMS	Triphenylphosphin-monosulfat
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	Ultraviolett
XPA	<i>xeroderma pigmentosum A</i>
XRCC1	<i>X-ray repair complementing protein 1</i>
Zn	Zinkfinger
ZP	Zetapotential

10.2 Verwendete Chemikalien und Instrumente

10.2.1 Chemikalien und Kits

20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
20X PARP Buffer	Trevigen (Helgerman)
10X Activated DNA	Trevigen (Helgerman)
10X PARP Cocktail	Trevigen (Helgerman)
10X Strep-Diluent	Trevigen (Helgerman)
2X Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2X TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
3-Aminobenzamide	Trevigen (Helgerman)
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
Acetonitril LC-MS <i>grade</i>	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 40 % (Rotiphorese® Gel (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
Alkalische Phosphatase	Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V	Merck Millipore (Darmstadt)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Annexin V FITC-konjugiert	Biolegend (London)
BD FACSDiva CS&T	BD (Heidelberg)
Borsäure (≥ 99,8 %)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	VWR (Darmstadt)
CasyTon®	Omni Life Science (Bremen)
CellTiter-Glo® Buffer	Promega (Madison)
CellTiter-Glo® Substrate	Promega (Madison)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA Suspension Buffer	TEKnova (Kristiansand)
DNase	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat ($\geq 99\%$) ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol 80 %ig und 96 %ig	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/ μL)	New England BioLabs (Frankfurt)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England BioLabs (Frankfurt)
FACS Flow	BD (Heidelberg)
FACS Rinse	BD (Heidelberg)
Fetales Kälberserum 10 %ig (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
Giemsa®-Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
Glycin ($\geq 99\%$)	Roth (Karlsruhe)
Gold(III)-chlorid (99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gold(III)-chlorid Trihydrat ($\geq 99,9\%$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gold pure single element standard (10 % HCl)	Perkin Elmer (Waltham)
HAT Universal Colorimetric PARP Assay Kit	Trevigen (Helgerman)
Igepal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Iod in wässriger Lösung (0,1N)	VWR (Darmstadt)
i/qScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
Kaliumhydroxid ($\geq 99,5\%$)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumjodid ($\geq 99,5\%$)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumacetat ($\geq 98\%$)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid ($\geq 98,5\%$)	Roth (Karlsruhe)
Methanol ($\geq 99,5\%$)	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver ($\geq 99,5\%$)	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid ($\geq 99,5\%$)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10 %)	AppliChem (Darmstadt)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Oligonuklotide	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Orange G	AppliChem (Darmstadt)
<i>PageRuler prestained</i> , Größenmarker	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
PARP-HSA (10 U/ μL)	Trevigen (Helgerman)
PCR <i>Certified Water</i>	Trevigen (Helgerman)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (P.: 5000 U/ml, S.: 5 mg/l)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phosphodiesterase	Affymetrix (Santa Clara)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Propidiumiodid (1 mg/mL in wässriger Lösung)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Protease-Inhibitor	Roche (Basel)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNase Away	VWR (Darmstadt)
RNase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Roche High Pure miRNA Isolation Kit	Roche (Mannheim)
Salpetersäure (ROTIPURAN®Supra 69 %)	Roth (Karlsruhe)
Sazsäure (32 %, reinst)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 4 N	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	BioRad (München)
Strep-HRP	Trevigen (Helgerman)
SYBR Green Supermix	VWR (Darmstadt)
TACS-Sapphire	Trevigen (Helgerman)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
ToxinSensor™ Gel Clot Endotoxin Assay Kit	Genscript (Piscataway)
Trichloressigsäure (≥ 99 %)	Roth (Karlsruhe)
tri-Natriumcitrat Dihydrat (≥ 99 %)	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (≥ 99,5 %)	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (PUFFERAN® ≥99,9 %, p.a.)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10 % Lsg.	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Tween®20	Roth (Karlsruhe)
VECTASHILD Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid Suprapur® (30 %)	Merck Millipore (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)

10.2.2 Antikörper

<i>anti</i> -PAR (10H) <i>mouse</i> monoklonal (1/800 in Blockierlösung)	Abcam (Cambridge)
<i>goat anti-mouse</i> IgG H&L (HRP Konjugat) (1/500 in Blockierlösung)	Santa Cruz (Dallas)
<i>goat anti-mouse</i> IgG H&L (Alexa Fluor® 488 konjugiert) (1/500 in Blockierlösung)	Abcam (Cambridge)
PARP-1 (F-2) <i>mouse</i> monoklonal (1/500 in Blockierlösung)	Santa Cruz (Dallas)
α -Tubulin <i>mouse</i> monoklonal IgG1 (1/500 in Blockierlösung)	Santa Cruz (Dallas)

10.2.3 Lösungen und Puffer

Partikelsynthese

Gold(III)-chlorid Trihydrat	0,5 mM in bidest. Wasser
tri-Natriumcitrat	1 % (Massenanteil $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$) in bides.Wasser

Zellkultur

PBS (pH 7,4)	5,84 g NaCl (100 mM) 0,334 g KCl (4,5 mM) 0,99 g Na_2HPO_4 (7 mM) 0,41 g KH_2PO_4 (3 mM) in 1 L bidest. Wasser
PBS-EDTA	0,005 M Na_2 -EDTA in PBS
Trypsin –Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

Aufnahmeuntersuchungen

Ätzlösung (Iod/Kaliumiodidlösung) in PBS	1,47 mL Iod in wässriger Lösung (340µM) 67,73 mg Kaliumiodid (2,04 mM) in 200 mL PBS
Matrixmodifizier	0,005 mg Palladiumstandard 0,003 mg Magnesiumstandard in 0,2 % HCl (pro Messung)

Bestimmung der Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen

Ringer-Lösung	147 mM NaCl 402 mM KCl 297 mM CaCl ₂
---------------	---

SDS-PAGE und Western Blot

10x Protease-Inhibitor	Eine Tablette in 1 mL bidest. Wasser
Proteinextraktionslösung	TRIS-HCl (50 mM) NaCl (250 mM) EDTA (1 mM) Triton X-100 (0,1 %) Protease-Inhibitor-Cocktail (10x)
Trenngel (10 %) (Gelstärke 1 mm)	1,5 mL TRIS (1 M, pH 8,8) 60 µL SDS (10 %) 60 µL Glycerol 120 µL EDTA (0,1 M) 1,5 mL Acrylamid (40 %) 60 µL APS (10 %) 6 µL TEMED in 2,694 mL bidest. Wasser
Sammelgel (4 %) (Gelstärke 1 mm)	0,5 mL TRIS (1 M, pH 6,8) 40 µL SDS (10 %) 80 µL EDTA (0,1 M) 10 µL Bromphenolblau 0,4 mL Acrylamid (40 %) 40 µL APS (10 %) 10 µL TEMED in 2,93 mL bidest. Wasser

1x Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % Methanol
Transferpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin
PBST	0,05 % Tween®20 in PBS

Elektromobilitäts Shift Assay

5 % Acrylamidgel (Gelstärke 1 mm)	800 µL Acrylamid (40 %) 80 µL APS (10 %) 20 µL TEMED 7,1 mL TBE-Puffer (0,5x)
0,5 x TBE Puffer	53,91 g TRIS Base 27,51 g Borsäure 3,72 g Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O in 1 L bidest. H ₂ O
10 X Ladepuffer	800 µL Glycerol 1 mg Orange G 10 µL Bromphenolblau in 2 mL bidest. H ₂ O
EMSA-Puffer (pH 8)	0,63 g TRIS-HCl (40 mM) 0,077 g DTT (5mM) 0,038 g MgCl ₂ (4 mM) 0,01 g BSA (0,1 mg/mL) 100 µL Igopal (0,1 %) in 100 mL bidest. H ₂ O
M-TNT Puffer	2,5 g Milchpulver in 50 mL TNT-Puffer
TNT-Puffer (pH 7,5)	15,46 g TRIS-HCl (0,1 M) 8,77 g NaCl (0,15 M) 50 µL Tween®20 (0,05 %) in 1 L bidest. H ₂ O

10.3 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten, transparent	TPP (Transadingen)
96-Well-Platten Nunc™, weiss	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Amersham Nitrocellulose Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Casy-Cups	Omni Life Science (Bremen)
Deckgläschen (Ø 15 mm)	Roth (Karlsruhe)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen (5 mL)	Terumo (Eschborn)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon Tubes (3,5 mL)	BD (Heidelberg)
Glaspipetten (1,2,5,10 und 20 mL)	Roth (Karlsruhe)
Handschuhe (Latex)	VWR (Darmstadt)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Richmond)
Kryoröhrchen	Roth (Karlsruhe)
Magnetrührstäbe	Roth (Karlsruhe)
Multiply®-µStrip (8er Kette)	Sarstedt (Nümbrecht)
Nylon-Membran (0,2 µM)	Merck Millipore (Darmstadt)
Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen LTS 20 µL	Mettler Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen, 1-20 µL	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen, 1-200 µL	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Polyvinylidenfluorid Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel, 20 mL und 50 mL	Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter (500 mL), 0,2 µM, PES	VWR (Darmstadt)
Sterilindikatorband (Autoklav, Heißluftsterilisator)	Roth (Karlsruhe)
TEM <i>Grids</i> (Kohlefilm auf 400 mesh Cu-Netzchen)	Ted Pella (USA)
Vernichtungsbeutel	VWR (Darmstadt)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe)
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Dassel)

Zellkulturschalen, (Ø 15 cm, Ø 10 cm, Ø 6 cm, Ø 3,5 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	VWR (Darmstadt)

10.4 Instrumente und Software

LC-MS/MS-System

Pumpe, Autosampler Waters 2690	Waters (Milford, USA)
Säulenofen	Beckman Coulter (Krefeld)
Micromass Quattro Micro Tandem Quadrupol MS	Waters (Milford, USA)

Instrumente

Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham)
Autoklav D-150	Systec (Linden)
Axio Imager Z2	Zeiss (Oberkochen)
Axio Observer	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen)
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Blotting Kammer	Peqlab (Erlangen)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	Omni Life Science (Bremen)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Cryo 1°C Cooler	VWR (Darmstadt)
Elektrophorese Kammer	BioRad (München)
Elektrophorese Stromgerät	BioRad (München)
Eppendorf Pipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf (Hamburg)
Evaporator	Thermo Scientific (Langenselbold)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR (Darmstadt)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
Heizschüttler MKR 13	HLC-BioTech (Bovenden)
Heizschüttler SH 26	Cat (Staufen)
Heizschüttler TS-100	Peqlab (Erlangen)

Hypersil Gold aQ <i>column</i> (150 mm x 2.1 mm, Partikelgröße 3 µm)	Thermo Scientific (Langenselbold)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Gerlingen)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Güterloh)
LAS 3000	Raytest (Straubenhardt)
Durchflusszytometer LSRII Fortessa FACS	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Magnetrührer Variomag® Poly Komet	VWR (Darmstadt)
Megafrage 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Multipette® Pipette Lite XLS 0,5-10 µL	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Labinco B.V. (Brenda)
Rotator	Labinco B.V. (Brenda)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
Taumler	Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Thermal Cycler C100 (CFX 96 Real Time System)	BioRad (München)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memert (Schwabach)

Software

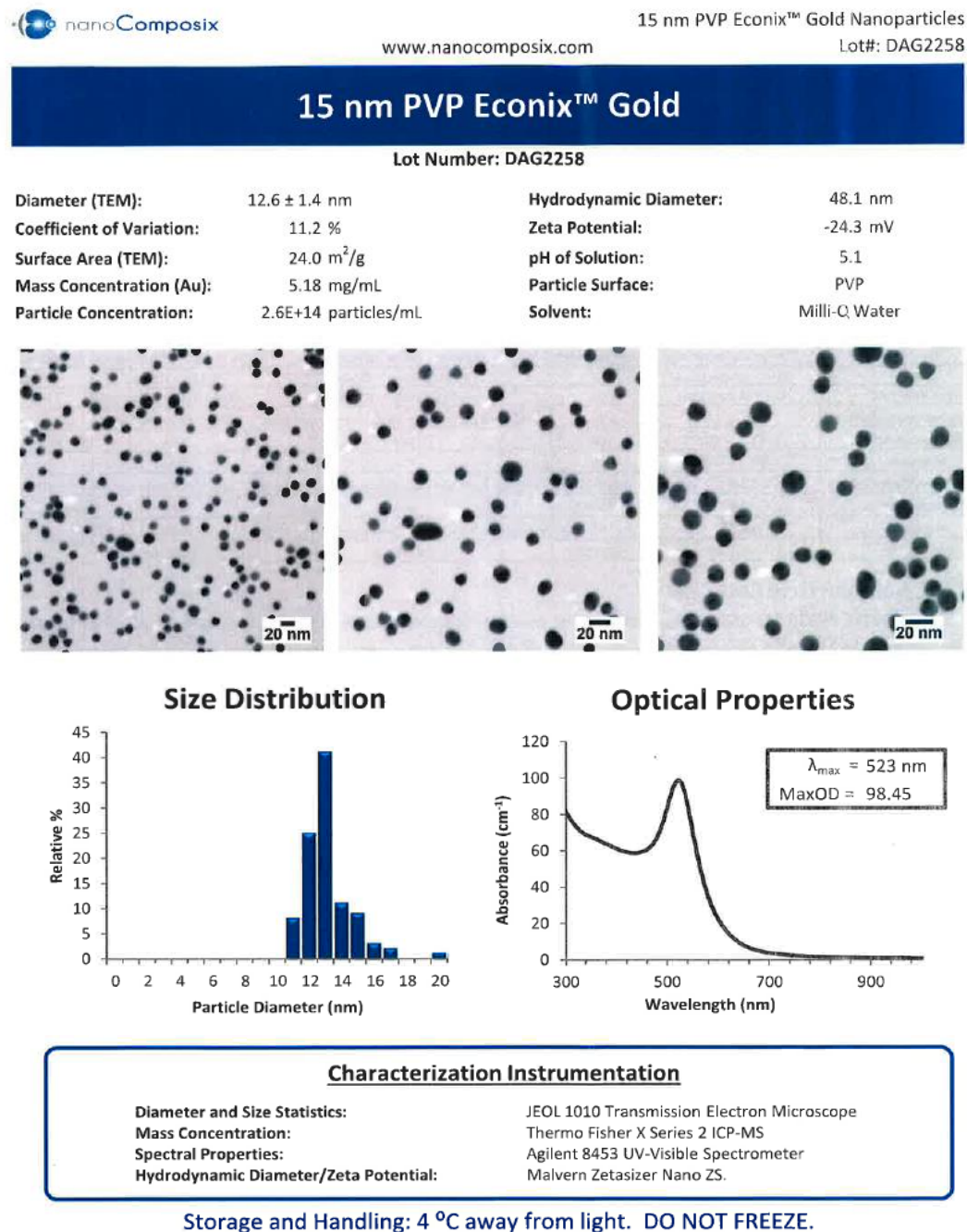
AA Winlab 322	Perkin Elmer (Rotgau)
AIDA Image Analyzer	Raytest (Straubenhardt)
AxioVision (Rel. 4.9.1)	Zeiss (Oberkochen)
BD FACSDiva™	BD (Heidelberg)
Fluidigm Real Time PCR Analysis	Fluidigm (San Francisco)
GenEx	MultiD Analyses (Gotberg)
Image J	Open Source
SPSS	SPSS Statistics (Chicago)
OriginLab	OriginLab (Northampton)

ZEN2

Zeiss (Oberkochen)

10.5 Ergänzende Daten

10.5.1 Herstellerangaben der Partikelcharakterisierung der Pvp-Au NP



nanoComposix, Inc.
4878 Ronson Ct. Suite K
San Diego, CA 92111

For more information visit: www.nanocomposix.com

support@nanocomposix.com
Phone: (858) 565-4227
Fax: (619) 330-2556

Abbildung 37: Kopie der Herstellerangaben der Pvp-Au NP Charakterisierung.

10.5.2 Genset der HT RT-qPCR-Methode

In Tabelle 12 sind die Gene der verwendeten HT RT-qPCR aufgelistet. Die Primersequenzen können Fischer (2016) entnommen werden.

Tabelle 12: Auflistung der mittels HT RT-qPCR untersuchten Gene.

Referenzgene	Metall-homöostase	Oxidative Stressantwort	Apoptotische Faktoren/ Zellzyklus-regulatoren	DNA-Schadens-antwort und Reparatur	Fremdstoff-metabolismus
<i>ACTB</i>	<i>FTH1</i>	<i>CAT</i>	<i>APAF1</i>	<i>APEX1</i>	<i>ABCB1</i>
<i>B2M</i>	<i>MT1X</i>	<i>G6PD</i>	<i>AXIN2</i>	<i>ATM</i>	<i>ABCC1</i>
<i>GAPDH</i>	<i>MT2A</i>	<i>GCLC</i>	<i>BAX</i>	<i>ATR</i>	<i>ADH1B</i>
<i>GUSB</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GPX1</i>	<i>BBC3</i>	<i>BRCA1</i>	<i>ALDH1A1</i>
<i>HPRT1</i>	<i>TFRC</i>	<i>GPX2</i>	<i>BCL2</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CYP1A1</i>
		<i>GSR</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>DDB1</i>	<i>EPHX1</i>
		<i>HMOX1</i>	<i>BTRC</i>	<i>DDB2</i>	<i>GSTP1</i>
		<i>HSPA1A</i>	<i>CCND1</i>	<i>DDIT3</i>	<i>NAT1</i>
		<i>IL8</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>ERCC1</i>	<i>NQO1</i>
		<i>KEAP1</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>ERCC2</i>	<i>SULT1A1</i>
		<i>MAP3K5</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>ERCC4</i>	<i>UGT1A</i>
		<i>NFE2L2</i>	<i>E2F1</i>	<i>ERCC5</i>	
		<i>NFKB1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GADD45A</i>	
		<i>NFKB2</i>	<i>JUN</i>	<i>LIG1</i>	
		<i>NFKBIA</i>	<i>MDM2</i>	<i>LIG3</i>	
		<i>PRDX1</i>	<i>MYC</i>	<i>MGMT</i>	
		<i>SEPP1</i>	<i>PLK3</i>	<i>MLH1</i>	
		<i>SOD1</i>	<i>PMAIP1</i>	<i>MSH2</i>	
		<i>SOD2</i>	<i>PPM1D</i>	<i>OGG1</i>	
		<i>TXN</i>	<i>SIRT2</i>	<i>PARP1</i>	
		<i>TXNRD1</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>PCNA</i>	
			<i>TP53</i>	<i>POLB</i>	
			<i>VEGFA</i>	<i>POLD1</i>	
			<i>XIAP</i>	<i>RAD50</i>	
				<i>RAD51</i>	
				<i>RRM2B</i>	
				<i>XPA</i>	
				<i>XPC</i>	
				<i>XRCC5</i>	

10.5.3 Ergänzende Daten zur Bestimmung des Goldgehaltes mittels GF-AAS

Die Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze wurde nach der Leerwertmethode der DIN 32645 bestimmt. Es wurden zehn Leerwerte (0,2 % HCl) gemessen, hierbei wurde der Goldgehalt je Leerwertprobe dreimal bestimmt.

Tabelle 13: Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze nach der Leerwertmethode der DIN 32645.

	Schnellschätzung	Berechnung nach DIN 32645
Nachweisgrenze Au ($\mu\text{g/mL}$)	0,16	0,05
Erfassungsgrenze Au ($\mu\text{g/mL}$)	0,31	0,11
Bestimmungsgrenze Au ($\mu\text{g/L}$)	1,56	0,51

10.5.4 Partikelgrößenverteilung von Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS

Dargestellt ist die Partikelgrößenverteilung von Cit-Au NP ($50 \mu\text{g/mL}$) in DMEM mit 10 % FKS.

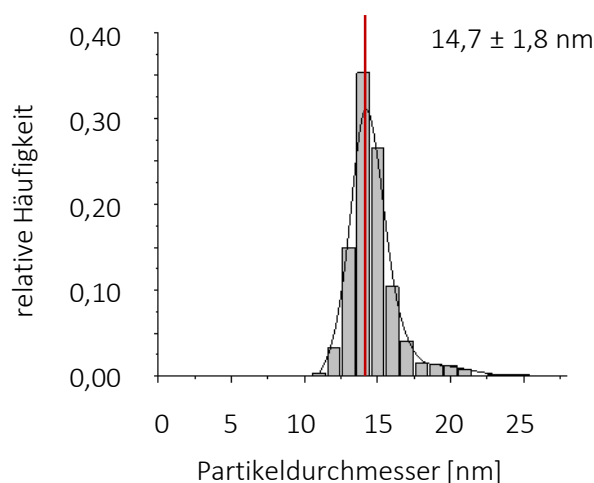


Abbildung 38: Größenverteilung der Cit-Au NP in DMEM mit 10 % FKS. Dargestellt ist der Mittelwert der Durchmesser von ≥ 500 Partikeln ($50 \mu\text{g/mL}$ in DMEM mit 10 % FKS) aus zwei Syntheseansätzen $\pm$ SD.

10.5.5 Mikroskopische Größenabschätzung der lysosomalen Vesikel

Dargestellt ist die mit Hilfe der Bildauswertungssoftware ZEN 2 abgeschätzte Größe von Lysosomen in HeLa-S3 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 mg/mL Cit- bzw. Pvp-Au NP.

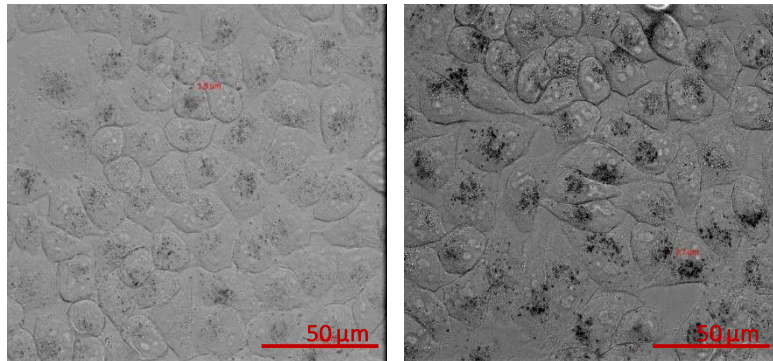


Abbildung 39: Größenbestimmung der lysosomalen Partikel nach Aufnahme von Cit- (A) und Pvp-Au NP (B) in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µg/mL der entsprechenden Partikel inkubiert und die Lysosomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® Deep Red gefärbt. Die Größenabschätzung der lysosomalen Vesikel erfolgte mit Hilfe der Bildauswertungssoftware ZEN 2 im Durchlichtkanal und ergab eine Größe der Lysosomen von circa 2-3 µm (rechts 1,9 µm, links 2,7 µm). Dargestellt sind die überlagerten Aufnahmen im Durchlichtkanal.

10.5.6 Zytotoxizität von tri-Natriumcitrat

Um den Einfluss des Stabilisierungsgens tri-Natriumcitrat sowie den Verdünnungseffekt des Zellkulturmediums auf HeLa S3-Zellen zu untersuchen, wurden die gleichen Volumenanteile (0,03, 0,13, und 0,3) der tri-Natriumcitratlösung eingesetzt, wie bei den Behandlungen mit 5, 20 und 50 µg/mL der Cit-Au NP Suspension. Die Inkubation mit 0,06 % tri-Natriumcitratlösung, welche zur Partikelsynthese der Cit-Au NP verwendet wurde, zeigte keinen Einfluss auf die Zellzahl, Koloniebildungsfähigkeit und den ATP-Gehalt von HeLa S3-Zellen (Abbildung 40 und 41).

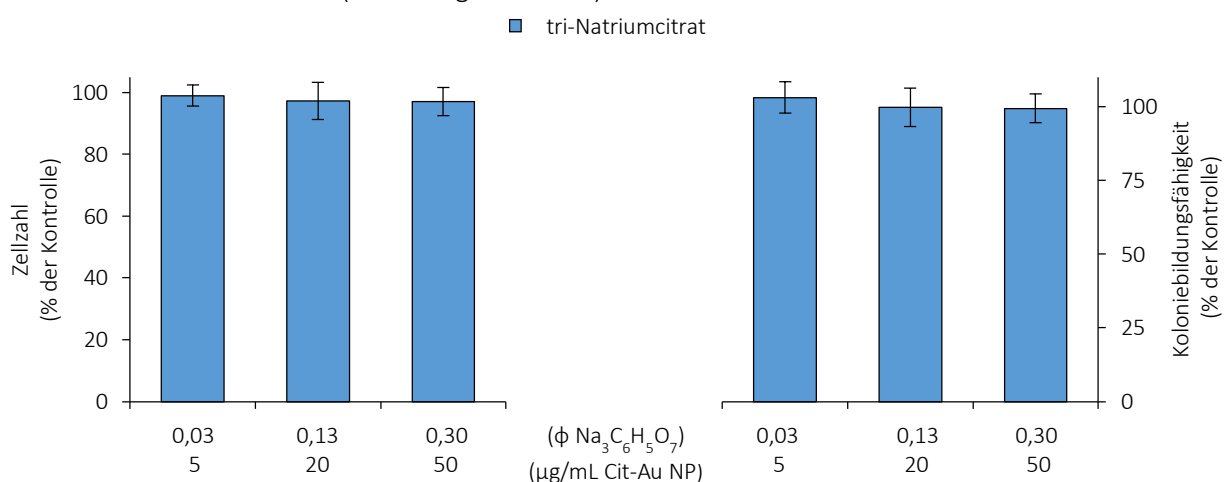


Abbildung 40: Einfluss einer 0,06 % tri-Natriumcitratlösung auf die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit in HeLa S3-Zellen. Die tri-Natriumcitratlösung wurde in den gleichen Volumenanteilen (ϕ) der Inkubationsvolumina mit 5, 20 und 50 µg/mL der Cit-Au NP Suspension eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit der 0,06 % Natriumcitratlösung inkubiert, gezählt und für die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit weitergesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten $\pm$ SD aus drei unabhängigen Versuchen.

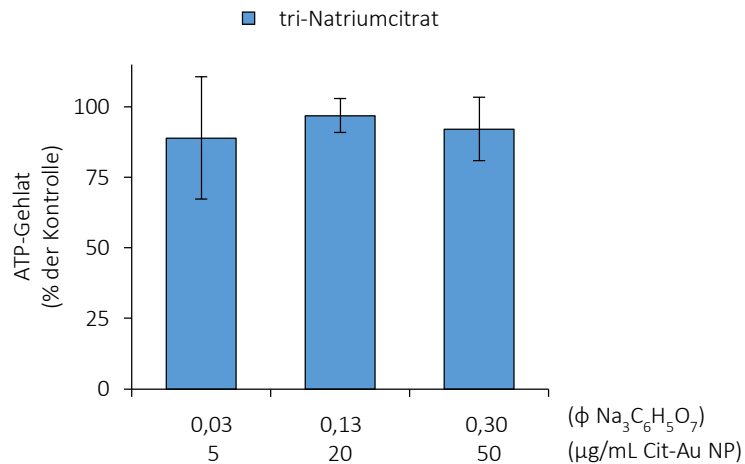


Abbildung 41: Einfluss einer 0,06 % tri-Natriumcitratlösung auf den ATP-Gehalt von HeLa S3-Zellen. Die tri-Natriumcitratlösung wurde in den gleichen Volumenanteilen (φ) der Inkubationsvolumina mit 5, 20 und 50 µg/mL der Cit-Au NP Suspension eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit der 0,06 % Natriumcitratlösung inkubiert und der zelluläre ATP-Gehalt luminometrisch gemessen und auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Werten ± SD aus drei unabhängigen Versuchen.

10.5.7 Abtrennung membranständiger Au NP mit einer Ätzlösung

Um nur die intrazelluläre Fraktion der Cit- und Pvp-Au NP zu bestimmen wurden die Zellen im Rahmen der Aufnahmeuntersuchungen bei Abbruch des Experiments für zwei Minuten mit einer Ätzlösung aus Iod/Kaliumiodid behandelt. In Abbildung 42 ist der Vergleich der zellulären Goldgehalte mit und ohne Abtrennung der membranständigen Partikel durch die Ätzlösung dargestellt. Bei den Behandlungen mit Pvp- und Cit-Au NP konnten deutlich reduzierte Goldgehalte durch Abtrennung der membranständigen Partikel bestimmt werden. Die Ätzlösung zeigte keinen Einfluss auf den Goldgehalt nach Inkubation mit der löslichen Substanz AuCl₃.

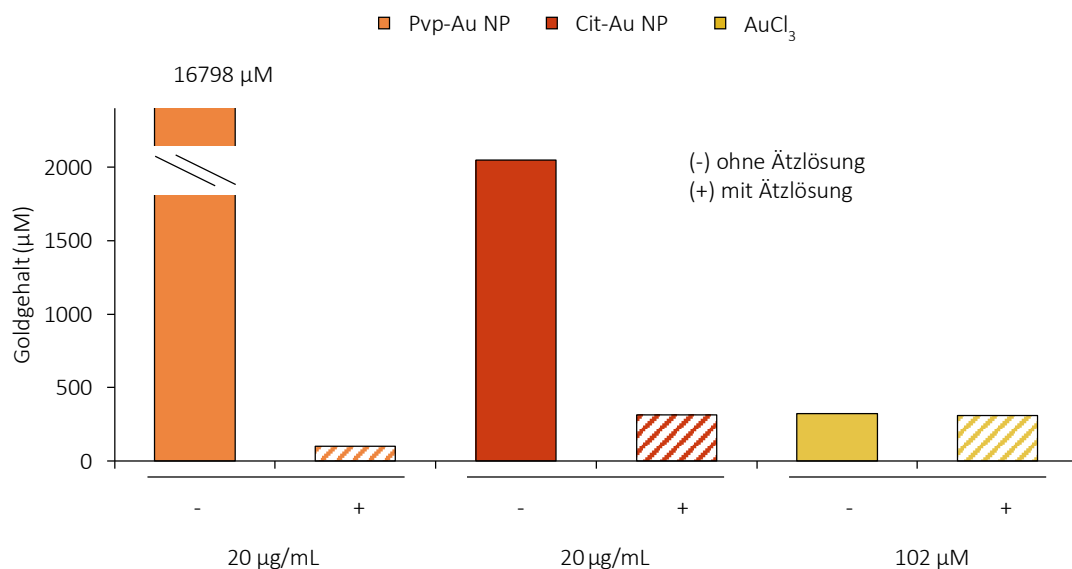


Abbildung 42: Einfluss einer Iod/Kaliumiodid-Ätzlösung zur Abtrennung Membran-anhaftender Cit- und Pvp-Au NP auf den zellulären Goldgehalt. HeLa S3-Zellen wurden für vier Stunden mit 20 µg/mL Cit-, Pvp-Au NP bzw. 102 µM AuCl₃ inkubiert. Bei Abbruch des Experiments wurde je Inkubationsansatz eine Probe mit (+) und ohne (-) Behandlung mit der Iod/Kaliumiodid-Ätzlösung mitgeführt und anschließend der Goldgehalt mittels GF-AAS analysiert.

10.5.8 Zellulärer Goldgehalt nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy

Nach Inkubationen mit den Liganden konnte, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, kein Anstieg des zellulären Goldgehaltes beobachtet werden.

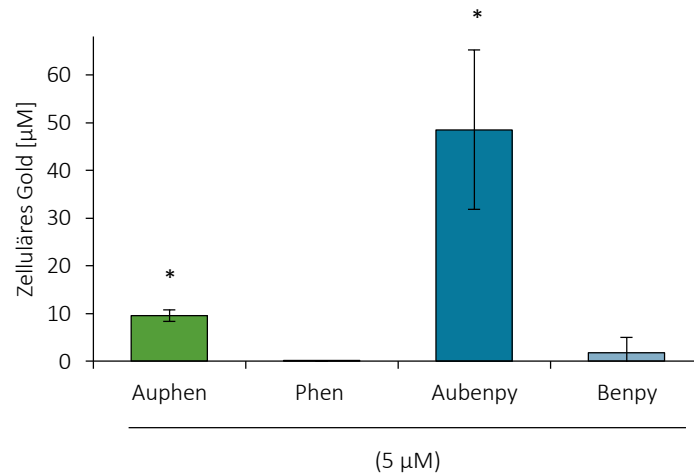


Abbildung 43: Zellulärer Goldgehalt von HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Auphen, Aubenpy, Phen und Benpy. HeLa S3-Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 µM Auphen, Aubenpy, Phen bzw. Benpy inkubiert. Die Quantifizierung des zellulären Goldgehaltes erfolgte mittels GF-AAS. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen $\pm$ SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach T-Test (* $p \leq 0,05$).

11 Publikationsliste

Publikationen in Vorbereitung

Fischer B. M., Hubele W., Hartwig A. „*Impact of endocytosis and lysosomal acidification on mechanistic toxicity of copper oxide nanoparticles: modulation of gene expression related to genomic stability and cellular uptake*“

Hubele W., Feye J., Seifert T., Roesky P., Hartwig A. „*Impact of gold(III) complexes and corresponding ligands on the PARP-activity in subcellular and cellular systems*“

Hubele W., Kartman N., Hartwig A. „*Comparision of toxic effects mediated by soluble gold compounds and bioinert gold nanoparticles*“

Beiträge auf Fachtagungen

Hubele W., Strauch. B.M., Hartwig A., *Impact of different endocytosis mechanisms on the uptake of nano- and microscaled copper oxide particles*. 29. GUM Meeting der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V., München (2016)

Hubele W., Schilling V., Seifert T., Roesky P., Hartwig A. *Impact of gold complexes on the poly(ADP-ribosyl)ation activity of PARP-1*. DNA Repair, 15th Biennal Meeting of the DGDR, Karlsruhe (2018)