

**Von Polysulfanen, hochreaktiven S₈-Nanopartikeln und
organochalkogenhaltigen Redoxkatalysatoren:
Identifizierung und Charakterisierung neuer, potentieller
Wirkmechanismen und intrazellulärer Targets**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

-Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften-

der Universität des Saarlandes

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Thomas Schneider

Saarbrücken

2012

Diese Doktorarbeit entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. Claus Jacob in der Fachrichtung 8.2 Pharmazie (Bioorganische Chemie) der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2011.

Tag des Kolloquiums: 07. November 2012

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Berichterstatter: Prof. Dr. Claus Jacob

Prof. Dr. Ingolf Bernhardt

Prof. Dr. Gilbert Kirsch

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller

Akad. Mitarbeiterin: Dr. Britta Diesel

Für meine Großmutter

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Claus Jacob** für die Möglichkeit, diese Dissertation im Fachbereich Pharmazie, Fachrichtung Bioorganische Chemie, durchzuführen und für die Überlassung des sehr interessanten Themas.

Im selben Umfang danke ich **Herrn Prof. Dr. Ingolf Bernhardt** für die Übernahme des Koreferates sowie **Herrn Prof. Dr. Uli Müller** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein weiterer großer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Gilbert Kirsch** von der Universität Metz für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit im Interreg-Projekt IVA „Corena“ der EU sowie für die Übernahme des externen Gutachtens.

Des Weiteren danke ich **Frau Dr. Britta Diesel** für die Teilnahme am Prüfungsausschuss als akademische Mitarbeiterin.

Ferner danke ich **Herrn Dr. Florenz Sasse** sowie dem **gesamten Team** der Chemischen Biologie für die tolle Zeit am HZI in Braunschweig sowie die ausgezeichnete Betreuung und die hilfreiche Unterstützung bei Fragen jeder Art.

Torsten, Hamdoon, Mandy, Aicha, Khairan, Vincent, Brigitte, Peng, Zhanjie und den anderen **Mitarbeitern** und **Mitarbeiterinnen** des Arbeitskreises Jacob danke ich für die gute und teils unterhaltsame Zusammenarbeit im Labor.

Ein weiterer Dank gilt allen **internen** und **externen** Kooperationspartnern, ohne die eine schnelle und erfolgreiche Veröffentlichung der Ergebnisse nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt meinen **Eltern**, die mir erst das Studium und dann die anschließende Promotion ermöglicht haben und mir in jeder Lebenslage tatkräftig zur Seite standen.

Last but not least danke ich meiner **Freundin Maria** für ihren großen Beistand, ihren aufmunternden Humor sowie ihr aufgebrachtes Verständnis in den letzten Jahren.

Eingeflossene Publikationen

Die vorgelegte kumulative Dissertation gliedert sich in drei Publikationen, welche durch römische Zahlen gekennzeichnet sind:

I. Interactions of polysulfanes with components of red blood cells

Thomas Schneider, Lalla A. Ba, Khairan Khairan, Clemens Zwergel, Nguyen Duc Bach, Ingolf Bernhardt, Wolfgang Brandt, Ludger Wessjohann, Marc Diederich and Claus Jacob

Medicinal Chemistry Communications (2011) 2, 196-200.

Auszeichnung des Manuskriptes als **‘Hot article’** von der Royal Society of Chemistry.

II. Selective antimicrobial activity associated with sulfur nanoparticles

Thomas Schneider, Alexander Baldauf, Lalla A. Ba, Vincent Jamier, Khairan Khairan, Mohammed Bader-Sarakbi, Nico Reum, Marc Schneider, Anne Röseler, Katja Becker, Torsten Burkholz, Paul G. Winyard, Mareike Kelkel, Marc Diederich, and Claus Jacob

Journal of Biomedical Nanotechnology (2011) 7, 395-405.

III. Deciphering intracellular targets of organochalcogen based redox catalysts

Thomas Schneider, Yazh Muthukumar, Bettina Hinkelmann, Raimo Franke, Mandy Döring, Claus Jacob and Florenz Sasse

Medicinal Chemistry Communications (2012) 3, 784-787.

Stellungnahme über die geleisteten Beiträge des Autors

Der Autor möchte zu den Publikationen (**I-III**) in der Doktorarbeit Stellung beziehen:

I.

Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der Polysulfane. Planung und Durchführung der angewandten Methoden (*in vitro* Assays, experimentelle und theoretische Bestimmung der $\log P$ -Werte, Zirkular-Dichroismus- und UV-Vis-Spektroskopie, FACS-Analyse). Interpretation der Ergebnisse. Konzipieren und (Mit)-Verfassen des Manuskriptes.

Durchführung der molekularen Docking-Studien durch Herrn PD Dr. Wolfgang Brandt vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale).

II.

Synthese und Aufreinigung der Schwefel- und Selen-Nanopartikel sowie der tellurhaltigen Nanodrähte. Charakterisierung der Nanopartikel bzw. Nanodrähte mittels Zetasizer und TEM/XRD-Analyse. Elektrochemische Charakterisierung der synthetisierten Nanopartikel bzw. Nanodrähte. Planung der weiteren angewandten Methoden. Interpretation der Ergebnisse. Konzipieren und (Mit)-Verfassen des Manuskriptes.

Durchführung des Screenings der Nanopartikel bzw. Nanodrähte in verschiedenen biologischen Modellen durch Herrn Alexander Baldauf (ehemaliger von mir betreuter Wahlpflichtpraktikant), Herrn Khairan Khairan, Frau Dr. Anne Röseler, Herrn Dr. Torsten Burkholz sowie Frau Dr. Mareike Kelkel.

Bereitstellung der Gold- und PLGA-Nanopartikel durch Herrn Dr. Nico Reum.

III.

Planung und Durchführung der High Content Analyse (Impedanz-Messungen, (zellbasierte) *in vitro* Methoden, Fluoreszenz-Mikroskopie, Durchflusszytometrie, SDS-PAGE, Western-Blots, chemogenetisches Screening). Interpretation aller Ergebnisse sowie Konzipieren und (Mit)-Verfassen des Manuskriptes.

Bereitstellung der tellurhaltigen Redoxkatalysatoren durch Frau Mandy Döring.

Durchführung der Cluster-Analyse durch Herrn Dr. Raimo Franke.

Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen (Bakterien und Pilze) durch Frau Bettina Hinkelmann.

Weitere Publikationen des Autors, die nicht Bestandteil dieser Dissertation sind:

- **Exploring synthetic avenues for the effective synthesis of selenium- and tellurium- containing multifunctional redox agents**

S. Mecklenburg, S. Shaaban, L. A. Ba, T. Burkholz, **T. Schneider**, B. Diesel, A. K. Kiemer, A. Roseler, K. Becker, J. Reichrath, A. Stark, W. Tilgen, M. Abbas, L. A. Wessjohann, F. Sasse, C. Jacob, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4753-4762.

- **Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast**

M. C. Gruhlke, D. Portz, M. Stitz, A. Anwar, **T. Schneider**, C. Jacob, N. L. Schlaich, A. J. Slusarenko, *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 1916-1924.

- **ROS-independent JNK activation and multi-site phosphorylation of Bcl-2 link diallyltetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis**

M. Kelkel, C. Cerella, F. Mack, **T. Schneider**, C. Jacob, M. Dicato, M. Diederich, *Carcinogenesis* **2012**, accepted.

- **From Phenotype to Mode of Action: Novel Bioinformatics Methods to use Cellular Impedance Measurements for Drug Discovery**

M. Fountain, T. Schulze, **T. Schneider**, B. Hinkelmann, F. Sasse, F. Klawonn, C. Jacob, R. Franke, *Nature Communications* **2012**, in preparation.

Reviews:

- **Role of Cysteine**

L. A. Ba, T. Burkholz, T. Schneider, C. Jacob

For: **Amino acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry.**

Vol.5: Analysis and Function of Amino Acids and Peptides.

A. B. Hughes, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2011.

- **Natural sulfur products as redox modulators and selective inducers of cell death**

T. Schneider, L. A. Ba, B. Czepukojc, V. Jamier, C. Jacob

For: **Natural compounds as inducers of cell death**

M. Diederich, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2012.

1	EINLEITUNG	2
1.1	Redoxmodulation: Altes Target in neuem Licht	2
1.2	Schwefelhaltige Naturstoffe der <i>Allium</i> Spezies	4
1.3	Chalkogenhaltige Nanostrukturen	10
1.3.1	Schwefel-Nanopartikel	10
1.3.2	Selen-Nanopartikel.....	10
1.3.3	Tellurhaltige Nanostrukturen	11
1.4	Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)	12
1.4.1	Allgemeines.....	12
1.4.2	Bildung Reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS)	12
1.4.3	ROS induzierte Mechanismen in Krebszellen und normalen Zellen.....	13
1.5	Multifunktionale Sensor-/Effektor-Katalysatoren	15
1.5.1	Einteilung der redox-modulierenden Substanzen in drei verschiedene Wirkstoffklassen.....	15
1.5.2	Literaturbekannte Verbindungen der drei Wirkstoffklassen	17
1.6	Biologische Modelle	20
1.6.1.	Rote Blutzellen (RBCs).....	20
1.6.2	Eukaryontisches Modell.....	25
1.6.3	Backhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.6.4	Nematoden	29
1.6.5	Malaria-Erreger <i>Plasmodium falciparum</i>	31
2	ZIEL der Arbeit	33
3	ERGEBNISSE und DISKUSSION	34
3.1	Interactions of polysulfanes with components of red blood cells	35
3.2	Selective antimicrobial activity associated with sulfur nanoparticles	36
3.3	Deciphering intracellular targets of organochalcogen based redox catalysts	37
4	ZUSAMMENFASSUNG	38
5	SUMMARY	39
6	AUSBLICK	40
7	ANHANG	42
7.1	Abkürzungsverzeichnis	42
7.2	Literaturverzeichnis	47

1 EINLEITUNG

1.1 Redoxmodulation: Altes Target in neuem Licht

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Claus Jacob (Pharmazie; Fachrichtung Bioorganische Chemie) befasst sich mit der Entwicklung intelligenter, organochalkogener Wirkstoffe sowie der Erforschung der möglichen Wirkmechanismen dieser relativ kleinen Moleküle in verschiedenen biologischen Modellen (u.a. Krebszellen, Bakterien, Hefen und Pilze). Die organochalkogenen Verbindungen (u.a. Polysulfane, chinoide Redoxkatalysatoren) der AG Jacob wechselwirken effektiv und selektiv mit dem (intra)zellulären Thiolstat und eignen sich dabei sehr gut, um selektiv als Elektrophile mit thiolhaltigen, nucleophilen Biomolekülen (z.B. Proteinen/Enzymen) reagieren zu können [Jacob, 2012]. So zeigen z.B. die schwefelhaltigen Polysulfane (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) der Gattung *Allium sativum* (Knoblauch) vielversprechende (biologische) Aktivitäten in diversen biologischen Modellen (u.a. Krebszellen), die primär durch Modulation des intrazellulären Redoxgleichgewichts bestimmt werden [Jacob, 2008; Anwar, 2008; Cerella, 2009; Busch, 2010; Viry, 2010]. Die klassische Redoxchemie deckt jedoch nicht komplett das breite, chemisch mögliche Reaktionsspektrum der Polysulfane ab, mit der die biologische Aktivität der Verbindungen vollständig erklärt werden kann. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden kumulativen Dissertation, nach erfolgreicher Synthese der chemisch einfachen Moleküle, mit Hilfe moderner Methoden aus der (biologischen) Chemie umfangreiche Untersuchungen der Polysulfane in humanen roten Blutzellen durchgeführt. Infolge dessen konnten neue biologische Wirkmechanismen der synthetischen Polysulfane in humanen roten Blutzellen identifiziert werden. Da die chemische Struktur der Polysulfane aufgrund ihrer kettenartigen Schwefel-Schwefel-Bindungen sehr den schwefelhaltigen Nanopartikeln ähnelt und dadurch eventuell Rückschlüsse auf die biologische Aktivität der Nanostrukturen gewonnen werden können, wurde die Synthese der S_8 -Nanopartikel in der Arbeitsgruppe etabliert. Die S_8 -Nanopartikel besitzen gegenüber den Polysulfanen, insbesondere den Diallyltetra-, penta- oder hexasulfanen, eine höhere chemische Stabilität, sind geruchsneutral und können einfach in hohen Ausbeuten generiert werden. Ferner wurden die Synthesen von selenhaltigen Nanopartikeln sowie tellurhaltiger Nanodrähte im Labor etabliert, um eine analoge Reihe der Chalkogene zu bilden. Durch die Synthese der verschiedenen chalkogenhaltigen, elementaren Nanostrukturen konnten erstmals für diese Nanostrukturen umfangreiche Untersuchungen in verschiedenen biologischen Modellen (u.a. *Steinernema feltiae*, *Plasmodium falciparum*, Krebszellen) durchgeführt

werden, um anschließend wichtige Erkenntnisse über die biologische Aktivität der schwefel- und selenhaltigen Nanopartikel sowie der tellurhaltigen Nanodrähte zu erhalten.

Aus den selen- und tellurhaltigen Nanostrukturen wächst das Interesse, auch entsprechende chalkogenhaltige Redoxkatalysatoren zu untersuchen, die selektiv auf intrazellulär erhöhte Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)-Level in Krebszellen wirken. Der genaue Wirkmechanismus dieser Verbindungen ist bisher ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings wird vermutet, dass diese Verbindungen in der Zelle das Redoxgleichgewicht stören und es dadurch in gewissen Zellen selektiv zum Zelltod durch Apoptose kommt [Doering, 2010; Jamier, 2010]. Um umfangreiche Details über den Wirkmechanismus sowie mögliche intrazelluläre Targets der Redoxkatalysatoren zu gewinnen, wurden die chalkogenhaltigen, chinoiden Verbindungen in einer High-Content Analyse mittels moderner Methoden aus der chemischen Biologie in verschiedenen biologischen Modellen (u.a. Krebszellen und *Saccharomyces cerevisiae*) untersucht. Die generierten Daten bilden eine breite Grundlage, um die Wirkmechanismen der synthetisierten Verbindungen besser zu verstehen und darauf aufbauend neue, hoch selektive zytotoxische Leitstrukturen basierend auf diesen chemisch einfachen Molekülen zu entwickeln.

1.2 Schwefelhaltige Naturstoffe der *Allium* Spezies

Zahlreiche Pflanzen der Gattung *Allium*, wie z.B. Knoblauch oder Zwiebeln, enthalten organische, schwefelhaltige, biologisch aktive Verbindungen, die über die Jahre hinweg erfolgreich aus Pflanzen isoliert werden konnten [Muenchberg, 2007; Jacob, 2008].

Polysulfane¹ (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) stellen neben Allicin, Diallylsulfid (DAS), Diallyldisulfid (DADS), Ajoen und den Dithiinen (s.a. Abb. 1) die Mehrheit der schwefelhaltigen Komponenten von Knoblauch (*Allium sativum*) dar [Jacob, 2010]. Zu den prominentesten Vertretern der Klasse der Polysulfane gehören das Diallyltrisulfid (DATS) und das Diallyltetrasulfid (DATTS). Während die beiden kleinen Moleküle chemisch gesehen auf den ersten Blick den Sulfiden (z.B. DAS) und Disulfiden (z.B. DADS) ähneln, zeigen sie große Unterschiede in ihrer biologischen Aktivität *in vitro* und *in vivo* auf [Jacob, 2008; Anwar, 2008; Cerella, 2009; Busch, 2010; Viry, 2010; Schneider, 2011].

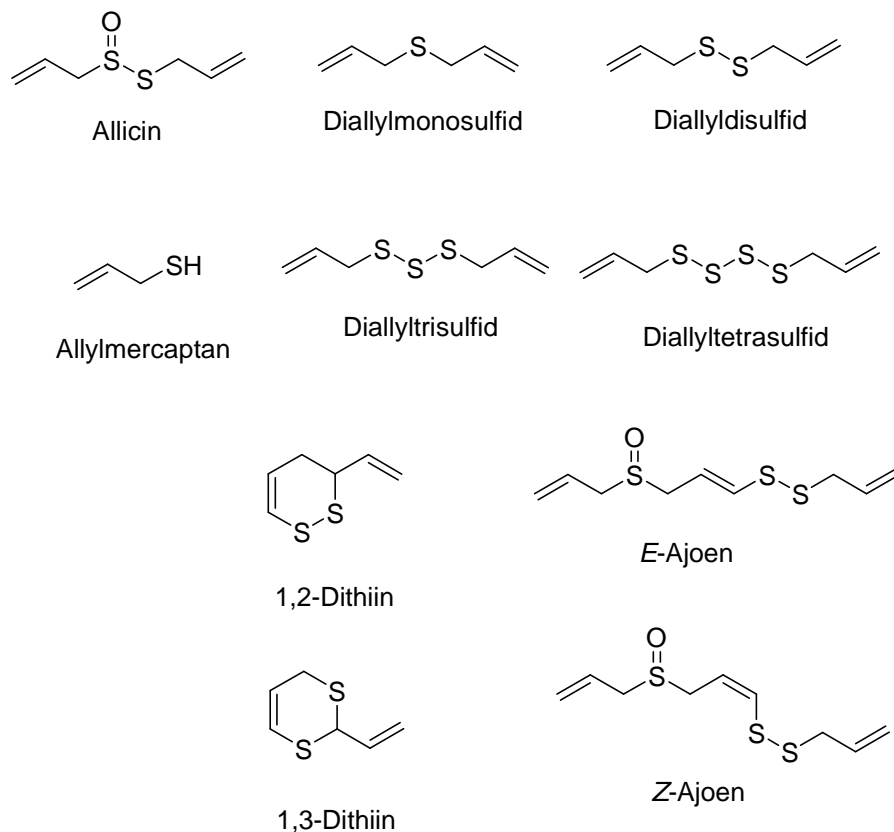


Abbildung 1: Übersicht über organische Schwefelverbindungen aus *Allium sativum*.

¹Polysulfane haben die chemische Formel RS_xR ($R \neq H$ und $x \geq 3$). Die Verbindungen sollten nicht mit Polysulfiden verwechselt werden, die nach IUPAC interpretiert geladene, oft anorganische Spezies vom Typ RS_x^- ($R \neq H$ und $x \geq 2$) oder S_x^{2-} ($x \geq 2$) darstellen. Allerdings haben sich gewisse Naturprodukte als „Polysulfide“ eingebürgert und werden hier (etwas inkorrekt) auch als solche bezeichnet (z.B. DATS, DATTS).

1.2.1 Biologische Aktivität der Polysulfane

1.2.1.1 Chemische und biochemische Reaktionen der Polysulfane

Die Substanzklasse der Polysulfane zeigt therapeutisch interessante biologische Aktivitäten in verschiedenen (biologischen) Modellen (z.B. Krebszellen, Bakterien, Pilze, Mikroben). Polysulfane, wie etwa DATS und DATTS, können S-Thiolierungen an Peptiden, Proteinen und Enzymen durchführen, oxidieren Cystein-Reste in Proteinen/Enzymen und wirken so gezielt auf verschiedene zelluläre Prozesse. Im Gegensatz zu einer einfachen, klassischen Thiol/Disulfid-Austauschreaktion führt die Thiol/Polysulfan-Austauschreaktion zur Freisetzung von Perthiolen (RSSH), Hydrogen-Polysulfanen (RS_xH , $x \geq 3$) und Schwefelwasserstoff (H_2S). Die komplexen Redoxreaktionen treten entweder direkt (an Proteinen/Enzymen) auf oder indirekt durch Oxidation von Glutathion (GSH; reduzierte Form) zu Glutathiondisulfid (GSSG), was zu einer Verschiebung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts zu (stärker) oxidierenden (elektrochemischen) Potentialen führt [Schaefer, 2001]. Die Beeinflussung des intrazellulären Thiol-Status, der sogenannte ‚intrazelluläre Thiolstat‘ der Zelle, hat weitreichende Folgen, die von einer Aktivierung der antioxidativen Abwehr bis hin zur Einleitung von Apoptose führen können.

Von besonderem Interesse sind die elektronenreichen, reduzierten Formen der Polysulfane, die Perthiole (RS_xH , $R \neq H$, $x \geq 2$), die Disulfid-Bindungen in Proteinen spalten können und intrazellulär mit Metallionen und molekularem Sauerstoff (O_2) Superoxidradikal-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) generieren. Perthiole oder andere RS_xH Spezies können zudem auch unter Freisetzung von sogenannten S_x Spezies, wie z.B. S_2 oder S_3 , zersetzt werden (s.a. Abb. 2) [Benson, 1978; Ghosh, 1988; Meyer, 1976; Nakayama, 2004; McCarthy, 2004]. Außerdem besteht für Perthiole die Möglichkeit, als Oxidans zur Bildung von Peptid- oder Protein-Disulfid-Modifizierungen zu führen (in Form von $PrSS_xH$) begleitet von der Freisetzung von H_2S oder sogar von längerkettigen, anorganischen Polysulfiden (H_2S_x im Gleichgewicht mit HS_x^- und S_x^{2-}). Die RS_xH oder auch H_2S_x Spezies eignen sich sehr gut als Liganden für Metallionen (Zink-, Kupfer- und Eisen-Ionen) von Metalloproteinen (Abb. 2). Es wird in der Literatur postuliert, dass eine Bindung an das Metalloprotein nicht nur zur Beeinflussung des Proteins führt (z.B. zur Inhibierung von gewissen Metalloenzymen), sondern auch zu einer Störung der intrazellulären Metall-Homöostase führen kann [Bhat, 2007; Hadi, 2007].

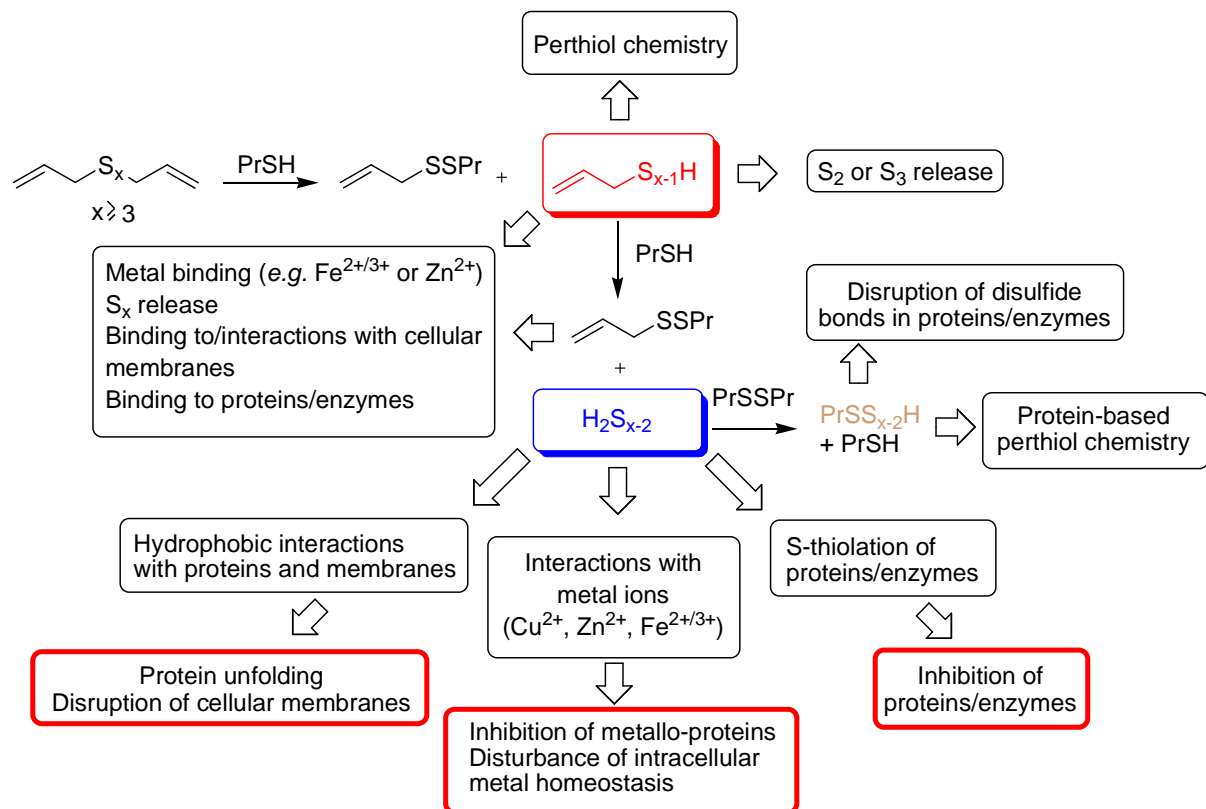


Abbildung 2: Schematische Darstellung über mögliche chemische und biochemische Reaktionen der Polysulfane nach [Schneider, 2012].

1.2.1.2 Intrazelluläre Targets der Polysulfane

In den letzten Jahren konnten zudem verstärkt neue, intrazelluläre Targets von DATS und DATTS erfolgreich identifiziert werden. Die kleinen Moleküle interagieren z.B. mit Proteinen, die für Zellzyklus bzw. Apoptose essentiell sind [Dirsch, 1998; Herman-Antosiewicz, 2004; Wu, 2005; Chung, 2006; Herman-Antosiewicz, 2007; Herman-Antosiewicz, 2007; Karmakar, 2007; Cerella, 2009]. Der genaue Wirkmechanismus der Verbindungen, der zur Apoptose führt, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt worden [Jacob, 2006; Jacob, 2006; Muenchberg, 2007; Cerella, 2009].

Über LC-MS/MS Analyse mit DATS behandeltem β -Tubulin konnten *in vitro* spezifische, oxidativ bedingte Veränderungen von Cystein-Resten $Cys^{12\beta}$ und $Cys^{354\beta}$ detektiert werden, die zu S-Allylmercaptocystein modifiziert wurden [Hosono, 2005]. Diese gewonnene Erkenntnis spricht für eine direkte S-Thiolierung von β -Tubulin durch DATS und weniger für

einen indirekten, oxidativen Prozess durch GSSG oder via Hochregulierung von ROS (s.a. Abb. 3).

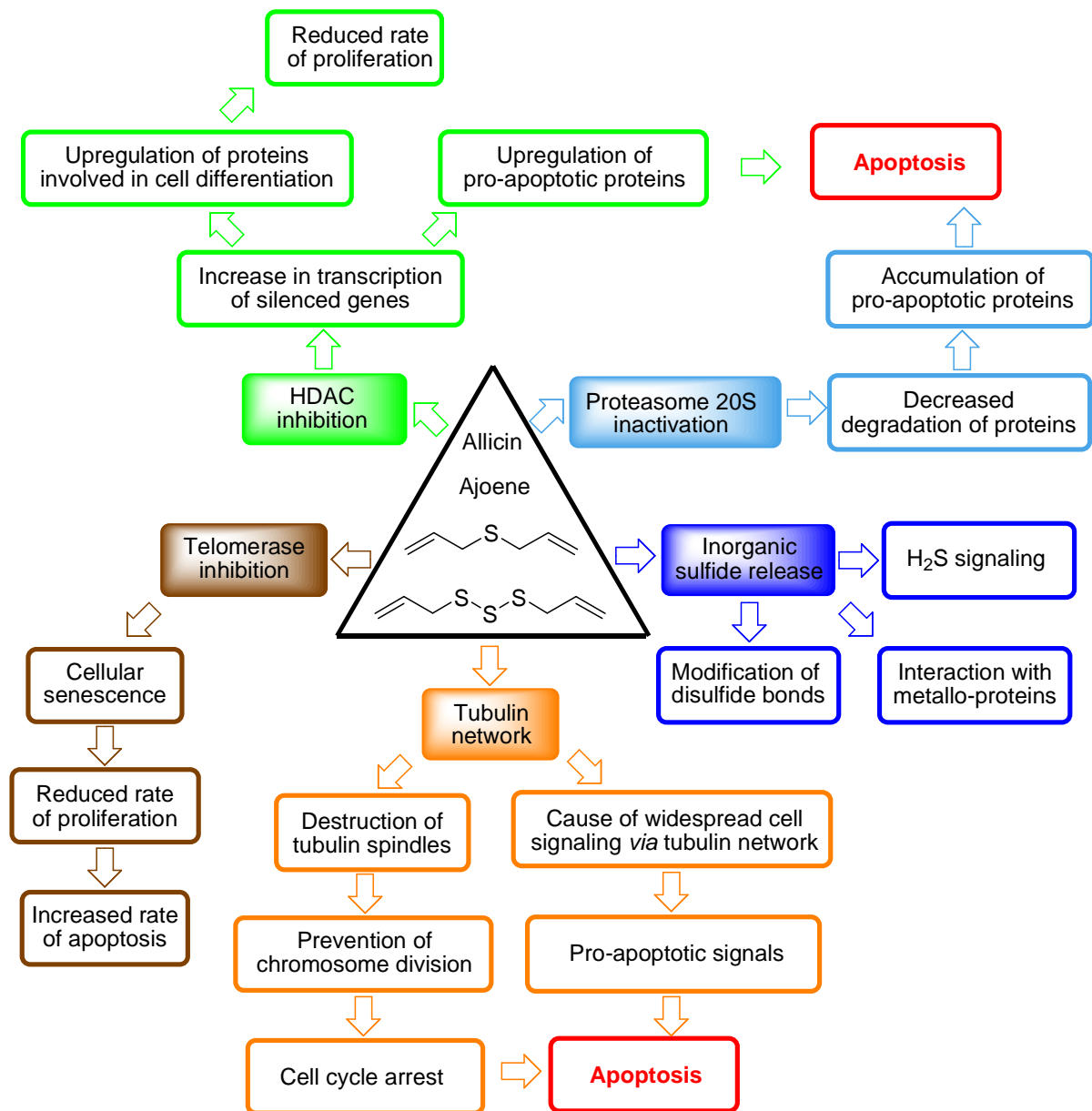


Abbildung 3: Intrazelluläre Targets der organischen Schwefelverbindungen. Die zugrundeliegenden Mechanismen für die postulierten Effekte sind (teilweise) noch immer nicht vollständig verstanden bzw. basieren vorrangig auf in vitro Daten. Abb. nach [Schneider, 2012].

Ferner konnte in einer weiteren Studie für DATS und DATTS in U937 Leukämiezellen gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose abhängig von der Länge der Schwefelkette

in den Molekülen ist. In Übereinstimmung mit anderen Experimenten konnte so nachgewiesen werden, dass DATTS die höchste biologische Aktivität besitzt. 10 μM der Verbindung führt zu einer Akkumulierung der U937 Zellen in der frühen Mitose (G2/M-Phase), gefolgt von einer Caspase-induzierten Apoptose. Außerdem wurde gezeigt, dass DATTS zur Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak, einer Herunterregulierung des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinlevels sowie zur Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytoplasma führt [Cerella, 2009].

In einer Serie von Experimenten mit humanen Darmkrebszellen (HCT-116) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass DATS und DATTS (je 40 μM) zu einer Reduktion der Zellviabilität, einem Zellzyklus-Arrest sowie folglich zur Apoptose führt. Die Induktion der Apoptose ist abhängig vom Redoxstatus der Zelle. Zudem konnte durch mehrere Forschergruppen unabhängig voneinander bestätigt werden, dass sowohl DATTS als auch sein Propyl-Analogon Dipropyltetrasulfid (DPTTS) die *cdc25* Isoformen A und C *in vitro* inhibiert [Busch 2010, Viry 2010]. Eine Verknüpfung zwischen DATS, *cdc25 C*, Induktion von pro-apoptotischen Proteinen und Apoptose konnte zuvor bereits in humanen Prostatakrebszellen (PC-3) nachgewiesen werden [Xiao, 2005; Xiao, 2005; Xiao, 2006].

In nachfolgenden Studien wurden weitere Proteine als Targets der Polysulfane identifiziert. 40 μM von DATS führte zu einem schnellen Anstieg der Ser⁴⁷³- und Thr³⁰⁸-Phosphorylierung der Proteinkinase Akt gefolgt von einer Inhibierung ihrer Kinase-Aktivität [Xiao, 2005]. Ferner war DATS für einen Abfall der Ser¹⁵⁵- und Ser¹³⁶- Phosphorylierung von Bad verantwortlich [Xiao, 2005]. In humanen Prostatakrebszellen (LNCaP, C4-2 und TRAMP-C1) führte DATS zu einem konzentrationsabhängigen Abfall des Androgenrezeptor (AR)-Proteinlevels und einer Hemmung der AR-Proteinfunktion [Xiao, 2005]. In der Tat konnte mittels Transkriptions-PCR-Analyse eine dosisabhängige Reduktion des AR auf mRNA-Level erfolgreich nachgewiesen werden [Stan, 2009]. Die generierten Daten sind von größtem Interesse, da hier eine Wechselwirkung von DATS auf DNA-Transkriptions-Level wahrscheinlich ist und weniger eine direkte Inhibierung von bereits vorhandenen Enzymen/Proteinen, die im Zellzyklus oder auch bei der Apoptose eine Rolle spielen.

Ferner wurde in humanen Prostatakrebszellen gezeigt, dass DATS die Bildung „Reaktiver Sauerstoff-Spezies“ (ROS) verursacht und zu einem Proteinlevel-Anstieg des Cdk-Inhibitors p21 führt. Die Apoptose in den untersuchten Zellen war gleichzeitig mit einem Abfall des Bcl-2 Proteinlevels verknüpft [Xiao, 2004; Xiao, 2005]. Eine ROS-verknüpfte Aktivität der

Polysulfane, die in mehreren Untersuchungen bestätigt wurde, erklärt wohl auch die Veränderungen auf dem DNA-Transkriptions-Level [Xiao, 2004; Xiao, 2005; Jacob, 2010].

Aufgrund der vielseitigen chemischen Eigenschaften der Polysulfane gibt es mittlerweile zahlreiche Studien, die sowohl eine Thiol/Polysulfan-Austauschreaktion als auch eine Bildung von Schwefel- und Sauerstoffradikalen postulieren. Kürzlich veröffentlichte Daten haben z.B. gezeigt, dass DATS die intrazellulären ROS- und Ca^{2+} -Level in humanen Hautkrebszellen (A375) erhöht und zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) führt [Wang, 2010]. Ferner wurde als Antwort auf die oxidativ bedingte DNA-Schädigung eine Aktivierung des p53-Signalweges beobachtet. p53 wiederum induziert eine Expression von p21 und beeinflusst G2/M-Modulatoren wie z.B. Wee I Kinase, cdc25 C und cdc2. Es führt zudem zur Einleitung des mitochondrialen Signalweges der Apoptose, der eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9 sowie eine Spaltung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) zur Folge hat [Wang, 2010]. Weitere Studien, basierend auf den antioxidativen Eigenschaften von DATS, belegen die Einflussnahme von ROS, DNA-Schädigungen und einer veränderten Protein-Expression [Tsai, 2007; Zeng, 2008].

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der die biologische Aktivität von DATS und DATTS erklären könnte, wurde kürzlich publiziert. Dieser schlägt vor, dass die kleinen Moleküle sehr schnell zu Allylmercaptan (AM) metabolisiert werden können, das wiederum als Inhibitor von verschiedenen Histondeacetylase (HDAC)-Enzymen bekannt ist. Allylmercaptan führt hierbei schnell zu einer Histon-Hyperacetylierung in humanen Darmkrebszellen, die mit einer Bindung des Transkriptionsfaktors Sp3 an die Promoter-Region des *P21WAF1*-Gens verknüpft ist und folglich zum Zellzyklus-Arrest führt [Nian, 2008; Nian, 2009].

Generell scheint allerdings bislang die Beeinflussung von zellulären Mechanismen durch Redoxprozesse im Vordergrund zu stehen. Daher wurden u.a. als Teil dieser Arbeit auch (schwefelhaltige) Nanopartikel untersucht, die eine ähnliche Redoxchemie wie DATS und DATTS aufweisen, jedoch stabiler sind und ferner nicht so eine hohe Geruchsintensität aufweisen.

1.3 Chalkogenhaltige Nanostrukturen

1.3.1 Schwefel-Nanopartikel

Schwefelhaltige Nanostrukturen finden oft ihre Verwendung bei der Synthese von Schwefel-Nanogemischen für Lithium-Batterien, in der Modifizierung von Kohlenstoff-Nanostrukturen sowie bei der Synthese von Schwefel-Nanodrähten mit Kohlenstoff, um Hybridmaterialien u.a. für Gassensoren zu generieren [Yu, 2004; Zheng, 2006; Barkauskas, 2007; Smorgonskaya, 2002; Santiago, 2006].

Ferner zeigen schwefelhaltige Nanopartikel gewisse interessante, antimikrobielle Eigenschaften in verschiedenen biologischen Modellen (z.B. Bakterien, Hefen und Pilze). Die S_8 -Nanopartikel (30 und 150 $\mu\text{g/ml}$) mit einer Durchschnittsgröße von ca. 10 nm weisen dabei signifikante antibakterielle Aktivitäten gegen Gram negative *Pseudomonas aeruginosa* und Gram positive *Staphylococcus aureus* Bakterien auf [Desphande, 2008].

Der S_8 -Ring der Schwefel-Nanopartikel basiert, analog zu den organischen, schwefelhaltigen Polysulfanen (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$), auf kettenartigen Schwefel-Schwefel-Bindungen. Da letztere verantwortlich für die umfangreiche biologische Aktivität der Polysulfane sind, sollten die Schwefel-Nanopartikel zumindest in der Theorie ebenfalls in der Lage sein, mit diversen Bio-Molekülen, wie z.B. Cystein-haltigen Proteinen/Enzymen, zu reagieren und daher ebenfalls eine biologische Aktivität analog zu DATS und DATTS zu zeigen [Schneider, 2011]. Ferner bilden die reduzierten Formen der S_8 -Nanopartikel sowie der Polysulfane, wie z.B. H_2S_x ($x \geq 2$) oder RS_xH ($R \neq H$, $x \geq 2$), respektive, unter physiologischen Bedingungen $O_2^{\cdot-}$, binden an Metall-Ionen (z.B. Eisen-, Zink- oder Kupfer-Ionen) oder wechselwirken mit Membranen und Membranproteinen. Die Schwefel-Nanopartikel sollten daher auch hier ähnlich reagieren (Polysulfanchemie). Sie sind verglichen mit den längerkettigen Polysulfan-Verbindungen, insbesondere den Diallyltetra-, penta- oder hexasulfiden, in ihrer Struktur chemisch gesehen wesentlich stabiler und können in hohen Ausbeuten generiert werden, was grundsätzlich von extrem großem Vorteil gegenüber den konventionellen organischen Polysulfanen ist [Schneider, 2011].

1.3.2 Selen-Nanopartikel

Selenhaltige Nanomaterialien stellen einige der Hauptmaterialien in der Fotoelektronik zur Herstellung von Fotokopiergeräten, Solarzellen und auch bei der Xerografie dar [Best, 1979].

Ferner kann Selen in andere funktionale Halbleiter mit interessanten optischen (z.B. CdSe) und magnetischen (z.B. ZnSe) Eigenschaften integriert werden [Shan, 2005; Wang, 2006]. Das chemische Element weist mit seinen umfangreichen, äußerst diversen Formen (trigonal, monoklinisch, rhomboedrisch und amorph) eine große strukturelle Vielfalt auf, die im Bereich der anwendungsorientierten Forschung zu Nutze gemacht wird [Abdelouas, 2000; Gates, 2000]. Trigonales Selen besitzt z.B. als p-Typ-Halbleiter sehr gute photoelektrische Eigenschaften, die u.a. auch in der medizinischen Diagnostik zum Einsatz kommen [Gates, 2002]. In den letzten Jahren wurden zudem verstärkt selenhaltige Nanodrähte und Nanoröhrchen durch verschiedene experimentelle Strategien generiert, wie z.B. mithilfe der hydrothermalen Methode [Lu, 2002; Ma, 2004; Chen, 2003; Zhang, 2004; Cao, 2004].

Basierend auf den bereits bekannten pro- und antioxidativen Eigenschaften von elementarem Selen wurden erste Studien mit selenhaltigen Nanopartikeln in verschiedenen biologischen Modellen (z.B. Krebszellen und Bakterien) durchgeführt [Zhang, 2001; Tran, 2011]. Im Mausmodell konnte dabei z.B. gezeigt werden, dass die Selen-Nanopartikel (~ 40 - 60 nm) verglichen mit Natriumselenit (Na_2SeO_3) eine um siebenfach geringere akute Toxizität aufzeigen (LD_{50} 113 und 15 mg Se/kg Körpergewicht) [Zhang, 2001]. Zudem weisen selenhaltige Nanopartikel (7.8, 15.5 und 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit einer Durchschnittsgröße von ca. 40-60 nm signifikante, antibakterielle Aktivitäten gegen Gram positive *Staphylococcus aureus* Bakterien auf [Tran, 2011]. Die vielversprechenden antibakteriellen sowie weitere antimikrobielle Eigenschaften der Selen-Nanopartikel sind nach aktuellem Forschungsstand bisher noch nicht weiter untersucht worden.

1.3.3 Tellurhaltige Nanostrukturen

Elementares Tellur ist analog zu Selen ein Halbleiter vom Typ p und stellt somit einen wichtigen Baustein zur Herstellung von diversen Nanomaterialien dar. Die sogenannte Layer-by-Layer-Technik ermöglicht z.B. die Herstellung von fotoaktiven, tellurhaltigen Nanodrähten/Polyelektrolyt-Filmen [Wang, 2006]. Tellurhaltige Nanodrähte können zudem über verschiedene thermische Verfahren bei hohen (> 350 °C) als auch bei niedrigeren Temperaturen (< 200 °C) generiert werden [Mayers, 2002; Liu, 2003; Zhu, 2004; Grison, 1951].

Während der letzten zehn Jahre wurden zudem neue, innovative fluoreszierende Materialien, wie z.B. Cadmiumtellurid-Nanopartikel (CdTe), hergestellt, die als Quantumdots in der

medizinischen Bildgebung und Diagnostik eine wichtige Rolle einnehmen können [Deng, 2007]. Die neue Generation von Biosensoren zur Fluoreszenzmessung ermöglicht so beispielsweise eine schnelle, simultane und unabhängige Detektion von zwei verschiedenen Virenarten [Deng, 2007].

Nach aktuellem Stand der Forschung sind bisher keine Studien über das Screening von elementaren, tellurhaltigen Nanopartikeln bzw. Nanodrähten in biologischen Modellen in der Fachliteratur verfügbar.

Da die biologische Aktivität der Polysulfane, wie wahrscheinlich auch die der S₈- und selenhaltigen Nanopartikel auf redoxmodulierenden Prozessen beruht, ist es naheliegend, dass sich synthetische, organische selen- und tellurhaltige, multifunktionale Sensor-/Effektor-Wirkstoffe, die selektiv auf intrazellulär erhöhte ROS-Level in Krebszellen wirken, womöglich noch besser zur effektiven und vor allem selektiven Behandlung von solchen Krankheiten eignen könnten.

1.4 Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)

1.4.1 Allgemeines

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) sind allgemein definiert als sauerstoffhaltige, reaktive chemische Spezies. Es gibt zwei verschiedene Typen von ROS, der eine bestehend aus Radikalen, beispielsweise Superoxid- ($O_2^{\bullet-}$) und Hydroxyl- ($\bullet OH$) Radikale, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in ihren äußeren Orbitalen besitzen, und der andere, nicht-radikalische ROS-Typus, der keine ungepaarten Elektronen hat, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3) und Singlet-Sauerstoff (1O_2) [Trachootham, 2009].

1.4.2 Bildung Reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS)

Die Erzeugung von ROS wird entweder exogen durch Schadstoffe, Zigarettenrauch oder (UV)-Strahlung oder auch endogen innerhalb der Zelle verursacht. Die Hauptquelle für intrazelluläre ROS-Bildung stellen dabei die Mitochondrien dar, wo molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor bei der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette durch

fehlerhafte Elektronenübertragung zu Superoxid reagieren kann, welches dann in einer Folgereaktion in weitere ROS umgewandelt wird [Trachootham, 2009].

In Phagozyten und einigen Krebszellen kann ROS auch durch die Aktivierung von membranverknüpften NADPH-Oxidasen generiert werden. Ferner besteht die Möglichkeit der Bildung von ROS als Nebenprodukt bei diversen biochemischen Reaktionen, beispielsweise bei β -Oxidationen in Peroxisomen oder bei Detoxifizierungs-Reaktionen mit CYP450-Enzymen [Trachootham, 2009].

1.4.3 ROS induzierte Mechanismen in Krebszellen und normalen Zellen

Zahlreiche Studien belegen einen erhöhten intrazellulären ROS-Level in Krebszellen [Szatrowski, 1991; Kawanishi, 2006; Toyokuni, 1995]. Ein moderater Anstieg an ROS kann die Zellteilung sowie Zelldifferenzierung fördern, wohingegen signifikant erhöhte Mengen an ROS zu oxidativ bedingten Schäden bei Lipiden, Proteinen, DNA sowie zum Zelltod führen [Boonsta, 2004; Schafer, 2001; Perry, 2000]. Zellen regulieren ihren ROS-Haushalt daher durch endogene, antioxidative Enzyme (z.B. Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) und exogene, nicht-enzymatische Verbindungen (u.a. Ascorbinsäure, Isoflavone, Polyphenole) (s.a. Tab. 1).

Table 1: Darstellung wichtiger ROS-Moleküle sowie deren Metabolismus. Abb. nach [Nordberg, 2001].

ROS – Molekül	Hauptquellen	Enzymatisches Abwehrsystem	Produkte
Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)	„Ausströmen“ von Elektronen der Elektronentransportkette Aktivierte Phagozyten Xanthinoxidase Flavoenzyme	Superoxid-Dismutase (SOD)	$H_2O_2 + O_2$
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Vom $O_2^{\cdot-}$ via Superoxid-Dismutase (SOD) NADPH-Oxidase (Neutrophile) Glucoseoxidase Xanthinoxidase	Glutathionperoxidase Katalasen Peroxiredoxine (Prx)	$H_2O + GSSG$ $H_2O + O_2$ $H_2O + RSSR$
Hydroxylradikal ($\cdot OH$)	Vom $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 in Gegenwart von Übergangsmetallen (Fe oder Cu) (via Fenton-Reaktion) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$	keines	
Stickstoffoxid ($\cdot NO$)	Stickstoffoxidsynthasen	Glutathion/TrxR	GSNO

Unter physiologischen Bedingungen können normale Zellen durch ihre antioxidative Belastbarkeit eine bestimmte Menge an exogenen ROS-Faktoren tolerieren bevor der kritische Grenzwert überschritten wird. In Krebszellen hingegen führt ein Anstieg des ROS-Levels bedingt durch metabolische Unregelmäßigkeiten und onkogene Signalwirkung zu einer Redoxanpassung, einer Verlagerung der (intrazellulären) Redoxdynamik hin zu hoher ROS-Bildung, gefolgt von einer Hochregulierung der antioxidativen Belastbarkeit mit Eliminierung von überschüssigem ROS, um den ROS-Level unter der kritischen Marke zu halten. Folglich sind Krebszellen stärker abhängig von der antioxidativen Abwehr und sensitiver gegenüber exogenen ROS-Faktoren oder Molekülen, die das antioxidative System inhibieren. (s.a. Abb. 4) [Trachootham, 2009].

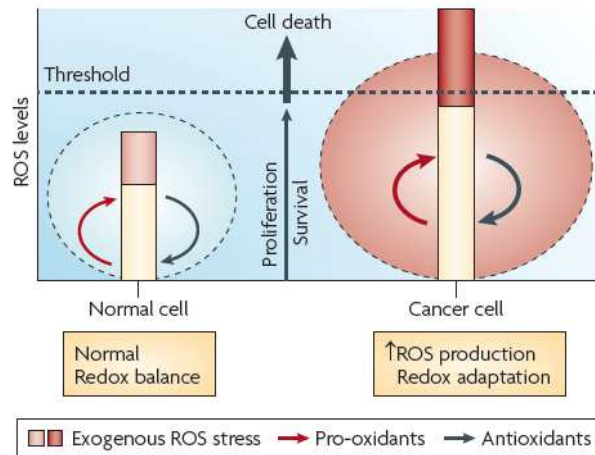


Abbildung 4: Redoxregulation und deren Kontrolle durch ROS in normalen, „gesunden“ Zellen und in Krebszellen nach [Trachootham, 2009].

1.5 Multifunktionale Sensor-/Effektor-Katalysatoren

1.5.1 Einteilung der redox-modulierenden Substanzen in drei verschiedene Wirkstoffklassen

ROS-induzierende Strategien können nach aktuellem Forschungsstand mit folgenden drei Wirkstoffklassen umgesetzt werden:

- (1) Verbindungen, die den intrazellulären ROS-Level bis hin zur lethalen Dosis erhöhen
- (2) Moleküle, die antioxidative Enzyme inhibieren und folglich die ROS-Konzentration in der Zelle zu lethalen Dosen erhöhen
- (3) Katalysatoren, die die Toxizität der bereits intrazellulär vorhandenen ROS steigern

Basierend auf den unterschiedlichen Wirkstoffklassen und den bisher literaturbekannten Studienergebnissen wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacob ein (mögliches) Wirkmechanismen-Modell entwickelt. Dieses postulierte Modell erklärt, wie die

Redoxmodulation eines prä-existierenden intrazellulären Redox-Status zu einer selektiven Zytotoxizität von Verbindungen gegenüber Krebszellen führt, die aufgrund ihrer Entartung auf natürliche Weise einen erhöhten ROS-Level besitzen (s.a. Abb. 5) [Jamier, 2010]. Ähnliche Modelle wurden, wie bereits in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben, auch von Huang und Kollegen vorgeschlagen [Trachootham, 2009].

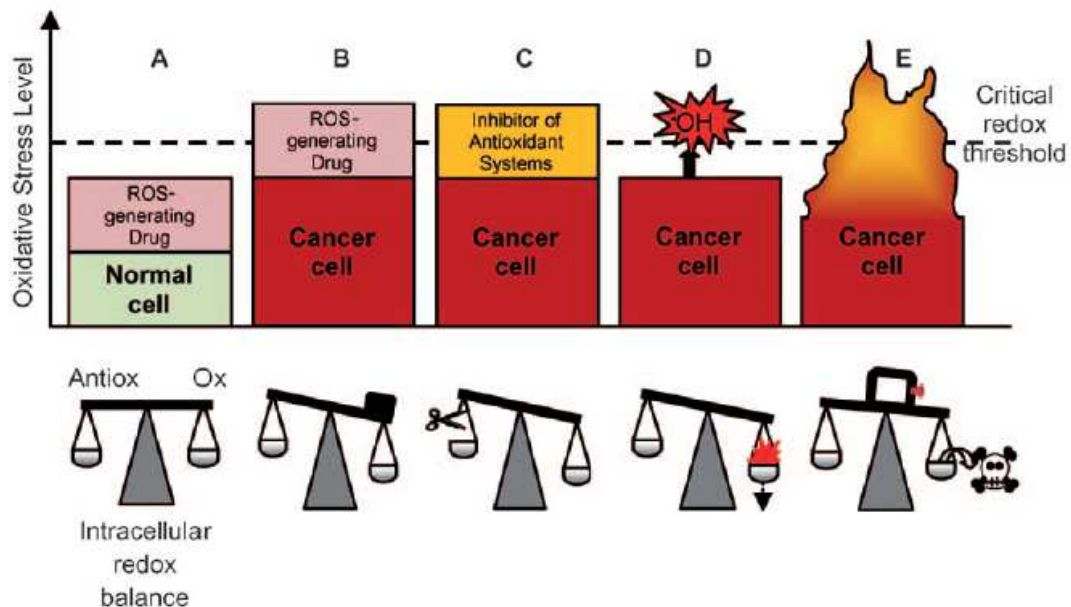


Abbildung 5: Postuliertes, vorläufiges Modell zur Erklärung der selektiven Zytotoxizität der verschiedenen Redoxmodulatoren und Sensor-/Effektor-Moleküle nach [Jamier, 2010].

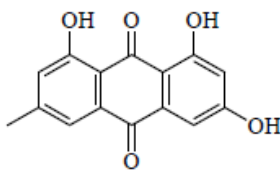
Während solche Verbindungen in normalen, „gesunden“ Zellen mit ausgeglichenem, intrazellulärem Redox-Haushalt den OS-Level nur geringfügig erhöhen (Szenario A, Abb. 5), zeigen die OS-Level der Krebszellen häufig bereits einen signifikanten Anstieg, der sehr nahe am kritischen Grenzwert zur Induktion der Apoptose liegt (Szenario B und C, Abb. 5). Eine weitere Zunahme an OS kann durch ROS-generierende Agentien oder auch durch Inhibitoren verschiedener antioxidativer Enzyme bewirkt werden. Im Gegensatz dazu sind hochselektive, ursprünglich als SOD-Mimetika entwickelte Verbindungen in der Lage, bereits vorhandene ROS in schädliche Radikale (z.B. Hydroxyl-Radikale) umzuwandeln (Szenario D, Abb. 5). Andere Katalysatoren hingegen, wie z.B. GPx-Mimetika, haben keinen direkten Einfluss auf den intrazellulären ROS-Level und seine chemische Zusammensetzung. Diese fördern vielmehr die Reaktion vorhandener ROS mit redox-sensitiven Proteinen/Enzymen, was zu

schnellen, oxidativ bedingten Veränderungen der Proteine/Enzyme führt und folglich Apoptose-induzierende Prozesse in der Zelle auslösen kann (Szenario E, Abb. 5) [Jamier, 2010].

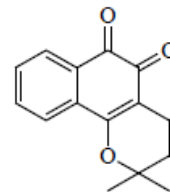
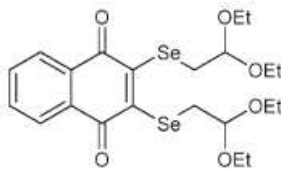
1.5.2 Literaturbekannte Verbindungen der drei Wirkstoffklassen

1.5.2.1 Verbindungen, die den intrazellulären ROS-Level bis hin zur lethalen Dosis erhöhen

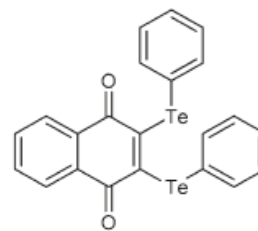
Typische Vertreter für die erst genannte Wirkstoffklasse sind z.B. chinonhaltiges Emodin und β -Lapachon (s.a. Abb. 6) [Leu, 2009; Bair, 2010; Klotz, 2009]. Die in der Arbeitsgruppe Jacob entwickelten, chinonhaltigen Redoxverbindungen können in gewisser Hinsicht auch dieser Wirkstoffklasse zugeordnet werden.



Emodin

 β -Lapachon

2,3-Bis[(2,2-diethoxyethyl)selanyl]naphthochinon

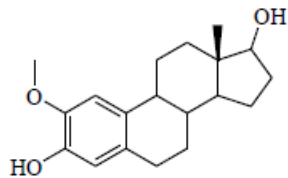


2,3-Bis(phenyltellanyl)naphthochinon

Abbildung 6: Chemische Strukturen der Verbindungen, die den intrazellulären ROS-Level bis hin zur lethalen Dosis erhöhen können.

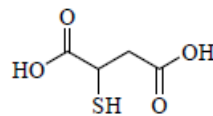
1.5.2.2 Moleküle, die antioxidative Enzyme inhibieren und folglich die ROS-Konzentration in der Zelle zu lethalen Dosen erhöhen

Inhibitoren der humanen Kupfer-, Zink-Superoxiddismutase (SOD), wie z.B. 2-Methoxyestradiol, verhindern die intrazelluläre Umwandlung von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 , welches anschließend durch Katalasen (CAT), Glutathionperoxidasen (GPx) oder auch durch Peroxiredoxine (Prdx) detoxifiziert wird [Huang, 2000]. Ein prominenter Glutathionperoxidase-Inhibitor stellt Mercaptosuccinylsäure dar, wohingegen Aminotriazol ein bekannter Vertreter der Katalase-Inhibitoren ist (Abb. 7) [Ishihara, 2005].



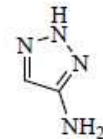
2-Methoxyestradiol

(SOD-Inhibitor)



Mercaptosuccinylsäure

(GPx-Inhibitor)



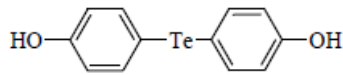
Aminotriazol

(CAT-Inhibitor)

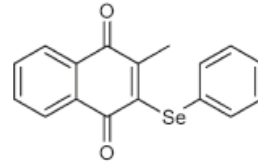
Abbildung 7: Chemische Strukturen von beispielhaft ausgewählten Verbindungen, die antioxidative Enzyme inhibieren und folglich die ROS-Konzentration zu lethalen Dosen erhöhen können.

1.5.2.3 Katalysatoren, die die intrazelluläre ROS-Toxizität erhöhen

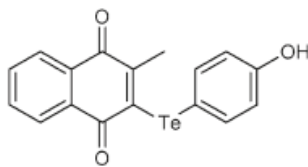
Zur dritten Wirkstoffklasse (sowie oftmals auch zur ersten Wirkstoffklasse) gehören u.a. die hochselektiven, selen- und tellurhaltigen, chinoiden Katalysatoren mit mehreren Redoxzentren der Arbeitsgruppe Jacob, deren Leitstrukturen durch chemische Modifizierungen über die Jahre optimiert worden sind (Abb. 8) [Fry, 2005; Shaaban, 2009; Doering, 2010].



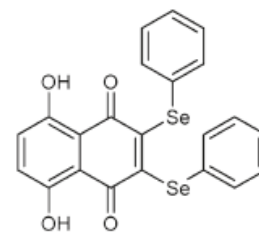
4,4'-Dihydroxydiphenyltellurid



2-(Phenylselanyl)-3-methylnaphthochinon



2-(Hydroxyphenyltellanyl)-3-methylnaphthochinon



2,3-Bis(phenylselanyl)-5,8-dihydroxynaphthochinon

Abbildung 8: Redox-Katalysatoren der AG Jacob, die die intrazelluläre ROS-Toxizität erhöhen können.

Tellurhaltige Redox-Katalysatoren sind in der Lage, intrazelluläre ROS-Level zu „detektieren“ und anschließend wichtige, cysteinhaltige Proteine/Enzyme zu oxidieren. Dieser Prozess läuft in Anwesenheit von H_2O_2 sehr oft katalytisch ab und resultiert in der Bildung von S-thiolierten Biomolekülen. Die S-thiolierten Proteine/Enzyme werden entweder direkt als Teil des katalytischen Zyklus gebildet (Abb. 9a) oder indirekt als Folgeprozess durch erhöhte Glutathiondisulfid-Level (Abb. 9b) [Ba, 2010].

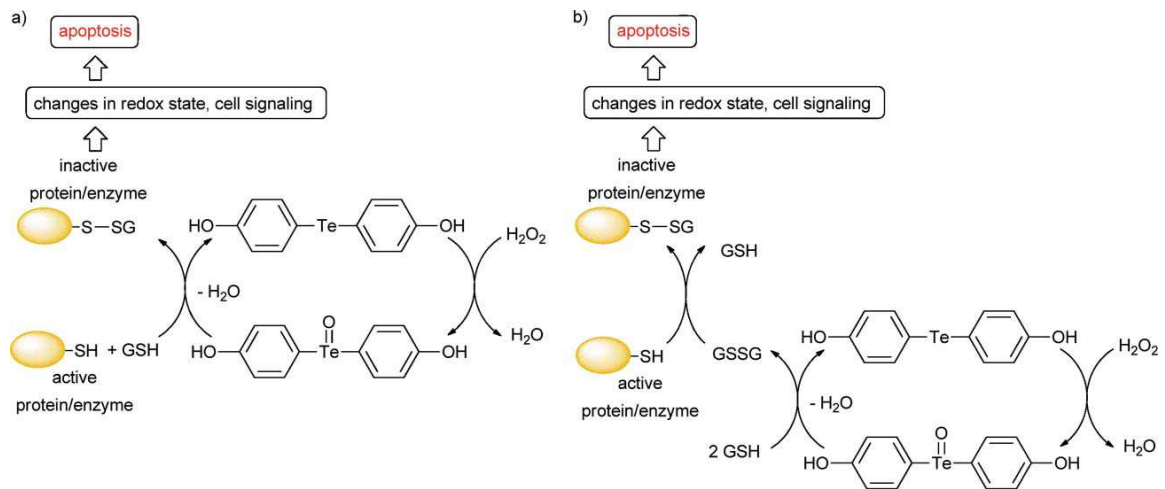


Abbildung 9a und 9b: Postulierter, Apoptose-induzierender Mechanismus tellurhaltiger Redoxkatalysatoren gezeigt am Beispiel von 4,4'-Dihydroxydiphenyltellurid. Abb. nach [Ba, 2010].

1.6 Biologische Modelle

1.6.1. Rote Blutzellen (RBCs)

Rote Blutzellen, oder auch Erythrozyten genannt, werden über den Prozess der Erythropoese in den Stammzellen des Knochenmarks gebildet. Erythrozyten sind relativ einfach strukturierte Zellen, die zur Klasse der Prokaryonten gehören. Die Hauptaufgabe der roten Blutzellen besteht im Transport von molekularem Sauerstoff (O_2) und Kohlenstoffdioxid (CO_2).

Das Hämoglobin stellt das wichtigste Protein der humanen RBCs dar und ist für die charakteristische rote Farbe verantwortlich. Das Protein besteht sowohl beim Menschen als auch bei Säugetieren aus je zwei Untereinheiten (Globulin) vom α - und β -Typ, einem Protoporphyrin als prosthetische Gruppe (Nichtproteinanteil) sowie einer eisenhaltigen (Fe^{2+}) Häm-Einheit (s.a. Abb. 10). Beim Menschen treten vier leicht unterschiedliche Varianten des Hämoglobins auf. Diese unterscheiden sich überwiegend in den Proteinuntereinheiten voneinander. Es handelt sich dabei um HbA1, HbA2, HbF und Gower-2 (Prozentualer Anteil: HbA1 (97%), HbA2 (2%), HbF, Methämoglobin (Ferrihämoglobin) \sim 1%) [Vinogradov, 1993].

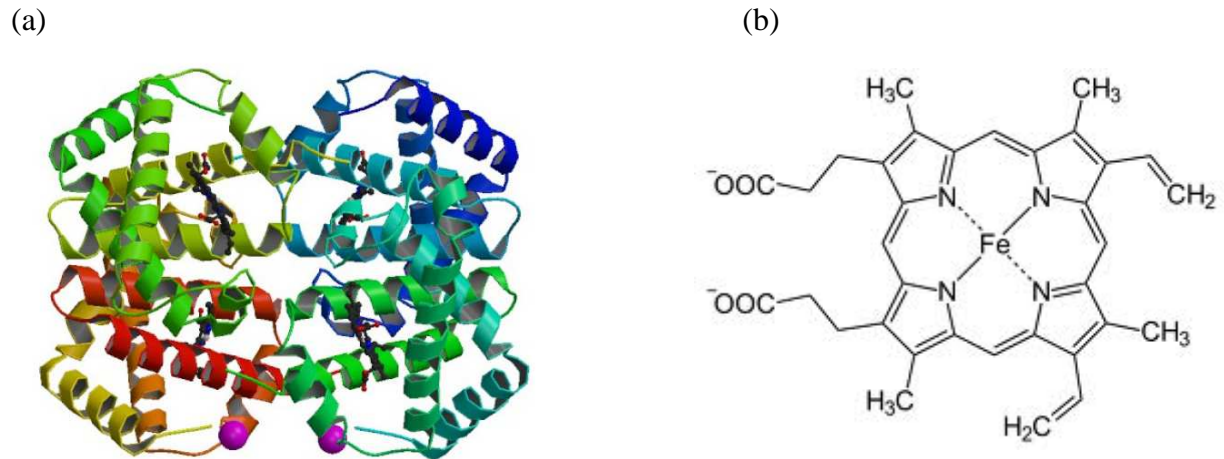


Abbildung 10: Kristallstruktur von humanem Hämoglobin mit Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen (a) sowie Darstellung der Häm-Gruppe des Hämoglobins (b) nach [Fermi, 1984].

1.6.1.1 Membran der roten Blutzellen

1.6.1.1.1 Membranlipide

Die humane RBCs Membran setzt sich aus Proteinen (52 %), Lipiden (41 %) und Kohlenhydraten (7 %) zusammen [Haest, 2003; Dodge, 1963]. Membranlipide werden in folgende drei Klassen eingeteilt: Phospholipide (62,7 %), neutrale Lipide (25,2 %) und Glycosphingolipide (~ 12 %) [Nelson, 1972]. Phospholipide wiederum unterteilt man in Sphingomyelin und Glycerophospholipide. Glycerophospholipide werden in folgende drei Hauptbestandteile eingeteilt: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS). Neutrale Lipide bestehen überwiegend aus Cholesterol [Nelson, 1972].

Die Phospholipide sind in der Plasmamembran der RBCs asymmetrisch verteilt [Mandal, 2005]. Die zwei Seiten der Plasmamembran unterscheiden sich daher in ihrer Phospholipidzusammensetzung. Sphingomyelin und PC sind vorwiegend auf der äußeren Membranseite der Lipiddoppelschicht lokalisiert, wohingegen PS und PE sich auf der inneren Membranseite befinden [Woon, 1999].

1.6.1.1.2 Membranproteine

Die Membran der RBCs besteht nach aktuellem Forschungsstand aus 10 Hauptproteinen und ungefähr 100 weniger häufig vorkommenden Proteinen. Basierend auf ihren Bindungsaffinitäten zu Lipiden werden Membran-Proteine in 2 Gruppen eingeteilt. Periphere Proteine sind entweder außen- oder innenliegend auf der Membran lokalisiert und nur schwach gebunden. Integrale Proteine hingegen sind fest durch hydrophobe Aminosäuresequenzen in die Lipiddoppelschicht eingelagert [Yawata, 2003].

Die Membranproteine der RBCs können aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften in drei Kategorien klassifiziert werden. Zytoskelettproteine (α - und β -Spektrin, Protein 4.1, Aktin) sind unterhalb der Lipiddoppelschicht lokalisiert. Integrale Proteine (Band 3 und Glycophorine) sind in die Lipiddoppelschicht eingelagert und „verankerte“ Proteine (Anchoring Proteins; Ankyrin und Protein 4.2) sind sowohl mit dem Zytoskelettnetzwerk als auch mit den integralen Membranproteinen verknüpft. Die Funktion der Membranproteine wird vorzugsweise durch den Phosphorylierungs-, Methylierungs- und Glycolysierungsstatus oder auch durch Lipidmodifizierungen reguliert [Yawata, 2003; Cohen, 1992].

1.6.1.1.3 Membran-Transport

Der Ionen-transport (u.a. K^+ - und Na^+ -Ionen) durch die biologische Membran der humanen RBCs kann in folgende vier Transportmechanismen eingeteilt werden:

(1) Pumpen

(z.B. Na^+/K^+ -, Ca^{2+} -Pumpe)

(2) Carriers

(z.B. K^+/Cl^- -Co-Transporter; Na^+/Mg^{2+} -Co-Transporter; Na^+/Li^+ -Co-Transporter; $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Co-Transporter)

(3) Kanäle

(Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanal; nicht-selektiver spannungsabhängiger Kationen-Kanal)

(4) „Rest“- Transport

Die Transport-Rate kann entweder über radioaktiv markierte Substanzen, Fluoreszenz-gelabelte Farbstoffe oder auch elektrophysiologische Methoden (Patch-Clamp-Technik) detektiert werden. In Abbildung 11 sind für Na^+ und K^+ die verschiedenen Transport-Mechanismen in humanen RBCs im Detail veranschaulicht [Bernhardt, 2003].

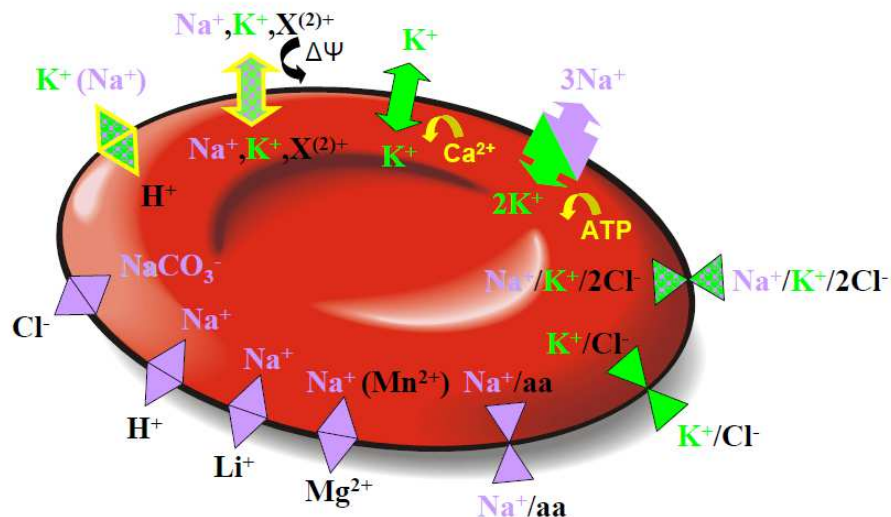


Abbildung 11: Übersicht über verschiedene Transport-Systeme für Na^+ und K^+ in humanen RBCs. Folgende Transport-Mechanismen sind dargestellt: Na^+/K^+ -Pumpe; $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporter; K^+Cl^- -Symporter; Na^+ -abhängiger Aminosäure(aa)-Transport; $\text{NaCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austausch; $\text{Na}^+(\text{Mn}^+)/\text{Mg}^{2+}$ -Antiporter; Na^+/Li^+ -Antiporter und Na^+/H^+ -Antiporter: nicht-selektiver, spannungsabhängiger Kationen-Kanal; $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Antiporter und Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanal (Gardos-Kanal). Abb. nach [Bernhardt, 2003].

1.6.1.2 Postulierte Mechanismen der Phosphatidylserin-Exposition in RBCs

1.6.1.2.1 Ca^{2+} -abhängiger Mechanismus

In vielen voneinander unabhängig durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass ein Ca^{2+} -Influx zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, dadurch zu einer Aktivierung der Phospholipid-Scramblase und folglich zur Exposition von PS von der inneren zur äußeren Membranseite der RBCs führt. Die durch Anstieg des Ca^{2+} -Levels bedingte Aktivierung des Gardos-Kanals hat außerdem ein Schrumpfen der RBCs (durch Wasser-verlust) sowie eine Abnahme des KCl-Levels zur Folge [Lang, 2003].

Ferner wird in der Literatur postuliert, dass zwei unterschiedliche Ca^{2+} -abhängige Signalwege durch einen osmotischen Schock induziert werden [Lang, 2006; Lang, 2007]. Der erste Signalweg bewirkt eine Aktivierung der Cyclooxygenase, die zu einer Bildung von Prostaglandin E_2 (PGE_2) und folglich zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen führt [Kaestner, 2004]. Der zweite Signalweg hingegen aktiviert die Phospholipase A_2 , die wiederum eine Freisetzung des Thrombozyten-aktivierenden Faktors zur Folge hat. Dieser führt zur Aktivierung der Sphingomyelinphosphodiesterase (SMase) und regt die Bildung von Ceramid an [Lang, 2006].

1.6.1.2.2 Ca^{2+} -unabhängiger Mechanismus

In der Literatur sind verschiedene mögliche Mechanismen zur PS-Exposition postuliert, die unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} -Level ablaufen. So wurde z.B. in diversen Studien gezeigt, dass es unter ATP-armen, Glucose-freien Bedingungen oder in Anwesenheit von Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) auch zur Exposition von PS kommen kann [Akel, 2006; Braun, 2009; Lang, 2003; Klarl, 2006]. Ferner konnte die Exposition von PS durch hohe Glucosekonzentrationen (0.8 M) oder auch durch Pb^{2+} -haltige Agentien ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \geq 0.1 \mu\text{M}$) detektiert werden. Bei Behandlung der RBCs mit Pb^{2+} -Ionen konnte ein Schrumpfen der Zellen über FACS-Analyse festgestellt werden [Quan, 2008; Kiedaisch, 2008]. In einer weiteren Studie wurde zudem gezeigt, dass eine Aktivierung der Caspase 3 die Exposition von PS in oxidativ gestressten RBCs reguliert [Mandal, 2002].

1.6.1.2.3 Bildung von zellulären Mikrovesikeln

Mikrovesikel sind kleine Vesikelstrukturen, die bei der Einleitung sowie während der Apoptose in Zellen freigesetzt werden. Die kleinen Mikrovesikel unterstützen u.a. die Koagulation durch Exposition von negativ geladenen Phospholipiden wie z.B. Phosphatidylserin. Mikrovesikel sind multifunktionelle Strukturen in der Zelle und befördern zudem auch Rezeptoren und Adhäsionsproteine [Diamant, 2004].

Der genaue Mechanismus der Mikrovesikelbildung ist mit der transversalen Wanderung von PS und dem ‚membrane blebbing‘ verknüpft. Die Bildung der Vesikel ist das Resultat einer vorübergehenden Überladung der äußeren Membranseite, die zu Lasten der inneren Seite der

Membran führt. Ist das Zytoskelett nicht mehr in der Lage der Oberflächenspannung entgegenzuwirken, kann eine Ausströmung der Vesikel erfolgen [Diamant, 2004].

Die humanen RBCs eignen sich sehr gut, um mögliche Interaktionen der Polysulfane (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) mit zellulären Membranen zu erforschen. Ferner besitzen die RBCs einen hohen Hämoglobingehalt, der es in Kombination mit möglichen Membraninteraktionen erlaubt, neue, alternative, biochemisch relevante Wirkmechanismen der Polysulfane an einem prominenten Metalloprotein zu identifizieren.

Die chalkogenhaltigen Sensor-/Effektor-Moleküle hingegen wirken selektiv auf intrazellulär erhöhte ROS-Level in Krebszellen. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Es wird in der Literatur postuliert, dass diese Verbindungen in der Zelle das Redoxgleichgewicht stören und es dadurch in gewissen Zellen selektiv zum Zelltod durch Apoptose kommen kann [Doering, 2010; Jamier, 2010]. Um die Wirkmechanismen solcher chemisch einfacher Redoxkatalysatoren besser zu verstehen, wurden daher u.a. umfangreiche Studien in Krebszellen und in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt.

1.6.2 Eukaryontisches Modell

1.6.2.1 Zellaufbau

Der menschliche Organismus setzt sich aus ungefähr 10 Billionen Zellen mit mehr als 200 verschiedenen Arten von Zellen zusammen [Cooper, 2009]. Jede einzelne Zelle besteht aus einer komplexen Vielfalt von Kompartimenten und Organellen, die für die Durchführung wichtiger Prozesse von größter Bedeutung sind. DNA, mRNA, (Signal-) Kaskaden von Protein-Interaktionen sowie kleine Moleküle sind verantwortlich für das Zusammenspiel verschiedener Zellbestandteile und folglich für die intra- und extrazelluläre Kommunikation [Barabasi & Olivai, 2004].

1.6.2.2 Zytoskelett

Das Zytoskelett der Zelle ist ein aus Proteinen aufgebautes Netzwerk und setzt sich aus folgenden drei Hauptkomponenten zusammen:

- (1) Aktinfilamente (F-Aktin)
- (2) Mikrotubuli
- (3) Intermediärfilamente (Zytokeratin und andere).

Die drei genannten Proteinpolymere bilden ein dichtes Netzwerk in der Zelle.

1.6.2.2.1 Aktin-Filamente (F-Aktin)

F-Aktin sind Proteinfilamente, die aus globulärem G-Aktin bestehen und sich ständig im Auf- und Abbau befinden. Ein Aktinfilament besteht aus zwei ineinander verwundenen α -Helices, deren Durchmesser 6 nm beträgt (s.a. Abb. 12).

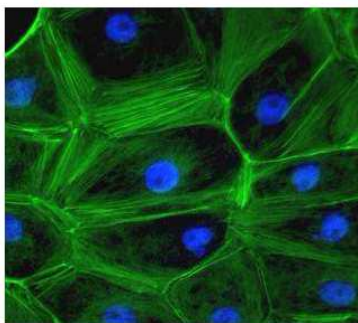


Abbildung 12: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Aktin-Filamente. Der Zellkern ist blau und die Aktin-Filamente sind grün gefärbt. Abb. nach [Alberts, 2004].

Die Hauptaufgaben der Proteinfilamente liegen in der Migration über Oberflächen, Adhäsion an extrazelluläre Membrane (Stressfasern) sowie der Formgebung der Zelle. Ferner können sie mit Hilfe von Motorproteinen zu einer Kontraktion oder Entspannung in der Zelle führen. Die physischen Eigenschaften des Aktin-Netzwerks sind abhängig von der Länge und der Konzentration an Filamenten. Aktin-bindende Proteine regulieren diese Eigenschaften und unterstützen oder verhindern die Bildung von (neuen) Filamenten. Die Aktin-bindenden Proteine nutzen zudem das Netzwerk für diverse Transportaufgaben von Zellkompartimenten

[Chhabra, 2007]. Ferner wird in der Literatur postuliert, dass Aktin eine wichtige Aufgabe bei der Antwort der Zelle auf verschiedene Stressfaktoren zukommt, wie z.B. bei extrazellulären osmotischen Veränderungen oder auch bei erhöhten ROS-Level [Bettinger, 2004; Dalle-Donne, 2001].

1.6.2.2.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hoch dynamische Strukturen, die sich aus den kleinen Protein-Untereinheiten (Heterodimere) α - und β -Tubulin zusammensetzen. Der Durchmesser eines Mikrotubulus beträgt ca. 24 nm (Abb. 13) [Jordan, 2004].

Das Mikrotubuli-Netzwerk befindet sich analog zu den Aktin-Filamenten in einem ständigen Auf- und Abbau. Dabei erfolgt die GTP-abhängige Verlängerung der Mikrotubuli immer am positiven Ende. Mikrotubuli sind essentiell für den intrazellulären Transport und bestimmen die Anordnung von Kompartimenten und Organellen in der Zelle. Ferner nehmen sie auch eine wichtige Rolle bei der Trennung der Chromosomen während der Mitose ein [Jordan, 2004].

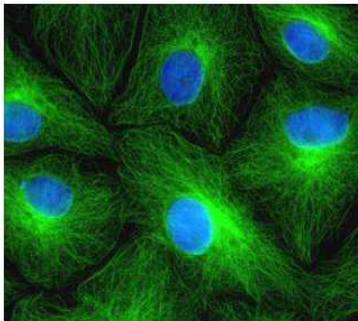


Abbildung 13: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Mikrotubuli-Strukturen. Die Mikrotubuli sind grün und der Nukleus ist blau gefärbt. Abb. nach [Alberts, 2004].

1.6.2.2.3 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente stellen die variabelsten Komponenten des Zytoskeletts dar. In unterschiedlichen Zelltypen sind verschiedene Familien dominierend, wie z.B. die Keratin-Familie in Epithelzellen. Die Intermediärfilamente setzen sich aus mehr als 70 Proteinen zusammen, deren Gemeinsamkeit in einer konservierten, aus drei Teilen bestehenden Domäne liegt. Sie sind sowohl im Nukleus als auch im Zytosol zu finden und stellen so eine

Verbindung zwischen Zellkern und Zelloberfläche her (Abb. 14). Intermediärfilamente können sich eigenständig verlängern und sind mit den Mikrotubuli und dem F-Aktin vernetzt. Intermediärfilamente verleihen den Zellen die mechanische Festigkeit und verbinden in manchen Gewebearten die Zellen miteinander [Alberts, 2004; Plattner; 2006; Skalli, 1991].

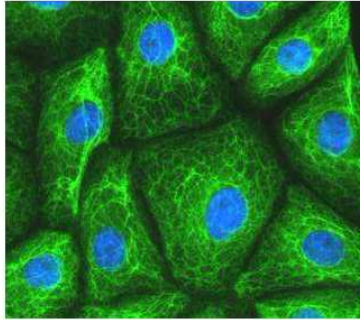


Abbildung 14: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Intermediärfilamente. Der Zellkern ist blau und die Intermediärfilamente sind grün gefärbt. Abb. nach [Alberts, 2004].

1.6.2.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus ist der zyklische Ablauf von Mitose und Interphase in einer eukaryontischen Zelle. Die zwei Abschnitte des Zellzyklus lassen sich wiederum in verschiedene Phasen eingliedern. G_0/G_1 (G = Gap) definiert die Phase der Pause zwischen Zellproliferation und DNA-Verdopplung. G_0 bezeichnet das Ruhen der ausdifferenzierten Zelle und G_1 stellt die Phase dar, in der wichtige Proteine für die anschließende S-Phase (DNA-Synthese) gebildet werden. Ferner sind in den Gap-Phasen wichtige Proteine wie z.B. CDKs (Cycline dependent Kinases) und Cycline verstärkt exprimiert, die zur Überwachung der Zellproliferation, Beseitigung von Fehlern sowie zur Induktion der Apoptose dienen. In der S-Phase (S = Synthese) erfolgt die Verdopplung der DNA, gefolgt von der G_2 -Phase zur Vorbereitung der Mitose und der damit verbundenen Synthese von wichtigen Proteinen wie z.B. α - und β -Tubulin. In der M-Phase (M = Mitose) findet die Zellteilung statt. Die DNA kondensiert während des Ablaufs von Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase. Die Schwesternchromatiden werden zu den entgegengesetzten Zellpolen transportiert und die Zellproliferation wird vollzogen [Whitfield, 2006].

1.6.3 Backhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* hat ihren Ursprung in den obergärigen Bierhefen. Die Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* haben eine runde bis ovale Form, einen Durchmesser von ca. 5 – 10 µm und vermehren sich durch den Prozess der Knospung. Der Eukaryont stellt analog zum Prokaryonten *Escherichia coli* oder auch zum Nematoden *Caenorhabditis elegans* einen wichtigen Modellorganismus in der molekular- und zellbiologischen Forschung dar [Raven, 2006; Ankeny, 2001]. Ferner wird die Backhefe über den ‚Chemical Genetic Interaction Approach‘ als wichtige Methode in der chemischen Biologie angewandt, um erste Informationen über den Wirkmechanismus von neuen, potentiellen Wirkstoffen zu erhalten. Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass Mutationen in Signalwegen, die durch spezifische Substanzen angegriffen werden, zu besonders sensitiven Mutanten für genau diese Substanzen führen. Ein Strang mit einer Mutation, der nach Inkubation mit der Verbindung keine signifikante perturbierende Wirkung zeigt, weist im Normalfall hingegen auf einen von der Substanz nicht beeinflussten Signalweg hin [Parsons, 2006].

Die beiden nachfolgenden Modellorganismen *Steinernema feltiae* und *Plasmodium falciparum* wurden u.a. für das Screening der schwefel- und selenhaltigen Nanopartikel sowie der tellurhaltigen Nanodrähte ausgesucht, um vorab, einfach und relativ schnell umfangreiche Informationen über die Toxizität der verschiedenen elementaren Nanostrukturen zu erhalten. Der Erreger der tropischen Malaria stellt ferner ein hoch interessantes medizinisches Target dar, das sensitiv gegenüber redoxmodulierenden Prozessen reagiert.

1.6.4 Nematoden

Die rundlichen Fadenwürmer (Nematoden) stellen einen der artenreichsten Stämme des Tierreichs dar und gehören zu dem Stamm der *Pseudocoelomaten* [Gaugler, 2004]. Die relativ kleinen, weißen bis farblosen fädigen Würmchen haben sich im Laufe der Evolution an nahezu alle klimatischen Bedingungen angepasst. Häufig sind mehr Nematoden nach Arten und Anzahl vorhanden als alle anderen vielzelligen Tiere (Metazoa) zusammen. Zudem gibt es auch eine erhebliche Anzahl von parasitischen Arten, sowohl in Pflanzen (z.B. das Rübenälchen) als auch in Tieren, einschließlich des Menschen. Dazu gehören zum Beispiel der Spulwurm (*Ascaris lumbricoides*), die Mikrofilarien *Wuchereria bancrofti* und *Brugia*

malayi, die Wanderfilarie (*Loa loa*), der Madenwurm (*Enterobius vermicularis*) oder der Zwergfadenwurm (*Strongyloides stercoralis*) [Decker, 1989; WHO, 1995]. Viele Nematodenarten sind Schädlinge in der Landwirtschaft und im Gartenbau, da sie durch ihr Eindringen in die Wurzelsysteme den Pflanzenstoffwechsel stark beeinträchtigen können. Je nach Stärke des Nematodenbefalls können Nematizide, biologische Bekämpfungsmethoden als auch thermische Verfahren eingesetzt werden. Nematoden, wie z.B. *Steinernema feltiae* können jedoch auch als Nützlinge gegen Schnecken und andere Pflanzenschädlinge verwendet werden. Die meisten freilebenden Nematoden sind mikroskopisch klein (Größe: 0.3 – 1 mm) und gehören zur Meio- oder Mesofauna. Die Nahrung ist unterschiedlich und reicht bei freilebenden Arten von Bakterien und Algen über Pilze, Aas und Fäkalien bis hin zu räuberisch erbeuteten Tieren [Hazir, 2001; Grewal, 2005; Gaugler, 2002]. Ein weiterer prominenter Vertreter der Nematoden stellt *Caenorhabditis elegans* dar, der in den letzten Jahrzehnten vorzugsweise in der Genetik und Entwicklungsbiologie zu einem beliebten Modellorganismus geworden ist. Die Ergebnisse der Grundlagenforschung von *Caenorhabditis elegans* lassen sich auf ein vielfältiges Organismenspektrum übertragen [Ankeny, 2001].

1.6.4.1 Nematoden der Gattung *Steinernema feltiae*

Fadenwürmer der Gattung *Steinernema feltiae* gehören zu den sogenannten entomopathogenen Nematoden, die zur Bekämpfung von verschiedenen Pflanzenschädlingen erfolgreich verwendet werden. Die Gattung ist über Symbiose mit bestimmten Enterobakterien der *Xenorhabdus*-Spezies verknüpft [Grewal, 2005; Kaya, 1993; Chavarría-Hernández, 2001]. Neben dem klassischen Einsatz als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel kann *Steinernema feltiae* auch als Modellorganismus im Labor in Betracht gezogen werden, um u.a. Informationen über die biologische Aktivität (v.a. Toxizität) von potentiellen Wirkstoffen zu erhalten.

1.6.5 Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*

1.6.5.1 Tropische Malaria (*Malaria Tropica*)

Malaria Tropica (tropische Malaria), verursacht durch den Einzeller *Plasmodium falciparum*, stellt eine der am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten weltweit dar. Mehr als 300 Millionen Menschen sind von der Krankheit betroffen, die jährlich bei etwa zwei Millionen Menschen zum Tod führt [Greenwood, 2002]. Ein Hauptgrund für die verheerende Situation ist die schnelle und effektive Resistenz in *Plasmodium falciparum* gegen klassische und auch neue Antimalaria-Medikamente. Die Suche nach neuen, potentiellen Wirkstoffen erfordert daher die Identifikation von neuen, möglichen Targets für die chemotherapeutische Behandlung [Ridley, 2002].

1.6.5.2 Oxidativer Stress in *Plasmodium falciparum*

Die Malariaparasiten sind während ihres erythrozytären Lebenszyklus' erheblichem oxidativem Stress ausgesetzt. Die pro-oxidative Umgebung wird vor allem durch Eisen und Sauerstoff verursacht, die analog der Fenton-Reaktion miteinander reagieren [Becker, 2004]. Die Hauptursache der Entstehung von ROS, wie z.B. Wasserstoffperoxid und Superoxid, liegt dabei im Metabolismus von Hämoglobin, welches in der Nahrungsvakuole verdaut wird. Dabei entstehen neben den gewünschten Aminosäuren auch ROS und toxische Nebenprodukte. So kann das Hämoglobin spontan zu Methämoglobin oxidiert werden und führt damit zur Bildung von $O_2^{\bullet-}$. Das zusätzlich anfallende toxische Häm wird überwiegend zu Hämozoin kristallisiert. Ein weiterer Teil entkommt aber diesem Prozess. Dieser diffundiert in das Cytosol der Parasiten und kann zu Membranschäden führen, sowie weitere ROS erzeugen [Muller, 2004].

Eine zusätzliche Bildung von ROS wird infolge des Sauerstoffmetabolismus aufgrund des schnellen Wachstums und der hohen Proliferationsrate erreicht [Becker, 2004]. Daneben ist der Parasit dem Immunsystem des Wirtes, welches ebenfalls ROS und Stickstoffmonoxid-Radikale ($\bullet NO$) produziert, ausgesetzt. Um sich gegen die ROS-Level wehren zu können, besitzt der Malariaerreger eine Vielzahl von antioxidativen Schutzmechanismen. Dazu zählen die Superoxid-Dismutasen und Glutathion (GSH), sowie die GSH- und Thioredoxin-abhängigen Proteine [Becker, 2004].

1.6.5.3 Antioxidative Abwehr in *Plasmodium falciparum*

Wenn der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* im sogenannten Trophozoitenstadium in humanen roten Blutzellen vorliegt, besitzt er einen sehr aktiven Glutathionmetabolismus. Viele der bekannten Glutathion-abhängigen Prozesse sind dabei direkt mit der spezifischen Lebensweise des Parasiten verknüpft. Die reduzierte Form von GSH unterstützt das schnelle Zellwachstum, indem es bei der Desoxyribonukleotidsynthese als Elektronendonator dient. Ferner nimmt es an der Detoxifizierung von Häm teil, das bei der Verdauung von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole gebildet wird [Harwaldt, 2002; Atamna, 1994]. Freie Radikale in dem Parasiten, wie z.B. das Thiylradikal (GS^{\bullet}), können über mehrere Reaktionssequenzen beseitigt werden [Wardman, 1995]. Proteine, die in die verschiedenen GSH-abhängigen Prozesse involviert sind, sind die Glutathionreduktase, Glutaredoxine, Glyoxalase I und II, Glutathion-S-Transferasen und Thioredoxine. Die genannten Proteine, sowie die ATP-abhängigen Enzyme der Glutathionsynthese, werden als potentielle Targets für neue, innovative Wirkstoffe intensiv erforscht.

2 ZIEL der Arbeit

Das Ziel dieser vorliegenden Dissertation besteht in der Aufklärung neuer, möglicher Wirkmechanismen von Polysulfanen (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) und selektiver, organochalkogenhaltiger Redoxkatalysatoren mit Hilfe moderner Methoden aus der (biologischen) Chemie. Eine Weiterführung dieser Studien beinhaltet notwendigerweise auch die Synthese von hochreaktiven, stabilen Schwefel-, Selen- und Tellur-Nanopartikeln, die anschließend in verschiedenen biologischen Modellen umfangreich auf ihre Aktivität hin untersucht werden sollen.

Die **drei Hauptziele** der Dissertation lassen sich dabei wie folgt zusammenfassen:

- (1) Screening von synthetischen Polysulfanen in roten Blutzellen zur Aufklärung eines möglichen, membran-zentrierten Wirkmechanismus.
- (2) Synthese, Aufreinigung, Charakterisierung hochreaktiver Schwefel-, Selen- und Tellur-Nanopartikel sowie Bestimmung der (biologischen) Aktivität in verschiedenen Modellen (*Steinernema feltiae*, *Plasmodium falciparum*, Krebszellen).
- (3) High Content Analyse organochalkogenhaltiger Redoxkatalysatoren in diversen, biologischen Modellen (u.a. Krebszellen, *Saccharomyces cerevisiae*) sowie Identifizierung neuer Wirkmechanismen und intrazellulärer Targets.

3 ERGEBNISSE und DISKUSSION

In diesem Kapitel werden die drei Publikationen von Herrn Dipl.-Chem. Thomas Schneider als Erstautor beschrieben, bei denen es u.a. um die Aufklärung eines neuen Wirkmechanismus von synthetischen Polysulfanen (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) in humanen roten Blutzellen geht, sowie um die Identifizierung der ersten definierten intrazellulären Targets selektiver, organochalkogenhaltiger Redoxkatalysatoren (2-(Phenyltellanyl)-3-methylnaphthoquinon und 2,3-Bis(phenyltellanyl)naphthoquinon) in verschiedenen biologischen Modellen (Krebszellen, *Saccharomyces cerevisiae*). Eine weitere Publikation beschreibt gewissermaßen die Fortführung der Studien der organischen Polysulfane (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) und handelt von der Synthese und Charakterisierung schwefel- und selenhaltiger Nanopartikel sowie tellurhaltiger Nanodrähte, die erstmals in verschiedenen biologischen Modellen (*Steinernema feltiae*, *Plasmodium falciparum*, Krebszellen) auf ihre Aktivitäten untersucht worden sind.

3.1 Interactions of polysulfanes with components of red blood cells

Thomas Schneider, Lalla A. Ba, Khairan Khairan, Clemens Zwergel, Nguyen Duc Bach, Ingolf Bernhardt, Wolfgang Brandt, Ludger Wessjohann, Marc Diederich and Claus Jacob

Auszeichnung des Manuskriptes als '**Hot article**' von der Royal Society of Chemistry.

Dieses Manuskript wurde als Artikel in folgendem Journal veröffentlicht:

Medicinal Chemistry Communications (2011) 2, 196-200.

Publikation I

© 2011 Royal Society of Chemistry.

All rights reserved.

The full text of this article is available online at

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/md/c0md00203h>

3.2 Selective antimicrobial activity associated with sulfur nanoparticles

Thomas Schneider, Alexander Baldauf, Lalla A. Ba, Vincent Jamier, Khairan Khairan, Mohammed Bader-Sarakbi, Nico Reum, Marc Schneider, Anne Röseler, Katja Becker, Torsten Burkholz, Paul G. Winyard, Mareike Kelkel, Marc Diederich, and Claus Jacob

Dieses Manuskript wurde als Artikel in folgendem Journal veröffentlicht:

Journal of Biomedical Nanotechnology (2011) 7, 395-405.

Publikation II

© 2011 American Scientific Publishers.

All rights reserved.

The full text of this article is available online at

<http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2011/00000007/00000003/art00009?token=0045147d526c39412f415d7670256f70747b605f416a762530332948d992fa51294da>

3.3 Deciphering intracellular targets of organochalcogen based redox catalysts

Thomas Schneider, Yazh Muthukumar, Bettina Hinkelmann, Raimo Franke, Mandy Döring, Claus Jacob and Florenz Sasse

Dieses Manuskript wurde als Artikel in folgendem Journal publiziert:

Medicinal Chemistry Communications (2012) 3, 784-787.

Publikation III

© 2012 Royal Society of Chemistry.

All rights reserved.

The full text of this article is available online at

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/md/c2md20049j>

4 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Charakterisierung und Identifizierung neuer, biologischer Wirkmechanismen von schwefelhaltigen Naturprodukten (Polysulfanen), elementaren, synthetischen Nanopartikeln und hochselektiven, organochalkogenhaltigen Redoxkatalysatoren. Dabei konnte für die natürlich vorkommenden Polysulfane zum ersten Mal in humanen roten Blutzellen gezeigt werden, dass ein bislang unbekannter membranzentrierter Mechanismus und neuartige Wechselwirkungen mit Metalloproteinen für (viele der) beobachteten Aktivitäten verantwortlich sind. Hingegen wirken die organochalkogenhaltigen, chinoiden Redoxkatalysatoren selektiv auf das Zytoskelett (Tubulin/Aktin), was ihre Fähigkeit erklärt, das Wachstum von Krebszellen (selektiv) zu hemmen. In einer High-Content Analyse in verschiedenen biologischen Modellen (u.a. Krebszellen und *Saccharomyces cerevisiae*) wurden zum ersten Mal definierte, intrazelluläre Targets von zwei hochreaktiven tellurhaltigen Redoxkatalysatoren (2-(Phenyltellanyl)-3-methylnaphthoquinon und 2,3-Bis(phenyltellanyl)naphthoquinon) mittels moderner Methoden (u.a. markierungsfreies Monitoring von Zellen über Impedanz-Messungen) identifiziert. Die chalkogenhaltigen Nanopartikel weisen ebenfalls eine interessante biologische Aktivität (gegen *Steinernema feltiae* und *Plasmodium falciparum*) auf, die wahrscheinlich auf das besondere Redox-Verhalten dieser Nanostrukturen zurückzuführen ist und in Zukunft ebenfalls weiter erforscht werden muss.

5 SUMMARY

This PhD thesis describes the characterization and identification of new biological modes of action of sulfur containing natural products (polysulfanes), elemental synthetic nanoparticles and highly selective organochalcogen based redox catalysts. It could be shown for naturally occurring polysulfanes with human red blood cells, that an hitherto unknown membrane centered mode of action and new interactions with metalloproteins are responsible for (most) of the observed activities. In contrast, the organochalcogen quinoid based redox catalysts act selectively on the cytoskeleton (tubulin/actin), which explains their ability to inhibit selectively the growth of cancer cells. By using a High Content Analysis in different biological models (*e.g.* cancer cells and *Saccharomyces cerevisiae*) defined intracellular targets of highly reactive tellurium containing redox catalysts (2-(phenyltellanyl)-3-methylnaphthoquinone and 2,3-bis(phenyltellanyl)naphthoquinone) could be identified for the first time with different state of the art techniques (*e.g.* kinetic cell-based morphological screening via impedance measurements). The chalcogen based nanoparticles also possess an interesting biological activity (against *Steinernema feltiae* and *Plasmodium falciparum*), that is probably based on the special redox behavior of these nanostructures and has to be studied in more detail in the future.

6 AUSBLICK

Die vorliegende, kumulative Doktorarbeit zeigt u.a. die Aufklärung eines neuen Wirkmechanismus von synthetischen Polysulfanen (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) in humanen roten Blutzellen. Die lipophilen Polysulfane DATS und DATTS können aufgrund von Ligand-Metall und hydrophober Wechselwirkungen an Metalloproteine, wie z.B. humanes Hämoglobin oder humane Histondeacetylase 4 (HDAC 4), binden. Ferner konnte über FACS-Analysen gezeigt werden, dass die Polysulfane (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$) den intrazellulären Ca^{2+} -Level in humanen roten Blutzellen signifikant erhöhen, vermutlich zur Aktivierung der Phospholipid-Scramblase führen und folglich zur Exposition von PS zur äußeren Seite der RBCs-Membran. Die resultierenden, biochemischen Veränderungen tragen zu einem signifikanten, besseren Verständnis des Wirkmechanismus der Polysulfane bei und finden vielleicht auch bei anderen Zelltypen, z.B. in eukaryontischen Modellen, statt. Die generierten Daten bilden eine breite Grundlage für weiterführende Studien auf dem Gebiet der selektiven Wirkstoffforschung.

Eine Weiterführung dieser Studie bestand in der Synthese und Charakterisierung von schwefel- und selenhaltigen Nanopartikeln sowie tellurhaltiger Nanodrähte. Umfangreiche, erstmalig durchgeführte, biologische Untersuchungen für diese Nanostrukturen in verschiedenen biologischen Modellen (*Steinernema feltiae*, *Plasmodium falciparum*, Krebszellen) zeigen die hohe antimikrobielle und selektive Aktivität der S_8 -Nanopartikel auf, die sehr wahrscheinlich, analog zu den organischen Polysulfanen (RS_xR , $R \neq H$, $x \geq 3$), auf die kettenartigen Schwefel-Schwefel-Bindungen zurückzuführen ist. Die S_8 -Nanopartikel sind gegenüber den Polysulfanen, insbesondere den Diallyltetra-, penta- oder hexasulfanen, chemisch stabiler, sind geruchsneutral und können einfach in hohen Ausbeuten generiert werden. Die selektive Toxizität der schwefelhaltigen Nanopartikel bildet eine breite Wissensbasis für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der S_8 -Nanopartikel als mögliche innovative Pestizide.

Noch besser als schwefelhaltige Redoxmodulatoren eignen sich synthetische, multifunktionale, organische selen- und tellurhaltige Sensor-/Effektor-Wirkstoffe, die selektiv auf bereits bestehende intrazellulär erhöhte ROS-Level in Krebszellen wirken. In der vorliegenden, kumulativen Dissertation konnten zum ersten Mal definierte, intrazelluläre Targets (Aktin/Tubulin) von organochalkogenhaltigen Redoxkatalysatoren (2-(Phenyltellanyl)-3-methylnaphthoquinon und 2,3-Bis(phenyltellanyl)naphthoquinon) mittels hierarchischer Clusteranalyse von Impedanzmessungen und chemogenetischem Screening

erfolgreich identifiziert werden. Mit Hilfe von DARTS (drug affinity response target stability) und Western-Blot-Analysen wurde bestätigt, dass 2-(Phenyltellanyl)-3-methylnaphthoquinon direkt an die Zytoskelettproteine Tubulin und Aktin bindet, wohingegen 2,3-Bis(phenyltellanyl)naphthoquinon nur an Aktin bindet. Die generierten Daten zeigen einen neuen, intramolekularen, Apoptose-induzierenden Mechanismus auf und bilden zugleich eine breite Grundlage, um die Wirkmechanismen der organochalkogenhaltigen Redoxkatalysatoren besser zu verstehen und darauf aufbauend neue, hoch selektive zytotoxische Leitstrukturen zu entwickeln.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AM	Allylmercaptan
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Kation
CdSe	Cadmiumselenid
CdTe	Cadmiumtellurid
Cl ⁻	Chlorid-Anion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP450	Cytochrom P450
DADS	Diallyldisulfid
DAS	Diallylsulfid
DATS	Diallyltrisulfid
DATTS	Diallyltetrasulfid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPTTS	Dipropyltetrasulfid

Dr.	Doktor
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenz aktivierter Zell-Sortierer)
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
G-Aktin	Globuläres Aktin
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Wasserstoff-Proton
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HDAC	Histondeacetylase
IC	inhibitory concentration (inhibierende Konzentration)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Internationale Union für reine und angewandte Chemie)
K ⁺	Kalium-Kation
KCl	Kaliumchlorid

LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie)
LD ₅₀	Mittlere Lethale Dosis
M	Molar
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Kation
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
mV	Millivolt
Na ⁺	Natrium-Kation
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (nach IUPAC: reduzierte Form)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Molekularer Sauerstoff
OS	Oxidativer Stress
Pb(NO ₃) ₂	Bleinitrat
Pb ⁺	Blei-Kation
PCR	Polymerase Chain Reaction

	(Polymerase-Kettenreaktion)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Prof.	Professor
PrSH	Protein mit Thiolgruppe
PS	Phosphatidylserin
RBCs	Red Blood Cells (Rote Blutzellen)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoff-Spezies)
RSSH	Perthiole
s.a.	siehe auch
S ₈	elementarer Schwefel (Schwefelringe)
SMase	Shingomyelinphosphodiesterase
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Sidewards Scatter (Seitwärtsstreulicht)
S-Thiolierung	Schwefel-Thiolierung
TEM	transmission electron microscopy (Transmissions-Elektronen-Mikroskopie)
u.a.	unter anderem
UV	Ultra-Violett
XRD	X-ray diffraction (Röntgenstrahlbeugung)

z.B.	zum Beispiel
ZnSe	Zinkselenid

7.2 Literaturverzeichnis

Abdelouas A., Gong W. L., Lutze W., Shelnett J. A., Franco R., Moura I., *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 1510–1512.

Akel A., Hermle T., Niemoeller O. M., Kempe D. S., Lang P. A., Attanasio P., Podolski M., Wieder T., Lang F., *European Journal of Pharmacology* **2006**, *532*, 11-17.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Wiley-VCH Verlag* **2004**, *4. Auflage*.

Ankeny A., *Nature Reviews Genetics* **2001**, *2*, 474-479.

Anwar A., Burkholz T., Scherer C., Abbas M., Lehr C. M., Diederich M., Jacob C., Daum N., *Journal of Sulfur Chemistry* **2008**, *29 (5)*, 251-268.

Atamna H., Pascarmona G., Ginsburg H., *Molecular and Biochemical Pharmacology* **1994**, *67*, 79-89.

Ba L. A., Doering M., Jamier V., Jacob C., *Organic Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 4203–4216.

Bair S., Palchaudhuri R., Hergenrother P. J., *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 5469 –5478.

Barkauskas J., Juskenas R., Mileriene V., Kubilius V., *Materials Research Bulletin* **2007**, *42*, 1732.

Becker K., Tilley L., Vennerstrom J. L., Roberts D., Rogerson S., Ginsburg H., *International Journal of Parasitology* **2004**, *34(2)*, 163-189.

Benson S. W., *Chemical Reviews* **1978**, *78*, 23-35.

Bernhardt I., Weiss E., (eds. Bernhardt, I., Elorry, J.C.), *Springer-Verlag* **2003**, 83-109.

Best E., Hinz I., Wendt H., *Gmelin Handbuch Anorganische Chemie* **1979**, *10*, 168–180.

Bettinger T., Gilbert D. M., Amberg D. C., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, *5*, 410-415.

Bhat H., Azmi A. S., Hadi S. M., *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *218 (3)*, 249-255.

- Boonstra J., Post J. A., *Gene* **2004**, 337, 1–13.
- Braun M., Foller M., Gulbins E., Lang F., *Biometals*, **2009**, 22, 453-460.
- Busch C., Jacob C., Anwar A., Burkholz T., Ba L. A., Cerella C., Diederich M., Brandt W., Wessjohann L., Montenarh M., *International Journal of Oncology* **2010**, 36 (3), 743-749.
- Cao B., Xie Y., Zhang S. Y., *Advanced Materials* **2004**, 16, 649–653.
- Cerella C., Scherer C., Cristofanon S., Henry E., Anwar A., Busch C., Montenarh M., Dicato M., Jacob C., Diederich M., *Apoptosis* **2009** 14 (5), 641-654.
- Chavarría-Hernández N., Torre M. D., *Biotechnology Letters* **2001**, 23, 311-315.
- Chen Y. T., Sun Q. Y., Li H. L., *Chemistry Letters* **2003**, 32, 448–453.
- Chhabra S., Higgs H. N., *Nature Reviews Cell Biology* **2007**, 95, 1110-1121.
- Chung Y., *Journal of Medicinal Food* **2006**, 9 (2), 205-213.
- Cohen M., Gascard P., *Seminars in Hematology* **1992**, 29, 244-292.
- Cooper M., and Hausman R. E., *The Cell* **2009**, ASM Press, 5. Ausgabe.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R., *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, 31 (12), 1624–1632.
- Decker H., *BRILL* **1989**, s.1.
- Deng T., Zhang Y., Yue J. C., Tang F. Q., Wei Q., *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, 111, 12024–12031.
- Deshpande S., Khomane R. B., Vaidya B. K., Joshi R. M., Harle A. S., Kulkarn B. D., *Nanoscale Research Letters* **2008**, 3 (6), 221-229.
- Diamant M., Tushuizen M. E., Sturk A., Nieuwland R., *European Journal of Clinical Investigation* **2004**, 34, 392-401.
- Dirsch M., Kiemer A. K., Wagner H., Vollmar A. M., *Atherosclerosis* **1998**, 139 (2), 333-339.
- Dodge T., Mitchell C., Hanahan, D. J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1963**, 100, 119-130.

- Doering M., Ba L. A., Lilienthal N., Nicco C., Scherer C., Abbas M., Zada A. A. P., Coriat R., Burkholz T., Wessjohann L., Diederich M., Batteux F., Herling M., Jacob C., *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, 6954–6963.
- Fermi G., Perutz M. F., Shaanan B., Fourme R., *Journal of Molecular Biology* **1984**, 175, 159-174.
- Fry F. H., Holme A. L., Giles N. M.; Giles G. I., Collins C., Holt K., Pariagh S., Gelbrich T., Hursthouse M. B., Gutowski N. J., Jacob C., *Organic and Biomolecular Chemistry* **2005**, 3 (14), 2579-2587.
- Gates B., Mayers B., Cattle B., Xia Y. N., *Advanced Functional Materials* **2002**, 12, 219–227.
- Gates B., Yin Y. D., Xia Y. N., *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 12582–12583.
- Gaugler R., Bilgrami A. L., *CABI* **2004**, s.1.
- Gaugler R., *CABI* **2002**, s.1.
- Ghosh T., Bartlett P. D., *Journal of the American Chemical Society* **1988**, 110, 7499-7506.
- Greenwood B., Mutabingwa T., *Nature* **2002**, 415, 670-672.
- Grewal S., Ehlers R. U., Shapiro-Ilan D. I., *CABI* **2005**, s.1.
- Grison E., *Journal of Chemical Physics*. **1951**, 19, 109.
- Hadi S. M., Bhat S. H., Azmi A. S., Hanif S., Shamim U., Ullah M. F., *Seminars in Cancer Biology* **2007**, 17 (5), 370-376.
- Haest W. M., (eds. Bernhardt, I., Elorry, J.C.), *Springer-Verlag*, **2003**, pp. 1-25.
- Harwaldt P., Rahlfs S., Becker K., *Biological Chemistry* **2002**, 383, 821-830.
- Hazir S., Stock S. P., Kaya H. K., Koppenhöfer A. M., Keskin N., *Journal of Invertebrate Pathology* **2001**, 77, 243-250.
- Herman-Antosiewicz A., Powolny A. A., Singh S. V., *Acta Pharmacologica Sinica* **2007**, 28 (9), 1355-1364.
- Herman-Antosiewicz A., Singh S. V., *Mutation Research* **2004**, 555 (1-2), 121-131.

- Herman-Antosiewicz A., Stan S. D. , Hahm E. R., Xiao D., Singh S. V., *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, 6 (4), 1249-1261.
- Hosono T., Fukao T., Ogihara J., Ito Y., Shiba H., Seki T., Ariga T., *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280 (50), 41487-41493.
- Huang P., Feng L., Oldham E. A., Keating M. J., Plunkett W., *Nature* **2000**, 407, 390–395.
- Ishihara Y., Shiba D., Shimamoto N., *Free Radical Research* **2005**, 39(2), 163–173.
- Jacob C., Anwar A., *Physiologia Plantarum* **2008**, 133 (3), 469-480.
- Jacob C., Battaglia E., Burkholz T., Peng D., Bagrel D., Montenarh M., *Chemical Research in Toxicology* **2012**, 25, 588.
- Jacob C., Knight I., Winyard P. G., *Biological Chemistry* **2006**, 387 (10-11), 1385-1397.
- Jacob C., *Natural Product Reports* **2006**, 23 (6), 851-863.
- Jamier V., Ba L. A., Jacob C., *Chemistry-A European Journal* **2010**, 16 (36), 10920-10928.
- Jordan A., Wilson L., *Nature Reviews Cancer* **2004**, 4, 253-265.
- Kaestner L., Tabellion W., Lipp P., Bernhardt I., *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2004**, 92, 1269-1272.
- Karmakar S., Banik N. L., Patel S. J., Ray S. K., *Apoptosis* **2007**, 12 (4), 671-684.
- Kawanishi S., Hiraku Y., Pinlaor S., Ma N., *Biological Chemistry* **2006**, 387, 365–372.
- Kaya K., Gaugler R., *Annual Review of Entomology* **1993**, 38, 181-206.
- Kiedaisch V., Akel A., Niemoeller O. M., Wieder T., Lang F., *The American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, 87, 1530-1534.
- Klarl A., Lang P. A., Kempe D. S., Niemoeller O. M., Akel A., Sobiesiak M., Eisele K., Podolski M., Huber S. M., Wieder T., Lang F., *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2006**, 290, C244-C253.
- Klotz O., Sies H., (eds.: C. Jacob, P. G. Winyard), *Wiley-VCH Verlag* **2009**, 45–61.
- Lang A., Kaiser S., Myssina S., Wider T., Lang F., Huber S. M., *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2003**, 285, C1553-C1560.

- Lang F., *Journal of the American College of Nutrition* **2007**, 26, 613S-623S.
- Lang F., Lang K. S., Lang P. A., Huber S. M., Wieder T., *Acta Physiologica* **2006**, 187, 191-198.
- Lang F., Shumilina E., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S. M., *Contributions to nephrology (ed. F. Lang)* **2006**, 142-160.
- Lang S., Durantou C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S. M., *Cell Death & Differentiation* **2003**, 10, 249-256.
- Leu L., Mohassel L., *American Journal of Health-System Pharmacy* **2009**, 66, 1913–1918.
- Liu Z., Hu Z., Xie Q., Yang B., Wu J., Qian Y., *Journal of Materials Chemistry* **2003**, 13, 159.
- Lu J., Xie Y., Xu F., Zhu L. Y., *Journal of Materials Chemistry* **2002**, 12, 2755–2761.
- Ma R., Qi L. M., Ma J. M., Cheng H. M., *Advanced Materials* **2004**, 16, 1023–1026.
- Mandal D., Mazumder A., Das P., Kundu M., Basu J., *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 39460-39467.
- Mandal D., Moitra P. K., Saha S., J. Basu J., *FEBS Letters* **2002**, 513, 184-188.
- Mayers B. T., Xia Y., *Journal of Materials Chemistry* **2002**, 12, 1875.
- McCarthy C., Thorwirth S., Gottlieb C. A., Thaddeus P., *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 4096-4097.
- Meyer B., *Chemical Reviews*, **1976**, 76, 367-388.
- Muenchberg U., Anwar A., Mecklenburg S., Jacob C., *Organic Biomolecular Chemistry* **2007**, 5 (10), 1505-1518.
- Muller S., *Molecular Microbiology* **2004**, 53(5), 1291-1305.
- Nakayama J., Aoki S., Takayama J., Sakamoto A., Sugihara Y., Ishii A., *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9085-9093.
- Nelson J., (eds. Nelson, G.J.), *Wiley Interscience* **1972**, 317-386.
- Nian H., Delage B., Pinto J. T., Dashwood R. H., *Carcinogenesis* **2008**, 29 (9), 1816-1824.

Nian H., Delage B., Ho E., Dashwood R. H., *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2009**, *50* (3), 213-221.

Nordberg J., Arnér E. S., *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, *31*, 1287-1312.

Organization, World Health, s.l., *World Health Organization*, **1995**.

Parsons B., Lopez A., Givoni I. E., Williams D. E., Gray C. A., Porter J., Chua G., Sopko R., Brost R. L., Ho C. H., Wang J., Ketela T., Brenner C., Brill J. A., Fernandez E., Lorenz T. C., Payne G. S., Ishihara S., Ohya Y., Andrews B., Hughes T. R., Frey B. J., Graham T. R., Andersen R. J., Boone C., *Cell* **2006**, *126*, 611-625.

Perry G., Raina A. K., Nunomura A., Wataya T., Sayre L. M., Smith M. A., *Free Radical Biology & Medicine* **2000**, *28*, 831-834.

Plattner H., Hentschel J., *Thieme Verlag* **2006**, *3. Auflage*.

Quan B., Han Y., Yang C., Hu W. B., Liu M. X., Liu A., Wang Y., Wang J. X., *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2008**, *16*, 1181-1184.

Raven H., Evert R. F., Eichhorn S. E., Friedl T., *De Gruyter* **2006**, *Kapitel 14*.

Ridley G., *Nature* **2002**, *415*, 686-693.

Santiago P., Carvajal E., Mendoza E., Rendon L., *Microscopy and Microanalysis* **2006**, *12(suppl. 2)*, 690.

Schafer Q., Buettner G. R., *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, *30*, 1191-1212.

Schneider T., Ba L. A., Czepukojc B., Jamier V., Jacob C., (ed. M. Diederich), *Springer-Verlag* **2012**.

Schneider T., Ba L. A., Khairan K., Zwergel C., Bach N. D., Bernhardt I., Brandt W., Wessjohann L., Diederich M., Jacob C., *Medicinal Chemistry Communications* **2011**, *2*, 196-200.

Schneider T., Baldauf A., Ba L. A., Jamier V., Khairan K., Bader-Sarakbi M., Reum N., Schneider M., Röseler A., Becker K., Burkholz T., Winyard P. G., Kelkel M., Diederich M., Jacob C., *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2011**, *7*, 395-405.

Shaaban S., Ba L., Abbas M., Burkholz T., Denkert A., Gohr A., Wessjohann L., Sasse F., Weber W., Jacob C., *Chemical Communications* **2009**, *31*, 4702-4704.

- Shan Y., Li D., Feng L. Y., Kong X. G., Liu Y. C., Bai Y. B., Li T. J., Sun J. Z., *Chinese Journal of Chemistry* **2005**, 23 (12), 1688–1692.
- Skalli O., Goldman R. D., *Cell Motility and the Cytoskeleton* **1991**, 19, 67-79.
- Smorgonskaya E. A., Kyutt R. N., Shuman V. B., Danishevskii A. M., Gordeev S. K., Grechinskaya A. V., *Physics of the Solid State* **2002**, 44, 1908.
- Stan D., Singh S. V., *Clinical Cancer Research* **2009**, 15 (15), 4895-4903.
- Szatrowski P., Nathan C. F., *Cancer Research* **1991**, 51, 794–798.
- Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H., *FEBS Letters* **1995**, 358, 1–3.
- Trachootham D., Alexandre J., Huang P., *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8, 579-591.
- Tran A., Webster T. J., *International Journal of Nanomedicine* **2011**, 6, 1553-1558.
- Trotman C. N., *Comparative Biochemistry and Physiology* **1993**, 106, 1-26.
- Tsai W., Chen H. W., Yang J. J., Sheen L. Y., Lii C. K., *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2007**, 55 (3), 1019-1026.
- Vinogradov S. N., Walz D. A., Pohajdak B., Moens L., Kapp O. H., Suzuki T., Trotman C. N., *Comp Biochem Physiol B* **1993**, 106, 1-26.
- Viry E., Anwar A., Kirsch G., Jacob C., Diederich M., Bagrel D., *International Journal of Oncology* **2011**, 38 (4), 1103-1111.
- Wang C., Yang J. H., Hsieh S. C., Sheen L. Y., *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2010**, 58 (11), 7096-7103.
- Wang N., Du F. L., *Crystal Research and Crystal Technology*. **2006**, 41 (4), 323–327.
- Wang Y., Tang Z., Podsiadlo P., Elkasabi Y., Lahann J., Kotov N. A., *Advanced Materials* **2006**, 18, 518.
- Wardman P., von Sonntag C., *Methods in Enzymology* **1995**, 251, 31-45.
- Whitfield L., George L. K., Grant G. D., Perou C. M., *Nature Reviews Cancer* **2006**, 6, 99-106.
- Woon A., Holland J. W., Kable E. P., Roufogalis D., *Cell Calcium* **1999**, 25, 313-320.

- Wu X., Kassie F., Mersch-Sundermann V., *Mutation Research* **2005**, 589 (2), 81-102.
- Xiao D., *Carcinogenesis* **2005**, 27 (3), 533-540.
- Xiao D., Choi S., Johnson D. E., Vogel V. G., Johnson C. S., Trump D. L., Lee Y. J., Singh S. V., *Oncogene* **2004**, 23 (33), 5594-5606.
- Xiao D., Herman-Antosiewicz A., Antosiewicz J., Xiao H., Brisson M., Lazo J. S., Singh S. V., *Oncogene* **2005**, 24 (41), 6256-6268.
- Xiao D., Lew K. L., Kim Y. A., Zeng Y., Hahm E. R., Dhir R., Singh S. V., *Clinical Cancer Research* **2006**, 12 (22), 6836-6843.
- Yawata Y., *WILEY-VCH Verlag* **2003**, 1-46.
- Yu X., Xie J., Yang J., Wang K., *Journal of Power Sources* **2004**, 132, 181.
- Zeng T., Zhang C. L., Zhu Z. P., Yu L. H., Zhao X. L., Xie K. Q., *Toxicology* **2008**, 252 (1-3), 86-91.
- Zhang H., Yang D. R., Ji Y. J., Ma X. Y., Xu J., Que D. L., *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 1179–1182.
- Zhang S., Gao X. Y., Zhang L. D., Bao Y. P., *BioFactors* **2001**, 15, 27-38.
- Zheng W., Liu Y. W., Hu X. G., Zhang C. F., *Electrochimica Acta* **2006**, 51, 1330.
- Zhu Y. J., Wang W. W., Qi R. J., Hu W. L., *Angewandte Chemie, International Edition* **2004**, 43, 1410.