

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik - Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in A549 Tumorzellen nach ZnO
Nanopartikelexposition

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Florian Illy
aus Friedrichshafen

Mainz, 2022

Zusammenfassung

Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO NP) sind aufgrund ihrer Charakteristika und einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften in verschiedenen Anwendungsbereichen bereits weit verbreitet. Sie werden gleichzeitig als innovative Wirkstoffe für medizinische Anwendungen immer attraktiver. Allerdings führt die kontinuierliche Verwendung von ZnO NP zu einer zunehmenden Freisetzung in die Umwelt mit unbekanntem Ergebnissen hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen und möglicherweise gesundheitsschädlichen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus. Um mögliche Nebenwirkungen der steigenden Exposition beurteilen zu können, aber auch um die Translation nanopartikelbasierter Therapeutika in die klinische Praxis zu ermöglichen, müssen profunde Kenntnisse über ihr Verhalten in biologischen Systemen erlangt werden. In diesem Zusammenhang war das Ziel dieser Arbeit, das genotoxische Potential von ZnO NP zu evaluieren. Das Auftreten, die Dynamik und die zugrundeliegenden Mechanismen von ZnO-NP-induzierten Doppelstrangbrüchen als eine der schwerwiegendsten Form von DNA-Schäden wurden an der menschlichen alveolären Adenokarzinom-Zelllinie (A549) untersucht.

Um Apoptose-begleitende DNA Doppelstrangbrüche von direkten ZnO NP bedingten DNA Schäden unterscheiden zu können, wurden mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* - Analyse subtoxische Dosen definiert und in den weiteren Analysen verwendet. Anschließend wurden DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) durch eine γ H2AX-Expressionsanalyse mittels Western Blot nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von A549 Zellen mit ZnO NP zu DSB führte. Interessanterweise kam es bei Behandlung mit 100 μ g/ml ZnO NP zu einem frühen Auftreten von DSB innerhalb der ersten 5 Minuten und einem anschließenden Einpendeln der γ H2AX-Werte auf das Niveau der Kontrollgruppen. Bei einer ZnO NP Konzentration von 20 μ g/ml wurde ein deutlich späterer Peak an DNA-Schäden 48 h nach ZnO NP Behandlung festgestellt.

Während die frühen DSB in Zusammenhang mit extrazellulär freigesetzten Zn^{2+} -Ionen stehen könnten, wäre für die beobachteten DNA-Schäden 48 h nach ZnO NP Behandlung die zelluläre Aufnahme solider ZnO NP und ihre anschließende intrazelluläre Dissoziation ein denkbarer Mechanismus.

Bei der Immundetektion wurde eine zusätzliche Proteinbande, vermutlich mono-ubiquitiniertes γ H2AX (γ H2AX-ub1) nachgewiesen. Die quantitative Analyse der Banden ergab, dass das Verhältnis γ H2AX / γ H2AX-ub1 bei sub-toxischen ZnO NP Dosierungen konstant blieb. Bei zytotoxischen Behandlungsschemen hingegen konnte kein γ H2AX-ub1 detektiert werden, was

nahe legt, dass kein γ H2AX-ub1 während der Apoptose gebildet wird. Die Ergebnisse weisen auf die Spezifität von mono-ubiquitiniertem γ H2AX als Biomarker für nicht-apoptotische DSB hin.

Die Daten zeigen abhängig von der eingesetzten Dosis eine zytotoxische bzw. genotoxische Aktivität von ZnO NP. Freigesetzte Zn^{2+} -Ionen vermitteln zumindest teilweise diese Effekte. Beteiligte Signalwege sollten nun in weiterführenden Experimenten definiert werden.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung/Fragestellung | 1 |
| 2 Literaturdiskussion | 2 |
| 2.1 Zink | 2 |
| 2.1.1 Zink im menschlichen Organismus | 2 |
| 2.1.2 Die Biochemie von Zink | 3 |
| 2.1.2.1 Zink-Koordinationsumgebungen und die Funktionen von Zink | 3 |
| 2.1.2.2 Zink-Metalloenzyme | 4 |
| 2.1.2.3 Zink als struktureller Bestandteil von Proteinen | 5 |
| 2.1.2.4 Zink-Proteine in der Genregulation | 5 |
| 2.1.2.5 Zn ²⁺ -Ionen in der Signalweiterleitung | 6 |
| 2.1.2.6 <i>Redox-Zinc-Switch</i> | 6 |
| Abbildung 5: <i>Redox-Zinc-Switch</i> | 7 |
| 2.1.3 Zink-Homöostase | 7 |
| 2.1.3.1 Zink-Transporter | 7 |
| 2.1.3.2 Zink-Sensoren | 7 |
| 2.1.3.3 Zink-Bindungsmoleküle: Metallothionein | 8 |
| Abbildung 8: Zink-Bindungsmoleküle: Metallothionein | 9 |
| 2.1.3.4 Physiologische und pathologische Zn ²⁺ -Ionen Konzentrationen | 9 |
| 2.2 <i>Nanotechnologie, Nanomaterialien und Nanomedizin</i> | 10 |
| 2.2.1 Zink Oxid Nanopartikel (ZnO NP) | 10 |
| 2.2.2 Anwendungsmöglichkeiten und Risiken | 11 |
| 2.2.3 Expositionswege, Verteilung und Folgen der Partikelaufnahme | 11 |
| 2.2.3.1 Haut | 11 |
| 2.2.3.2 Gastrointestinal-Trakt | 11 |
| 2.2.3.3 Atemwege | 11 |
| 2.2.3.4 Gezielte Anwendung als Therapeutikum: i.v. oder i.a. Gabe | 12 |
| 2.2.4 Nanotoxizität von ZnO NP | 12 |
| 2.2.5 <i>In vitro</i> Zytotoxizitätsmechanismen | 13 |
| 2.2.5.1 Zn ²⁺ -Ionen-Freisetzung | 13 |
| 2.2.5.2 Extrazelluläre Freisetzung von Zn ²⁺ -Ionen | 13 |
| 2.2.5.3 Aufnahme von ZnO NP in die Zelle | 14 |
| Abbildung 10: Zn ²⁺ -Ionen-Freisetzung aus ZnO NP | 15 |
| 2.2.5.4 Intrazelluläre Freisetzung von Zn ²⁺ -Ionen aus ZnO NP | 15 |
| 2.2.5.5 Zn ²⁺ -Ionen-abhängiger Zytotoxizitätspfad | 16 |
| 2.2.5.6 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) | 16 |
| 2.2.5.7 ZnO NP und die Erzeugung von ROS | 16 |
| 2.2.5.7.1 Fenton und Haber-Weiss-Reaktionen | 16 |
| 2.2.5.7.2 Reduzierte GSSG-Reduktase-Aktivitäten | 17 |
| 2.2.5.7.3 Mitochondriale Dysfunktion | 17 |
| 2.2.6 Genotoxizität | 17 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3 | <i>DNA-Doppelstrangbrüche</i> | 19 |
| 2.3.1 | DDR: Eine Signaltransduktionskaskade | 19 |
| 2.3.1.1 | H2AX - Phosphorylierung | 19 |
| 2.3.1.2 | Die Rolle von γ H2AX und γ H2AX-ub1 in der DDR | 20 |
| 2.3.1.3 | Nutzung von γ H2AX und γ H2AX-ub1 zur Unterscheidung von apoptotischen und nicht-apoptotischen DNA-Doppelstrangbrüchen | 22 |
| 3 | Material und Methoden | 23 |
| 3.1 | <i>Material</i> | 23 |
| 3.1.1 | Zelllinien | 23 |
| 3.1.2 | Zinkoxid-Nanopartikel | 23 |
| 3.1.2.1 | Charakterisierung der ZnO NP Charge MV323 | 23 |
| 3.1.3 | Chemikalien | 24 |
| 3.1.4 | Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 3.1.5 | Geräte | 27 |
| 3.1.6 | Puffer, Lösungen, und Zellkulturmedium | 29 |
| 3.2 | <i>Methoden</i> | 31 |
| 3.2.1 | Zellkultur | 31 |
| 3.2.1.1 | Kultivierung der Zellen | 31 |
| 3.2.1.2 | Zellzählung | 31 |
| 3.2.1.3 | Aussaat der Zellen für die Behandlung | 32 |
| 3.2.1.4 | Ernten der Zellen | 32 |
| 3.2.1.4.1 | Ernten der Zellen für Auswertung mittels Western Blot | 32 |
| 3.2.1.4.2 | Ernten der Zellen für Auswertung mittels Durchflusszytometrie | 32 |
| 3.2.1.5 | Kryokonservierung der Zellen | 33 |
| 3.2.2 | Zinkoxid Nanopartikel und Zinkchlorid-Lösung | 33 |
| 3.2.2.1 | Lagerung und Aliquotierung der Zinkoxid Nanopartikel | 33 |
| 3.2.2.2 | Behandlung von Zellen mit Zinkoxid-Nanopartikeln | 33 |
| 3.2.2.3 | Behandlung von Zellen mit Zinkchlorid-Lösung | 34 |
| 3.2.3 | Bestrahlung der Zellen | 34 |
| 3.2.4 | SDS-PAGE und Western Blot | 34 |
| 3.2.4.1 | Arbeitsablauf des Western Blots | 35 |
| 3.2.4.2 | Erstellung der Proben | 35 |
| 3.2.4.3 | Proteinbestimmung und Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE | 36 |
| 3.2.4.4 | Durchführung der SDS-PAGE | 36 |
| 3.2.4.5 | Proteintransfer vom Gel auf die Membran | 37 |
| 3.2.4.6 | Immundetektion | 38 |
| 3.2.4.7 | Densitometrische Analyse der Proteinbanden | 39 |
| 3.2.5 | Durchflusszytometrie (FACS) | 39 |
| 3.2.5.1 | Arbeitsablauf Apoptose-Nekrose-Assay | 41 |
| 3.2.5.1.1 | Erstellung der Proben | 41 |
| 3.2.5.1.2 | Apoptose Färbung und Messung mittels FACS | 41 |
| 3.2.5.2 | Auswertung | 42 |
| 3.2.6 | Lichtmikroskopie | 42 |
| 4 | Ergebnisse | 43 |
| 4.1 | <i>Zytotoxizitätsbestimmung</i> | 44 |
| 4.2 | <i>γH2AX Expressionsanalyse mittels Western Blot</i> | 48 |
| 4.2.1 | Doppelbanden nach ZnO NP und ZnCl ₂ Behandlung | 48 |
| 4.2.2 | Doppelbanden nach Bestrahlung und zytotoxischen ZnO NP Dosierungen | 50 |
| 4.2.3 | Verhältnis der densitometrischen Werte (γ H2AX / γ H2AX-ub1) | 50 |
| 4.2.4 | Analyse von DNA-Schäden mittels γ H2AX Expressionsanalyse | 53 |

| | | |
|----------|--|------------------------------------|
| 4.2.4.1 | Kurze Zeiträume (Abbildung 25) | 53 |
| 4.2.4.2 | Lange Zeiträume (Abbildung 26) | 55 |
| 5 | Diskussion | 57 |
| 5.1 | <i>γH2AX –Formation bei Apoptose</i> | 57 |
| 5.2 | <i>Mono- und di-ubiquitiniertes γH2AX</i> | 59 |
| 5.3 | <i>γH2AX-ub1 als Biomarker für nicht-apoptotische DNA-Doppelstrangbrüche</i> | 59 |
| 5.4 | <i>Genotoxizität von ZnO Nanopartikel</i> | 60 |
| 5.5 | <i>Extrazelluläre ZnO NP Auflösung und Zn^{2+}-Ionen vermittelte DSB</i> | 60 |
| 5.6 | <i>Aufnahme der ZnO NP und intrazelluläre Dissoziation</i> | 62 |
| 5.7 | <i>Zn^{2+}-Ionen abhängiger Genotoxizitätspfad</i> | 63 |
| 5.8 | <i>Vergleichbarkeit der Ergebnisse</i> | 64 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 65 |
| 7 | Anhang | 74 |
| 7.1 | <i>Western Blot und Immundetektion von γH2AX</i> | 74 |
| 8 | Danksagung | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| 9 | Tabellarischer Lebenslauf | Fehler! Textmarke nicht definiert. |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Zinkverteilung im menschlichen Körper | 2 |
| Abbildung 2: Position von Zink im Periodensystem | 4 |
| Abbildung 3: Stabilitätskonstanten für von Metall ²⁺ -Ionen gebildete Komplexe | 4 |
| Abbildung 4: Zinkfinger-Proteine | 5 |
| Abbildung 5: <i>Redox-Zinc-Switch</i> | 7 |
| Abbildung 6: Genomische Effekte als Folge von Zinksignalen..... | 8 |
| Abbildung 7: Struktur von Metallothionein..... | 8 |
| Abbildung 8: Zink-Bindungsmoleküle: Metallothionein | 9 |
| Abbildung 9: Maßstab von Nanomaterialien | 10 |
| Abbildung 10: Zn ²⁺ -Ionen-Freisetzung aus ZnO NP..... | 15 |
| Abbildung 11: DNA-Schadensantwort auf DSB und SSB | 20 |
| Abbildung 12: Unterschiede in der γ H2AX-Ubiquitinierung | 22 |
| Abbildung 13: TEM Aufnahme der ZnO NP Charge MV323 | 23 |
| Abbildung 14: Stain-Free Gel und Stain-Free Blot..... | 37 |
| Abbildung 15: Aufbau einer Wet-Blot Kassette | 38 |
| Abbildung 16: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie (FACS)..... | 40 |
| Abbildung 17: Toxizitätsbestimmung von ZnO NP und ZnCl ₂ -Lösung..... | 45 |
| Abbildung 18: Toxizitätsbestimmung von ZnO NP (40 μ g/ml)..... | 46 |
| Abbildung 19: Toxizitätsbestimmung von ZnO NP und ZnCl ₂ -Lösung..... | 47 |
| Abbildung 20: Western Blot: <i>Kurze Behandlungszeiträume</i> | 49 |
| Abbildung 21: Western Blot: <i>Lange Behandlungszeiträume</i> | 49 |
| Abbildung 22: Western Blot: ZnO NP und Bestrahlung..... | 50 |
| Abbildung 23: Verhältnis der densitometrischen Werte..... | 51 |
| Abbildung 24: Verhältnis der densitometrischen Werte..... | 52 |
| Abbildung 25: γ H2AX Expression nach Behandlung mit ZnO NP/ZnCl ₂ | 54 |
| Abbildung 26: γ H2AX Expression nach Behandlung mit ZnO NP | 56 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Chemikalien | 24 |
| Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien | 25 |
| Tabelle 3: Geräte..... | 27 |
| Tabelle 4: Verwendete ZnO NP/ZnCl ₂ Konzentrationen und Dosierung..... | 34 |
| Tabelle 5: Behandlungsplan für Western Blot..... | 35 |
| Tabelle 6: Eingesetzte Blockierungs- und Antikörperlösungen | 39 |
| Tabelle 7: Kombinationen der gemessenen Fluoreszenzsignale | 41 |
| Tabelle 8: Behandlungsplan FACS..... | 42 |
| Tabelle 9: Ergebnisse der Immundetektion von γ H2AX | 75 |
| Tabelle 10: Statistische Analyse: <i>Kurze Behandlungszeiträume</i> | 76 |
| Tabelle 11: Ergebnisse der Immundetektion von γ H2AX | 77 |
| Tabelle 12: Statistische Analyse: <i>Lange Behandlungszeiträume</i> | 78 |
| Tabelle 13: Verhältnisse densitometrischen Werte (γ H2AX / γ H2AX-ub1)..... | 79 |
| Tabelle 14: Statistische Analyse der densitometrischen Werte: <i>Kurze Zeiträume</i> | 81 |
| Tabelle 15: Verhältnisse densitometrischen Werte: <i>Lange Zeiträume</i> | 82 |
| Tabelle 16: Statistische Analyse der densitometrischen Werte: <i>Lange Zeiträume</i> | 84 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Ausgeschriebener Name |
|-------------------|--|
| ANOVA | <i>One-Way Analysis Of Variance</i> |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| ATM | <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> |
| ATR | <i>Ataxia Telangiectasia Rad3</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CHK1 | Checkpoint-Homolog-Kinase 1 |
| CHK2 | Checkpoint-Homolog-Kinase 2 |
| DDR | DNA-Schadensantwort (<i>DNA-Damage-Response</i>) |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| (DNA)-DSB | (DNA)-Doppelstrangbrüche |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | <i>Enhanced Chemiluminescence Substrate</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FACS | <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | <i>Forward-Scatter</i> |
| MT | Metallothionein |
| NAC | N-Acetylcystein |
| (D)PBS | <i>(Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline</i> |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |

| | |
|------------------|---|
| PS | Phosphatidylserin |
| PVDF | Polyvinylidenfluoridmembran |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SSC | <i>Side-Scatter</i> |
| TE | Trypsin-EDTA |
| TBS | <i>Tris-Buffered Saline</i> |
| TBST | <i>Tris-Buffered Saline</i> mit Tween |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UB | Unbehandelte Probe |
| ZnO NP | Zinkoxid-Nanopartikel |
| ZnT | Zinktransporter |
| γH2AX | H2A, Mitglied der Histonfamilie X, phosphoryliert an Serin 139 |
| γH2AX-ub1 | Monoubiquitiniertes γH2AX |
| γH2AX-ub2 | Diubiquitiniertes γH2AX |

1 Einleitung/Fragestellung

Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO NP) gehören aufgrund ihrer Charakteristika und einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften zu den am häufigsten verwendeten Nanomaterialien in Verbraucherprodukten. Das breite Anwendungsspektrum gibt allerdings Anlass zur Sorge über ihre potenzielle Toxizität. Gleichzeitig werden ZnO NP als innovative Wirkstoffe für medizinische Anwendungen immer attraktiver und um die Translation nanopartikelbasierter Therapeutika in die klinische Praxis zu ermöglichen, müssen profunde Kenntnisse über ihr Verhalten in biologischen Systemen erlangt werden.

In diesem Zusammenhang befasst sich die vorliegende Doktorarbeit mit dem genotoxischen Potential von ZnO NP. Ziel war es, das Auftreten, die Dynamik und die zugrundeliegenden Mechanismen von ZnO NP-induzierten Doppelstrangbrüchen als eine der schwerwiegendsten Form von DNA-Schäden an der menschlichen alveolären Adenokarzinom-Zelllinie (A549) zu untersuchen. Metalloxid-Nanopartikel wie ZnO NP sind in der Lage, Metallionen freizusetzen und es ist bereits belegt, dass eine Korrelation zwischen der Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen und ihrer Zytotoxizität besteht. Deshalb sollten Versuche mit $ZnCl_2$ überprüfen, ob extrazellulär freigesetztes, nanopartikuläres Zink als Vermittler von DNA-Schäden in der Tumorzelllinie A549 in Frage kommt.

Methodisch wurden für diese Arbeit Zellkulturen (A549) angelegt und im Zuge von Vorversuchen zytotoxische Effekte der ZnO NP im Zuge einer zeit- und dosisabhängigen Behandlung mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* analysiert. Sub-toxische Behandlungsschemata wurden definiert und dann für die genotoxischen Analysen verwendet. DNA-Doppelstrangbrüche (DNA DSB) sollten durch eine γ H2AX-Expressionsanalyse mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Forschungsfragen:

- Bei welchen Dosen und Zeiträumen besitzen die untersuchten ZnO NP zytotoxische Aktivität in der Tumorzelllinie A549?
- Bei welchen Dosen und Zeiträumen besitzen die untersuchten ZnO NP genotoxische Aktivität in der Tumorzelllinie A549?
- Inwiefern können zytotoxische und genotoxische Effekte der ZnO NP voneinander abgegrenzt werden?
- Kommen extrazellulär freigesetzte, nanopartikuläre Zn^{2+} -Ionen als Vermittler von DNA-Schäden in der Tumorzelllinie A549 in Frage?

2 Literaturdiskussion

2.1 Zink

2.1.1 Zink im menschlichen Organismus

Der Gehalt an Zink im menschlichen Körper beträgt physiologisch 2-4 g und die Blut-Plasmakonzentration reicht von 12-16 μM . Demzufolge handelt es sich bei Zink per definitionem um ein Spurenelement, welches vor allem in der Skelett-Muskulatur (60% der gesamten Zinkmenge im Körper), Knochen (30%), Leber (5%) und der Haut (5%) vorliegt. [1] (Abbildung 1)

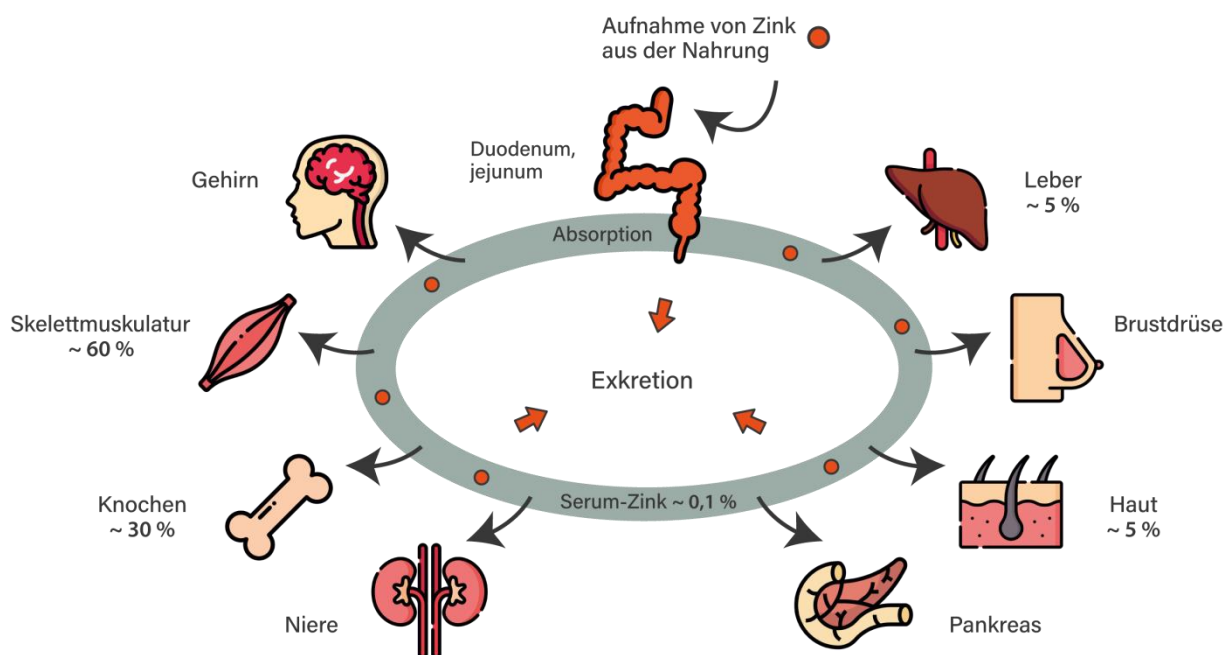


Abbildung 1: Zinkverteilung im menschlichen Körper

Das mit der Nahrung aufgenommene Zink wird hauptsächlich im Duodenum und Jejunum absorbiert und dann in periphere Gewebe wie Skelettmuskeln (60%), Knochen (30%), Leber (5%), Haut (5%) Gehirn, Niere und Bauchspeicheldrüse verteilt. Überschüssiges Zink wird durch gastrointestinale Sekretion, Ablösung von Mucosa-Zellen und über die Nieren ausgeschieden. Verändert nach Golan et al. 2017. [2]

Zink ist ubiquitär in der Zelle verteilt: etwa 30-40% des gesamten zellulären Zinks befindet sich im Zellkern, etwa 50% im Zytoplasma und den sich dort befindlichen Organellen, und der Rest ist mit Membranen assoziiert. [3] In den meisten menschlichen Zellen liegt die Zink-Gesamtkonzentration bei 200-300 μM . [4] Bestimmte Typen von Neuronen oder Zellen der Prostata weisen allerdings höhere Zink-Konzentrationen auf. [5] [6] In den meisten Zelltypen

ist mit sehr großem Abstand der größte Anteil von intrazellulärem Zink an Proteine gebunden. Im Gegensatz dazu steht das sogenannte „freie Zink“, welches nicht an Proteine gebunden ist. Es existiert in nur sehr geringen Konzentrationen im Zytoplasma. Die meisten Zink-Metalloproteine haben Metallbindungsaffinitäten im Bereich von nM bis pM, was darauf hindeutet, dass auch die Konzentration von „freiem Zink“ in diesem Bereich liegt. Peck und Ray ermittelten 1971 die „freie Zink“- Konzentration basierend auf der Affinität des Enzyms Phosphoglucose-6-Phosphatase für Zink und schlossen auf eine Konzentration im Bereich von mehreren hundert Picomol pro Liter.

2.1.2 Die Biochemie von Zink

Zink spielt für das Wachstum, die Entwicklung und die Differenzierung von unterschiedlichsten Lebensformen, einschließlich Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren, eine essenzielle Rolle. [7] Bereits 1869 postulierten Raulin et al. den Bedarf von Zink für das Wachstum des Schimmelpilzes *Aspergillus niger*. [8] Das erste Zink-Metalloenzym, Carboanhydrase II wurde 1940 von Keilin und Mann entdeckt. Sie zeigten, dass Zink essenziell notwendig für dessen enzymatische Aktivität ist. Vermutlich binden etwa 2800 der menschlichen Proteine Zink, was circa 10% des menschlichen Proteoms entspricht. [9]

2.1.2.1 Zink-Koordinationsumgebungen und die Funktionen von Zink

Obwohl Zink in lebenden Organismen redox-inert ist und nur einen Wertigkeitszustand (Zn (II)) besitzt [10], erfüllt es verschiedene Funktionen im menschlichen Organismus. Zink fungiert als katalytisches Metall in Zink-Metalloenzymen und ist, öfter als jedes andere Metall-Ion, ein integraler Bestandteil für den Erhalt und die Ausbildung der Struktur in Proteinen. Über einen Mechanismus der Zn^{2+} -Ionen Freisetzung sind manche Zink-Bindungen auch chemisch aktiv und wichtig für die Interaktionen zwischen verschiedenen Biomolekülen im Sinne der Signalweiterleitung. Ein Beispiel dafür sind Verknüpfungen zwischen der Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen aus Zink-Proteinen und dem Redox-Metabolismus. [11] Zink in Verbindung zeigt eine flexible und dynamische Koordinationsgeometrie mit sowohl Stickstoff- und Sauerstoff- als auch Schwefelliganden, welche wiederum in Histidin-, Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten in Proteinen vorhanden sind. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für die vielen biologischen Funktionen von Zink. [12] [13] Die jeweils unterschiedlichen Koordinationsumgebungen modulieren die chemischen Eigenschaften des Zn^{2+} -Ions, steuern die Kinetik seiner Bindung und ermöglichen dem Zn^{2+} -Ion entweder metabolisch aktiv oder inert zu sein. [14]

2.1.2.2 Zink-Metalloenzyme

In allen sechs großen Enzymklassen sind insgesamt über 200 Zink-Enzyme bekannt. [15] [9] [16]. Weshalb Zink in diesen Enzymen ein geeigneter Co-Faktor für enzymatische Reaktionen ist, geht bereits aus seiner Stellung im Periodensystem hervor (Abbildung 2): Zink-Kationen enthalten bereits ein gefülltes d-Orbital (d^{10}), nehmen demzufolge nicht an Redoxreaktionen teil und bleiben in biologischem Medium stabil. In seiner katalytischen Funktion wiederum fungiert Zink als Lewis-Säure. Im Vergleich zu den anderen redox-inerten und divalenten Metall-Ionen, Calcium und Magnesium hat Zink die größte Affinität zu den Elektronendonatoren der jeweiligen Liganden (Abbildung 3), was auch durch seine Position in der Irving-Williams-Serie veranschaulicht wird. [17] [18]

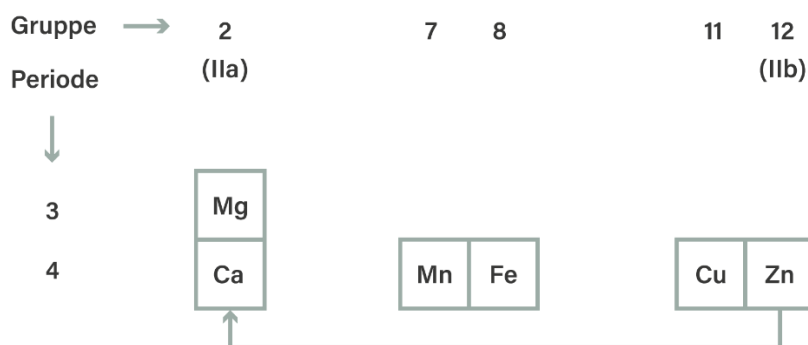


Abbildung 2: Position von Zink im Periodensystem

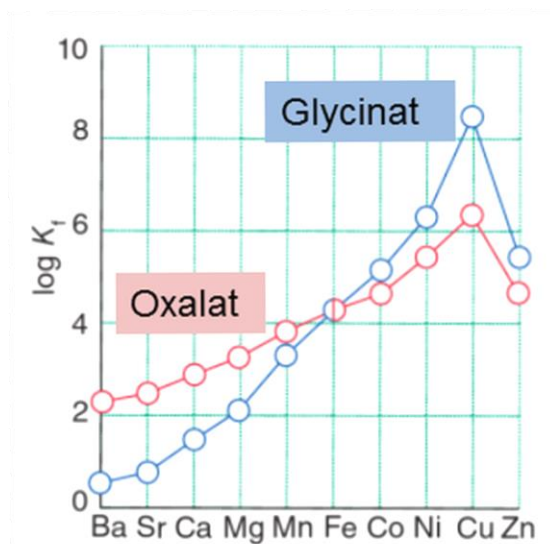


Abbildung 3: Stabilitätskonstanten für von Metal^{2+} -Ionen gebildete Komplexe

Die Stabilitätskonstanten (K_f) für ausgewählte von Metal^{2+} -Ionen gebildeten Komplexen (hier Oxalat- und Glycinat-Liganden) werden gezeigt. Obwohl der absolute Wert von Ligand zu Ligand variiert, ist die relative Affinität von Liganden mit demselben Donoratom für diese Metalle immer ähnlich und durch die Irving-Williams-Reihe beschrieben. [19] Verändert nach Shriver et al. 2014. [20]

2.1.2.3 Zink als struktureller Bestandteil von Proteinen

Zink ist ein wichtiger struktureller Bestandteil in vielen Proteinen, von denen der größte Anteil eine Rolle in der Genregulation spielt. Zink bildet typischerweise Koordinationskomplexe mit vier Liganden in einer tetraedrischen Geometrie. Von den potenziellen Zn^{2+} -Liganden in Proteinen (siehe 2.1.2.1) überträgt das Schwefelatom vom Cystein die meiste Ladung auf das Zn^{2+} -Ion und vermindert die Fähigkeit des Zn^{2+} -Ion, als Lewis-Säure zu agieren, wodurch diese Komplexe relativ reaktionsträge werden. So kommt es, dass Zn^{2+} -Cysteinkomplexe eher strukturelle Rollen innerhalb von Proteinen erfüllen. [21] [22]

2.1.2.4 Zink-Proteine in der Genregulation

Das menschliche Genom codiert für etwa 1500 regulatorische sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren. [23] Etwa die Hälfte der eukaryotischen Transkriptionsfaktoren bindet Zink. [9] Viele solcher Zink-Proteine, die bei der Regulation der Genexpression mitwirken, enthalten einen oder mehrere sogenannter Zinkfinger. Das sind kleine Proteindomänen, die durch ein Zn^{2+} -Ion stabilisiert werden. Sie sind die am häufigsten vorkommende Klasse struktureller Zn^{2+} -Cysteinkomplexe. [24] Zinkfinger-Proteine fungieren unter anderem als DNA-Bindungsmotive. (Abbildung 4) [25]

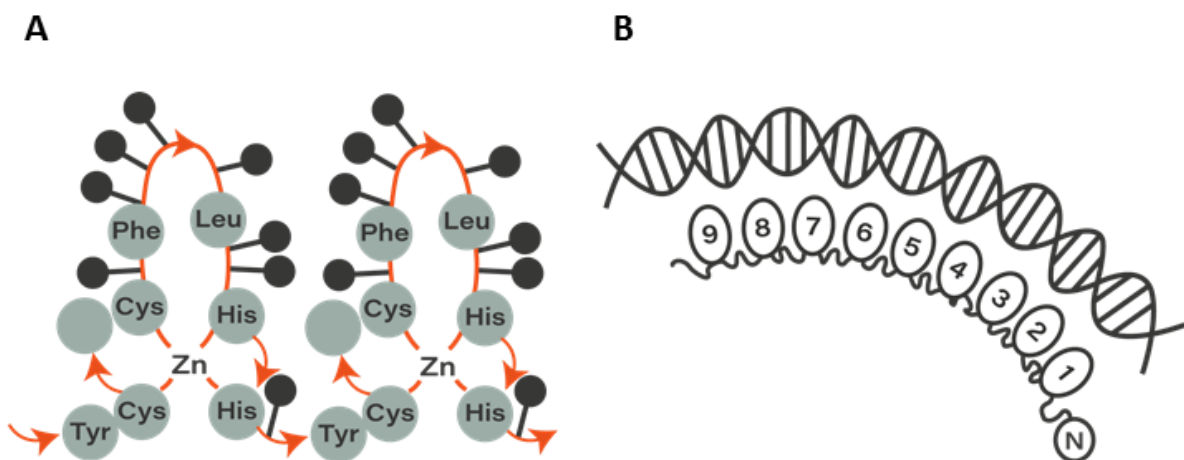


Abbildung 4: Zinkfinger-Proteine

Zinkfinger-Proteine haben mindestens eine Zinkfingerdomäne. (A): Innerhalb einer Zinkfingerdomäne wird das Zn^{2+} -Ion durch zwei Histidin- und zwei Cysteinreste tetraedrisch gebunden. Dadurch werden die α -Helices stabilisiert, welche die DNA sequenz-spezifisch erkennen. (B): Der Aufbau des Transkriptionsfaktors IIIA (TFIIIA) als Paradigma der Zinkfinger-Proteine ist dargestellt. Jeder der neun Zinkfinger bindet genau in eine große Furche der DNA. Verändert nach Klug et al. (2010). [26]

2.1.2.5 Zn²⁺-Ionen in der Signalweiterleitung

Zn²⁺-Ionen erfüllen regulatorische Funktionen in der Signalweiterleitung innerhalb von Zellen und zwischen Zellen, wobei diese Form der Signalübertragung gleichbedeutend ist mit einer vorübergehenden Veränderung des Levels an „freiem Zink“ in der Zelle. [27] [28] [29] Zn²⁺-Ionen werden beispielsweise von stimulierten Neuronen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und beeinflussen die postsynaptische Zelle. [30] Intrazelluläre Zn²⁺-Ionen-Signale werden im Zytosol ausgehend von dem extrazellulären Raum oder aus intrazellulären Zink-Speichern erzeugt. Der Import, Export und die Freisetzung von Zn²⁺-Ionen aus Zink-Proteinen tragen somit zur Fähigkeit einer Zelle bei, Signale zu generieren. Zn²⁺-Ionen können in diesem Zusammenhang als *second messenger* betrachtet werden. [31] [29] Manche Proteine wie beispielsweise Metallothioneine sind in der Lage, als eine Antwort auf Redox-Signale Zn²⁺-Ionen-Signale zu generieren, weshalb sie auch als *Redox-Zinc-Switch* bezeichnet werden. [32] [29]

2.1.2.6 Redox-Zinc-Switch

Ein relativ neu entdecktes Prinzip der Proteinstruktur, das in mehreren Zink-Proteinen existiert, sind sogenannte *Redox-Zinc-Switches*. [29] Das Zn²⁺-Ion selbst ist redox-inert, koordiniert jedoch Cystein-Liganden, welche dem Komplex redox-aktive Eigenschaften verleihen. Die Grundlage dieses Mechanismus besteht in einer Kopplung zwischen dem Redox-Zustand und dem Gleichgewicht zwischen Zink- / Thiolat-Koordination im reduzierten Zustand und der Ausbildung von Disulfidbrücken im oxidierten Zustand. (Abbildung 5) [21] [33] [32] Abhängig vom Redox-Zustand und der Cystein/Cystin Konversion kommt es zur Änderung des Zinkbindungsstatus. Die Oxidation der Schwefelliganden setzt Zn²⁺-Ionen frei, während die Reduktion der Schwefelliganden die Zinkbindungskapazität wiederherstellt. [21] Das freigesetzte Zink kann dann an andere Proteine im Sinne der Zn²⁺-Ionen-Signalübertragung binden. Als eine weitere Konsequenz des Zink-Verlustes kann sich auch die Konformation des betreffenden *Redox-Zinc-Switches* ändern. [21] [11]

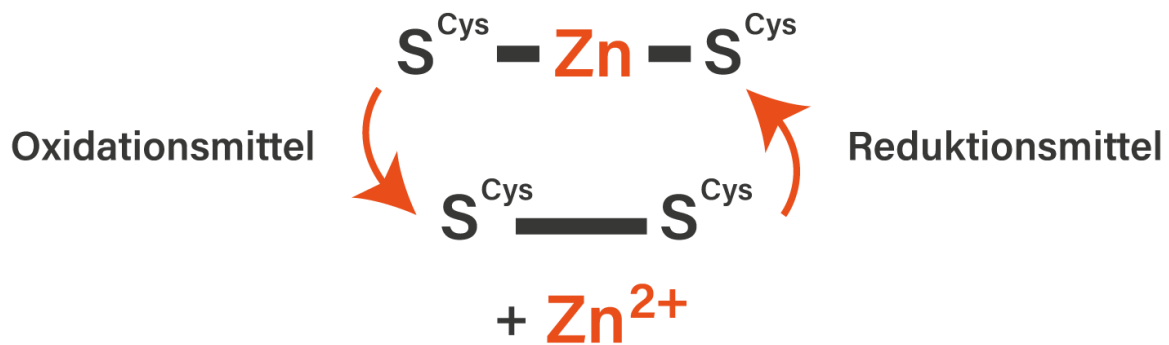


Abbildung 5: Redox-Zinc-Switch

Die Grundlage dieses Mechanismus besteht in einer Kopplung zwischen dem Redox-Zustand und dem Gleichgewicht zwischen Zink- / Thiolat-Koordination im reduzierten Zustand und der Ausbildung von Disulfidbrücken im oxidierten Zustand. Die Oxidation der Schwefelliganden setzt Zink frei, während die Reduktion der Schwefelliganden die Zinkbindungskapazität wiederherstellt. Verändert nach Maret et al. 2017. [29]

2.1.3 Zink-Homöostase

Die große Anzahl an bekannten Zinkproteinen und ihre reibungslose Funktion erfordert eine korrekte homöostatische Kontrolle von Zink in der Zelle. Zum einen ist die Regulation des „freien Zinks“ wichtig, weil „freie“ Zn^{2+} -Ionen sehr reaktiv und zytotoxisch sind. [34] Zum anderen ist auch für die Funktion von Zn^{2+} -Ionen-Signalen die Wiederherstellung des Gleichgewichtszustandes notwendig. Um eine enge intrazelluläre Zinkkontrolle zu ermöglichen, existieren verschiedene Proteine deren Aufgabe die Gewährleistung der zellulären Zink-Homöostase ist: Zink-Bindungsmoleküle, Zink-Transporter und sog. Zink-Sensoren. [35] [36] Durch sie wird es möglich, die Konzentration an Zink, welches nicht an einen Bindungspartner gebunden ist, strikt auf den extrem niedrigen Werten im picomolaren Konzentrationsbereich zu halten. [36]

2.1.3.1 Zink-Transporter

Zink-Transporter (ZnT) sind notwendig, denn Zn^{2+} -Ionen sind als geladenes, zweiwertiges Kation nicht in der Lage die Zellmembran durch passive Diffusion zu passieren. Zink-Transporter der ZnT-Familie senken den zytoplasmatischen Zinkspiegel durch den Efflux von Zink aus der Zelle in den Extrazellularraum oder durch den Transport in intrazelluläre Vesikel und Organellen. Transporter aus der ZIP (Zink-Importeur)-Familie hingegen erhöhen den zytoplasmatischen Zinkspiegel. Sie ermöglichen die Aufnahme von Zink aus dem extrazellulären Raum und die Freisetzung von Zink aus Vesikeln und Organellen. [36] [37]

2.1.3.2 Zink-Sensoren

Der *Metal-Response-Element*-bindende Transkriptionsfaktor-1 (MTF-1) ist der einzige bekannte eukaryotische Zn^{2+} -Ionen Sensor. Er steuert zinkabhängig die Genexpression von

Proteinen. Bei erhöhten Zink-Konzentrationen in der Zelle wird dadurch beispielsweise die Transkription jener Gene erhöht, welche für Metallothionein (MT) oder ZnT-1 kodieren. (Abbildung 6) [38] [39]

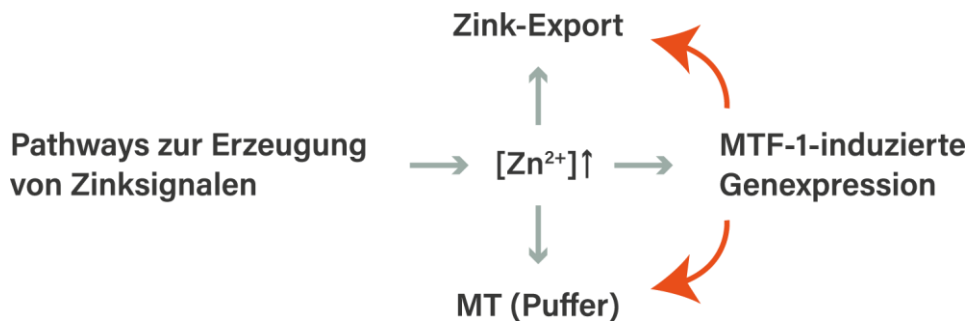


Abbildung 6: Genomische Effekte als Folge von Zinksignalen

MTF-1 ist ein Zink-Sensor. Als Transkriptionsfaktor induziert er zinkabhängig die Expression des Zinkexporteurs ZnT1 und von Metallothionein und passt so die zelluläre Zinkpufferkapazität an. Verändert nach Maret et al. 2017. [29]

2.1.3.3 Zink-Bindungsmoleküle: Metallothionein

Metallothioneine (MT) sind Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht (6-7 kDa), die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse der Metallhomöostase mitwirken, und in der Lage sind Metall-Ionen zu komplexieren. Bis zu sieben Zn^{2+} -Ionen können von den Cystein-Sulfhydryl-Gruppen eines MT-Proteins gebunden werden. (Abbildung 7) [40] MT sind aber auch in der Lage, abhängig vom Redox-Status Zn^{2+} -Ionen aufzunehmen oder in das Zytoplasma abzugeben. [33] Sie sind *Redox-Zink-Switches* (siehe 2.1.2.6) und erfüllen auch dynamische Funktionen als Zink-Akzeptoren und Zink-Donatoren im Zuge der Signalweiterleitung. (Abbildung 8) Bisher wurde kein anderes Protein neben MT gefunden, das für die vorübergehende Zinkspeicherung in der Zelle zuständig ist. [32] [27]

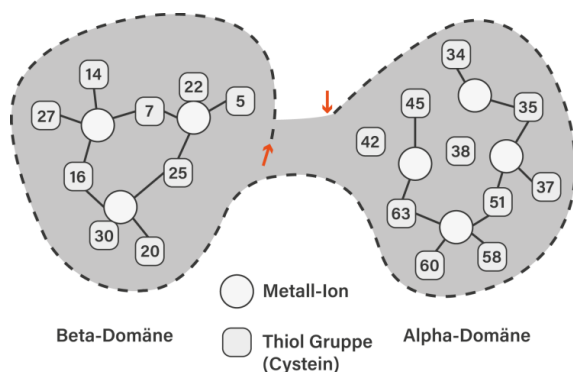


Abbildung 7: Struktur von Metallothionein

Verändert nach Gumulec et al. 2012. [40]

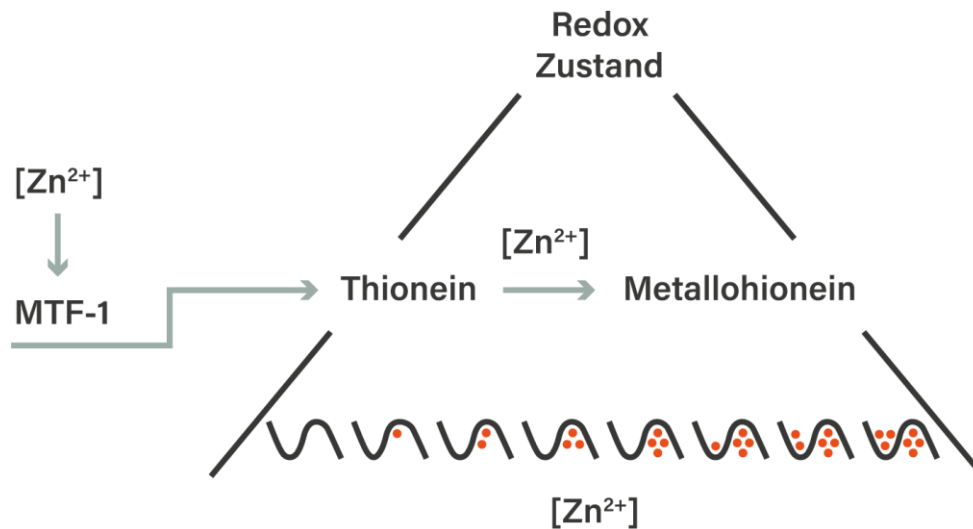


Abbildung 8: Zink-Bindungsmoleküle: Metallothionein

Die Transkription von Metallothionein-Genen wird durch den Zink-Sensor MTF-1 gesteuert. Metallothioneine dienen der vorübergehenden Zinkspeicherung sind aber auch Redox-Zink-Switches. Der zelluläre Redox-Zustand beeinflusst die Zink-Bindungskapazität von (Metallo-)Thionein. Die Oxidation der Schwefelliganden setzt Zn²⁺-Ionen frei, während die Reduktion der Schwefelliganden die Zinkbindungskapazität wiederherstellt. Abhängig von der Zink-Verfügbarkeit und vom Redox-Zustand sind Metallothioneine mit bis zu 7 Zn²⁺-Ionen beladen. Die metallbeladene Form wird Metallothionein genannt, die metallfreie ist das Thionein. Geändert nach Maret et al. 2011. [27]

2.1.3.4 Physiologische und pathologische Zn²⁺-Ionen Konzentrationen

Fluktuationen der Zn²⁺-Ionen Konzentration spielen in physiologischen Konzentrationsbereichen eine wichtige Rolle für regulatorische Funktionen. (siehe 2.1.2.5) Zusätzlich entfaltet Zink in diesen Konzentrationen anti-oxidative Wirkungen, wird aber aufgrund seiner redox-inerten Eigenschaften als pro-Antioxidans bezeichnet. [27] Zink bindet an die Sulfhydrylgruppen von Cystein und schützt so die Zelle vor oxidativem Stress. Zusätzlich ist Zink an der Expression von anti-oxidativen Proteinen beteiligt, die unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren MTF-1 und Nrf-2 stehen. [41] Wenn der physiologische Konzentrationsbereich unter- oder überschritten wird, i.e. bei Zinkmangel oder bei Zinküberakkumulation, kommt es zu „pro-oxidativen“ Wirkungen von Zink. [42] Auf der einen Seite ist der Schutz der Sulfhydrylgruppen von Proteinen unter Zinkmangel unzureichend. [43] Auf der anderen Seite werden bei Zinküberakkumulation unter anderem die mitochondriale Atmung und antioxidative Enzyme wie die Glutathion-Reduktase (GSR) gehemmt. [36] Der Abschnitt 2.2.5.5 *Zn²⁺-Ionen abhängiger Zytotoxizitätspfad* dieser Arbeit beschäftigt sich im Zusammenhang mit Zinkoxid-Nanopartikeln (ZnO NP) ausführlich mit dieser Thematik. Zellen sind insbesondere dann anfällig für Zinküberakkumulationen und damit einhergehende Schäden, wenn die zelluläre Zinkpufferkapazität durch MT unter Bedingungen wie oxidativem Stress beeinträchtigt ist.

2.2 Nanotechnologie, Nanomaterialien und Nanomedizin

Nach der aktuellen Definition der Europäischen Union (EU) sind Nanomaterialien natürliche, zufällige oder hergestellte Materialien, die Partikel in ungebundenem Zustand enthalten, entweder als Aggregate oder als Agglomerate, wobei mindestens 50% dieser Partikel eine äußere Dimension im Größenbereich von unter 100 nm aufweisen. [44] Im Vergleich mit demselben Material in *Bulk-Form* unterscheiden sich Nanopartikel in ihrem chemischen, biologischen und katalytischen Verhalten. [45] [44] [46] [47] Das größere Verhältnis von Oberfläche zu Volumen geht mit einer erhöhten Oberflächenreaktivität einher. [48] Aus biologischer Sicht und mit Blick auf die Nanomedizin haben Nanopartikel außerdem die Dimension von Enzymen, Rezeptoren und Antikörpern. (Abbildung 9) Diese Eigenschaft ermöglicht es Nanopartikeln mit zellulären Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren zu interagieren. Der Transfer von Nanopartikeln in innere zelluläre Strukturen erlaubt die Manipulation intrazellulärer Prozesse in einem bisher undenkbaeren Ausmaß. [49] [50] Deshalb bieten nanomedizinische Anwendungen eine große Chance, therapeutisches Potenzial auszuschöpfen, das bisher aufgrund chemischer, physikalischer oder biologischer Beschränkungen unerreichbar war. [51] [52] [53]

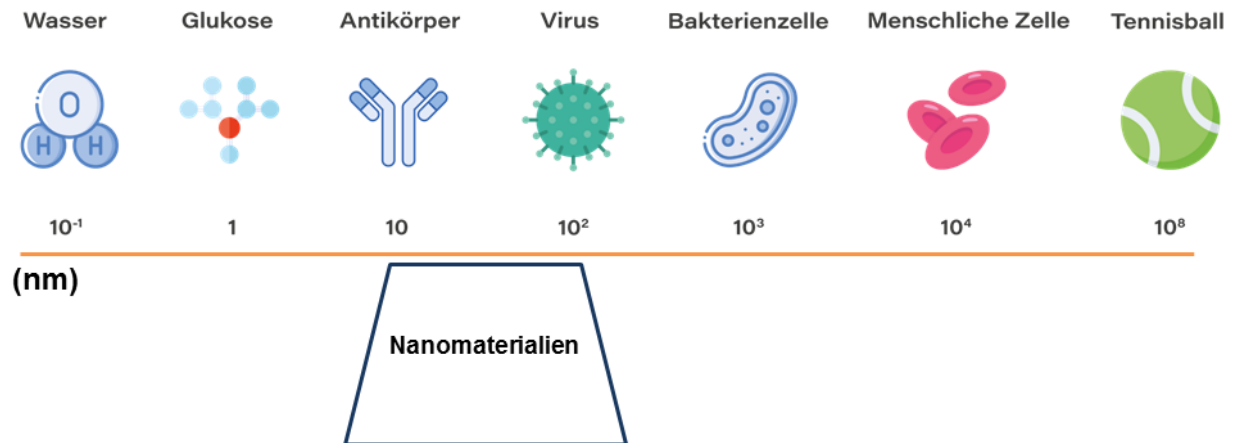


Abbildung 9: Maßstab von Nanomaterialien

Die Größe von Nanomaterialien wird im Verhältnis zu anderen Objekten dargestellt. Verändert nach (Amin et al. 2014) [54]

2.2.1 Zink Oxid Nanopartikel (ZnO NP)

In den letzten Jahren haben sich ZnO NP aufgrund ihrer Charakteristika und einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie z.B. der hohen chemischen und mechanischen Stabilität, der hohen Katalyse-aktivität und dem breiten Spektrum der Strahlungsabsorption in verschiedenen Anwendungsbereichen etabliert. [55] [56] Die

scheinbar gute Biokompatibilität von ZnO NP macht es interessant, auch ihre antibakteriellen, antimykotischen, antiviralen und krebsbekämpfenden Eigenschaften in der Therapie zu nutzen. [57] Zinkoxid-Nanopartikel kommen in einer großen Vielfalt von Strukturen vor. Zudem sind sie als Metalloxid-Nanopartikel in der Lage Zn^{2+} -Ionen freizusetzen und so über zusätzliche Mechanismen mit dem Körper zu interagieren. Dies macht sie wahrscheinlich zu einer der vielseitigsten Familien von Nanostrukturen. [58] [55]

2.2.2 Anwendungsmöglichkeiten und Risiken

ZnO NP haben aufgrund ihrer außergewöhnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten. [59] [56] Verwendung finden ZnO NP beispielsweise in der Industrie und in der Kosmetik [60]. Sie gehören zu den am häufigsten verwendeten Nanomaterialien in Kosmetika und Sonnenschutzmitteln, da sie UV-Licht effizient absorbieren aber gleichzeitig sichtbares Licht nicht streuen. Dadurch sind sie transparent und ästhetisch annehmbar. [61]. Die zunehmende Produktion und Verwendung von ZnO NP führt allerdings zur Freisetzung in die Umwelt und zu einer Anreicherung in Luft, Boden, Wasser und Pflanzen. Dem folgt die unvermeidliche Exposition des Menschen verbunden mit Bedenken hinsichtlich ihrer noch nicht ausreichend erforschten und möglicherweise gesundheitsschädlichen Auswirkungen. [62] [63]

2.2.3 Expositionswege, Verteilung und Folgen der Partikelaufnahme

Kontakt zwischen dem menschlichen Organismus und ZnO NP entsteht bei dermalen Exposition, Inhalation oder oraler Aufnahme. [47] Ein weiterer, neuer „Expositionsweg“, besonders im Hinblick auf potenzielle, zukünftige biomedizinische Anwendungen von ZnO NP als Krebstherapeutikum, könnte die i.v. oder i.a. Gabe von ZnO NP darstellen. [64] [65] [57]

2.2.3.1 Haut

Für Verbraucher von Kosmetik ist die Exposition über die Haut eine Möglichkeit, mit ZnO NP in Kontakt zu kommen. ZnO NP durchdringen die Haut, insbesondere das Stratum corneum jedoch nicht oder nur in geringem Maße. Dies gilt auch für sonnenverbrannte Haut. [66] [67]

2.2.3.2 Gastrointestinal-Trakt

ZnO NP können über Produkte, wie beispielsweise Zahnpasta oral aufgenommen werden und in den Gastrointestinal-Trakt gelangen. Studien an Enterozyten von *Xenopus laevis* zeigten in diesem Zusammenhang eine Auswirkung von metallischen Nanopartikeln, insbesondere ZnO NP, auf ROS-Bildung, Entzündung und Nekrose in den untersuchten Zellen. [68]

2.2.3.3 Atemwege

Vandebriel et. al (2012) verglichen in einem Review von 2012 (*A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles*) eine Vielzahl von *In-vivo*-Experimenten an Säugetieren. Die Ergebnisse

deuten darauf hin, dass verglichen mit den anderen untersuchten Expositionswegen die Inhalation von ZnO NP die größte Gefahr darstellt. [66] Partikel mit Größen im Nanometerbereich sind in der Lage die peripheren Atemwege zu erreichen und an den Alveolarzellen zytotoxische, genotoxische und entzündliche Wirkungen hervorzurufen. [47] Unterschiede zwischen Nanopartikeln und *Bulkmaterial* existieren in Bezug auf Ablagerungsorte und *Clearance*. Die inhalierten Partikel mit einem Durchmesser von 1 nm und 50 nm reichern sich in allen Abschnitten des Respirationstraktes an, während größere Partikel ($> 1 \mu\text{m}$) sich hauptsächlich im Nasopharyngealbereich ablagerten. [69] Weiterhin sind intratracheal instillierte Partikel mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm in der Lage in den Blutkreislauf zu gelangen. [70] Die Partikel werden auf diesem Weg dann direkt oder indirekt an weitere Organe verteilt. [71] Zielorgane sind Leber, Milz, Lunge, Niere und das Herz. [66] Eine Veröffentlichung stellt indes sogar die Hypothese auf, dass NP über periphere Nerven bis in das Gehirn gelangen könnten [72]

2.2.3.4 Gezielte Anwendung als Therapeutikum: i.v. oder i.a. Gabe

Ein weiterer „Expositionsweg“, besonders im Hinblick auf potentielle, zukünftige biomedizinische Anwendungen von ZnO NP als Krebstherapeutikum, stellt die i.v. oder i.a. Gabe von ZnO NP dar. Daten bezüglich der Verteilungsrates in verschiedene Organe nach i.v. oder i.a. Gabe von ZnO NP sind allerdings rar: DeLong et al. (2021) zeigten in Mausversuchen, dass nach intravenöser Verabreichung von ZnO NP eine Verteilung in Leber, Milz, Niere und Lunge stattfindet. [73] Zusätzlich gibt es wichtige *in vitro* Erkenntnisse z.B. aus den Arbeiten von Wiesmann et al. (2019): Es wurde gezeigt, dass die Endothelzellen der Blutgefäße sehr empfindlich gegenüber ZnO NP sind. [57] Auch in anderen Studien wurde nach ZnO NP Behandlung eine erhöhte Expression entzündungsfördernder Oberflächenproteine in verschiedenen Endothelzellsystemen festgestellt. [74] [75] Dies verlangt nach einer Strategie, die sicherstellt, dass ZnO NP, die in den Blutkreislauf injiziert werden, ihre toxische Ladung nur am Tumor freisetzen. Eine Möglichkeit wäre die ZnO NP im Blutkreislauf durch eine Beschichtung zu schützen und die Therapie somit spezifischer zu gestalten. [76]

2.2.4 Nanotoxizität von ZnO NP

Dass ZnO NP zytotoxische Effekte auf verschiedene biologische Systeme haben können wurde in Bakterien [63] und Säugetierzellen [77] [78] [79] bereits demonstriert. Auch ist bekannt, dass die intratracheale Instillation von ZnO NP oxidativ-entzündliche Reaktionen in der Lunge des Menschen hervorrufen können. [80] Aus Abschnitt 2.2.3.3 geht hervor, dass die Exposition der Atemwege gegenüber ZnO NP eine mögliche Gefahr darstellt. Die bronchiale Epithelzelllinie (BEAS-2B) und die alveoläre Adenokarzinom-Zelllinie (A549) sind beide menschliche Zelllinien, die die Atemwege repräsentieren und häufig verwendet werden. [81]

Eine zytotoxische Wirkung von ZnO NP gilt zumindest gegenüber diesen beiden, aber auch einigen anderen Zelllinien als gesichert. [66] [61] [82] [81] [77] *In-vivo*-Daten über die toxischen Auswirkungen auf ganze Organismen sind allerdings noch spärlich. [83] Auf die nanotoxikologischen Ergebnisse können sich neben der ZnO NP Dosis und dem untersuchten Zelltyp auch die physikalischen Eigenschaften der NP, d.h. Größe, Oberflächenladung, Agglomerationsverhalten, Form und die jeweilige Versuchsumgebung *in vitro*, z.B. die Phosphat- und Protein-Konzentration im Zellkulturmedium auswirken. [84] [85] Größe, Oberflächenladung und das Agglomerationsverhalten der jeweiligen ZnO NP Charge werden als wichtigste Parameter zur Bestimmung des zytotoxischen Potenzials von ZnO NP diskutiert. [86, 87] [88]

2.2.5 *In vitro* Zytotoxizitätsmechanismen

Die zunehmende Exposition gegenüber Nanopartikeln [89] und der Blick in die Zukunft, nämlich auf die potentielle Anwendung von ZnO NP in der Medizin erfordern neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Nanotoxizität: „Um eine Translation dieser Partikel in die klinische Praxis zu ermöglichen ist es fundamental wichtig ihr Verhalten in biologischen Systemen im Detail zu verstehen, um so ihre Toxizität genau kontrollieren zu können.“ [83]

2.2.5.1 Zn²⁺-Ionen-Freisetzung

Metalloxid-Nanopartikel wie ZnO NP stellen toxikologisch eine besondere Herausforderung dar, weil sie in der Lage sind Metallionen frei zu setzen. [65] Grundlegend gilt es hier zwischen zwei verschiedenen Szenarien zu differenzieren. Das sind die extrazelluläre Dissoziation von ZnO NP und die intrazelluläre Freisetzung von Zn²⁺-Ionen aus ZnO NP. Die intrazelluläre Freisetzung von Zn²⁺-Ionen setzt jedoch eine vorherige Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle voraus.

2.2.5.2 Extrazelluläre Freisetzung von Zn²⁺-Ionen

Zn²⁺-Ionen können bereits extrazellulär aus ZnO NP freigesetzt und anschließend internalisiert werden. [90] [91] Dies wird insbesondere von Arbeiten gestützt, in denen eine schnelle intrazelluläre Akkumulation von Zn²⁺-Ionen nach ZnO NP Behandlung beobachtet wurde. Heim et al. zeigten dementsprechend, dass die Exposition von A549 Zellen gegenüber ZnO NP verschiedener Größe zu einem schnellen intrazellulären Anstieg der Zn²⁺-Ionen-Konzentration innerhalb von 10 Minuten führte. Interessanterweise wurde dabei auch die Akkumulation von Zn²⁺-Ionen im Nucleus festgestellt. [92] Wiesmann et al. (2019) zeigten durch Versuche mit Zinkchlorid (ZnCl₂), dass extrazellulär frei gesetzte Zn²⁺-Ionen zytotoxische Effekte hervorrufen. [65]

2.2.5.3 Aufnahme von ZnO NP in die Zelle

Die intrazelluläre Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen aus ZnO NP, setzt eine vorherige Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle voraus. In einer Vielzahl von Studien mit unterschiedlichen Methoden und verschiedenen Zelllinien wurde beobachtet, dass die Aufnahme von ZnO NP in das Zellinnere grundsätzlich stattfinden kann. Beobachtungen von Gilbert et al. (2012), bei denen die Röntgen- und Rasterkraftmikroskopie verwendet wurden, zeigen die Internalisierung solider ZnO NP in BEAS-2B Zellen. [93] Hackenberg et al. (2011) beobachteten ZnO NP sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus von menschlichen *nasal-mucosa*-Zellen. [94] Durch die Methodik der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) konnten Wiesmann et al. (2015) zeigen, dass ZnO@SiO₂ Nanopartikel (ZnO NP mit einer Silica-Beschichtung) innerhalb von 4 h nach ZnO NP Behandlung von verschiedenen Tumorzelllinien, inklusive der auch in meiner Arbeit untersuchten Zelllinie A549 internalisiert wurden. [65] Condello et al. (2016) zeigten den Eintritt von ZnO NP in menschliche Kolonkarzinomzellen mittels TEM. [95] Nach Rejman et al. und Condello et al. (2016) ist die Endozytose ein möglicher Aufnahmemechanismus für ZnO NP. [96] [95] Scherzad et al. (2019) beobachteten, dass bei der Kultivierung von hMSC-Zellen in Plasma Nanopartikel-Agglomerate in der Plasmagruppe größer waren, als bei der Kultivierung der Zellen in DMEM-EM. Es wurden geringere Mengen an intrazellulären ZnO NP in der Plasmagruppe beobachtet und während bei der Standardkultivierung mit DMEM-EM, Zelltod und DNA-Schäden bereits bei 15 µg/ml ZnO NP auftraten, wurden solche Effekte in der Plasmagruppe nicht beobachtet. Das deutet auf eine Korrelation zwischen der Toxizität von ZnO NP und ihrer Aufnahme hin. [97] Die Gesamtgröße des Partikels beeinflusst die zelluläre Aufnahme, unabhängig davon, ob dieser Partikel aus einer einzelnen Einheit oder aus einer Ansammlung von Partikeln, bzw. einem Aggregat oder Agglomerat besteht. [98] [97] Darüber hinaus kann die Aufnahme abhängig von der Oberflächenbeschichtung [99], der Oberflächenladung [100] und des entsprechenden Zelltyps der aufnehmenden Zelle unterschiedlich ausfallen. [101]

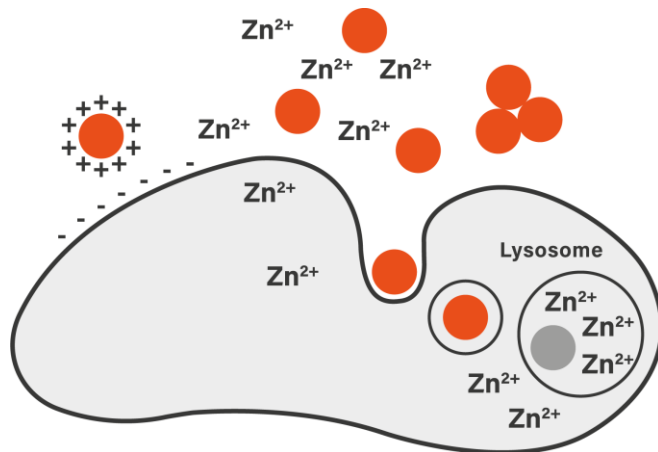


Abbildung 10: Zn²⁺-Ionen-Freisetzung aus ZnO NP

Es scheint eine Korrelation zwischen der ZnO NP-induzierten Zytotoxizität und der intrazellulären Zn²⁺-Ionen-Konzentration zu bestehen. Grundlegend können zwei verschiedenen Szenarien unterschieden werden: 1) Zn²⁺-Ionen können extrazellulär aus ZnO NP freigesetzt und anschließend internalisiert werden. 2) Die intrazelluläre Freisetzung von Zn²⁺-Ionen aus ZnO NP setzt eine vorherige Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle voraus. Die Instabilität von ZnO NP bei niedrigem pH-Wert führt zu der Auflösung der Nanopartikel während des endozytären Aufnahmeprozesses, innerhalb der Endosomen, Lysosomen oder in einem anderen sauren Kompartiment. Die Gesamtgröße, Oberflächenbeschichtung und Oberflächenladung der Nanopartikel, sowie der Zelltyp der aufnehmenden Zelle beeinflussen die zelluläre Aufnahme. Verändert nach Wiesmann et al. 2020. [57]

2.2.5.4 Intrazelluläre Freisetzung von Zn²⁺-Ionen aus ZnO NP

Ein wichtiger Faktor für die Nanotoxizität ist der Punkt, an dem sich die internalisierten ZnO NP auflösen und es zur Freisetzung von Zn²⁺-Ionen kommt. Cho et al. (2011) zeigten, dass ZnO NP sich nicht in künstlicher Intrazellulär-Flüssigkeit auflösen (Gamble-Lösung, pH 7,4), jedoch in künstlicher Lysosomaler-Flüssigkeit (pH 4,5) schnell zu Zn²⁺-Ionen dissoziieren. [102] Auch ist bekannt, dass der pH-Wert vom frühen Endosom (pH 6,3) zum späten Endosom (pH 5,5) allmählich abnimmt und das Lysosom bei phagozytischen Zellen noch saurer ist (pH 4,7). [103] Die Instabilität von ZnO NP bei niedrigem pH-Wert erhöht folglich die Wahrscheinlichkeit einer intrazellulären Auflösung während des Aufnahmeprozesses, innerhalb der Endosomen, Lysosomen oder in einem anderen sauren Kompartiment [104] [105] [102] [95] Um zu beweisen, dass eine ZnO NP Auflösung in der frühen Phasen des Endozytose-Weges stattfindet, wiesen Mihai et al. (2015) mit der Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen 1 h nach der ZnO NP Exposition fast die Hälfte der intrazellulären Zn²⁺-Ionen in den Endosomen nach. Zusätzlich wurde in selbiger Publikation gezeigt, dass 3 h nach ZnO NP Exposition, in Übereinstimmung mit dem natürlichen Fortschreiten, also der Verschmelzung von Endosomen mit dem lysosomalen Kompartiment, der größte Teil der intrazellulären Zn²⁺-Ionen in den Lysosomen nachgewiesen wurde. [105]

2.2.5.5 Zn²⁺-Ionen-abhängiger Zytotoxizitätspfad

Viele Untersuchungen zeigen eine Korrelation zwischen der ZnO NP-induzierten Zytotoxizität und der freien intrazellulären Zinkkonzentration. [106] [77] [107] Hackenberg et. al (2011) vermuten zusätzlich eine Korrelation zwischen intrazellulärer Zn²⁺-Ionen-Konzentration und Genotoxizität. [91] Verbindungen zwischen der intrazellulären Akkumulation von Zn²⁺-Ionen und den am meisten diskutierten Mechanismen der Nanotoxizität von ZnO NP, i.e. Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Induktion von DNA-Schäden sind noch nicht zweifelsfrei gezeigt.

2.2.5.6 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

ROS ist ein Sammelbegriff, der Sauerstoff-enthaltende Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Valenzelektron oder instabilen Bindungen zusammenfasst, die gegenüber vielen biologischen Zielen eine sehr große chemische Reaktionsbereitschaft aufweisen. [108] [109] [110] Endogen entstehen sie zum Beispiel als Nebenprodukt des anaeroben Stoffwechsels, also der mitochondrialen Atmung. [111] [112] [113] ROS werden aber auch von Entzündungszellen gebildet, um so Viren und Bakterien zu schädigen. [114] Zellen bilden Antioxidantien, um mit einem bestimmten Maß an ROS umzugehen. Probleme treten dann auf, wenn die Bildung von ROS das physiologisch normale Maß überschreitet und die antioxidative Kapazität der Zelle erschöpft ist. Hohe ROS-Dosen führen dann zu Zellschäden an DNA, Proteinen und Lipiden. [111]

2.2.5.7 ZnO NP und die Erzeugung von ROS

Viele Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass die Erzeugung von ROS ein wichtiger Bestandteil im ZnO NP abhängigen Zytotoxizitätspfad sein könnte. [111] [115] [116] [95] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] Shen et al. (2013) und Song et al. (2010) stellten fest, dass parallel zu der Erhöhung der intrazellulären Zinkkonzentrationen auch die Generierung von ROS mit der Zytotoxizität von ZnO NP korreliert. [77] [90] [107] Jedoch sind auch diese Ergebnisse nicht in der Lage, die ROS-Produktion als Ursache der Zytotoxizität oder als Folge der Zn²⁺-Ionen-Freisetzung zu charakterisieren. Welcher Mechanismus wirklich dem beobachteten intrazellulären Anstieg von ROS zugrunde liegt ist nicht bekannt. [57] Um mögliche Kausalitäten aufzudecken, werden unterschiedliche Thesen verfolgt, die eine Verbindung zwischen der Erhöhung der intrazellulären Zn²⁺-Ionen-Konzentrationen und der Generierung von ROS herstellen könnten.

2.2.5.7.1 Fenton und Haber-Weiss-Reaktionen

Viele Metalloxid-Nanopartikel sind in der Lage die ROS-Bildung direkt zu induzieren, indem sie an Fenton und Haber-Weiss-Reaktionen teilnehmen. [111] Da Zink jedoch in biologischen Systemen redox-inert ist [10], kann dies für sie ausgeschlossen werden. Hohe intrazelluläre

Zinkkonzentrationen könnten jedoch indirekt ROS induzieren, indem reaktive Übergangsmetall-Ionen von ihren Bindungsstellen in Makromolekülen, wie z. B. Metallothionein verdrängt werden. [32] Beispielsweise könnten auf diese Weise freigesetzte Fe- und Cu-Ionen dann wiederum für Reaktionen vom Fenton-Typ zur Verfügung stehen.

2.2.5.7.2 Reduzierte GSSG-Reduktase-Aktivitäten

Das Verhältnis zwischen Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathiondisulfid (GSSG) dient als Sensor für ein Ungleichgewicht zwischen ROS und den intrazellulären Abwehrmechanismen. Sowohl Walther et al. (2000) als auch M Bishop et al. (2007) zeigten, dass Zn^{2+} -Ionen in der Lage sind, die Glutathion-Reduktase zu hemmen. [124] [125] [126]

2.2.5.7.3 Mitochondriale Dysfunktion

Auch mitochondriale Dysfunktionen wurden nach der Behandlung mit ZnO NP beobachtet. [127] [128] Möglicherweise interagieren die Zn^{2+} -Ionen mit den Mitochondrien und induzieren auf diese Weise eine erhöhte ROS-Produktion. [129] [130] Diesbezügliche Untersuchungen haben gezeigt, dass Zn^{2+} -Ionen die Zellatmung hemmen können, indem sie in die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase im Komplex I eingreifen. [6] [130] [131] [132] [133] Xia et al. (2008) zeigten eine nach ZnO NP Behandlung eintretende ROS-Produktion bei gleichzeitiger ultrastruktureller Veränderungen der Mitochondrien und Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials im Vergleich zur Kontrolle. [134] Condello et al. (2016) zeigten ebenfalls eine deutliche Wirkung der ZnO NP auf die Mitochondrien, die sich in einer starken ultrastrukturellen Veränderung ihrer Morphologie nach einer ZnO NP Expositionszeit von 24 h widerspiegelte. [95] Dineley et al. (2000) zeigten, dass sich eine erhöhte Zn^{2+} -Ionen Konzentration auf das mitochondriale Membranpotenzial von Astrozyten auswirkt. Bei Neuronen konnte dies allerdings nicht nachgewiesen werden. [106] Grundsätzlich könnte die mitochondriale Dysfunktion aber auch die Folge der ROS-Erzeugung im Zytosol und einer daraus resultierenden Schädigung der Mitochondrien sein. Das heißt, dass die mitochondriale Erzeugung von ROS eine Folge der Zytotoxizität ist und nicht deren Ursprung. [107]

2.2.6 Genotoxizität

Das Auftreten von DNA-Schäden nach der Exposition gegenüber ZnO NP wurde in einer Vielzahl von *In-vitro*-Untersuchungen beobachtet. [95] [118] [117] [91] [120] [122] Die für die Genotoxizität verantwortlichen Mechanismen sind allerdings noch nicht bekannt. [95] [117] Hackenberg et. al (2011) und Condello et. al (2016) vermuten eine Verbindung zwischen der Erhöhung der intrazellulärer Zn^{2+} – Ionen -Konzentration nach ZnO NP Behandlung und Genotoxizität. [95] [91] Aber auch wenn die Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen aus ZnO NP als grundlegende Voraussetzung für die Genotoxizität diskutiert wird, gibt es wenig Anhalt dafür, ob Zn^{2+} -Ionen direkt mit der DNA interagieren. Weitere Ereignisse, wie beispielsweise die

Generierung von ROS könnten einem Zytotoxizitätspfad der ZnO NP Auflösung und Zn²⁺-Ionen-Freisetzung nachgeschaltet sein, welcher schließlich in der Genotoxizität von ZnO NP resultiert. [77] [107] [91] Die Ergebnisse einer Vielzahl von Veröffentlichungen deuten bereits darauf hin, dass die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies ein wichtiger Bestandteil im ZnO NP abhängigen Zytotoxizitätspfad sein könnte. [111] [115] [116] [95] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] [77] [90] [107] Allerdings sind all diese Ergebnisse weder in der Lage die ROS-Produktion als Ursache der Zytotoxizität auszumachen noch belegen sie die ROS-Produktion als Folge der Zn²⁺-Ionen-Freisetzung. Das Gleiche gilt für Ergebnisse, welche eine Korrelation zwischen ROS und DNA-Schäden nach ZnO NP Behandlung nachweisen. [95] [117] [118] [119] [120] [121] [122] Sie sind nicht ausreichend, um eine Kausalität herzuleiten, obwohl es sicher ist, dass ROS mit DNA-Molekülen reagieren können und so Schäden sowohl an Purin- und Pyrimidinbasen als auch am DNA-Rückgrat verursachen. [135] Heim et al. beobachteten nach ZnO NP Exposition eine frühe Erzeugung von DNA-DSB sowie eine schnelle intrazelluläre Aufnahme von Zn²⁺-Ionen im Vergleich zur zeitlich späteren Erfassung von ROS: Verglichen mit der schnellen intrazellulären Zn²⁺-Ionen Akkumulation und einer starken Zunahme an Doppelstrangbrüchen, wurde ein weitaus langsamerer und lediglich moderater Anstieg des intrazellulären ROS-Level beobachtet, was Heim et al. auf einen ROS-unabhängigen Mechanismus schließen ließ. [136] Die Affinität positiv geladener Metallionen zur DNA erscheint auch plausibel, weil die Struktur der DNA ein negativ geladenes Phosphatrückgrat enthält und bereits Metall-DNA-Wechselwirkungen bekannt sind, welche die Grundlage zahlreicher Krebsmedikamente und antibakterieller Wirkstoffe sind. Viele dieser Medikamente basieren auf der Interkalation von Metallionen in die DNA-Struktur. [137] Zusätzlich wurde bereits beschrieben, dass Zn²⁺-Ionen *in vitro* mit DNA-Basenpaaren interagieren und so einen DNA-Metallionen-Komplex bilden können. [138] [139]

Abgesehen davon, dass DNA-Schäden maßgeblich zur Krebsentstehung beitragen, ist der durch DNA-Schäden ausgelöste programmierte Zelltod ein möglicher Mechanismus, welcher für den Zelltod nach ZnO NP Behandlung verantwortlich gemacht werden könnte. In Zellen mit intoleranten Mengen an DNA-Schäden wird die Apoptose, durch die DNA-Schadensantwort vermittelt aktiviert: [140] DNA-Schäden induzieren die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 an Ser15 und stabilisieren es. p53 fördert dann den mitochondrialen Apoptoseweg. [140] [141] [142] Sharma et al. (2012) beobachteten eine verstärkte Phosphorylierung von p53 an Ser15 nach Exposition mit ZnO NP. [141] Diese Aktivierung von p53 könnte als eine Reaktion auf ZnO NP-induzierte-DNA-Schäden erklärt werden.

2.3 DNA-Doppelstrangbrüche

Replikationsfehler, ionisierende Strahlung, UV-Licht aber auch Chemikalien und Medikamente können zu Schäden an der DNA führen. Doppelstrangbrüche (DSB) gehören zu den schwerwiegendsten Formen von DNA-Schäden [143] und „entstehen durch zwei einzelsträngige Brüche in gegenüberliegenden DNA-Strängen, die ausreichend nahe beieinander liegen.“ [144] Eine schnelle Reparatur von DSB ist wichtig, um Zelltod, Chromosomenaberrationen, Mutationen und die Auslösung pathologischer Folgen wie beispielsweise Krebs zu vermeiden. [145] Für die Erkennung und die sich anschließende Antwort auf DSB in Zellen ist eine Reihe komplexer DNA-Reaktionswege verantwortlich, die zusammengenommen als *DNA-Damage-Response* (DDR) bezeichnet werden. [146]

2.3.1 DDR: Eine Signaltransduktionskaskade

Im Allgemeinen beinhaltet die DNA-Schadensantwort einer Zelle die Erkennung von DNA-Läsionen mit anschließender Initiierung einer zellulären Signalkaskade, an deren Anfang der DNA-Schaden, und an deren Ende entweder Apoptose, Zelltod oder die DNA-Reparatur stehen. [145] Weiterhin kann die Reparatur der DNA durch einen Zellzyklusstopp unterstützt werden. (Abbildung 11) [147]

2.3.1.1 H2AX - Phosphorylierung

Eines der ersten Ereignisse nach DNA-Doppelstrangbrüchen ist die Phosphorylierung von H2AX, einer Histon-H2A-Variante, welche in menschlichen Zellen etwa 10% des gesamten Histons H2A ausmacht, durch ein oder mehrere Mitglieder der PI3K-ähnlichen Kinasegruppe. [148] Ursprünglich wurde die phosphorylierte Form von H2AX als neue Histon-H2AX-Spezies nach Behandlung mit ionisierender Strahlung entdeckt und dementsprechend als γ H2AX bezeichnet [149] Auf der einen Seite wurde beschrieben, dass für die Phosphorylierung von H2AX an Ser-139 die Proteinkinase ATM verantwortlich ist, aber auch die Kinasen DNA-PKcs und ATR, vor allem als Reaktion auf UV-vermittelte DSB und Einzelstrangbrüche ebenfalls H2AX phosphorylieren. Zusätzlich gibt es verschiedene Ergebnisse in Hinblick auf die Fragestellung wie die Erkennung von DNA-Schäden und die anschließende Aktivierung der oben genannten Proteinkinasen verknüpft ist. Eine verbreitete Theorie ist, dass ATM nicht direkt mit der DNA interagiert, sondern dessen Aktivierung von einer anfänglichen Schadenserkenkung durch den MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1 abhängt. [150] [151] MRE11 bindet an die geschädigte DNA und rekrutiert anschließend ATM, welches sich durch Autophosphorylierung und Monomerisierung aktiviert und dann distale Ziele wie H2AX phosphoryliert. [152]

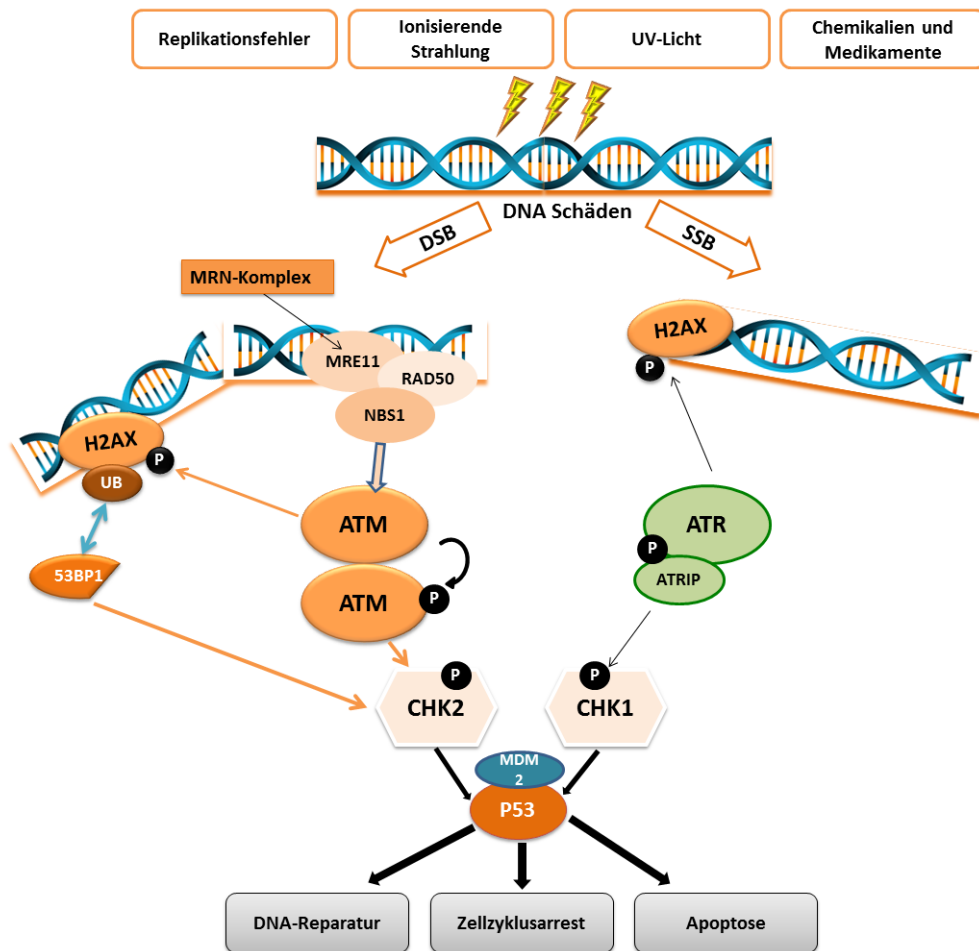


Abbildung 11: DNA-Schadensantwort auf DSB und SSB

Nach der anfänglichen Schadenserkenkung durch den MRN-Komplex phosphorylieren die aktivierten ATM-Monomere zahlreiche nachgeschaltete Ziele, wodurch es im Endeffekt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von CHK2 kommt. CHK2 vermittelt die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53, welcher durch die Ubiquitinligase MDM2 kontrolliert wird. Als Folge der Phosphorylierung wird p53 nicht mehr inhibiert und kann als Transkriptionsfaktor zelluläre Reaktionen vermitteln, zu denen Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur gehören.

2.3.1.2 Die Rolle von γ H2AX und γ H2AX-ub1 in der DDR

Die Bildung von γ H2AX verbessert zum einen die Zugänglichkeit der DNA und zum anderen wird die Rekrutierung und Akkumulation spezifischer DDR-Proteine an den DNA-Enden des Bruches ermöglicht. [148] [153] Anders ausgedrückt wird auf diese Weise ein epigenetisches Signal generiert, welches dann von nachgeschalteten DDR-Proteinen erkannt wird. [154] Eines dieser DDR-Protein ist MDC1, welches direkt an γ H2AX bindet und durch Rekrutierung der E3-Ligase RNF8 eine Protein-Ubiquitinierungskaskade initiiert, an deren Ende die E3-Ligase RNF168 die Monoubiquitinierung von Lys13/Lys15 in H2AX und γ H2AX katalysiert. [155] Das ubiquitinierte H2AX wird anschließend von 53BP1 erkannt und daraufhin reguliert

53BP1 die Aktivierung von CHK2. Neben der Phosphorylierung von H2AX ist somit auch die ubiquitinierte Form von H2AX und von γ H2AX ein wichtiger epigenetischer Marker für DNA-Läsionen im Verlauf der DDR. Im weiteren Verlauf der DNA-Schadensantwort vermittelt CHK2 die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53, welcher nicht-phosphoryliert durch die Ubiquitinligase MDM2 als Inhibitor kontrolliert wird (und durch die Phosphorylierung nun nicht mehr inhibiert werden kann). Als Transkriptionsfaktor kann p53 zahlreiche Gene regulieren und die Vermittlung von Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur sowie Apoptose beeinflussen. [156]
[157]

2.3.1.3 Nutzung von γ H2AX und γ H2AX-ub1 zur Unterscheidung von apoptotischen und nicht-apoptotischen DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche sind eine hochtoxische Form der DNA-Schädigung. Die Beteiligung von DSB an vielen Pathologien hat dazu geführt, dass diese Läsionen häufig zur Erfassung der Genotoxizität herangezogen werden. Indirekt kann dies über die Biodosimetrie (z.B. Western Blot) von γ H2AX erfolgen. Aber auch wenn γ H2AX häufig als spezifischer Marker für DSB beschrieben wird, kann es auch in Abwesenheit von DSB gebildet werden. Die Spaltung der chromosomalen DNA in Fragmente ist ein wesentlicher Bestandteil des programmierten Zelltods und aus diesem Prozess resultierende DSB münden im Zuge der DDR in γ H2AX-Formationen, welche schließlich nicht zwingend auf eine Genotoxizität zurückzuführen sind. [158] [159] [160] Wenn es im Verlauf von Versuchsreihen zu zytotoxischen Effekten kommt ist es deshalb fragwürdig γ H2AX als Biomarker für DNA-Schäden bzw. Doppelstrangbrüche heranzuziehen, insofern mögliche durch Apoptose-induzierte γ H2AX-Formationen nicht ausgeschlossen werden können. [159] Während auf der einen Seite Apoptose eine DNA-Fragmentierung und somit umfangreiche γ H2AX-Formationen induziert, wird auf der anderen Seite die γ H2AX-ub1-Bildung während der Apoptose blockiert. (Abbildung 12) Möglicherweise liegt der Grund hierfür in einer proteolytischen Spaltung der RING-Finger-Ubiquitin-Ligase RNF168 im Verlauf der Apoptose und der daraus folgenden Unterbindung der Ubiquitinierung von γ H2AX. [161] [162] Daraus folgt, dass die Detektion von γ H2AX-ub1-Banden als spezifischer Biomarker für nicht-apoptotische DNA-Doppelstrangbrüche angesehen werden könnte. [163]

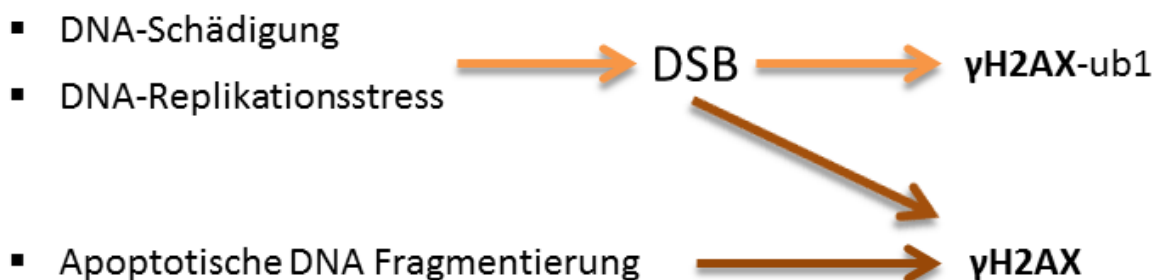


Abbildung 12: Unterschiede in der γ H2AX-Ubiquitinierung bei durch DNA-Schädigung verursachten und apoptotischen DSB

Die durch DNA-Schädigung und Replikationsstress verursachten DSB führen zur Bildung von γ H2AX und γ H2AX-ub1, während die Spaltung der chromosomalen DNA im Zuge der Apoptose nur zur Bildung von γ H2AX führt. Daraus folgt, dass die Detektion von γ H2AX-ub1-Banden als spezifischerer Biomarker für nicht-apoptotische DSB angesehen werden kann. Verändert nach Luczak et al. (2018) [163]

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit der humanen Zelllinie A549 gearbeitet. A549 ist eine Adenokarzinomzelllinie eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, dessen Zellen 1972 aus dem explantierten Tumor eines 58-jährigen männlichen Patienten isoliert wurden. A549-Zellen haben sich als Modellsystem zur Untersuchung epithelialer Tumore des oberen und unteren Respirationstraktes etabliert. Die Zelllinie stammt aus dem Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

3.1.2 Zinkoxid-Nanopartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO NP) mit der Chargennummer MV323 wurden von Melanie Viel aus der AG Tremel (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert. Für eine detaillierte Beschreibung der Synthese wird auf die Doktorarbeit von Martin Klünker (*Chemical Design and Application of Organized Multicomponent Hybrid Nanostructures, 2018*) verwiesen. [164] Für alle Versuche in meiner Doktorarbeit wurde die gleiche ZnO NP Charge MV323 verwendet.

3.1.2.1 Charakterisierung der ZnO NP Charge MV323

Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (Abbildung 13) zeigen die sphärische Form der ZnO NP. Die Größe der ZnO NP, die anhand der Abbildung aus drei Messungen bestimmt wurde, betrug $15,08 \text{ nm} \pm 0,50 \text{ nm}$.

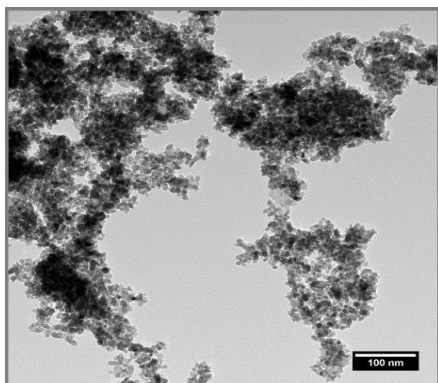


Abbildung 13: TEM Aufnahme der ZnO NP Charge MV323

Quelle: Melanie Viel, AG Tremel (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

| Chemikalien | Bezugsfirma |
|--|--|
| Accutase | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Aceton | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Albumin Fraktion V, NZ-Origin, 200 g 98%, pulv. für die Molekularbiologie | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Aqua ad injectabilia, 50 ml Wasser für Injektionszwecke nach DAB | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| <i>Bovine Calf Serum (FCS), Iron Supplemented</i> | VWR Life Science Seradigm, Radnor, PA, USA (Avantor, Radnor, PA, USA) |
| <i>cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i> | Roche Diagnostics, IN, USA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)) |
| DC™ Protein Assay Reagent A | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| DC™ Protein Assay Reagent B | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| DC™ Protein Assay Reagent C | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO; Rotipuran® ≥ 99,8 %, p.a.) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| DMEM/F-12 (1:1) (1x) | Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ethanol (Rotipuran® ≥ 99,8 %, p.a.) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| FastCast™ Resolver A 7,5%, 12% | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| FastCast™ Stacker A | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| Glycin (≥99%, zur Synthese) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol (puriss p.a., ACS-Reagenz, Reag.) | Honeywell, Riedel-de- Haën™, Muskegon, |

| | |
|--|---|
| ISO, Reag. Ph. Eur., ≥99.8 % (GC)) | MI, USA |
| Milchpulver (Blotting grade, pulv., fettarm) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid (≥99,8%, mit Antibackmittel) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt) |
| PhosSTOP EASYpack, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets | Roche Diagnostics, IN, USA |
| SDS (ultra pure, ≥99,5% für die Elektrophorese) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| terralin® liquid | Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| TEMED (≥99% p.a., für die Elektrophorese) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| TGX Stain-Free™ FastCast™ Resolver B | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| TGX Stain- Free™ FastCast™ Stacker B | BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| TRIS (PUFFERAN® ≥99,9%, p.a.) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Tryptanblau 0,4% | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt) |
| Trypsin-EDTA Solution (TE, 10X) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt) |
| Tween® 20 (Ph.Eur.) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate | PerkinElmer Inc. Waltham, MA, USA |
| Sterillium® classic pure | BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Venor®GeM Classic (Mycoplasmen-Detektionsset) | Minerva Biolabs®, Berlin, Deutschland |
| Zinc chloride 0,1 M solution | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt) |

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien | Bezugsfirma |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Einwegpasteurpipetten, unsteril | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| | Deutschland |
| <p>Eppendorf Reference® Pipette</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,5-10 µl • 2-20 µl • 10-100 µl • 20-200 µl • 100-1000 µl | <p>Eppendorf AG, Hamburg Deutschland</p> |
| <p>Eppendorfgefäße, Safe-Lock-Tubes</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 ml • 1,5 ml • 2ml | <p>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</p> |
| <p>Multipette® plus mit Aufsätzen (Combitips® advanced, PCR clean)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1,0 ml • 5,0 ml • 50 ml | <p>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</p> |
| <p>Pipettenspitzen</p> <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl • 200 µl • 1000 µl | <p>Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland</p> |
| <p>Polypropylen Röhren CELLSTAR®, steril</p> <ul style="list-style-type: none"> • 15 ml • 50ml | <p>Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> |
| <p>Serologische Pipetten, CELLSTAR®, steril</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5 ml • 10 ml • 25 ml | <p>Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> |

| | |
|--|--|
| Zellkulturflaschen CELLSTAR® mit Sterilfilter, steril <ul style="list-style-type: none"> • 25 cm² • 75 cm² • 175 cm² | Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Zellschaber (1,8 cm Klinge), steril | Falcon (Corning Incorporated) Corning, NY, USA |
| Rundboden-Polystyrolröhrchen | Falcon (Corning Incorporated), Corning, NY, USA |

3.1.5 Geräte

Tabelle 3: Geräte

| Gerät | Bezugsfirma |
|---|--|
| Bestrahlungsanlage Gammacell 2000 Nuklid: Cs-137 | Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark |
| Brutschrank Heracell 150i CO ₂ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Blotter BioRad Criterion™ tank blotter | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| ChemiDoc™MP imaging System | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Durchflusszytometer BD FACS Canto II | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Elektrophoresekammer Und Gelplatten mit festen Abstandshaltern (1,0 mm) und Silikondichtung (1,0 mm) | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Gefrierschrank (-80 °C) | Kendro Laboratory Products, Langenselbold (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |
| Kühlschrank | Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland |
| Laborabzug nach DIN 12924 | Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland |
| Magnetrührer MR 3001 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| Mini-Zentrifuge | Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Mikroskop Nikon TMS Inverted Phase Contrast Microscope | Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland |
| Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U | Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland |
| Netzgerät Power supply 1000/500 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Photometer Multiskan Ascent | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Serologische Pipette pipetus® | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland |
| Sterile Werkbank Flow Hera safe | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Stickstofftank | CRYO-4000, Chart Ind., Burnsville, MN, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Ultraschallhomogenisator SONOPULS mini20 | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland |
| Ultraschall-Reinigungsgerät Emmi® 40HC | EMAG AG, Mörfelden-Walldorf, Deutschland |
| Vortex IR | Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Vortex Top-Mix 11118 Fisher Brand® | Fisher Scientific GmbH, Schwerte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |
| Waage Kern PCB | Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland |
| Wasserbad | GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel, Deutschland |
| Wipp-Schüttler WS-10 | Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland |
| Zählkammer Neubauer-improved | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland |
| Zentrifuge Micro Centrifuge Modell: 100 VAC Fisherbrand® | Fisher Scientific, Schwerte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |

3.1.6 Puffer, Lösungen, und Zellkulturmedium

Zellkulturmedium

- DMEM/ F-12 Ham mit L-Glutamin und Phenolrot ohne HEPES (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- + 5% (v/v) *fetal calf serum* (FCS)
- + 2% (v/v) Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep)

Transfer Puffer

- 6,06 g Tris
- 29,3 g Glycerin
- 400 ml Methanol
- 7,4 ml 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
- Lösung auf 2000 ml mit entionisiertem Wasser aufgefüllt

Lysepuffer

- 0,8 g SDS
- 1 ml 2 M Tris/ HCl pH 6,8-7,5
- 4,6 ml Glycerin
- 2 ml entionisiertes Wasser
- zwei Tabletten cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics, IN, USA)
- eine Tablette PhosSTOP EASYpack phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

10x Waschpuffer (*Tris buffered saline (TBS)*)

- 24,2 g Tris
- 80 g NaCl
- 1000 ml entionisiertes Wasser
- pH Wert adjustiert auf 7,6 mit HCl

1x Waschpuffer (*Tris buffered saline*)

- 200 ml Waschpuffer
- 1800 ml entionisiertes Wasser
- 2 ml Tween20

5x Laufpuffer (*Elektrophorese Puffer*)

- 30 g Tris
- 144 g Glycerin
- 1000 ml entionisiertes Wasser

1x Laufpuffer (*Elektrophorese Puffer*)

- 5 ml SDS
- 500 ml entionisiertes Wasser

Stripping-Puffer

- 1,876 g Glycin in 1 l entionisiertem Wasser, pH-Wert mit HCl auf 2,0 eingestellt
- 1% (w/v) SDS

Einfrierlösung zur Kryokonservierung

- FCS mit 10 % DMSO

Material und Methoden

Lösung zum Ablösen von Zellen

- 1x Trypsin-EDTA (TE) aus 10x TE mit DPBS

10x Annexin V Binding Buffer

- 23,83 g Hepes
- 81,82 g NaCl +
- 3,68 g CaCl₂
- 1000 ml entionisiertes Wasser

1x Annexin V Binding Buffer

- 10 ml 10x Annexin V Binding Buffer
- 90 ml entionisiertes Wasser

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die zu untersuchende Zelllinie wurde in Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25 cm², 75 cm² bzw. 175 cm² unter sterilen Standardbedingungen im Brutschrank (37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre) kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde ein mit 5% FCS (Fetales Kälberserum) und 2% Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) angereichertes DMEM/F-12-Medium verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Im Abstand von jeweils 3 Tagen wurde das Zellkulturmedium erneuert. Außerdem wurde eine Mycoplasmen-Kontamination mittels PCR-Test (Venor®GeM Classic, Minerva Biolabs®, Berlin) ausgeschlossen. Alle Vorgänge im Zusammenhang mit der Zellkultur wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden bevor sie die gesamte Fläche der Zellkulturflasche lückenlos bedecken konnten, was einer Konfluenz von 90 % entspricht, passagiert. Zur Passagierung wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit 5 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen, welches daraufhin ebenfalls dekantiert wurde. Zur Ablösung der Zellen wurden 3 ml TE (Trypsin-EDTA) in die Zellkulturflasche gegeben und diese für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Kontrolle der vollständigen Ablösung der Zellen im Lichtmikroskop wurde die Reaktion mit 7 ml Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und bei 1500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert worden war, wurde das Zellpellet mit Medium versetzt und durch auf- und ab-pipettieren resuspendiert. Zur Weiterkultivierung wurde nun die gewünschte Menge der Zellsuspension mit der passenden Menge an Medium vermischt und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden maximal bis zur Passage 50 verwendet

3.2.1.2 Zellzählung

Für die Bestimmung der in der Zellsuspension vorliegenden Zellzahl wurden 30 µl der Zellsuspension in einer 96-Well-Platte mit 30 µl 0,4%iger Trypanblaulösung vermischt und in die Neubauer Zählkammer (Zählkammer Neubauer-improved, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen) pipettiert. Unter Berücksichtigung der abgebildeten Quadrate wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt, bis eine Zellzahl von mindestens 100 erreicht war. Es wurden jedoch immer mindestens 2 Eckquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Gesamtzellzahl ergab sich dann wie folgt:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl gezählte Zellen}}{\text{Anzahl Eckquadrate}} \times 2 \times \frac{10.000}{\text{ml}} \times \text{Volumen Zellsuspension in ml}$$

3.2.1.3 Aussaat der Zellen für die Behandlung

Für die Behandlung mit ZnO NP und ZnCl₂ wurden 700.000 Zellen ausschließlich in Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25 cm² 24 Stunden vor Behandlung ausgesät. Hierfür wurde nach vorangegangener Resuspendierung (3.2.1.1) und Zellzählung (3.2.1.2) eine Stocklösung mit 700.000 Zellen/ml erstellt und jede Zellkulturflasche mit 4 ml Zellkulturmedium und 1 ml Stocklösung befüllt und im Brutschrank kultiviert.

3.2.1.4 Ernten der Zellen

Die Vorgehensweise beim Ernten der Zellen war abhängig von der sich anschließenden Auswertungsmethode (Western Blot oder Durchflusszytometrie).

3.2.1.4.1 Ernten der Zellen für Auswertung mittels Western Blot

Vor dem Ernten der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft, ob sich die Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst hatten. Zellkulturmedium, welches abgelöste Zellen enthielt, wurde in einem Falcon gesammelt. Die Zellkulturflasche wurde mit kaltem PBS gewaschen und das PBS wieder vollständig entfernt. Die Zellen auf der Zellkulturplatte wurden mit 400 µl Lysepuffer versetzt, mit einem Zellschaber gesammelt und in ein 1000-µl-Eppendorfgefäß überführt. Die abgelösten Zellen im Falcon wurden, nach dem Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes, in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und anschließend ebenfalls in das Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde durchgängig auf Eis gelagert, um eine Degradierung der Proteine und insbesondere ihre Dephosphorylierung zu verhindern. Um eine vollständige Lyse der Zellen und die Fragmentierung der DNA sicherzustellen, wurden die Lysate mit dem Ultraschallstab (Ultraschallhomogenisator SONOPULS mini20, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) homogenisiert (2 x 30s, zwischen den beiden Serien Abkühlung auf Eis für 5 Minuten, Impulsdauer 0,5s, zwischen den Impulsen Pausen von 1s, Amplitude: 88%). Die Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren gelagert bei -20°C.

3.2.1.4.2 Ernten der Zellen für Auswertung mittels Durchflusszytometrie

Für jede Zellkulturflasche wurde das Zellmedium vollständig in ein Falcon überführt, die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und das PBS ebenfalls in das Falcon überführt. Um die Zellen abzulösen, wurden 2 ml Accutase hinzugegeben und die Zellkulturflasche für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde im Lichtmikroskop überprüft und darauffolgend die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Zellmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde danach in das jeweilige Falconröhrchen überführt. Die Falconröhrchen wurden auf Eis gelagert, zeitnah bei 1500 rpm und 4°C 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Dieser

Schritt diente dem Waschen der Zellen und wurde insgesamt 3-mal durchgeführt. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl Annexin V Bindung Puffer aufgenommen.

3.2.1.5 Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen wurden maximal bis zur Passage 50 verwendet. Um zu verhindern, dass eine Zelllinie bei einer hohen Passage ganz verworfen werden musste, wurden bei niedrigen Passagenzahlen Zellen durch Einfrieren konserviert. Dazu wurden die in einer möglichst großen Zellkulturflasche (175 cm²) herangewachsenen Zellen, wie oben beschrieben (3.2.1.1), mit TE abgelöst und die Reaktion mit Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in drei gleiche Teile geteilt, zentrifugiert (1500 rpm für 5 Minuten) und der Überstand dekantiert. Die Zellpellets wurden mit 1,5 ml einer Lösung aus 10% DMSO und 90% FCS resuspendiert und in Kryotubes (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) überführt. Diese wurden zuerst in einem Einfrierbehälter (CoolCell® SV2; BioCision LLC, Larkspur, CA, USA) im -80°C-Gefrierschrank gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden sie dann in einen Stickstofftank zur längerfristigen Aufbewahrung gegeben. Um die Zellen bei Bedarf wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie nach Entnahme aus dem Stickstofftank aufgetaut, mit 10 ml Medium vermischt und zentrifugiert (1500 rpm für 5 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend ausgesät.

3.2.2 Zinkoxid Nanopartikel und Zinkchlorid-Lösung

3.2.2.1 Lagerung und Aliquotierung der Zinkoxid Nanopartikel

Die ZnO NP wurden luftdicht verpackt in Schnappdeckelgläsern bei 8°C gelagert. Um für jede Behandlung eine neue NP-Suspension herstellen zu können, wurden die ZnO NP in kleineren Mengen auf 500-µl-Eppendorfgefäße verteilt. Dazu wurden auf einer Waage (Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland) erst die Eppendorfgefäße gewogen, die Waage tariert und eine kleine Menge ZnO NP mittels eines Spatels hineingefüllt. Das Gewicht in hundertstel mg wurde auf dem Deckel notiert. Der Betrag des Gewichts entsprach dann der Menge an Wasser in µl, welches für die Herstellung einer Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml benötigt wurde.

3.2.2.2 Behandlung von Zellen mit Zinkoxid-Nanopartikeln

Die ZnO NP wurden unmittelbar vor jeder Behandlung mit hochreinem Wasser (Wasser für Injektionszwecke nach DAB; Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) versetzt, sodass eine Stocklösung von 10 mg/ml entstand. Die Dosierung der ZnO NP erfolgte schließlich über das zugegebene Volumen der ZnO NP Stocklösung zum Zellkulturmedium. Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² enthielten 5 ml Zellkulturmedium, sodass die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 20 µg/ml, 40µg/ml und 100 µg/ml dementsprechend durch die Zugabe von 10 µl, 20 µl bzw. 50 µl ZnO NP Stocklösung erzielt wurden. Um eine möglichst

homogene ZnO NP Stocklösung herzustellen, wurde das mit Wasser versetzte Eppendorfgefäß erst 10 Sekunden auf dem Vortex Top Mix 11118 geschüttelt, dann für 5 Minuten in ein Ultraschallbad (Ultraschall-Reinigungsgerät Emmi® 40HC) bei 45 kHz gelegt und dann erneut für 10 Sekunden auf dem Vortex Top Mix 11118 geschüttelt. Zusätzlich wurde vor der Gabe in die Zellkulturflaschen mehrmals auf- und ab-pipettiert. Die Inkubation mit den ZnO NP erfolgte daraufhin im Brutschrank. Vier Stunden nach der jeweiligen ZnO NP Behandlung wurde das Zellkulturmedium durch 5 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt.

3.2.2.3 Behandlung von Zellen mit Zinkchlorid-Lösung

Um zu bewerten, ob aus den Nanopartikeln frei gesetzte Zinkionen zur Genotoxizität von ZnO NP beitragen, sollte die Genotoxizität der zugegebenen ZnO NP mit der Genotoxizität einer äquimolaren Menge an Zn^{2+} -Ionen verglichen werden. Hierzu wurden verschiedene Volumina einer 0,1-molaren $ZnCl_2$ -Lösung eingesetzt.

Tabelle 4: Verwendete ZnO NP/ $ZnCl_2$ Konzentrationen und Dosierung

ZnO NP Konzentration, eingesetzte Volumina der ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) und Volumina der eingesetzten 0,1-molaren $ZnCl_2$ - Lösung bei 5ml Zellkulturmedium. Die jeweils korrespondierenden Gemische enthalten dieselbe Menge an Zn^{2+} -Ionen.

| ZnO NP Konzentration | Eingesetzte ZnO NP Stocklösung pro 5 ml Zellkulturmedium | Korrespondierende Volumina der 0,1 M $ZnCl_2$ -Lösung pro 5 ml Zellkulturmedium |
|----------------------|--|---|
| 100 µg/ml | 50 µl | 61 µl |
| 20 µg/ml | 10 µl | 12,5 µl |

3.2.3 Bestrahlung der Zellen

Der Transport der Zellkulturflaschen zur Bestrahlungsanlage (Gammacell 2000 Nuklid: Cs-137, Mølsgaard Medical, Dänemark) erfolgte immer in einer Styroporkiste mit Wärme-Akkus (37°C). Es wurden alle Zellkulturflaschen einer Versuchsreihe, auch die, die nicht bestrahlt wurden, verpackt und transportiert. Die Zellkulturflaschen wurden mit 8 Gy bestrahlt und bis zur Ernte im Brutschrank untergebracht.

3.2.4 SDS-PAGE und Western Blot

Die $\gamma H2AX$ Expressionsanalyse der Zelllysate erfolgte per *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) und anschließendem Western Blot. Die in dieser Arbeit durchgeführte SDS-PAGE basierte auf einer eindimensionalen Trennung der Proteine entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel.

3.2.4.1 Arbeitsablauf des Western Blots

Der komplette Arbeitsablauf wurde unabhängig voneinander mindestens dreifach für alle beschriebenen Zeitpunkte und Dosierungen (siehe Tabelle 2) durchgeführt.

3.2.4.2 Erstellung der Proben

Die Aussaat der Zellen erfolgte wie in 3.2.1.3 beschrieben. Nach 24 h wurden die Zellen mit der nach dem Behandlungsplan vorgesehenen Menge ZnO NP Stocklösung (siehe 3.2.2.2) beziehungsweise ZnCl₂ (siehe 3.2.2.3) behandelt oder bestrahlt (8 Gy) und nach den im Behandlungsplan festgelegten Zeitpunkten wie in 3.2.1.4.1 beschrieben geerntet.

Tabelle 5: Behandlungsplan für Western Blot

Die aufgeführten Zeitpunkte entsprechen der Dauer zwischen Beginn der Behandlung und Abschluss des Lysevorgangs. Bei einer Behandlung länger als 4 h, wurde nach den ersten 4 h das Zellkulturmedium komplett entfernt und durch 5 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die ZnO NP Endkonzentration entspricht der ZnO NP Konzentration in 5 ml Zellkulturmedium.

| Behandlung für <i>kurze</i> Zeiträume | ZnO NP End-Konzentration | Behandlungszeiträume bis zur Lyse der Zellen | | | | | | | |
|--|--------------------------|--|-------|--------|--------|--------|--------|------|--|
| | | 3 min | 5 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | | |
| 50 µl ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) | 100 µg/ml | 3 min | 5 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | | |
| 62,5 µl 0,1 M ZnCl ₂ Lösung | / | 3 min | 5 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | | |
| Unbehandelt | / | 3 min | 5 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | | |
| Behandlung für <i>lange</i> Zeiträume | | Behandlungszeiträume bis zur Lyse der Zellen | | | | | | | |
| 50 µl ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) | 100 µg/ml | 1 h | 2 h | 4 h | 24 h | / | / | / | |
| 10 µl ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) | 20 µg/ml | 1 h | 2 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24h | 48 h | |
| Bestrahlung mit 8 Gy | / | 1 h | 2 h | 4 h | 24 h | / | 24h | 48 h | |
| Unbehandelt | / | 1 h | 2 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24h | 48 h | |

3.2.4.3 Proteinbestimmung und Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Lysate erfolgte durch eine Dreifachbestimmung mit dem DC-Protein Assay. (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) Hierzu wurden 5 µl des Lysats und 25 µl A' (A' entspricht 1 ml Reagenz A + 20 µl Reagenz S) in einer 96-Well-Platte vermischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Reagenz B. Bovines Serum Albumin (BSA) diente der Eichung als Proteinstandard. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei 750 nm mit dem Photometer (Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichgerade bestimmt. Aus dem Mittelwert der 3 Proteinkonzentrationen einer jeweiligen Probe konnte das aufzutragende Volumen ermittelt werden, in dem jeweils 40 µg Proteine enthalten waren. Anschließend wurden in neu bereitgestellten Eppendorfgläsern jeweils 200 µl Lysat mit 2 µl Bromphenolblau (5% (w/v)) und 10 µl Dithiothreitol (2 M) vermischt. Die Zugabe von Bromphenolblau erleichtert den Probenauftrag und ermöglicht die Visualisierung der Laufmittelfront während der Elektrophorese. Ein Farbumschlag von blau zu gelb deutet außerdem darauf hin, dass die Probe zu sauer ist. Dithiothreitol dient zur Reduktion von Disulfidbrücken und somit zur Zerstörung der Quartärstrukturen. Im letzten Schritt der Probenvorbereitung wurden die Proben auf 95°C für 10 Minuten erhitzt und anschließend bis zur Beladung auf Eis gelagert.

3.2.4.4 Durchführung der SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden die Gele mit der TGX-Stain-Free Fast Cast Acrylamid Lösung, 12% (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemäß Herstellerangaben gegossen. Das Bio-Rad Stain-Free System ermöglicht den Fluoreszenznachweis aller im Gel bzw. Blot befindlichen Proteinen direkt in den Gelen und Blots und ermöglicht dadurch die Kontrolle der jeweiligen Arbeitsschritte. (Abbildung 14) Das fertige 12% SDS-Polyacrylamidgel wurde dann in eine vertikale Elektrophorese-Kammer gespannt und beide Tanks mit Laufpuffer befüllt. In die erste Tasche des Gels wurde 5 µl *Molecular Weight Marker (PageRule Protein Ladder, Fermentas Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)* aufgetragen. Die restlichen Taschen wurden gemäß der vorangegangenen Proteinbestimmung mit den jeweiligen Volumina, welche 40 µg Protein enthielten, beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel und dauerte in etwa 2 Stunden, bis die bromphenolblaue Lauffront das untere Ende des Gels erreichte. Nach der Elektrophorese wurde das Stain-Free Gel mit dem Chemidoc MP Imaging System aktiviert und aufgenommen.

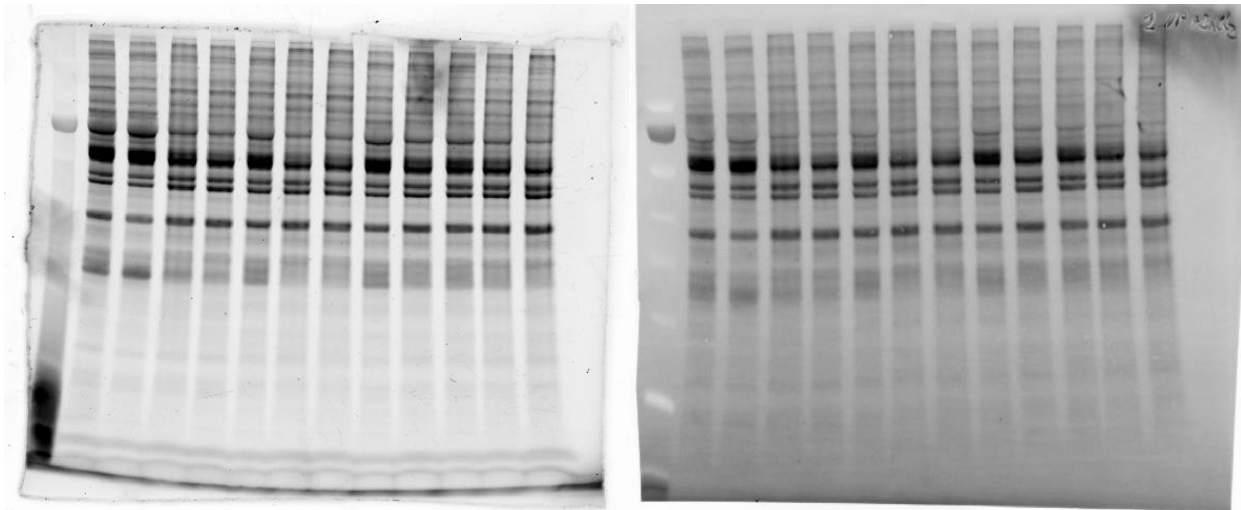


Abbildung 14: Stain-Free Gel und Stain-Free Blot

Stain-Free Gel (links) und der korrespondierende Stain-Free Blot (rechts) als exemplarische Aufnahmen. Das Bio-Rad Stain-Free System ermöglicht eine Visualisierung und Kontrolle der SDS-PAGE und des Proteintransfers.

3.2.4.5 Proteintransfer vom Gel auf die Membran

Im nächsten Schritt erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf dem Gel mit der *Wet-Tank* Methode auf eine Polyvinylidenfluoridmembran. (PVDF, *membrane*, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Die PVDF Membran wurde hierfür in Methanol aktiviert und zusammen mit 2 Whatmanpapieren und dem Gel für 20 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Anschließend erfolgte der Blotaufbau gemäß dem gezeigten Schema. (Abbildung 15) Die PVDF Membran durfte nach Aktivierung nicht erneut trocknen. Deshalb wurden alle Bestandteile der Blotkassette in Puffer inkubiert. Die fertige Kassette wurde schließlich in den Tank Blotter (*Criterion tank blotter* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)) eingebaut. Der Proteintransfer erfolgte für 14 h bei 19 mA und unter ständigem Rühren des Transferpuffers im Kühlraum bei 4°C. Anschließend wurde der Stain-Free Blot mit dem ChemiDoc™ MP *Imaging System* aufgenommen und so der Proteintransfer kontrolliert. (Abbildung 14)

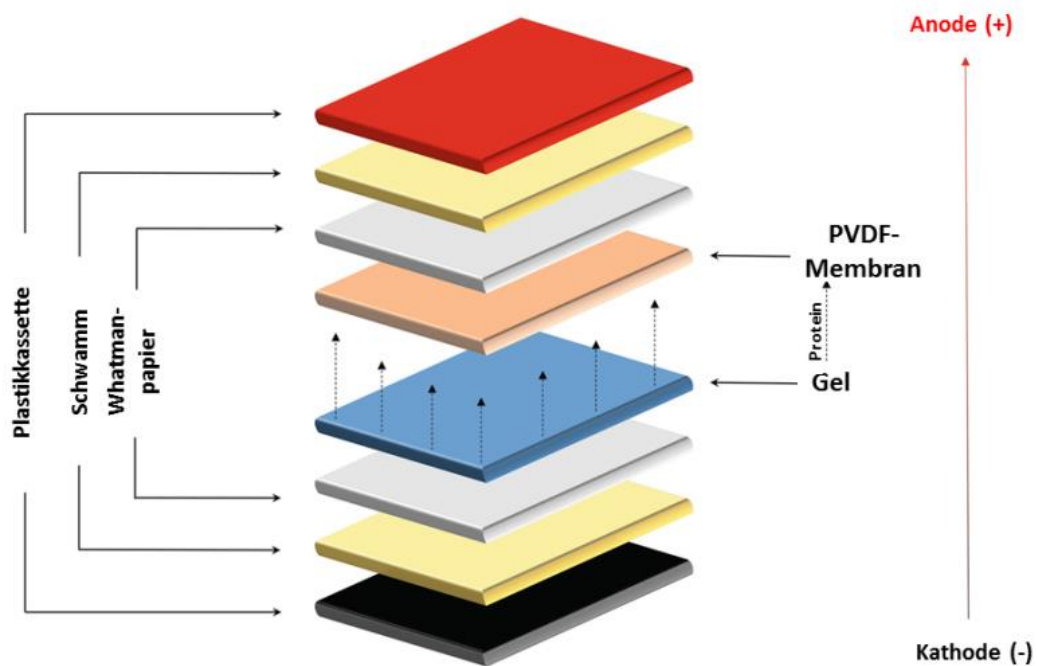


Abbildung 15: Aufbau einer Wet-Blot Kassette

Die Kassetten des Wet-Tanks wurden nach dem abgebildeten Schema befüllt. Von besonderer Wichtigkeit ist hierbei ein luftblasenfreier Kontakt zwischen Gel und PVDF-Membran. Verändert nach Gomes & Silva (2018) [165]

3.2.4.6 Immundetektion

Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine möglichst passgenaue Inkubationsschale überführt. Dann erfolgten die folgenden Wasch-, Blockierungs- und Inkubationsschritte (siehe Tabelle 6) auf dem Wipp-Schüttler (Ws-10, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland):

- 5 Minuten waschen der Membran mit 1x Waschpuffer
- Blockierung der Membran mit Blockierungspuffer für 1 h
- 3x 5 Minuten waschen der Membran mit 1x Waschpuffer
- Inkubation mit 10 ml Primär-Antikörper-Lösung für 21 h bei 4°C
- 3x 5 Minuten waschen der Membran mit 1x Waschpuffer
- Inkubation mit 10 ml Sekundär-Antikörper-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur
- 3x 5 Minuten waschen der Membran mit 1x Waschpuffer

Tabelle 6: Eingesetzte Blockierungs- und Antikörperlösungen

Der Vorgang der Proteindetektion war für beide Proteine identisch.

| Protein | γ H2AX | β -Aktin |
|--|---|--|
| Antikörper- Bezeichnung der Firma | #9718 pHistone H2AX(Ser139) (20E3) von Cell Signaling (Danvers, USA) | #A5441 von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Spezies | Rabbit | Mouse |
| Blockierung | 4% Milchpulver | 5% Milchpulver |
| 1.AK | 1:1000 in 5% BSA | 1:5000 in 3% Milchpulver |
| 2.AK | Anti-rabbit 1:5000 in 4% Milchpulver | Anti-mouse 1:5000 in 5% Milchpulver |

Zur Proteindetektion wurde die Membran 2 Minuten mit 2 ml lumineszierendem Western Blot Substrat (Western Lightning ECL Plus, PerkinElmer Inc. Waltham, MA, USA) inkubiert. Die Aufnahme der Banden erfolgte schließlich mit dem Chemidoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Sowohl Wasch-, Blockierungs- und Inkubationsschritte als auch die Aufnahme der Bilder erfolgte zuerst für γ H2AX und wurde daraufhin analog für β -Aktin durchgeführt. Sowohl die genaue Bezeichnung der Antikörper als auch die Inkubationsstrategien für das jeweilige Protein können Tabelle 6 entnommen werden.

3.2.4.7 Densitometrische Analyse der Proteinbanden

Zur Quantifizierung wurde die Intensität der γ H2AX-Banden mithilfe der *ImageLab*-Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bestimmt und mit der jeweils dazugehörigen Intensität der β -Aktin-Banden (Ladekontrolle) normalisiert.

3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete durchflusszytometrische Methode (Apoptose-Nekrose-Assay) diente der Identifikation und Quantifizierung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen in den zu untersuchenden Proben. Es wurden Fluoreszenzsignale (FITC und PI) gemessen, welche nach entsprechender Markierung in apoptotischen und nekrotischen Zellen entstehen, sobald die jeweiligen Zellen einen Laserstrahl in der Apparatur passieren. (Abbildung 16)

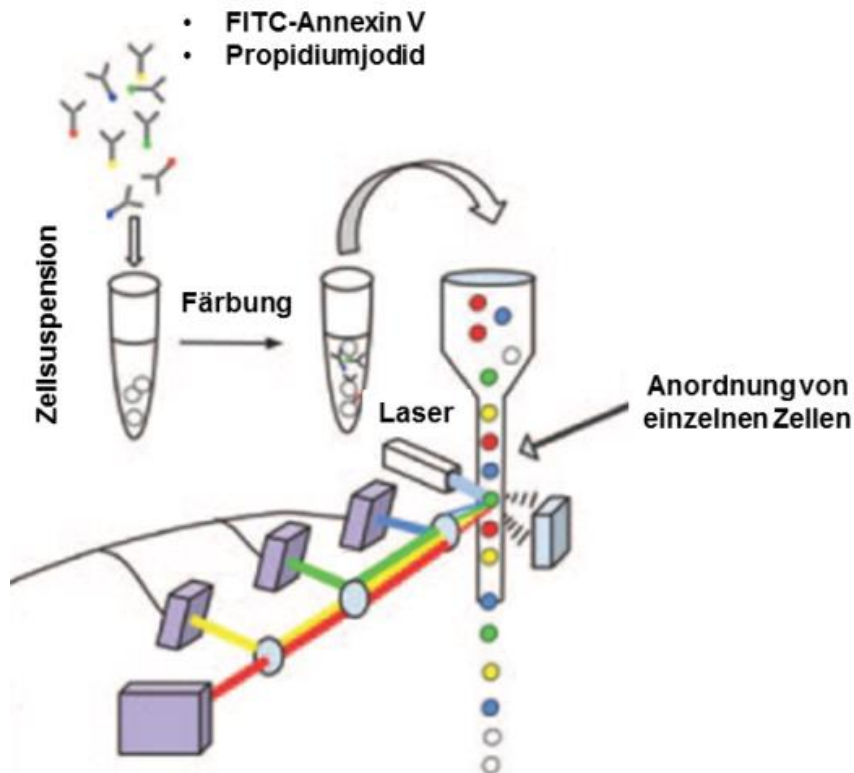


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und passieren in Flüssigkeit einen Laser. Die Lichtstreuung der Zellen gibt Erkenntnisse über die Zellgröße und die Zellgranularität und wird durch den Forward-Scatter (FSC) Detektor und den Side-Scatter (SSC) Detektor aufgenommen. Zusätzlich können Fluoreszenzsignale von Fluoreszenzdetektoren gemessen werden. Verändert nach Jahan-Tigh et al. 2012. [166]

Grundlage des verwendeten Assays ist die Translokation von einem Membranbestandteil, Phosphatidylserin (PS), welcher im Verlauf der frühen Apoptose vermehrt auf der nach außen gerichteten Membranseite auftritt und so für eine Markierung mit Annexin V zugänglich wird. Das Protein Annexin V ist an FITC, einen Fluoreszenzfarbstoff, gekoppelt. Die Translokation von PS geht dem Verlust der Membranintegrität voraus, welcher erst in den späteren Stadien des apoptotischen aber auch nekrotischen Zelltods auftritt. Wenn die Membran im weiteren Verlauf des Zelltods permeabel wird, kann FITC-Annexin V in die Zellen eindringen und auch an PS auf der Innenseite der Membran binden. Demzufolge ist eine Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid (PI) notwendig, um früh-apoptotische von spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können. PI interkaliert in die DNA und färbt sie an. Zellen, die als lebendig angesehen wurden, waren sowohl Annexin-V-negativ als auch PI-negativ, während Zellen, die sich in der frühen Apoptose befanden, Annexin-V-positiv und PI-negativ waren, und Zellen, die sich in der späten Apoptose befanden oder bereits tot waren, sowohl Annexin-V-

positiv als auch PI-positiv waren. Bei der Nekrose erfolgt keine Translokation von PS aufgrund der Disruption der Zellmembran im Anfangsstadium. Annexin-V-FITC kann an nekrotischen Zellen nicht binden. (siehe Tabelle 7)

Tabelle 7: Kombinationen der gemessenen Fluoreszenzsignale

| Ergebnis der Färbung | PI-negativ | PI-positiv |
|-----------------------------|-------------------|----------------------|
| Annexin-V-positiv | Frühe Apoptose | Tot / Späte Apoptose |
| Annexin-V-negativ | Lebend | Nekrose |

3.2.5.1 Arbeitsablauf Apoptose-Nekrose-Assay

3.2.5.1.1 Erstellung der Proben

Die Aussaat der Zellen erfolgte wie in 3.2.1.3 beschrieben. Nach 24 h wurden die Zellen mit der nach dem Behandlungsplan (siehe Tabelle 8) vorgesehenen Menge ZnO NP oder ZnCl₂ (0,1-molare Lösung) wie in 3.2.2.2 bzw. 3.2.2.3 beschrieben behandelt und nach den im Behandlungsplan festgelegten Zeitpunkten wie in 3.2.1.4.2 beschrieben geerntet.

3.2.5.1.2 Apoptose Färbung und Messung mittels FACS

Das Zellpellet wurde in 100 µl Annexin V Bindung Puffer aufgenommen und in ein Rundboden-Polystyrolröhrchen (Falcon (Corning Incorporated), Corning, NY, USA) überführt. Es wurden 5 µl FITC Annexin V und 3 µl PI pro Probe dazu pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden weitere 400 µl Annexin V Bindung Puffer dazugegeben und die Probe unmittelbar mit dem FACS Canto II-Flow Zytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) gemessen. Vor jeder Messung wurde der Inhalt im FACS-Röhrchen kurz auf dem Vortex homogenisiert und anschließend dem FACS Canto II zugeführt. Nach Start des Probendurchflusses wurde die Messung gestartet und es wurden insgesamt 10000 Zellen pro Probe gemessen. Die Fluoreszenzemissionen sowie SSC (Side-Scatter) und FSC (Forward-Scatter) Profile der Zellen, wurden für jede Probe in einer eigenen Datei gespeichert.

3.2.5.2 Auswertung

Die gemessenen Daten wurden über die Cytobank-Plattform (<https://www.cytobank.org/>, Cytobank, Inc., Santa Clara, CA, USA) analysiert.

3.2.6 Lichtmikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Abbildung der Zellmorphologie wurden die Zellen wie in 3.2.1.3 beschrieben ausgesät und 24 h später mit der nach dem Behandlungsplan (siehe Tabelle 8) vorgesehenen Menge ZnO NP (wie in 3.2.2.2 beschrieben) und ZnCl₂ (wie in 3.2.2.3 beschrieben) behandelt. Unter lichtmikroskopischer Vergrößerung (100x) wurden die Zellen an den im Behandlungsplan (siehe Tabelle 8) festgelegten Zeitpunkten fotografiert. (Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland))

Tabelle 8: Behandlungsplan FACS

Die aufgeführten Zeitpunkte entsprechen der Dauer zwischen Beginn der Behandlung und Abschluss des Erntevorgangs. Falls die Behandlung länger als 4 h gedauert hat, wurde nach den ersten 4 h das Zellkulturmedium komplett entfernt und durch 5 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden daraufhin bis zur Ernte weiterhin im Brutschrank inkubiert. Die ZnO NP End-Konzentration entspricht der ZnO NP Konzentration in 5 ml Zellkulturmedium.

| Behandlung | ZnO NP End-Konzentration | Zeitpunkte | | | |
|--|--------------------------|------------|-----|------|------|
| 50 µl ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) | 100 µg/ml | 1 h | 4 h | / | / |
| 20 µl ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) | 40 µg/ml | / | / | 24 h | 48 h |
| 10 µl ZnO NP Stocklösung (10 mg/ml) | 20 µg/ml | / | / | 24 h | 48 h |
| 62,5 µl 0,1 M ZnCl ₂ Lösung | / | 1 h | / | / | / |
| 12,5 µl 0,1 M ZnCl ₂ Lösung | / | / | / | 24 h | 48 h |
| Unbehandelt | / | 1 h | 4 h | 24 h | 48 h |

4 Ergebnisse

Im nachfolgenden Abschnitt werden meine Ergebnisse der *in vitro* Analyse des genotoxischen Potentials von ZnO NP und ZnCl₂ in A549 Tumorzellen dargestellt. Zur Bewertung der genotoxischen Schäden wurden die Zellen hinsichtlich des *DNA-Damage-Response* Proteins γ H2AX untersucht. Vorangegangene Zytotoxizitätsbestimmung verschiedener ZnO NP Konzentrationen dienten dazu, Apoptose und Nekrose zum jeweiligen Messzeitpunkt auszuschließen. Dies wird notwendig, weil die im Zuge der Apoptose induzierte DNA-Fragmentierung ebenfalls in γ H2AX-Formationen resultiert. [160] Mit dem vorherigen Ausschluss zytotoxischer Dosierungen konnte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse nicht durch den Einfluss avitaler Zellen beeinträchtigt wurden und tatsächlich der Genotoxizität von ZnO NP zuzurechnen waren. Auch die Detektion einer zusätzlichen Proteinbande bei 26 kDa im Western Blot ist ein zentrales Thema dieses Abschnitts. Vermutlich handelt es sich hierbei um mono-ubiquitiniertes- γ H2AX (γ H2AX-ub1). Während auf der einen Seite Apoptose eine DNA-Fragmentierung und somit umfangreiche γ H2AX Formationen induziert, wird auf der anderen Seite die γ H2AX-ub1-Bildung während der Apoptose blockiert. [161] γ H2AX-ub1 könnte deshalb als Biomarker für nicht-apoptotische DSB angesehen werden. [163]

4.1 Zytotoxizitätsbestimmung

Die Zytotoxizität verschiedener ZnO NP Dosierungen in A549 Zellen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie bewertet (N=1). Parallel dazu wurde die Morphologie der Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet und festgehalten. Die (Abbildung 17A) zeigt Illustrationen der Auswertung des Apoptose-Nekrose-Assay nach Behandlung mit einer ZnO NP Konzentration von 20 µg/ml, 12,5 µl ZnCl₂ (0,1 M), sowie eine unbehandelte Kontrollprobe jeweils 24 h und 48 h nach Behandlungsbeginn. Es erfolgte die gleichzeitige Messung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Färbung mit Annexin V-FITC) und der Permeabilität der Plasmamembran (Färbung mit Propidiumiodid (PI)) zur Identifizierung lebender, intakter Zellen (Annexin V negativ und PI negativ), früh apoptotischer Zellen (Annexin V positiv und PI negativ), toter Zellen (Annexin V positiv und PI positiv) und nekrotischer Zellen (Annexin V negativ und PI positiv). Der Anteil intakter Zellen befindet sich dabei im unteren linken Quadranten, die früh-apoptotischen Zellen im oberen linken Quadranten, die toten Zellen (entweder spät-apoptotisch oder nekrotisch) im oberen rechten Quadranten und nekrotische Zellen im unteren rechten Quadranten. Die durchflusszytometrische Analyse hat gezeigt, dass es bei einer ZnO NP Konzentration von 20 µg/ml keinen feststellbaren toxischen Effekt gab, welcher in einer Abnahme des Anteils intakter Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Proben resultiert hätte (Abbildung 17 C). Passend dazu zeigte die lichtmikroskopische Analyse (Abbildung 17B) weder Abrundung noch Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale. Bei den mit ZnCl₂-Lösung (12,5 µl) behandelten Zellen war eine Abnahme des Anteils intakter Zellen deutlich erkennbar. Die lichtmikroskopische Analyse zeigte passend dazu eine Abrundung und eine Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale (Abbildung 17 B). Im Apoptose-Nekrose-Assay war sowohl 24 h als auch 48 h nach Behandlung der Zellen mit einer ZnO NP Konzentration von 40 µg/ml ein Abfall des Anteils intakter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe erkennbar (Abbildung 18) und der Anteil der Zellen im oberen linken und im oberen rechten Quadranten (früh-apoptotische bzw. tote Zellen) war verglichen mit den unbehandelten Proben erhöht. (Abbildung 18A) Die mit ZnO NP behandelten Zellen zeigten im Lichtmikroskop passend dazu eine Abrundung und eine Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale. (Abbildung 18C) Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist 1 h nach Behandlung mit 100 µg/ml ZnO NP bzw. 62,5 µl ZnCl₂ (0,1M) kein deutlicher Rückgang des Anteils intakter Zellen erkennbar. (Abbildung 19) Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer ZnO NP Konzentration von 20 µg/ml keine zytotoxischen Effekte in dem untersuchten Zeitraum (48 h) zu erwarten sind und folglich dieses Behandlungsschema für eine genotoxische Analyse geeignet ist. Die ZnCl₂-Lösung (0,1M, 12,5 µl), mit einer äquimolaren Menge an Zn²⁺-Ionen eignet sich hingegen nicht. Das Behandlungsschema 100 µg/ml ZnO NP bzw. 62,5 µl ZnCl₂ (0,1M) für 1 h eignet sich ebenfalls für eine Untersuchung auf DSB.

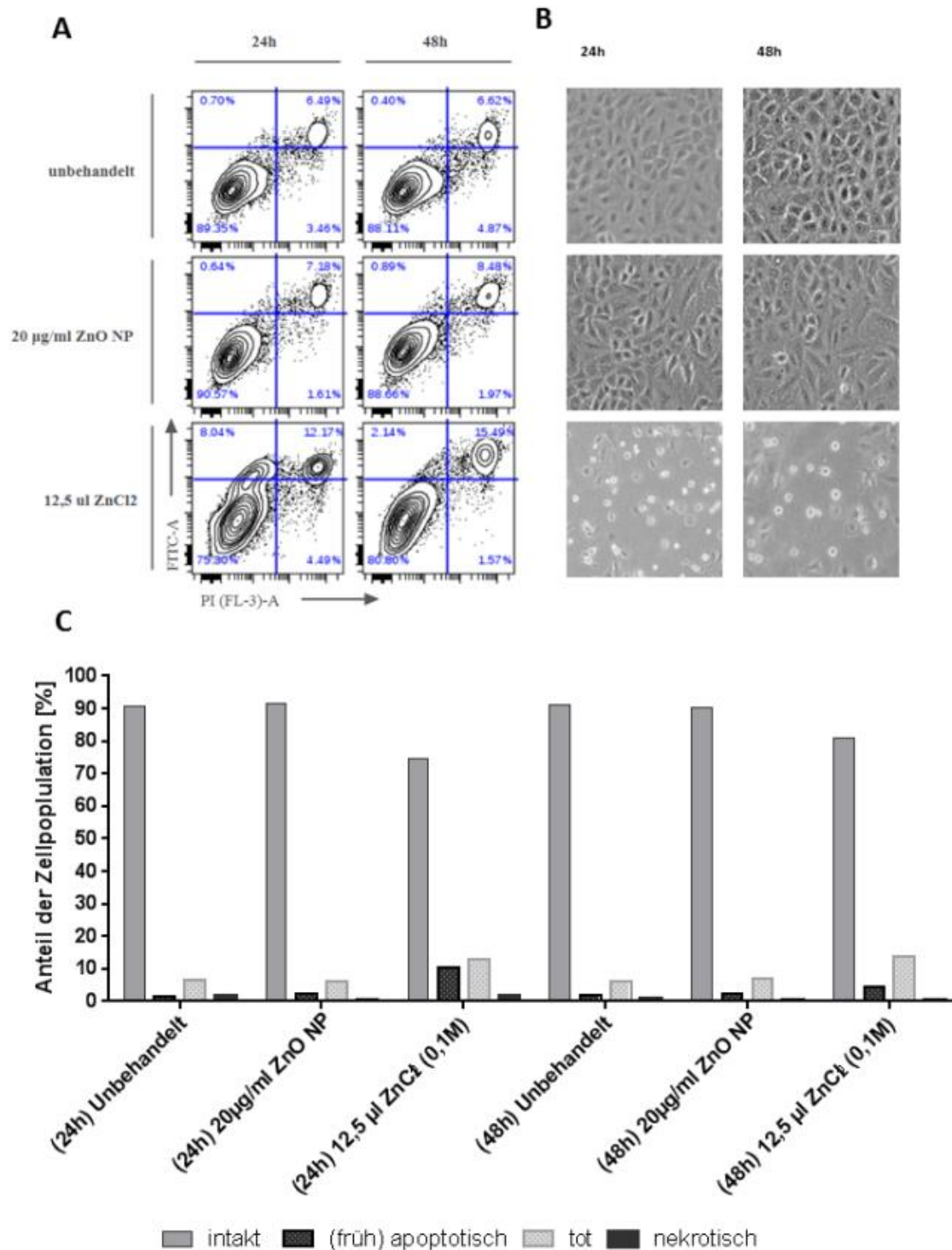


Abbildung 17: Toxizitätsbestimmung von ZnO NP und ZnCl₂-Lösung

(A) und (C) zeigen die relativen Anteile der lebenden intakten, (früh-) apoptotischen, toten und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation in den Kontrollgruppen und 24 h bzw. 48 h nach Behandlung mit 20 µg/ml ZnO NP bzw. 12,5 µl ZnCl₂ (0,1M). Die Behandlung mit 12,5 µl ZnCl₂ (0,1M) resultierte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h in deutlich erhöhtem Zelltod verglichen mit der Kontrollgruppe. (A) Parallel dazu wurde die Morphologie der behandelten Zellen lichtmikroskopisch festgehalten. (Vergrößerung 1:100) (B) N=1.

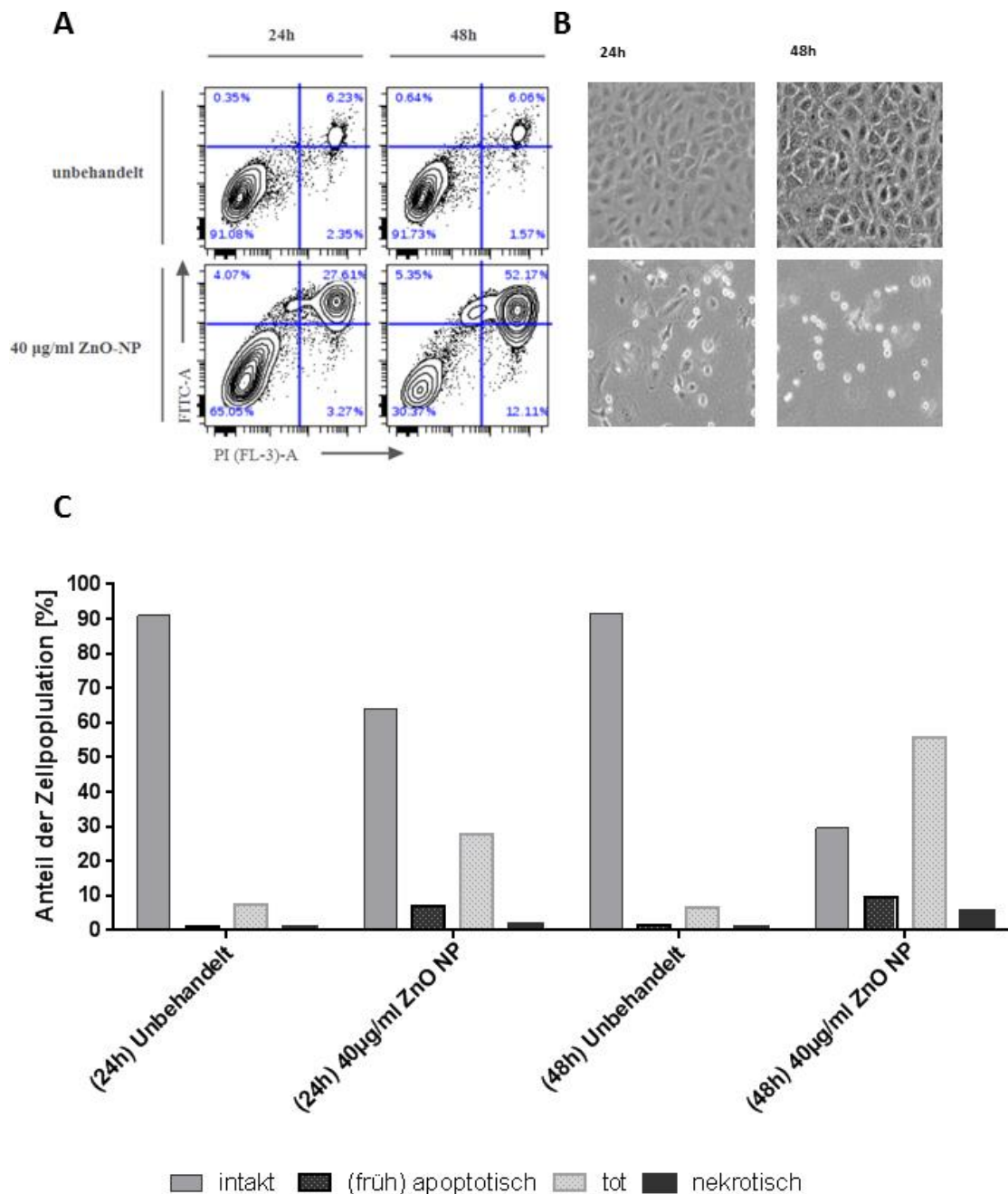


Abbildung 18: Toxizitätsbestimmung von ZnO NP (40µg/ml)

(A) und (C) zeigen die relativen Anteile der lebenden intakten, (früh-) apoptotischen, toten und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation in den Kontrollgruppen und 24 h bzw. 48 h nach Behandlung mit 40 µg/ml ZnO NP. Die Behandlung mit ZnO NP (40 µg /ml) resultierte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h in deutlich erhöhtem Zelltod verglichen mit der Kontrollgruppe. (A) Parallel dazu wurde die Morphologie der behandelten Zellen lichtmikroskopisch festgehalten. (Vergrößerung 1:100) (B) N=1.

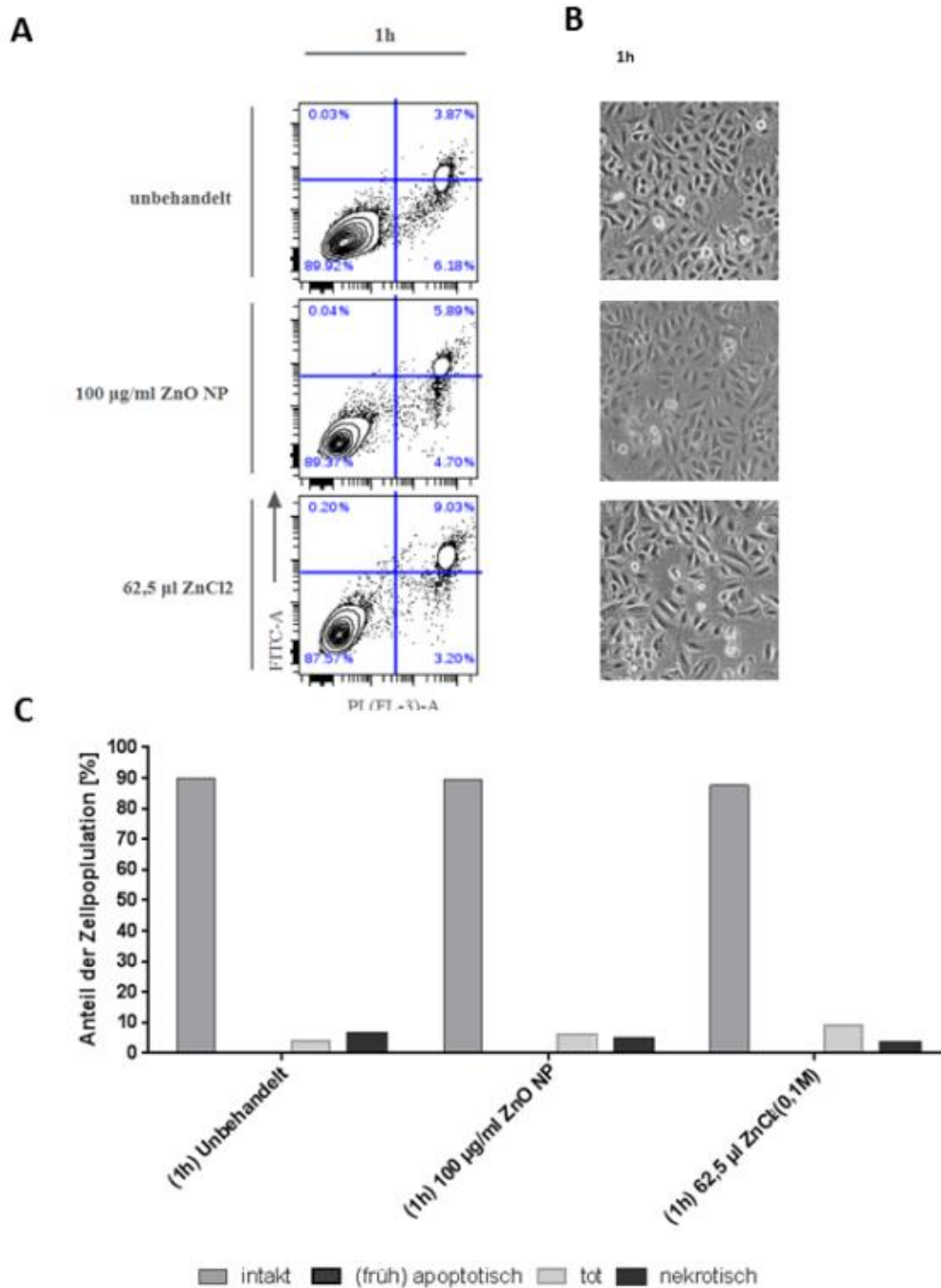


Abbildung 19: Toxizitätsbestimmung von ZnO NP und ZnCl₂-Lösung

(A) und (C) zeigen die relativen Anteile der lebenden intakten, (früh-) apoptotischen, toten und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation in der Kontrollgruppe und 1 h nach Behandlung mit 100 µg/ml ZnO NP bzw. 62,5 µl ZnCl₂ (0,1M). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist 1 h nach Behandlung mit 100 µg/ml ZnO NP bzw. 62,5 µl ZnCl₂ (0,1M) kein deutlicher Rückgang des Anteils intakter Zellen erkennbar. Parallel dazu wurde die Morphologie der behandelten Zellen lichtmikroskopisch festgehalten. (Vergrößerung 1:100) (B). N=1.

4.2 γ H2AX Expressionsanalyse mittels Western Blot

Zur Bewertung des genotoxischen Potenzials von ZnO NP wurden die Zellen hinsichtlich des *DNA-Damage Response* Proteins γ H2AX untersucht. Im Rahmen der DNA-Schadensantwort auf Doppelstrangbrüche wird das Histon H2AX am Serin 139 phosphoryliert und γ H2AX kann in diesem Zusammenhang als Biomarker für DSB angesehen werden. In dieser Arbeit wurden DNA-Doppelstrangbrüche indirekt durch eine γ H2AX Expressionsanalyse mittels Western Blot quantifiziert.

4.2.1 Doppelbanden nach ZnO NP und ZnCl₂ Behandlung

Abbildung 20 zeigt repräsentativ einen Western-Blot für die *Kurzen Behandlungszeiträume* (Tabelle 5) nach Behandlung mit ZnO NP und ZnCl₂. Im Verlauf der Immundetektion konnten auf den Blotmembranen zusätzliche Protein-Banden mit dem in Tabelle 6 aufgelisteten monoklonalen Antikörper für γ H2AX detektiert werden. Die Bande, welche das monomere Protein γ H2AX repräsentiert, konnte anhand des Molekulargewichts von ca. 17 kDa identifiziert werden. Zusätzlich konnten noch zwei weitere Protein-Banden auf Höhe von ca. 26 kDa bzw. ca. 36 kDa detektiert werden. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um mono-ubiquitiniertes γ H2AX (γ H2AX-ub1) und di-ubiquitiniertes γ H2AX (γ H2AX-ub2) handeln könnte. Die Doppelbanden sind 3 min, 5 min und 15 min sowohl nach Behandlung mit ZnO NP als auch nach Behandlung mit ZnCl₂-Lösung deutlich erkennbar. Die 28 kDa Bande ist jedoch deutlich stärker als die 36 kDa Bande, welche auf der Mehrzahl der Blotmembranen zu schwach für eine densitometrische Auswertung war. Weiterhin ist gut zu erkennen, dass die vermeintlichen γ H2AX-ub1-Banden 1 h nach Behandlungsbeginn mit ZnO NP bzw. ZnCl₂ sehr stark an Intensität verloren. Der repräsentative Blot für die *Langen Behandlungszeiträume* (Abbildung 21) zeigt die Existenz der vermeintlichen γ H2AX-ub1-Bande auch für die untersuchten Zeiträume 4, 8, 12, 24 und 48 h nach ZnO NP Behandlung (20 μ g/ml). Korrespondierend mit dem Blot *Kurze Behandlungszeiträume* (Abbildung 20) konnte für den Zeitpunkt 1 h nach ZnO NP Behandlung auch für die *Langen Behandlungszeiträume* lediglich eine sehr schwache γ H2AX-ub1-Bande beobachtet werden. Auffällig ist, dass 48 h nach Behandlung sowohl die Intensität der γ H2AX-ub1- als auch die der γ H2AX-Bande gleichermaßen anzusteigen scheint. Bei Betrachtung der beiden Blotmembranen (Abbildung 20, Abbildung 21) scheint es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der Intensität der γ H2AX-ub1- und der γ H2AX-Bande zu geben. Diese mit dem bloßen Auge wahrgenommenen Korrelationen gaben Anlass zur weiteren Auswertung der beiden Banden.

Ergebnisse

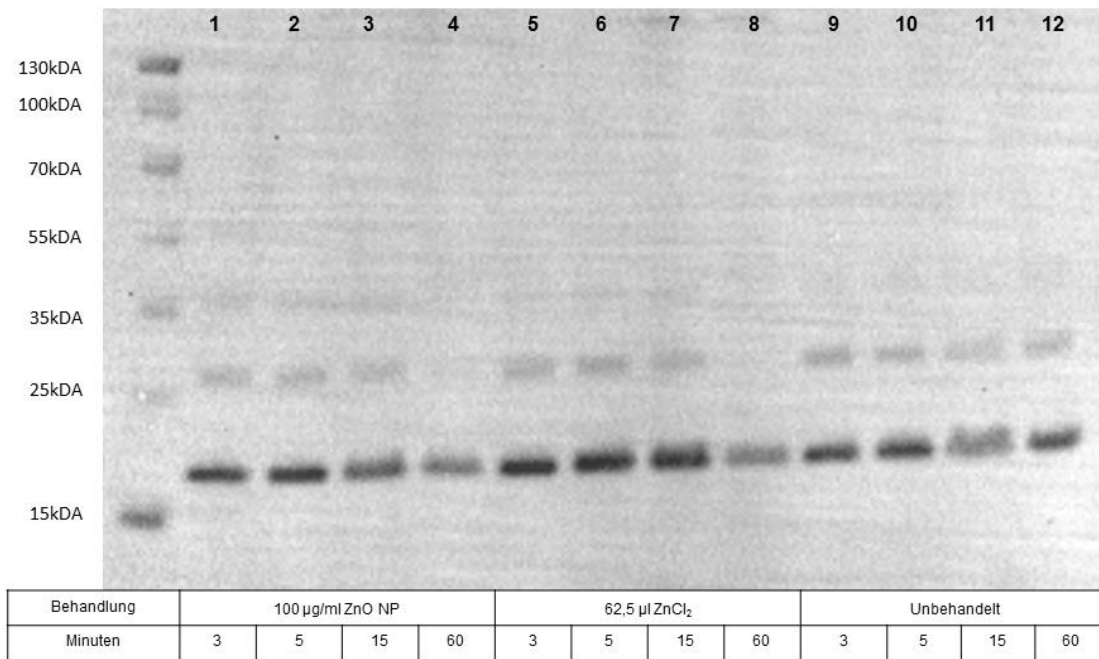


Abbildung 20: Western Blot: Kurze Behandlungszeiträume

Mittels Western Blot auf der Membran detektierte γ H2AX und γ H2AX-ub1 Proteinbanden nach Behandlung mit ZnO NP und ZnCl₂. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus den durchgeführten Versuchsreihen. A549 Zellen wurden für jeweils 3 min, 5 min, 15 min und 60 min mit ZnO NP (100 µg/ml) und ZnCl₂-Lösung (62,5 µl, 0,1M) behandelt: ZnO NP (1-4), ZnCl₂ (5-8), unbehandelt (9-12).

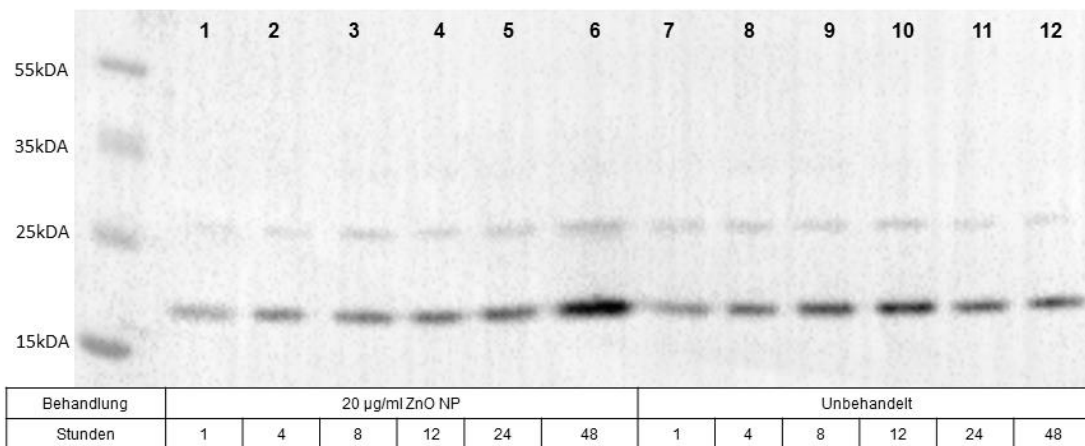


Abbildung 21: Western Blot: Lange Behandlungszeiträume

Mittels Western Blot auf der Membran detektierte γ H2AX und γ H2AX-ub1 Proteinbanden nach Behandlung mit ZnO NP. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus den durchgeführten Versuchsreihen. A549 Zellen wurden für 1, 4, 8, 12, 24 und 48 h mit ZnO NP (20 µg/ml) behandelt: ZnO NP (1-6), Unbehandelt (7-12).

4.2.2 Doppelbanden nach Bestrahlung und zytotoxischen ZnO NP Dosierungen

Im Rahmen von Vorversuchen wurden auch γ H2AX Expressionsanalysen von bestrahlten A549 Zellen (8Gy) und für ein zytotoxisches Behandlungsschemata (100 μ g/ml ZnO NP für 24 h) durchgeführt. Interessanterweise wurde 24 h nach Behandlung mit einer ZnO NP Konzentration von 100 μ g/ml keine Doppelbande detektiert, obwohl eine sehr starke γ H2AX-Bande sichtbar war. (Abbildung 22) Die Bestrahlung der Tumorzellen mit 8 Gy resultierte in gut sichtbaren Doppelbanden. (Abbildung 22) Eine Stunde nach Bestrahlung wiesen sowohl die γ H2AX-Bande als auch die korrespondierende γ H2AX-ub1-Bande eine hohe Intensität auf. Mit größeren Zeitabständen zwischen Bestrahlung und Ernte der Zellen (2 h, 4 h, 24 h nach Bestrahlung) wiesen dann beide Banden (γ H2AX- und γ H2AX-ub1-Bande) gleichermaßen eine viel niedrigere Intensität im Vergleich zum 1 h-Wert (8 Gy) auf.

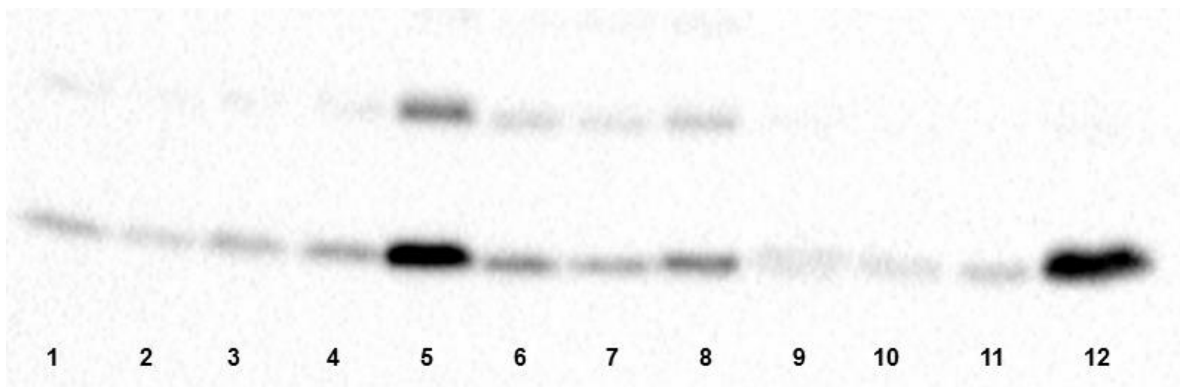


Abbildung 22: Western Blot: ZnO NP und Bestrahlung

Mittels Western Blot auf der Membran detektierte γ H2AX und γ H2AX-ub1 Proteinbanden nach Behandlung mit ZnO NP und nach Bestrahlung. Der Western Blot zeigt unbehandelte (1-4), mit 8 Gy bestrahlte (1, 2, 4 und 24 h nach Bestrahlung geerntet) (5-8), und 1, 2, 4 und 24 h nach ZnO NP (100 μ g/ml) Behandlung geerntete (9-12) Zellen der Zelllinie A549.

4.2.3 Verhältnis der densitometrischen Werte (γ H2AX / γ H2AX-ub1)

Die Inspektion der im Zuge der γ H2AX-Expressionsanalyse angefertigten Blotmembranen (Abbildung 20, Abbildung 21) lässt bereits eine Korrelation zwischen der Intensität der γ H2AX- und γ H2AX-ub1 Bande erahnen. Im nächsten Schritt wurden die densitometrischen Werte der jeweiligen γ H2AX- und γ H2AX-ub1 Banden einer Lane ins Verhältnis gesetzt. Um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten, wurden für beide Versuchsreihen (*Kurze Behandlungszeiträume* und *Lange Behandlungszeiträume*) jeweils 3 unabhängige Blotmembranen (N=3) ausgewertet. Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der Verhältnisse (γ H2AX / γ H2AX-ub1) der densitometrischen Werte der jeweiligen Bandenintensität. Es stellte sich heraus, dass sich dieses Verhältnis bei keinem

Ergebnisse

der dargestellten Behandlungszeiträume verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant unterscheidet. Auf dem repräsentativen Blot für die *Kurzen Behandlungszeiträume* (Abbildung 20) ist zu erkennen, dass 60 min nach $ZnCl_2$ Behandlung keine $\gamma H2AX$ -ub1-Bande detektiert wurde. Da auch auf den beiden anderen zur statistischen Auswertung herangezogenen Blotmembranen diese Bande nicht nachweisbar war, konnte kein Verhältnis errechnet werden.

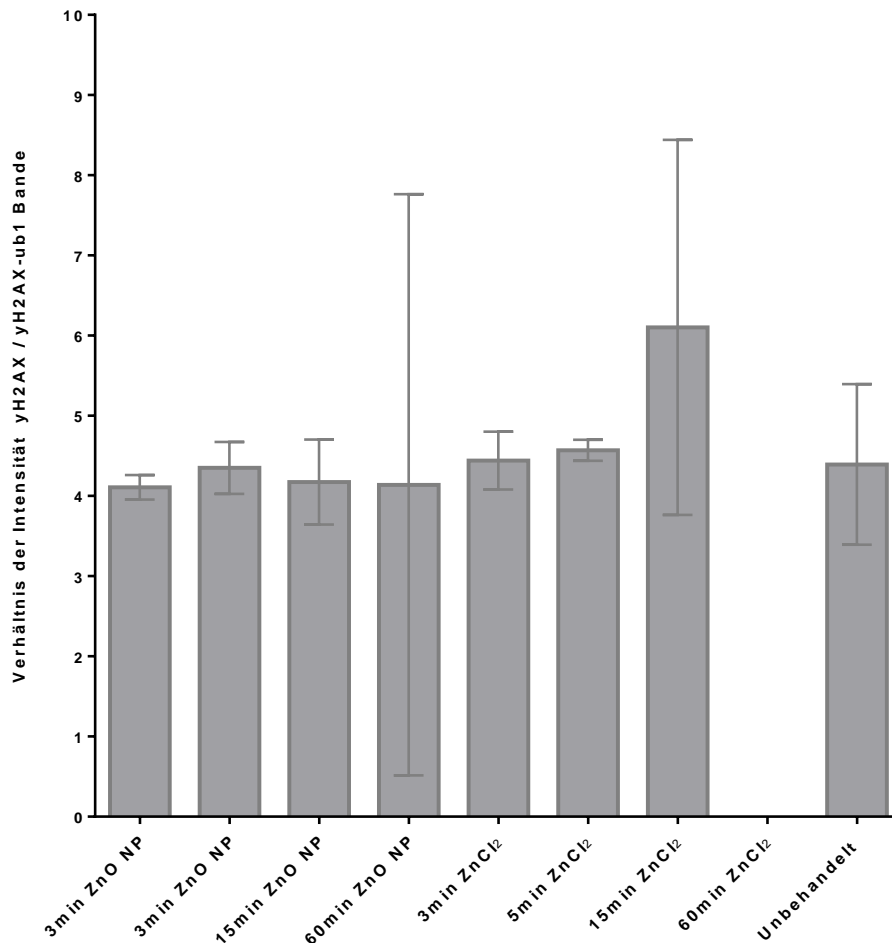


Abbildung 23: Verhältnis der densitometrischen Werte

A549 Zellen wurden für 3, 5, 15 und 60 Minuten mit ZnO NP (100 $\mu g/ml$) und $ZnCl_2$ -Lösung (62,5 μl , 0,1M) behandelt. Für jeden Zeitpunkt wurde eine separate Kontrolle erstellt, welche alle zusammen gemittelt wurden. (Unbehandelt). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisse der densitometrischen Werte der $\gamma H2AX$ - und $\gamma H2AX$ -ub1 Banden von 3 unabhängigen Experimenten ($N=3$). Zur statistischen Analyse wurde der one-way ANOVA durchgeführt, um jede Behandlungsgruppe mit den unbehandelten Kontrollzellen zu vergleichen. Korrektur mit dem Dunnett-Test für Multiple Mittelwertvergleiche. Es stellte sich heraus, dass sich das Verhältnis der densitometrischen Werte ($\gamma H2AX / \gamma H2AX$ -ub1) bei keinem der dargestellten Behandlungszeiträume verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant unterscheidet.

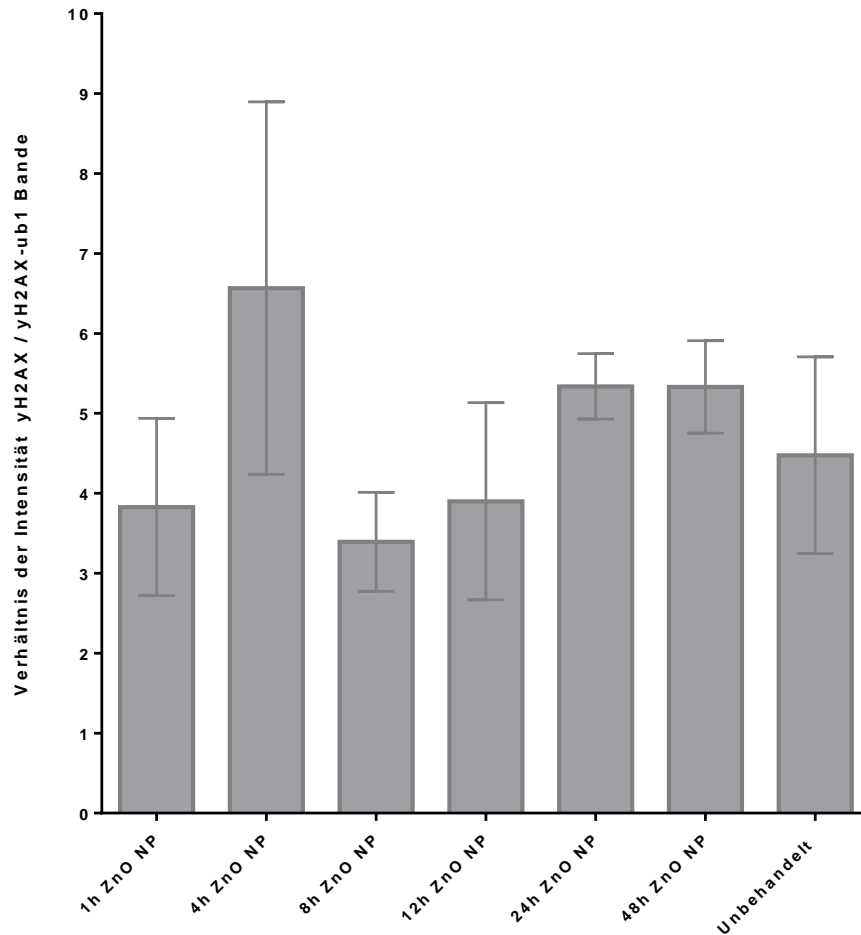


Abbildung 24: Verhältnis der densitometrischen Werte

A549 Zellen wurden für 1, 4, 8, 12, 24 und 48 h mit ZnO NP (20 μ g/ml) behandelt. Für jeden Zeitpunkt wurde eine separate Kontrolle erstellt, welche alle zusammen gemittelt wurden. (Unbehandelt). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisse der densitometrischen Werte der γ H2AX- und γ H2AX-ub1 Banden von 3 unabhängigen Experimenten (N=3). Zur statistischen Analyse wurde der one-way ANOVA durchgeführt, um jede Behandlungsgruppe mit den unbehandelten Kontrollzellen zu vergleichen. Korrektur mit dem Dunnett-Test für Multiple Mittelwertvergleiche. Es stellte sich heraus, dass sich das Verhältnis der densitometrischen Werte (γ H2AX / γ H2AX-ub1) bei keinem der dargestellten Behandlungszeiträume verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant unterscheidet.

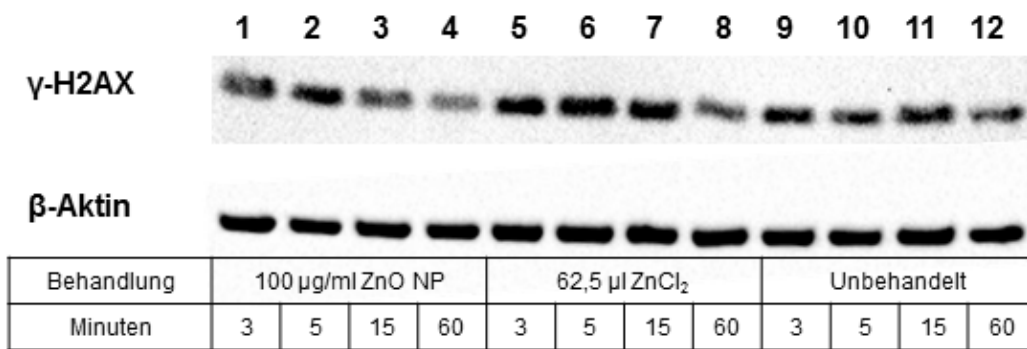
4.2.4 Analyse von DNA-Schäden mittels γ H2AX Expressionsanalyse

Nach Vorversuchen wurden zwei unterschiedliche Zeiträume mit jeweils geeigneten ZnO NP Konzentrationen festgelegt zur genaueren Untersuchung. Dies waren zum einen kurze Zeiträume (≤ 1 h) mit einer ZnO NP Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$. und zum anderen lange Zeiträume (≤ 48 h) mit einer ZnO NP Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$. Für diese beiden unterschiedlichen Behandlungsschemata konnte keine zytotoxische Wirkung der ZnO NP in den untersuchten Zeiträumen festgestellt werden.

4.2.4.1 Kurze Zeiträume (Abbildung 25)

Bereits 3 und 5 Minuten nach ZnO NP Behandlung wurde signifikant mehr γ H2AX detektiert, gefolgt von einem signifikanten Abfall der Menge an γ H2AX nach 60 Minuten unter das Level der unbehandelten Proben. Zusätzlich wurde die Genotoxizität der zugegebenen ZnO NP mit der Genotoxizität einer äquimolaren Menge an Zn^{2+} – Ionen verglichen. Hierzu wurden 62,5 μl einer 0,1-molaren ZnCl_2 -Lösung eingesetzt. Auch bei der Behandlung mit ZnCl_2 -Lösung war die Menge an γ H2AX in den Zellen signifikant erhöht (3 und 5 Minuten) und sank dann ebenfalls nach 60 Minuten signifikant unter das γ H2AX-Level der unbehandelten Proben.

A



B

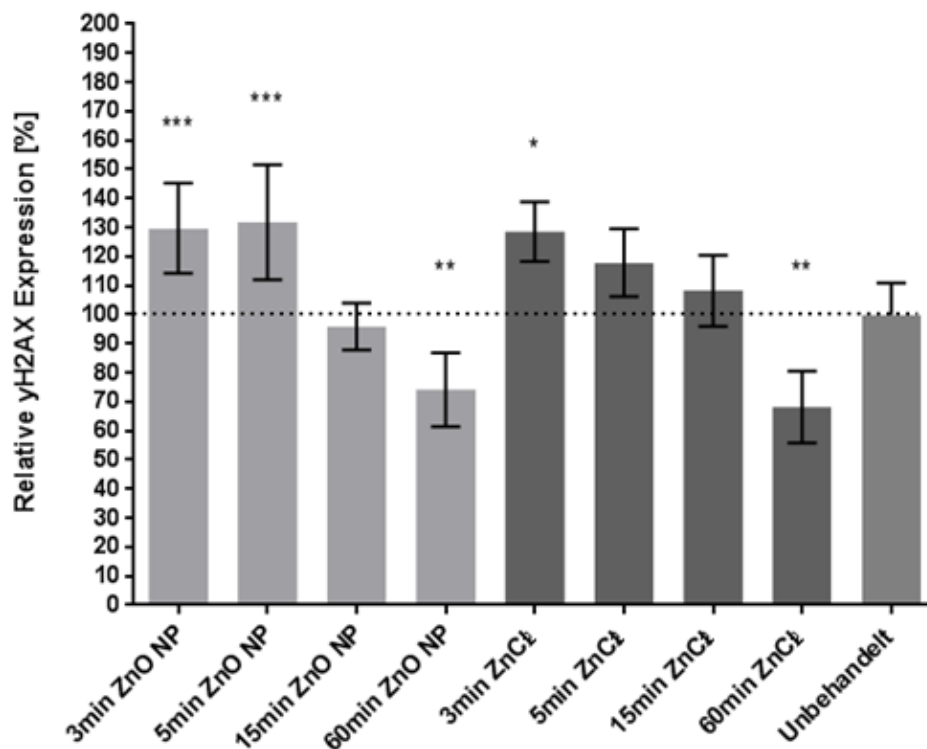


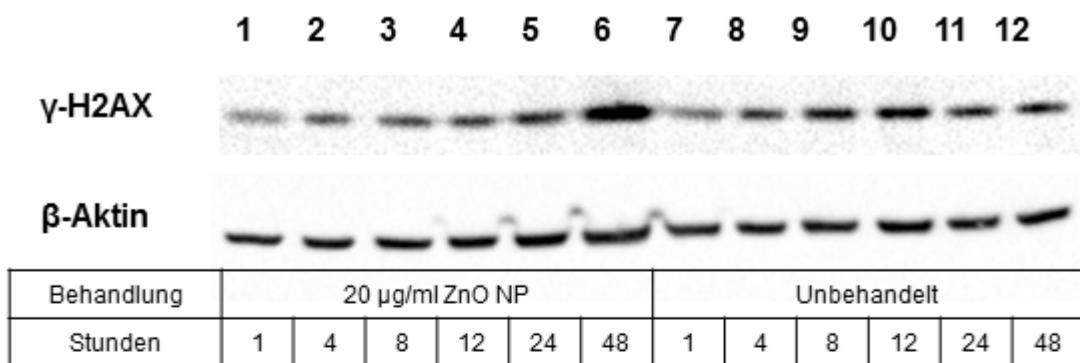
Abbildung 25: γH2AX Expression nach Behandlung mit ZnO NP/ZnCl₂

A549 Zellen wurden für 3, 5, 15 und 60 Minuten mit ZnO NP und ZnCl₂-Lösung behandelt. (A) zeigt repräsentativ für die Ergebnisse einen Western Blot: ZnO NP (1-4), ZnCl₂ (5-8), Unbehandelt (9-12). Die korrespondierenden β-Aktin-Banden dienten als Ladekontrolle. Für jeden Zeitpunkt wurde eine separate Kontrolle erstellt (9-12), welche alle in (B) zusammen gemittelt wurden. (B) zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten (Unbehandelt=100%) densitometrischen Analysen von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten (N≥3). Zur statistischen Analyse wurde der one-way ANOVA durchgeführt, um jede Behandlungsgruppe mit den unbehandelten Kontrollzellen zu vergleichen: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Korrektur mit dem Dunnett-Test für Multiple Mittelwertvergleiche.

4.2.4.2 Lange Zeiträume (Abbildung 26)

Den Ergebnissen der Zytotoxizitätsbestimmung zur Folge wurden die Langzeitbehandlungen über 48 h lediglich mit der ZnO NP Konzentration von 20 µg/ml durchgeführt, um zytotoxische Effekte und deren potentielle Auswirkung auf die γH2AX- Menge zu vermeiden. Abbildung 25 zeigt, dass 1 h nach Behandlungsbeginn die γH2AX-Expression signifikant unter dem Wert der unbehandelten Proben lag. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus 4.2.4.1, wo 1 h nach ZnO NP Behandlung das γH2AX-Level im Vergleich zu den unbehandelten Proben ebenfalls signifikant verringert war. Im Western Blot war 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach ZnO NP Behandlung kein signifikanter Unterschied in den γH2AX-Level im Vergleich zu den unbehandelten Proben feststellbar. Nach 48 Stunden kam es schließlich zu einer signifikant erhöhten γH2AX-Expression im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

A



B

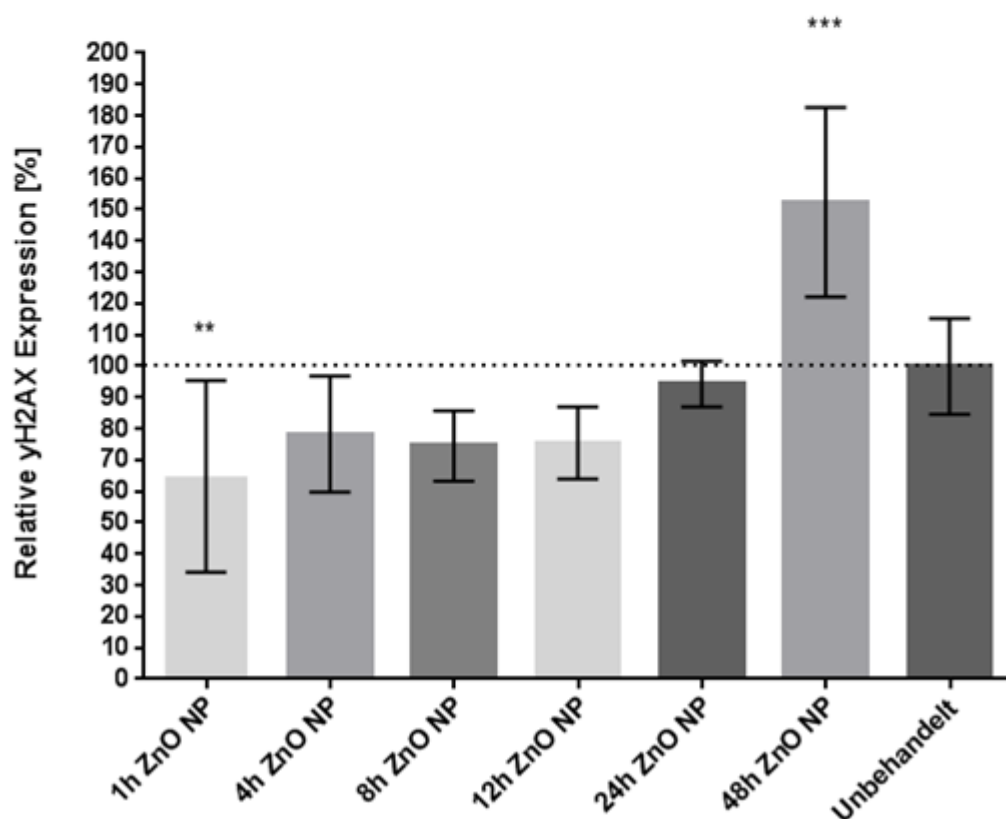


Abbildung 26: γH2AX Expression nach Behandlung mit ZnO NP

A549 Zellen wurden für 1, 4, 8, 12, 24 und 48 h mit ZnO NP behandelt. (A) zeigt repräsentativ für die Ergebnisse einen Western Blot: ZnO NP (1-6), Unbehandelt (7-12). Die korrespondierenden β-Aktin-Banden dienen als Ladekontrolle. Für jeden Zeitpunkt wurde eine separate Kontrolle erstellt (7-12), welche alle in (B) zusammen gemittelt wurden. (B) zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten (Unbehandelt=100%) densitometrischen Analysen von 4 unabhängigen Experimenten (N=4). Zur statistischen Analyse wurde der one-way ANOVA durchgeführt, um jede Behandlungsgruppe mit den unbehandelten Kontrollzellen zu vergleichen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Korrektur mit dem Dunnett-Test für Multiple Mittelwertvergleiche.

5 Diskussion

5.1 γ H2AX –Formation bei Apoptose

Apoptose bezeichnet eine Form des Zelltods, bei der nicht mehr benötigte Zellen aktiv und kontrolliert eliminiert werden. [167] Dies geschieht beispielsweise im Rahmen normaler Entwicklungsprozesse, aber auch als zelluläre Antwort auf Schäden, die nicht repariert werden können. Die vorherrschende Art des Zelltods ist allerdings von der Art der Zelle und der Verletzung abhängig. [168] Als zelluläre Reaktion auf die Behandlung mit ZnO NP kann, abhängig von der Tumorzelllinie sowohl der apoptotische als auch der nekrotische Zelltod ausgelöst werden. [65] Explizit für die Tumorzelllinie A549 zeigten die Ergebnisse des Nekrose-Apoptose-Assay, dass nach ZnO NP Behandlung in A549-Zellen fast alle Zellen durch Apoptose starben, was sich auch mit den Ergebnissen des Nekrose-Apoptose-Assay für A549-Zellen von Wiesmann et al. (2019) deckt. Diese Erkenntnisse sind wichtig, da die Spaltung der chromosomalen DNA in Fragmente auch ein Bestandteil des programmierten Zelltods ist. Aus diesem Prozess resultierende DSB münden im Zuge der DDR in γ H2AX-Formationen, welche jedoch nicht auf die Genotoxizität zurückzuführen sind. [158] In diesem Zusammenhang zeigten auch Rogakou et al. (2000) und Luczak et al. (2018), dass eine durch Apoptose induzierte DNA-Fragmentierung zu umfangreichen γ H2AX Formationen führt. [159] [160] Luczak et al. behandelten Zellen mit Staurosporin, einem Proteinkinase-inhibitor, der häufig in der Forschung zur Induktion von Apoptose eingesetzt wird, und mit TRAIL, einem physiologisch hergestellten Zytokin, welches durch Aktivierung der Rezeptoren DR4 und DR5 eine Caspase-vermittelte Apoptose auslöst. Bei 5 von 6 Zelllinien, inklusive der auch in meiner Arbeit verwendeten Zelllinie A549, wurde von Luczak et al. ein starker und zeitabhängiger Anstieg der γ H2AX-Expression im Zuge der Apoptose festgestellt. [159] Wenn es bei einer Behandlung von Zellen zu zytotoxischen Effekten kommt, ist es deshalb fragwürdig γ H2AX als Biomarker für DNA-Schäden bzw. Doppelstrangbrüche heranzuziehen, insofern die durch Apoptose induzierte γ H2AX-Formation nicht herausgefiltert werden kann. [159] Durch den Ausschluss zytotoxischer Behandlungsschemata mittels Apoptose-Nekrose Assay in Vorexperimenten der vorliegenden Studie konnte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse der genotoxischen Untersuchungen nicht durch den Einfluss avitaler Zellen beeinträchtigt wurden und tatsächlich der Genotoxizität von ZnO NP zuzurechnen waren.

In einem Zeitraum bis 1 h nach ZnO NP Behandlung war auch bei einer hohen ZnO NP Konzentration von 100 μ g/ml kein Abfall des Anteils intakter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe im Apoptose-Nekrose Assay feststellbar. Abbildung 18 zeigt jedoch, dass sowohl 24 h als auch 48 h nach Behandlungsbeginn bereits eine Konzentration von 40 μ g/ml ZnO NP den Anteil intakter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe deutlich

reduzierte. H2AX-Phosphorylierungen bei diesem Behandlungsschema sind wahrscheinlich Folge von Apoptose und hängen nicht mit Genotoxizität zusammen. Auch eine im Zuge von Vorversuchen angefertigte Blotmembran (Abbildung 22) worauf eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich intensivere γ H2AX-Bande 24 h nach Behandlungsbeginn mit 100 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP zu erkennen war, ist deshalb kein Anhaltspunkt für das DNA-schädigende Potential der untersuchten ZnO NP. Im Gegensatz dazu sind bei einer ZnO NP Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ keine zytotoxischen Effekte in den untersuchten Zeiträumen (24 h und 48 h nach ZnO NP Behandlung) im Apoptose-Nekrose Assay erkennbar gewesen. Die Ergebnisse ergänzten sich jeweils passend mit den Beobachtungen in den lichtmikroskopischen Aufnahmen. Die durchgeführten Experimente zeigten deutlich, dass der zytotoxische Effekt der verwendeten ZnO NP auf die Tumorzelllinie A549 dosis- und zeitabhängig ist und decken sich mit verschiedenen Ergebnissen aus Untersuchungen in Alveolar-Epithel-Zellen, aber auch mit mehreren anderen untersuchten Zelllinien. [169] [78] [79] Wiesmann et al. (2019) zeigten, dass sowohl maligne als auch nicht-maligne Zellen bei Behandlung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP keine anhaltenden Schäden erlitten. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP reduzierte sich die Zellviabilität auf unter 25% verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine ZnO NP Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP führte bei Fibroblasten lediglich zu einer sehr geringen Reduzierung der Zellviabilität, während bei Endothelzellen und Tumorzellen der Zelllinie A549 der Anteil intakter Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich erniedrigt war. [65] Die Daten von Wiesmann et al. (2019) veranschaulichen die jeweils unterschiedliche Sensitivität verschiedener Zelllinien auf eine ZnO NP Behandlung. Zusätzlich hat aber auch die Beschaffenheit der gewählten ZnO NP Charge, neben der ZnO NP Konzentration und Behandlungsdauer einen erheblichen Einfluss auf die Zytotoxizität. Größe, Oberflächenladung und ihr Verhalten in Bezug auf Agglomeration werden als wichtigste Parameter bei der Vorhersage der Zytotoxizität diskutiert. [100] [170] [86, 87] Eine genaue Voraussage über die Zytotoxizität einer ZnO NP Charge anhand dieser Parameter ist sehr schwierig, weshalb eine Toxizitätsbestimmung der verwendeten ZnO NP Charge vor genotoxischen Untersuchungen generell durchgeführt werden sollte. Auch die Literatur zeigt hier, dass die Ergebnisse mit verschiedenen Zelllinien und/oder unterschiedlichen Nanopartikeln nicht konsistent sind.

5.2 Mono- und di-ubiquitiniertes γ H2AX

Bei den im Western Blot detektierten Doppelbanden handelt es sich wahrscheinlich um mono- und di-ubiquitiniertes γ H2AX. Mono-ubiquitiniertes γ H2AX (γ H2AX-ub1) hat ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa und di-ubiquitiniertes γ H2AX (γ H2AX-ub2) hat ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa. [171] Die RNF8 / RNF168-vermittelte Ubiquitinierung von Lys13/Lys15 in H2A und γ H2AX ist für die Rekrutierung von nachgeschalteten Signal- und Reparaturfaktoren an die Schadensstelle notwendig. [162] Auch wenn sie in der Literatur nur selten beschrieben werden, scheint die Detektion von γ H2AX-ub1- und γ H2AX-ub2 Banden im Zuge von γ H2AX-Expressionsanalysen mittels Western Blot nicht ungewöhnlich zu sein: Luczak et al. (2018) testeten 5 kommerzielle Antikörper und wiesen jeweils ubiquitinierte γ H2AX-Formationen auf den Blotmembranen nach. [163]

5.3 γ H2AX-ub1 als Biomarker für nicht-apoptotische DNA-Doppelstrangbrüche

Während auf der einen Seite Apoptose eine DNA-Fragmentierung und somit umfangreiche γ H2AX Formation induziert, wird auf der anderen Seite die γ H2AX-ub1-Bildung während der Apoptose blockiert. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in einer proteolytischen Spaltung von RNF168 und der daraus folgenden Unterbindung der Ubiquitinierung von γ H2AX im Verlauf der Apoptose. [161] [162] Mit Verweis auf Abbildung 22 und die korrespondierenden Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung ist es deshalb plausibel, dass bei einer ZnO NP Konzentrationen von 100 μ g/ml 24 h nach Beginn der ZnO NP Behandlung eine sehr starke γ H2AX-Bande, aber keine γ H2AX-ub1-Bande detektiert wurde. Weitergedacht könnte das Auftreten von γ H2AX-ub1-Banden als spezifischer Biomarker für nicht-apoptotische DNA-Doppelstrangbrüche angesehen werden und vice versa könnte die Abwesenheit der γ H2AX-ub1-Banden oder ein im Vergleich zur Kontrollgruppe hoher Relativwert der densitometrischen Werte der Banden (γ H2AX / γ H2AX-ub1) für γ H2AX Formationen sprechen, welche nicht auf die Genotoxizität der ZnO NP zurückzuführen sind, sondern eher auf Prozesse im Verlauf der Apoptose. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das Verhältnis der densitometrischen Werte der γ H2AX- und γ H2AX-ub1 Banden für die jeweiligen Proben errechnet. Es stellte sich hierbei heraus, dass zwischen den behandelten, hinsichtlich Genotoxizität untersuchten Proben und den Kontrollgruppen kein signifikanter Unterschied in diesem Verhältnis existierte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um sub-toxische Behandlungsschemata handelt, welche nicht zur Auslösung von Apoptosen in den untersuchten Zeiträumen beigetragen haben. Passend dazu zeigten auch die korrespondierenden Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung, dass es in den untersuchten Zeiträumen nicht zu einer Apoptose der Zellen kam. Weiterhin ergaben die Auswertungen, dass eventuell ein linearer

Zusammenhang zwischen den densitometrischen Werten der γ H2AX- und γ H2AX-ub1 Banden bei sub-toxischen Behandlungen bestehen könnte. Auch Luczak et al. (2018) vermuten, dass bei durch oxidativen Stress induzierten DSB sowohl die γ H2AX als auch die γ H2AX-ub1 Intensitäten gleichermaßen dosisabhängig ansteigen. [159]

5.4 Genotoxizität von ZnO Nanopartikel

Das Auftreten von DNA-Schäden nach der Exposition gegenüber ZnO NP wurde in einer Vielzahl von *in-vitro*-Untersuchungen beobachtet [95] [118] [117] [91] [120] [122] und es existieren Daten, die zeigen, dass sie auch die DNA im Menschen schädigen könnten. [117] Das Ziel dieser Arbeit war es, das Auftreten, die Dynamik und die Mechanismen von ZnO NP induzierten Doppelstrangbrüchen als eine der schwerwiegendsten Form von DNA-Schäden *in vitro* an der Tumorzelllinie A549 zu untersuchen. Die menschliche alveoläre Adenokarzinom-Zelllinie (A549) wurde für die Versuchsreihen verwendet, insbesondere, weil verglichen mit den anderen möglichen Expositionswegen die Inhalation von ZnO NP die größte Gefahr für den Menschen darstellt. [66] Aber auch im Hinblick auf die potenzielle Anwendung von ZnO NP als Krebstherapeutikum ist es notwendig, Informationen über ihren Zytotoxizitätsmechanismus in Tumorzellen zu erlangen: So könnte in Zellen mit intoleranten Mengen an DNA-Schäden die Apoptose durch die DNA-Schadensantwort vermittelt aktiviert werden. [172] [141] [142] Allerdings ist die Auswahl einer stabilen Zelllinie, die zwar einige, aber nicht alle Merkmale der Zellen aufweist, von der sie abstammt einer der Gründe, weshalb mögliche schädliche Auswirkungen der ZnO NP Exposition nicht gänzlich auf den menschlichen Organismus übertragen werden können. [77]

5.5 Extrazelluläre ZnO NP Auflösung und Zn^{2+} -Ionen vermittelte DSB

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen bereits 3 und 5 Minuten nach Behandlung mit ZnO NP. Auf der einen Seite gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine zelluläre Aufnahme von soliden ZnO NP innerhalb dieses Zeitfensters und dementsprechend ist auch eine direkte Interaktion von ZnO NP mit der DNA 3 oder 5 Minuten nach ZnO NP Behandlung nicht nachgewiesen worden. Auch ohne die Vorbedingung einer Nanopartikelaufnahme könnte die Erhöhung der intrazellulären Zn^{2+} -Ionen Konzentration das genotoxische Potential von ZnO NP [107] [95] und die rasch auftretenden DNA-Schäden erklären: Zn^{2+} -Ionen könnten bereits extrazellulär aus ZnO NP freigesetzt und anschließend internalisiert werden. [66] [90] Diese Vermutung wird auch von Arbeiten gestützt, in denen eine schnelle intrazelluläre Akkumulation von Zn^{2+} -Ionen nach ZnO NP Behandlung beobachtet wurde. Heim et al. (2015) zeigten, dass die Exposition von A549 Zellen gegenüber ZnO NP verschiedener Größe zu einem schnellen intrazellulären Anstieg der Zn^{2+} -Ionen Konzentration innerhalb von 10 Minuten führte. Interessanterweise wurde dabei auch die

Akkumulation von Zn^{2+} -Ionen im Nucleus festgestellt [92] Aber auch wenn eine Korrelation zwischen der Erhöhung der intrazellulären Zn^{2+} -Ionen-Konzentration nach ZnO NP Behandlung und Genotoxizität zu bestehen scheint, bedeutet dies nicht automatisch, dass zwischen der Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen aus ZnO NP und der Induktion von DSB ein kausaler Zusammenhang besteht. An dieser Stelle konnten die Versuchsreihen mit $ZnCl_2$ -Lösung Hinweise geben. Es stellte sich heraus, dass auch nach der Behandlung mit $ZnCl_2$ die Menge an γ H2AX (3 min und 5 min nach Behandlung) signifikant erhöht war. Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine schnelle Zunahme der extrazellulären Zn^{2+} -Ionen Konzentration zu rasch auftretenden DNA-Doppelstrangbrüchen führt. Somit ist denkbar, dass auch die Genotoxizität der ZnO NP über extrazellulär aus ZnO NP freigesetzte Zn^{2+} -Ionen vermittelt wird. Allerdings liefern die erhobenen Daten keine Informationen darüber, ob Zn^{2+} -Ionen direkt mit der DNA interagieren. Weitere Ereignisse, wie beispielsweise die Generierung von ROS, könnten einem Zytotoxizitätspfad der ZnO NP Auflösung und Zn^{2+} -Ionen Freisetzung nachgeschaltet sein, welcher schließlich in der Genotoxizität von ZnO NP resultiert.[77] [107] [91] Die Affinität positiv geladener Metallionen zur DNA erscheint ebenfalls plausibel, weil die Struktur der DNA ein negativ geladenes Phosphatrückgrat enthält und bereits Metall-DNA-Wechselwirkungen bekannt sind, welche die Grundlage zahlreicher Krebsmedikamente und antibakterieller Wirkstoffe sind. Viele dieser Medikamente basieren auf der Interkalation der Metallionen in die DNA-Struktur. [137] Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass Zn^{2+} -Ionen mit DNA-Basenpaaren interagieren können. [138] [173] [139] Ob schlussendlich DNA-Doppelstrangbrüche eine mögliche Folge dieser Interaktionen sind, ist nicht bekannt. Heim et. al beobachteten DNA-Doppelstrangbrüche mittels γ H2AX-Foci-Analyse 15 Minuten nach Beginn der ZnO Behandlung. [92] Zu diesem Zeitpunkt konnte ich keine DNA-Schäden mehr nachweisen. Die zeitliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen ist möglicherweise auf unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften der jeweils verwendeten ZnO NP Chargen zurückzuführen. Insbesondere der Auflösung der Nanopartikel und der daraus resultierenden Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen kommt nach obiger Annahme eine tragende Rolle bezüglich der Genotoxizität zu. Möglicherweise kann eine Abnahme der Geschwindigkeit des Auflösungsprozesses als Ergebnis der Zunahme des Radius der Cluster im Verlauf der Aggregation von Nanopartikeln erklärt werden. [87]. In anderen Worten ist die Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen aus ZnO NP auch abhängig von ihren jeweiligen Agglomerations- / Aggregationstendenzen. [86, 87] Die angestoßene, zelluläre Reparatur von DNA Schäden in Kombination mit der Reduktion der Zn^{2+} -Ionen Freisetzung aufgrund der ZnO NP-Aggregation ist deshalb auch eine mögliche Erklärung, für die in meiner Arbeit beobachtete Abnahme der Menge an γ H2AX nach 15 Minuten.

Heim et al. (2015) vermuten überschießende DNA-Reparatur-Mechanismen als wahrscheinlichste Ursache für den Rückgang der früh nachweisbaren γ H2AX-Foci unter das Niveau der unbehandelten Kontrollgruppe. [136]

5.6 Aufnahme der ZnO NP und intrazelluläre Dissoziation

In meinen Untersuchungen wurden 48 h nach ZnO NP Behandlung (20 μ g/ml) signifikant mehr Doppelstrangbrüche im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet. Während es denkbar ist, dass der erste Peak (3 bzw. 5 min nach ZnO NP Behandlung) in Zusammenhang mit den extrazellulär freigesetzten und anschließend internalisierten Zn^{2+} -Ionen steht, könnte die zweite Welle an DSB (48 h nach ZnO NP Behandlung) mit der zellulären Aufnahme solider ZnO NP und ihrer anschließenden intrazellulären Dissoziation erklärt werden. In einer Vielzahl von Studien mit unterschiedlichen Methoden und Zelllinien wurde beobachtet, dass die Aufnahme von ZnO NP in das Zellinnere grundsätzlich stattfinden kann. [93] [94] [95] Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) konnten Wiesmann et al. (2015) zeigen, dass ZnO@SiO₂ Nanopartikel (ZnO NP mit einer Silica-Beschichtung) innerhalb von 4 h nach ZnO NP Behandlung von verschiedenen Tumorzelllinien, inklusive der in meiner Arbeit benutzten Tumorzelllinie A549, internalisiert wurden. [65] Ergebnisse von Scherzad et al. (2019) verdeutlichen die wichtige Rolle der ZnO NP Internalisierung in der Zyto- aber auch Genotoxizität von ZnO NP. Scherzad et al. (2019) beobachteten, dass bei der Kultivierung von hMSC-Zellen in Plasma die Nanopartikel-Agglomerate in der Plasmagruppe größer waren als bei der Kultivierung der Zellen in DMEM-EM. Es wurden geringere Mengen an intrazellulären ZnO NP in der Plasmagruppe beobachtet. Während bei der Standardkultivierung mit DMEM-EM, Zelltod und DNA-Schäden bereits bei 15 μ g/ml ZnO-NP auftraten, wurden solche Effekte in der Plasmagruppe nicht beobachtet. [97] Dadurch wird deutlich, dass eine Korrelation zwischen der Toxizität von ZnO NP und der Nanopartikel Aufnahme bestehen kann. [97] Nach Rejman et al. können als Aufnahmemechanismus von Nanopartikeln verschiedene Endozytosewege unterschieden werden. Condello et al. (2016) beschrieben neben der Endozytose auch passive Diffusion als möglichen Aufnahme-Mechanismus. [96] [95] Cho et al. (2011) zeigten, dass ZnO NP sich nicht in künstlicher Intrazellular-Flüssigkeit auflösten (Gamble-Lösung, pH 7,4), jedoch in künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (pH 4,5) schnell zu Zn^{2+} -Ionen dissoziierten. [102] Auch ist bekannt, dass der pH-Wert vom frühen Endosom (pH 6,3) zum späten Endosom (pH 5,5) allmählich abnimmt und das Lysosom bei phagozytotischen Zellen noch saurer ist (pH 4,7). [103] Die Instabilität von ZnO NP bei niedrigem pH-Wert erhöht folglich die Wahrscheinlichkeit einer intrazellulären Auflösung während des Aufnahmeprozesses innerhalb der Endosomen, Lysosomen oder in einem anderen sauren Kompartiment [104] [105] [102] [95] Um zu beweisen, dass eine ZnO NP Auflösung in der frühen Phasen des Endozytose-Weges stattfindet, wiesen Mihai et al. (2015)

mit der Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen 1 h nach der ZnO NP Exposition fast die Hälfte der intrazellulären Zn^{2+} -Ionen in den Endosomen nach. Zusätzlich wurde in selbiger Publikation beschrieben, dass 3 h nach ZnO NP Exposition, in Übereinstimmung mit dem natürlichen Fortschreiten, i.e. die Verschmelzung von Endosomen mit dem lysosomalen Kompartiment, der größte Teil der intrazellulären Zn^{2+} -Ionen in den Lysosomen nachgewiesen wurde. [105] Intrazelluläre Zinkkonzentrationen werden durch einen mehrschichtigen Prozess stark reguliert. Eine genaue Kontrolle von freiem Zink in den Zellen gelingt durch das empfindliche Abstimmen zwischen Zinktransport, i.e. Aufnahme, Abgabe und organellarer Sequestrierung und der Bindung von Zink durch Metalloproteine. [174] [35] [36] [37] Die beschriebene Internalisierung von ZnO NP und die resultierende Akkumulation von „freiem Zink“ in Endosomen und Lysosomen umgeht diese homöostatische Regulation.

5.7 Zn^{2+} -Ionen abhängiger Genotoxizitätspfad

Die intrazelluläre Akkumulation von Zn^{2+} -Ionen nach ZnO NP Behandlung wird als grundlegende Ursache für die ZnO NP Toxizität diskutiert. Allerdings ist nicht sicher, ob aus Nanopartikeln stammende Zn^{2+} -Ionen direkt mit der DNA interagieren. Die Ergebnisse einer Vielzahl von Veröffentlichungen deuten bereits darauf hin, dass die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ein wichtiger Bestandteil im ZnO NP abhängigen Zytotoxizitätspfad sein könnte [111] [115] [116] [95] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] und sowohl Shen et al. (2013) als auch Song et al. (2010) stellten fest, dass parallel zu der Erhöhung der intrazellulären Zn^{2+} -Ionen-Konzentrationen auch die Generierung von ROS mit der Zytotoxizität von ZnO NP korreliert. [77] [90] [107] Allerdings sind all diese Ergebnisse nicht in der Lage weder die ROS-Produktion als Ursache der Zytotoxizität noch als Folge der Zn^{2+} -Ionen Freisetzung zu charakterisieren. Dasselbe gilt für Ergebnisse, welche eine Korrelation zwischen ROS und DNA-Schäden nach ZnO NP Behandlung nachwiesen. [95] [117] [118] [119] [120] [121] [122] Sie sind ebenfalls nicht ausreichend um eine Kausalität herzuleiten, obwohl es sicher ist, dass ROS mit DNA-Molekülen reagieren können und so Schäden sowohl an Purin- und Pyrimidinbasen als auch am DNA-Rückgrat verursachen. [135] Andernfalls wäre es möglich, dass die Erzeugung von ROS auch eine Folge der Zytotoxizität von ZnO NP sein könnte und nicht deren Ursache. Leider kann der ROS-Fänger N-Acetylcystein (NAC) nicht verwendet werden, um die Wirkung von ZnO NP auf die DNA zu bewerten, ohne dass ROS vorhanden sind. NAC hat eine hohe Affinität zu Zn^{2+} -Ionen und verzerrt so die Ergebnisse der Behandlungen mit ZnO NP [175] [64] Andererseits ist es dennoch erwähnenswert, dass NAC ZnO NP induzierte DNA-Schäden verhindert. Es lässt sich folgern, dass oxidativer Stress und/oder Zn^{2+} -Ionen als Vermittler von ZnO NP-induzierten DNA-Schäden fungieren müssen. Eventuelle Zusammenhänge zwischen der Erhöhung der intrazellulären Zn^{2+} -Ionen Konzentration nach ZnO NP Behandlung und der Generierung von ROS sind derweil auch

Inhalte verschiedener Publikationen: Reduzierte GSSG-Reduktase-Aktivitäten [124] [125] [126], mitochondriale Dysfunktion [130] [127] [128] und angestoßene Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen [111] nach ZnO NP Behandlung werden als mögliche Verbindungen diskutiert. Demgegenüber beobachteten Heim et al. nach ZnO NP Exposition eine frühe Erzeugung von DNA-DSB sowie eine schnelle intrazelluläre Aufnahme von Zn^{2+} -Ionen im Vergleich zur zeitlich späteren Erfassung von ROS: Verglichen mit der schnellen intrazellulären Zn^{2+} -Ionen Akkumulation und einer starken Zunahme an Doppelstrangbrüchen nach 15 Minuten, wurde ein weitaus langsamerer und lediglich moderater Anstieg des intrazellulären ROS Level beobachtet, was Heim et al. auf einen ROS-unabhängigen Mechanismus schließen ließ. [136] Zusammengefasst muss bei jetzigem Erkenntnisstand immer daran gedacht werden, dass eine komplexe Reihung von Ereignissen bei der Behandlung mit ZnO NP stattfindet und ein mechanistischer Zusammenhang nicht unbedingt eine Kausalität bedeutet. [107]

5.8 Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Auf die nanotoxikologischen Ergebnisse können sich neben der ZnO NP Dosis und dem untersuchten Zelltyp auch die physikalischen Eigenschaften der NP, i.e. Größe, Oberflächenladung, [170] Agglomerationsverhalten [100], Form und die jeweilige Versuchsumgebung, z.B. die Phosphat- und Protein- Konzentration im Zellkulturmedium auswirken. [84] [85] Sowohl die intrazelluläre Aufnahme- als auch die Auflösungs-Kinetik von ZnO NP werden durch die jeweiligen spezifischen chemischen und physikalischen Eigenschaften bestimmt. Die Partikelgröße und Oberflächenladung von ZnO NP sind Faktoren, die ihre Zellaufnahme beeinflussen [88], wobei die Gesamtgröße des Partikels die zelluläre Aufnahme beeinflusst, unabhängig davon, ob dieser Partikel aus einer einzelnen Einheit oder aus einer Ansammlung von Partikeln, also einem Aggregat oder Agglomerat besteht. [98] [97] Somit ist sowohl die Geschwindigkeit des Auflösungsprozesses der ZnO NP [86] [87] als auch die Aufnahme in das Zellinnere abhängig von ihren jeweiligen Agglomerations- bzw. Aggregationstendenzen. Basierend auf Untersuchungen von dos Santos et al. (2011) kann zusätzlich angenommen werden, dass verschiedene Zelltypen Nanopartikel unterschiedlich schnell aufnehmen. [101] Daraus wird deutlich, dass Ergebnisse variieren, wenn unterschiedliche Zelltypen unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Aufnahmekinetiken für dieselbe Art von Nanopartikeln verwendet werden. Studien bezüglich der Genotoxizität von ZnO NP sind somit immer unter dem Gesichtspunkt der verwendeten Nanopartikel mit ihren jeweiligen physikochemischen Eigenschaften und den in den Untersuchungen verwendeten Zelllinien zu beurteilen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ogawa, Y., et al., *Zinc and Skin Disorders*. Nutrients, 2018. **10**(2).
2. Golan, Y., T. Kambe, and Y.G. Assaraf, *The role of the zinc transporter SLC30A2/ZnT2 in transient neonatal zinc deficiency*. Metallomics, 2017. **9**(10): p. 1352-1366.
3. Vallee, B.L. and K.H. Falchuk, *The biochemical basis of zinc physiology*. Physiological Reviews, 1993. **73**(1): p. 79-118.
4. Maret, W., *Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules*. Metallomics, 2015. **7**(2): p. 202-11.
5. Frederickson, C.J., et al., *Importance of Zinc in the Central Nervous System: The Zinc-Containing Neuron*. The Journal of Nutrition, 2000. **130**(5): p. 1471S-1483S.
6. Costello, L.C., et al., *Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2004. **7**(2): p. 111-7.
7. Vallee, B., I. Bertini, and H. Gary, *A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes*. Birkhauser, Boston, 1986: p. 1-15.
8. Raulin, J., *Études chimiques sur la végétation*. 1905: Masson & cie.
9. Andreini, C., et al., *Counting the zinc-proteins encoded in the human genome*. J Proteome Res, 2006. **5**(1): p. 196-201.
10. Krężel, A. and W. Maret, *The biological inorganic chemistry of zinc ions*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016. **611**: p. 3-19.
11. Maret, W., *Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life*. Adv Nutr, 2013. **4**(1): p. 82-91.
12. Bafaro, E., et al., *The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2017. **2**(1): p. 17029.
13. Krężel, A. and W. Maret, *The biological inorganic chemistry of zinc ions*. Arch Biochem Biophys, 2016. **611**: p. 3-19.
14. Maret, W., *Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005. **19**(1): p. 7-12.
15. Vallee, B.L. and A. Galdes, *The metallobiochemistry of zinc enzymes*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1984. **56**: p. 283-430.
16. Loh, S.N., *The missing zinc: p53 misfolding and cancer*. Metallomics, 2010. **2**(7): p. 442-9.
17. Butler, A., *Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms*. Science, 1998. **281**(5374): p. 207-209.
18. Maret, W., *The redox biology of redox-inert zinc ions*. Free Radical Biology and Medicine, 2019. **134**: p. 311-326.
19. Irving, H. and R. Williams, *Order of stability of metal complexes*. Nature, 1948. **162**(4123): p. 746-747.
20. Shriver, D., et al., *Inorganic Chemistry*. 2014: W. H. Freeman.
21. Pace, N.J. and E. Weerapana, *Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs*. Biomolecules, 2014. **4**(2): p. 419-34.
22. Lee, Y.M. and C. Lim, *Physical basis of structural and catalytic Zn-binding sites in proteins*. J Mol Biol, 2008. **379**(3): p. 545-53.
23. Ignatieva, E.V., V.G. Levitsky, and N.A. Kolchanov, *Human Genes Encoding Transcription Factors and Chromatin-Modifying Proteins Have Low Levels of Promoter Polymorphism: A Study of 1000 Genomes Project Data*. International Journal of Genomics, 2015. **2015**: p. 260159.
24. Krishna, S.S., I. Majumdar, and N.V. Grishin, *Structural classification of zinc fingers: survey and summary*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 532-50.

25. Gamsjaeger, R., et al., *Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 63-70.
26. Klug, A., *The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation*. Annual review of biochemistry, 2010. **79**: p. 213-231.
27. Maret, W., 4. *Human Zinc Biochemistry*, in *Zinc in human health*. 2011, IOS press. p. 45-62.
28. Krężel, A., Q. Hao, and W. Maret, *The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **463**(2): p. 188-200.
29. Maret, W., *Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of "Zinc Signals"*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(11): p. 2285.
30. Frederickson, C.J., J.-Y. Koh, and A.I. Bush, *The neurobiology of zinc in health and disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(6): p. 449-462.
31. Haase, H. and W. Maret, *The regulatory and signaling functions of zinc ions in human cellular physiology*, in *Cellular and molecular biology of metals*. 2010, CRC Press. p. 191-222.
32. Krezel, A., Q. Hao, and W. Maret, *The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling*. Arch Biochem Biophys, 2007. **463**(2): p. 188-200.
33. Maret, W. and B.L. Vallee, *Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(7): p. 3478-3482.
34. Maret, W., et al., *Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(5): p. 1936-1940.
35. Murakami, M. and T. Hirano, *Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling*. Cancer Sci, 2008. **99**(8): p. 1515-22.
36. Kloubert, V. and L. Rink, *Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells*. Food Funct, 2015. **6**(10): p. 3195-204.
37. Maret, W., *Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life*. Advances in Nutrition, 2013. **4**(1): p. 82-91.
38. Hardyman, J.E., et al., *Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc*. Metallomics, 2016. **8**(3): p. 337-43.
39. Laity, J.H. and G.K. Andrews, *Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1)*. Arch Biochem Biophys, 2007. **463**(2): p. 201-10.
40. Gumulec, J., et al., *Evaluation of alpha-methylacyl-CoA racemase, metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers*. Neoplasma, 2012. **59**(2): p. 191-201.
41. Chung, M.J., et al., *ZINC-mediated gene expression offers protection against H2O2-induced cytotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **205**(3): p. 225-36.
42. Hao, Q. and W. Maret, *Imbalance between pro-oxidant and pro-antioxidant functions of zinc in disease*. J Alzheimers Dis, 2005. **8**(2): p. 161-70; discussion 209-15.
43. Oteiza, P.I., et al., *Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes*. J Nutr, 1995. **125**(4): p. 823-9.
44. Gonzalez, L., D. Lison, and M. Kirsch-Volders, *Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review*. Nanotoxicology, 2008. **2**(4): p. 252-273.
45. Shi, H., et al., *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*. Part Fibre Toxicol, 2013. **10**: p. 15.

46. Brar, S.K., et al., *Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge--evidence and impacts*. Waste Manag, 2010. **30**(3): p. 504-20.
47. Oberdörster, G., E. Oberdörster, and J. Oberdörster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
48. Pettibone, J.M., et al., *Adsorption of organic acids on TiO₂ nanoparticles: effects of pH, nanoparticle size, and nanoparticle aggregation*. Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6659-6667.
49. Yameen, B., et al., *Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting*. Journal of controlled release, 2014. **190**: p. 485-499.
50. Rasmussen, J.W., et al., *Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2010. **7**(9): p. 1063-1077.
51. Carofiglio, M., et al., *Doped zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and potential use in nanomedicine*. Applied Sciences, 2020. **10**(15): p. 5194.
52. Sun, H., et al., *Gold nanoparticle-induced cell death and potential applications in nanomedicine*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(3): p. 754.
53. Ghadi, A., et al., *Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles: Potential applications in nanomedicine and biomedical engineering*. Caspian journal of internal medicine, 2014. **5**(3): p. 156.
54. Amin, R., R.A. Hameed, and K. El-Khatib, *Microwave heated synthesis of carbon supported Pd, Ni and Pd-Ni nanoparticles for methanol oxidation in KOH solution*. Applied Catalysis B: Environmental, 2014. **148**: p. 557-567.
55. Mohan, A.C. and B. Renjanadevi, *Preparation of Zinc Oxide Nanoparticles and its Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Diffraction(XRD)*. Procedia Technology, 2016. **24**: p. 761-766.
56. Madhumitha, G., G. Elango, and S.M. Roopan, *Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles: overview on synthesis and its applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. **100**(2): p. 571-81.
57. Wiesmann, N., W. Tremel, and J. Brieger, *Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(23): p. 4973-4989.
58. Kołodziejczak-Radzimska, A. and T. Jesionowski, *Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review*. Materials (Basel), 2014. **7**(4): p. 2833-2881.
59. Jiang, J., J. Pi, and J. Cai, *The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*. Bioinorg Chem Appl, 2018. **2018**: p. 1062562.
60. Nohynek, G.J., et al., *Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety*. Crit Rev Toxicol, 2007. **37**(3): p. 251-77.
61. Schilling, K., et al., *Human safety review of "nano" titanium dioxide and zinc oxide*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(4): p. 495-509.
62. Rajput, V., et al., *Accumulation of nanoparticles in the soil-plant systems and their effects on human health*. Annals of Agricultural Sciences, 2020. **65**(2): p. 137-143.
63. Samanta, P., *Review on Wet Chemical Growth and Anti-bacterial Activity of Zinc Oxide Nanostructures*. Journal of Tissue Science & Engineering, 2017. **08**.
64. Wiesmann, N., et al., *Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2019. **51**: p. 226-234.
65. Wiesmann, N., *Analysis of the toxicity mechanism of zinc oxide nanoparticles aiming at their application as innovative anti-tumor agent*. 2019, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

66. Vandebriel, R.J. and W.H. De Jong, *A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles*. Nanotechnology, science and applications, 2012. **5**: p. 61-71.
67. Cross, S.E., et al., *Human Skin Penetration of Sunscreen Nanoparticles: In-vitro Assessment of a Novel Micronized Zinc Oxide Formulation*. Skin Pharmacology and Physiology, 2007. **20**(3): p. 148-154.
68. Bacchetta, R., et al., *Evidence and uptake routes for Zinc oxide nanoparticles through the gastrointestinal barrier in Xenopus laevis*. Nanotoxicology, 2014. **8**(7): p. 728-44.
69. Oberdorster, G., et al., *Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles?* Inhal Toxicol, 1995. **7**(1): p. 111-24.
70. Nemmar, A., et al., *Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(9): p. 1665-8.
71. Kim, J.S., et al., *Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice*. Toxicol Sci, 2006. **89**(1): p. 338-47.
72. Oberdörster, G., et al., *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. Inhal Toxicol, 2004. **16**(6-7): p. 437-45.
73. DeLong, R.K., et al., *Zn-based physiometacomposite nanoparticles: distribution, tolerance, imaging, and antiviral and anticancer activity*. Nanomedicine, 2021. **16**(21): p. 1857-1872.
74. Tsou, T.C., et al., *Zinc oxide particles induce inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- κ B signaling*. J Hazard Mater, 2010. **183**(1-3): p. 182-8.
75. Chuang, K.J., et al., *Effects of zinc oxide nanoparticles on human coronary artery endothelial cells*. Food Chem Toxicol, 2016. **93**: p. 138-44.
76. Jiang, J., J. Pi, and J. Cai, *The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2018. **2018**: p. 1062562.
77. Saptarshi, S.R., A. Duschl, and A.L. Lopata, *Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview*. Nanomedicine (Lond), 2015. **10**(13): p. 2075-92.
78. Santimano, M., et al., *Zinc Oxide Nanoparticles Cause Morphological Changes in Human A549 Cell Line Through Alteration in the Expression Pattern of Small GTPases at mRNA Level*. Journal of Bionanoscience, 2013. **7**: p. 300-307.
79. Martin, A. and A. Sarkar, *Epithelial to Mesenchymal transition, eIF2 α phosphorylation and Hsp70 expression enable greater tolerance in A549 cells to TiO₂ over ZnO nanoparticles*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 436.
80. Cho, W.-S., et al., *Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes*. Particle and Fibre Toxicology, 2011. **8**(1): p. 27.
81. Singh, S., *Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity*. Toxicology mechanisms and methods, 2019. **29**(4): p. 300-311.
82. Ajdary, M., et al., *Health concerns of various nanoparticles: a review of their in vitro and in vivo toxicity*. Nanomaterials, 2018. **8**(9): p. 634.
83. Wiesmann, N., *Analysis of the toxicity mechanism of zinc oxide nanoparticles aiming at their application as innovative anti-tumor agent*. 2019.
84. Everett, W.N., et al., *Phosphate-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and agglomerates*. Toxicology Letters, 2014. **225**(1): p. 177-184.
85. Hsiao, I.L. and Y.-J. Huang, *Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles*. Journal of Nanoparticle Research, 2013. **15**(9): p. 1829.

86. Bian, S.-W., et al., *Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid*. *Langmuir*, 2011. **27**(10): p. 6059-6068.
87. David, C.A., et al., *Dissolution Kinetics and Solubility of ZnO Nanoparticles Followed by AGNES*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012. **116**(21): p. 11758-11767.
88. Yu, J., et al., *Effects of physicochemical properties of zinc oxide nanoparticles on cellular uptake*. *Journal of Physics: Conference Series*, 2011. **304**: p. 012007.
89. Piccinno, F., et al., *Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012. **14**(9): p. 1109.
90. Song, W., et al., *Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles*. *Toxicol Lett*, 2010. **199**(3): p. 389-97.
91. Hackenberg, S., et al., *Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(3): p. 657-63.
92. Heim, J., et al., *Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles*. *Nanoscale*, 2015. **7**(19): p. 8931-8938.
93. Gilbert, B., et al., *The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells*. *ACS Nano*, 2012. **6**(6): p. 4921-30.
94. Hackenberg, S., et al., *Repetitive Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles Induces DNA Damage in Human Nasal Mucosa Mini Organ Cultures*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2011. **52**: p. 582-9.
95. Condello, M., et al., *ZnO nanoparticle tracking from uptake to genotoxic damage in human colon carcinoma cells*. *Toxicol In Vitro*, 2016. **35**: p. 169-79.
96. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
97. Scherzad, A., et al., *Cultivation of hMSCs in Human Plasma Prevents the Cytotoxic and Genotoxic Potential of ZnO-NP In Vitro*. *Applied Sciences*, 2019. **9**(23): p. 4994.
98. Rothen-Rutishauser, B.M., et al., *Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques*. *Environmental Science & Technology*, 2006. **40**(14): p. 4353-4359.
99. Mu, Q., et al., *Systematic investigation of the physicochemical factors that contribute to the toxicity of ZnO nanoparticles*. *Chem Res Toxicol*, 2014. **27**(4): p. 558-67.
100. Abdelmonem, A.M., et al., *Charge and agglomeration dependent in vitro uptake and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015. **153**: p. 334-338.
101. dos Santos, T., et al., *Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines*. *Small*, 2011. **7**(23): p. 3341-9.
102. Cho, W.S., et al., *Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes*. *Part Fibre Toxicol*, 2011. **8**: p. 27.
103. Casey, J.R., S. Grinstein, and J. Orłowski, *Sensors and regulators of intracellular pH*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(1): p. 50-61.
104. Buerki-Thurnherr, T., et al., *In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity*. *Nanotoxicology*, 2013. **7**(4): p. 402-16.
105. Mihai, C., et al., *Intracellular accumulation dynamics and fate of zinc ions in alveolar epithelial cells exposed to airborne ZnO nanoparticles at the air-liquid interface*. *Nanotoxicology*, 2015. **9**(1): p. 9-22.
106. Dineley, K.E., et al., *Astrocytes Are More Resistant Than Neurons to the Cytotoxic Effects of Increased [Zn²⁺]*. *Neurobiology of Disease*, 2000. **7**(4): p. 310-320.

107. Shen, C., et al., *Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells*. Toxicological Sciences, 2013. **136**(1): p. 120-130.
108. Circu, M.L. and T.Y. Aw, *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(6): p. 749-62.
109. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants: a personal view*. Nutr Rev, 1994. **52**(8 Pt 1): p. 253-65.
110. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Current biology : CB, 2014. **24**(10): p. R453-R462.
111. Fu, P.P., et al., *Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species*. J Food Drug Anal, 2014. **22**(1): p. 64-75.
112. Kirkinezos, I.G. and C.T. Moraes, *Reactive oxygen species and mitochondrial diseases*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(6): p. 449-57.
113. Crapo, J.D., *Superoxide dismutase and tolerance to pulmonary oxygen toxicity*. Chest, 1975. **67**(2 Suppl): p. 39s-40s.
114. Slauch, J.M., *How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question*. Molecular microbiology, 2011. **80**(3): p. 580-583.
115. Kermanizadeh, A., et al., *An in vitro liver model--assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials*. Part Fibre Toxicol, 2012. **9**: p. 28.
116. Kumar, A., et al., *Engineered ZnO and TiO(2) nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of Escherichia coli*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(10): p. 1872-81.
117. Scherzad, A., et al., *Molecular Mechanisms of Zinc Oxide Nanoparticle-Induced Genotoxicity Short Running Title: Genotoxicity of ZnO NPs*. Materials (Basel), 2017. **10**(12).
118. Sharma, V., D. Anderson, and A. Dhawan, *Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2)*. J Biomed Nanotechnol, 2011. **7**(1): p. 98-9.
119. Patel, P., et al., *Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells*. Mutagenesis, 2016. **31**(4): p. 481-90.
120. Toduka, Y., T. Toyooka, and Y. Ibuki, *Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(14): p. 7629-36.
121. Golbamaki, N., et al., *Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms*. Nanoscale, 2015. **7**(6): p. 2154-98.
122. Alarifi, S., et al., *Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles*. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 983-993.
123. Pinho, A.R., et al., *In Vitro Cytotoxicity Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Spermatogonia Cells*. Cells, 2020. **9**.
124. Walther, U.I., et al., *Zinc toxicity in various lung cell lines is mediated by glutathione and GSSG reductase activity*. Biological Trace Element Research, 2000. **78**(1): p. 163-177.
125. Walther, U.I., et al., *Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines*. Arch Toxicol, 2003. **77**(3): p. 131-7.
126. Bishop, G.M., R. Dringen, and S.R. Robinson, *Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(8): p. 1222-30.

127. Choudhury, S.R., et al., *From the Cover: Zinc oxide Nanoparticles-Induced Reactive Oxygen Species Promotes Multimodal Cyto- and Epigenetic Toxicity*. Toxicological Sciences, 2017. **156**(1): p. 261-274.
128. De Berardis, B., et al., *Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **246**(3): p. 116-27.
129. Sensi, S.L., et al., *Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn²⁺ pools*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6157-62.
130. Sensi, S.L., et al., *Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2414-9.
131. Brown, A.M., et al., *Zn²⁺ inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13441-7.
132. Frazzini, V., et al., *Oxidative stress and brain aging: is zinc the link?* Biogerontology, 2006. **7**(5-6): p. 307-14.
133. Costello, L.C. and R.B. Franklin, *A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer*. Arch Biochem Biophys, 2016. **611**: p. 100-112.
134. Xia, T., et al., *Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties*. ACS Nano, 2008. **2**(10): p. 2121-2134.
135. Martinez, G.R., et al., *Oxidative and alkylating damage in DNA*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2003. **544**(2): p. 115-127.
136. Heim, J., et al., *Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles*. Nanoscale, 2015. **7**(19): p. 8931-8.
137. Morris, D.L., *DNA-bound metal ions: recent developments*. Biomolecular Concepts, 2014. **5**(5): p. 397-407.
138. Langlais, M., H.A. Tajmir-Riahi, and R. Savoie, *Raman spectroscopic study of the effects of Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ ions on calf thymus DNA: binding sites and conformational changes*. Biopolymers, 1990. **30**(7-8): p. 743-752.
139. Nejdil, L., et al., *DNA interaction with zinc(II) ions*. International journal of biological macromolecules, 2014. **64**: p. 281-287.
140. López-Contreras, A.J., et al., *An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(3): p. 455-461.
141. Sharma, V., D. Anderson, and A. Dhawan, *Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2)*. Apoptosis, 2012. **17**(8): p. 852-870.
142. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
143. Pan, M.-R., et al., *Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(32): p. 28599-28607.
144. Pastink, A. and P.M. LOHMAN, *Repair and consequences of double-strand breaks in DNA*. Mutation research, 1999. **428**(1-2): p. 141-156.
145. Mah, L.J., A. El-Osta, and T.C. Karagiannis, *γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair*. Leukemia, 2010. **24**(4): p. 679-686.
146. Stucki, M., et al., *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-1226.

147. Blackford, A.N. and S.P. Jackson, *ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response*. Molecular Cell, 2017. **66**(6): p. 801-817.
148. Scully, R. and A. Xie, *Double strand break repair functions of histone H2AX*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2013. **750**(1-2): p. 5-14.
149. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. Journal of biological chemistry, 1998. **273**(10): p. 5858-5868.
150. Lee, J.-H. and T.T. Paull, *ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. Science, 2005. **308**(5721): p. 551-554.
151. Kurz, E.U. and S.P. Lees-Miller, *DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 889-900.
152. Zhou, B.-B.S. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-439.
153. Kinner, A., et al., *γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. Nucleic acids research, 2008. **36**(17): p. 5678-5694.
154. Chapman, J.R. and S.P. Jackson, *Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage*. EMBO reports, 2008. **9**(8): p. 795-801.
155. Goldberg, M., et al., *MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint*. Nature, 2003. **421**(6926): p. 952-956.
156. Fragkos, M., J. Jurvansuu, and P. Beard, *H2AX Is Required for Cell Cycle Arrest via the p53/p21 Pathway*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(10): p. 2828-2840.
157. Hager, K.M. and W. Gu, *Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression*. Carcinogenesis, 2013. **35**(4): p. 740-746.
158. Imreh, G., et al., *Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger γ H2AX-ATM-p53-mediated apoptosis*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 17): p. 2951-63.
159. Luczak, M.W. and A. Zhitkovich, *Monoubiquitinated γ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks*. Toxicol Appl Pharmacol, 2018. **355**: p. 238-246.
160. Rogakou, E.P., et al., *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9390-5.
161. Luczak, M.W. and A. Zhitkovich, *Abstract 1754: Monoubiquitinated γ -H2AX - a more specific biomarker of DNA double-strand breaks*. Cancer Research, 2019. **79**(13 Supplement): p. 1754-1754.
162. Mattioli, F., et al., *RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1182-1195.
163. Luczak, M.W. and A. Zhitkovich, *Monoubiquitinated γ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks*. Toxicology and applied pharmacology, 2018. **355**: p. 238-246.
164. Klünker, D.M., *Chemical Design and Application of Organized Multicomponent Hybrid Nanostructures*. 2018.
165. Martins-Gomes, C. and A. Silva, *Western Blot Methodologies for Analysis of In Vitro Protein Expression Induced by Teratogenic Agents*. 2018. p. 191-203.
166. Jahan-Tigh, R.R., et al., *Flow cytometry*. The Journal of investigative dermatology, 2012. **132**(10): p. e1.
167. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. British journal of cancer, 1972. **26**(4): p. 239-257.

168. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. The New England journal of medicine, 2009. **361**(16): p. 1570-1583.
169. Saptarshi, S.R., et al., *Investigating the immunomodulatory nature of zinc oxide nanoparticles at sub-cytotoxic levels in vitro and after intranasal instillation in vivo*. Journal of Nanobiotechnology, 2015. **13**(1): p. 6.
170. Baek, M., et al., *Factors influencing the cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles: particle size and surface charge*. Journal of Physics: Conference Series, 2011. **304**: p. 012044.
171. Luczak, M. and A. Zhitkovich, *Monoubiquitinated γ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2018. **355**.
172. Liu, B., Y. Chen, and D.K.S. Clair, *ROS and p53: a versatile partnership*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. **44**(8): p. 1529-1535.
173. Lee, J.S., L.J.P. Latimer, and R.S. Reid, *A cooperative conformational change in duplex DNA induced by Zn²⁺ and other divalent metal ions*. Biochemistry and Cell Biology, 1993. **71**(3-4): p. 162-168.
174. Eide, D.J., *Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2006. **1763**(7): p. 711-722.
175. Pace, N.J. and E. Weerapana, *Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs*. Biomolecules, 2014. **4**(2): p. 419-434.

7 Anhang

7.1 Western Blot und Immundetektion von γ H2AX

A549 Zellen wurden für 3, 5, 15 und 60 Minuten mit ZnO NP und ZnCl₂-Lösung behandelt. Die korrespondierenden β -Aktin-Banden dienten als Ladekontrolle. Für jeden Zeitpunkt wurde eine separate Kontrolle erstellt welche alle zusammen gemittelt wurden. Tabelle 9 zeigt für jedes Experiment sowohl die einzelnen densitometrischen Werte, als auch die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten (Unbehandelt \equiv 100%) densitometrischen Analysen von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten ($N \geq 3$). Zur statistischen Analyse wurde der one-way ANOVA durchgeführt, um jede Behandlungsgruppe mit den unbehandelten Kontrollzellen zu vergleichen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Korrektur mit dem Dunnett-Test für Multiple Mittelwertvergleiche.

A549 Zellen wurden für 1, 4, 8, 12, 24 und 48 h mit ZnO NP behandelt. Die korrespondierenden β -Aktin-Banden dienten als Ladekontrolle. Für jeden Zeitpunkt wurde eine separate Kontrolle erstellt welche alle zusammen gemittelt wurden. Tabelle 11 zeigt für jedes Experiment sowohl die einzelnen densitometrischen Werte, als auch die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten (Unbehandelt \equiv 100%) densitometrischen Analysen von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten ($N \geq 3$). Zur statistischen Analyse wurde der one-way ANOVA durchgeführt, um jede Behandlungsgruppe mit den unbehandelten Kontrollzellen zu vergleichen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Korrektur mit dem Dunnett-Test für Multiple Mittelwertvergleiche.

Tabelle 9: Ergebnisse der Immundetektion von γ H2AX: Kurze Behandlungszeiträume

| | A549 Zellen | | | | |
|---------------------------|--|---------|---------|--------|--------|
| Protein | γ H2AX bezogen auf β -Aktin und in % der gemittelten UB | | | | |
| Behandlung | 100 μ g/ml ZnO NP | | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min | UB |
| N=1 | 138,866 | 99,661 | 88,188 | 53,350 | 100 |
| N=2 | 144,551 | 151,924 | 98,290 | 75,341 | 100 |
| N=3 | 128,384 | 130,995 | 100,299 | 87,283 | 100 |
| N=4 | 132,676 | 133,747 | 86,875 | 74,403 | 100 |
| N=5 | 104,389 | 133,747 | 105,680 | 80,415 | 100 |
| Mittelwert | 129,773 | 131,829 | 95,866 | 74,158 | 100 |
| Standardabweichung | 15,458 | 19,722 | 8,088 | 12,707 | 10,770 |
| Behandlung | 100 μ g/ml ZnCl ₂ | | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min | UB |
| N=1 | | | | | |
| N=2 | | | | | |
| N=3 | 117,755 | 104,482 | 94,603 | 55,640 | 100 |
| N=4 | 138,179 | 124,153 | 112,106 | 68,523 | 100 |
| N=5 | 129,674 | 125,052 | 118,063 | 80,395 | 100 |
| Mittelwert | 128,536 | 117,896 | 108,257 | 68,186 | 100,00 |
| Standardabweichung | 10,259 | 11,625 | 12,194 | 12,381 | 10,770 |

Tabelle 10: Statistische Analyse: Kurze Behandlungszeiträume

| | | | | |
|---|-------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| Table Analyzed | | | | |
| F | 15,14 | | | |
| P value | < 0,0001 | | | |
| P value summary | **** | | | |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes | | | |
| R square | 0,7204 | | | |
| ANOVA table | SS | DF | MS | |
| Treatment (between columns) | 18160 | 8 | 2270 | |
| Residual (within columns) | 7046 | 47 | 149,9 | |
| Total | 25206 | 55 | | |
| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
| UB vs. 3 min ZnO-NP | -29,77 | -46,36 to -13,19 | Yes | **** |
| UB vs. 5 min ZnO-NP | -30,02 | -46,60 to -13,43 | Yes | **** |
| UB vs. 15 min ZnO-NP | 4,133 | -12,45 to 20,72 | No | ns |
| UB vs. 60 min ZnO-NP | 25,84 | 9,255 to 42,43 | Yes | *** |
| UB vs. 3 min ZnCl₂ | -28,54 | -49,20 to -7,875 | Yes | ** |
| UB vs. 5 min ZnCl₂ | -17,90 | -38,56 to 2,765 | No | ns |
| UB vs. 15 min ZnCl₂ | -8,258 | -28,92 to 12,40 | No | ns |
| UB vs. 60 min ZnCl₂ | 31,81 | 11,15 to 52,47 | Yes | *** |

Tabelle 11: Ergebnisse der Immundetektion von γ H2AX: Lange Behandlungszeiträume

| | A549 Zellen | | | | | | |
|---------------------------|--|----------|----------|----------|----------|-----------|-----|
| Protein | γ H2AX bezogen auf β -Aktin und in % der gemittelten UB | | | | | | |
| Behandlung | 20 μ g/ml ZnO NP | | | | | | |
| Zeitraum | 1 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24 h | 48 h | UB |
| N=1 | 99,193 | 95,053 | 60,461 | 60,125 | 86,343 | 174,401 | 100 |
| N=2 | 30,349 | 52,495 | 74,742 | 76,253 | 103,936 | 133,330 | 100 |
| N=3 | 79,879 | 87,363 | 87,962 | 88,054 | 92,970 | 181,750 | 100 |
| N=4 | 50,07904 | 78,08425 | 74,85709 | 77,28131 | 93,91588 | 120,20490 | 100 |
| Mittelwert | 64,875 | 78,249 | 74,506 | 75,429 | 94,291 | 152,424 | 100 |
| Standardabweichung | 30,6 | 18,5 | 11,2 | 11,5 | 7,3 | 30,3 | 18 |

Tabelle 12: Statistische Analyse: *Lange Behandlungszeiträume*

| | | | | |
|---|-------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| Table Analyzed | | | | |
| F | 11,52 | | | |
| P value | < 0,0001 | | | |
| P value summary | **** | | | |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes | | | |
| R square | 0,6277 | | | |
| ANOVA table | SS | DF | MS | |
| Treatment (between columns) | 21737 | 6 | 3623 | |
| Residual (within columns) | 12893 | 41 | 314,5 | |
| Total | 34630 | 47 | | |
| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
| Unbehandelt vs. NP(1) | 35,04 | 9,399 to 60,68 | Yes | ** |
| Unbehandelt vs. NP(4) | 21,67 | -3,975 to 47,31 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(8) | 25,41 | -0,2313 to 51,05 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(12) | 24,49 | -1,154 to 50,13 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(24) | 5,625 | -20,02 to 31,27 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(48) | -52,51 | -78,15 to -26,87 | Yes | **** |

Tabelle 13: Verhältnisse densitometrischen Werte (γ H2AX / γ H2AX-ub1)

| A549 Zellen | | | | |
|---|--|----------|----------|----------|
| Behandlung | 100 μg/ml ZnO-NP | | | |
| | Volume (Int): γH2AX-Bande | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min |
| N=1 | 1764004 | 1943040 | 1516922 | 1190288 |
| N=2 | 1262074 | 1368422 | 1512346 | 1205094 |
| N=3 | 2148640 | 2252562 | 1859104 | 1461044 |
| | Volume (Int): γH2AX-ub1-Bande | | | |
| N=1 | 435850 | 456182 | 382674 | 176479 |
| N=2 | 315920 | 290510 | 316668 | 212476 |
| N=3 | 501900 | 552175 | 492025 | 114700 |
| Behandlung | 100 μg/ml ZnCl₂ | | | |
| | Volume (Int): γH2AX-Bande | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min |
| N=1 | 2084654 | 2258014 | 2122978 | 1204236 |
| N=2 | 1416228 | 1629078 | 1394184 | 783750 |
| N=3 | 2686684 | 2901782 | 2516566 | 1699802 |
| | Volume (Int): γH2AX-ub1-Bande | | | |
| N=1 | 435367 | 485714 | 496340 | 0 |
| N=2 | 347996 | 368654 | 159544 | 0 |
| N=3 | 601350 | 625250 | 475700 | 0 |
| Behandlung | Unbehandelt | | | |
| | Volume (Int): γH2AX-Bande | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min |
| N=1 | 1665840 | 1826924 | 1730542 | 1554212 |
| N=2 | 1799908 | 1603778 | 1641882 | 1556808 |
| N=3 | 2136238 | 1780168 | 2297776 | 1583764 |
| | Volume (Int): γH2AX-ub1-Bande | | | |
| N=1 | 499882 | 497904 | 558210 | 427800 |
| N=2 | 375650 | 279862 | 274956 | 268600 |
| N=3 | 562750 | 459375 | 488350 | 366700 |
| Verhältnisse der densitometrischen Werte (γH2AX / γH2AX-ub1) | | | | |
| Behandlung | 100 μg/ml ZnO-NP | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min |
| Mittelwert | 4,107734 | 4,349733 | 4,172763 | 4,138772 |

Anhang

| | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|
| Standardabweichung | | | | |
| Behandlung | 100 µg/ml ZnCl₂ | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min |
| Mittelwert | 4,441897 | 4,569613 | 6,102019 | 0 |
| Standardabweichung | | | | |
| Behandlung | Unbehandelt | | | |
| | | | | |
| Zeitraum | 3 min | 5 min | 15 min | 60 min |
| Mittelwert | 3,973328 | 4,425009 | 4,59226 | 4,582669 |
| Standardabweichung | | | | |

Tabelle 14: Statistische Analyse der densitometrischen Werte: Kurze Zeiträume

| | | | | |
|---|-------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| Table Analyzed | | | | |
| F | 1,712 (8, 27) | | | |
| P value | 0,1411 | | | |
| P value summary | ns | | | |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No | | | |
| R square | 0,5672 | | | |
| ANOVA table | SS | DF | MS | |
| Treatment (between columns) | 64,69 | 8 | 8,086 | |
| Residual (within columns) | 49,36 | 27 | 1,828 | |
| Total | 114,0 | 35 | | |
| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
| Unbehandelt vs. NP(3) | 0,2856 | -2,190 to 2,761 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(5) | 0,04358 | -2,432 to 2,519 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(15) | 0,2206 | -2,255 to 2,696 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(60) | 0,2545 | -2,221 to 2,730 | No | ns |
| Unbehandelt vs. ZnCL2(3) | -0,04858 | -2,524 to 2,427 | No | ns |
| Unbehandelt vs. ZnCL2(5) | -0,1763 | -2,651 to 2,299 | No | ns |
| Unbehandelt vs. ZnCL2(15) | -1,709 | -4,184 to 0,7665 | No | ns |
| Unbehandelt vs. ZnCL2(60) | 4,393 | 1,918 to 6,868 | Yes | *** |

Tabelle 15: Verhältnisse densitometrischen Werte: *Lange Zeiträume*

| A549 Zellen | | | | | | |
|-------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Behandlung | 20 µg/ml ZnO-NP | | | | | |
| | Volume (Int): γ H2AX-Bande | | | | | |
| Zeitraum | 1 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24h | 48h |
| N=1 | 733125 | 763150 | 577000 | 596125 | 921750 | 1716725 |
| N=2 | 533236 | 787930 | 777480 | 797170 | 1097778 | 1794122 |
| N=3 | 628820 | 924554 | 1321327 | 1451438 | 1865070 | 3094466 |
| N=4 | 1037097 | 1152279 | 1372594 | 1397066 | 1916222 | 4520070 |
| Behandlung | Unbehandelt | | | | | |
| | Volume (Int): γ H2AX-Bande | | | | | |
| N=1 | 774375 | 1204625 | 990625 | 1482950 | 919125 | 1161225 |
| N=2 | 1117930 | 865876 | 1223640 | 1099032 | 1393480 | 1228678 |
| N=3 | 1266794 | 1744642 | 2435861 | 2106245 | 1868129 | 2151075 |
| N=4 | 1289518 | 1332240 | 1954700 | 2208506 | 1446148 | 1416312 |
| Behandlung | 20 µg/ml ZnO-NP | | | | | |
| | Volume (Int): γ H2AX-ub1-Bande | | | | | |
| Zeitraum | 1 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24h | 48h |
| N=1 | 137588 | 109714 | 168168 | 267564 | 171798 | 332398 |
| N=2 | 190701 | 164409 | 304206 | 210483 | 185892 | 375732 |
| N=3 | 194660 | 95220 | 326720 | 322040 | 368600 | 590280 |
| N=4 | 262080 | 239505 | 387177 | 274953 | 381696 | 735924 |
| Behandlung | Unbehandelt | | | | | |

| | Volume (Int): γ H2AX-ub1-Bande | | | | | |
|---------------------------|---|------------|------------|-------------|------------|------------|
| N=1 | 258786 | 316712 | 240218 | 336314 | 300410 | 249414 |
| N=2 | 260946 | 213990 | 335706 | 373632 | 357441 | 202503 |
| N=3 | 384580 | 629740 | 500520 | 551840 | 378720 | 412060 |
| N=4 | 310359 | 296310 | 344526 | 317772 | 242529 | 192129 |
| | Verhältnisse der densitometrischen Werte (γH2AX / γH2AX-ub1) | | | | | |
| Behandlung | 20 μ g/ml ZnO-NP | | | | | |
| Zeitraum | 1 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24h | 48h |
| Mittelwert | 3,828031 | 6,567265 | 3,394053 | 3,900857 | 5,337733 | 5,331019 |
| Standardabweichung | | | | | | |
| Behandlung | Unbehandelt | | | | | |
| Zeitraum | 1 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24h | 48h |
| Mittelwert | 3,681343 | 3,779098 | 4,577272 | 4,52941 | 4,463397 | 5,828809 |
| Standardabweichung | | | | | | |

Tabelle 16: Statistische Analyse der densitometrischen Werte: *Lange Zeiträume*

| | | | | |
|---|-------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| Table Analyzed | | | | |
| F | 3,339 | | | |
| P value | 0,0090 | | | |
| P value summary | ** | | | |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes | | | |
| R square | 0,3283 | | | |
| ANOVA table | SS | DF | MS | |
| Treatment (between columns) | 30,32 | 6 | 5,053 | |
| Residual (within columns) | 62,04 | 41 | 1,513 | |
| Total | 92,35 | 47 | | |
| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
| Unbehandelt vs. NP(1) | 0,6485 | -1,130 to 2,427 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(4) | -2,091 | -3,869 to -0,3120 | No | * |
| Unbehandelt vs. NP(8) | 1,083 | -0,6962 to 2,861 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP12) | 0,5757 | -1,203 to 2,354 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(24) | -0,8612 | -2,640 to 0,9175 | No | ns |
| Unbehandelt vs. NP(48) | -0,8545 | -2,633 to 0,9243 | No | ns |

