

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

Analyse der Zink-Konzentration im Tumor nach intravaskulärer Applikation von
Zinkoxid-Nanopartikeln in Kombination mit iRGD-Peptid im CAM Assay

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

Vorgelegt von

Juliette Aimee Brassard
aus Bad Kreuznach

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. et med. habil. Jürgen Brieger

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peer Kämmerer

Tag der Promotion: 30. April 2026

Nachnutzungslizenz: CC BY-ND 4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Forschungsfrage.....	2
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Einführung in die Tumorthherapie.....	3
2.1.1 Zielgerichtete Tumorthherapie.....	4
2.2 Freies Zink.....	5
2.2.1 Zink-Homöostase.....	6
2.3 Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP).....	6
2.3.1 Nanomedizin.....	6
2.3.2 Anwendungsbereich und Synthese der ZnO-NP.....	7
2.3.3 Dissoziation, Wechselwirkungen und Internalisierung der ZnO-NP.....	8
2.3.4 Die Proteinkorona.....	10
2.3.5 Toxizität von ZnO-NP.....	11
2.3.6 ZnO-NP in der Tumorthherapie.....	15
2.4 iRGD-Peptid.....	16
2.4.1 iRGD als Tumor-homing-Peptid.....	16
2.4.2 Struktur des iRGD-Peptids.....	17
2.4.3 Bindung an tumorspezifische Rezeptoren.....	17
2.4.4 Verstärkung der Tumorpenetration durch Aktivierung eines rezeptorvermittelten Endozytose-Mechanismus.....	18
2.4.5 Koadministration von iRGD zur Effizienzsteigerung von Anti-Tumor-Mitteln..	19
2.4.6 iRGD im Anwendungsbereich der onkologischen Bildgebung.....	19
2.4.7 Inhibierender Effekt von iRGD auf spontane Metastasierung.....	20
2.4.8 Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Anwendungssicherheit von iRGD.	20
2.5 Chorion-Allantois-Membran-Assay (CAM-Assay).....	21

2.5.1	Der CAM-Assay als Alternative für Tierversuche	21
2.5.2	Aufbau und Funktionen der CAM	22
2.5.3	Tumor-Transplantate im CAM-Assay.....	23
3	Material.....	23
3.1	Zelllinie	23
3.2	Hühnereier	23
3.3	Zinkoxid-Nanopartikel	24
3.4	iRGD-Peptid.....	24
3.5	Chemikalien	24
3.6	Laborgeräte	26
3.7	Verbrauchsmaterialien	28
3.8	Zellkulturmedium, Puffer und Zusätze.....	30
3.8.1	Zellkulturmedium.....	30
3.8.2	Puffer für die Zn-Messung	30
3.8.3	Puffer für die SDS-Page.....	30
3.8.4	Puffer für den Western Blot	31
3.9	Software.....	32
4	Methoden	32
4.1	Zellkultur	32
4.1.1	Auftauen der Zellen	32
4.1.2	Makro- und mikroskopische Betrachtung.....	33
4.1.3	Zellpassage.....	33
4.1.4	Erstellung der 3D-Kulturen	33
4.1.5	Kryokonservierung	34
4.2	CAM-Assay.....	35
4.2.1	Bestückung des Brutkastens	35
4.2.2	Öffnen der Eier.....	36
4.2.3	Vitalitäts- und Kontaminationskontrolle.....	37
4.2.4	Besiedlung der CAM	37
4.2.5	Kontrolle des Tumoreinwuchs	38

4.2.6	Intravaskuläre Applikation von ZnO-NP und iRGD	38
4.2.7	Tumorentnahme	40
4.2.8	Zeit- und Dosisreihe	41
4.3	Messung der Zinkkonzentration	42
4.3.1	Lyse des Tumorgewebes	42
4.3.2	Proteinbestimmung	43
4.3.3	Kolorimetrische Analyse	44
4.4	Strahleninduzierte Aktivierung von ERK als Positivkontrolle für Zn-abhängige Phosphorylierung in Huh-7 Zellen	46
4.4.1	Kultivierung und Bestrahlung von Huh-7	46
4.4.2	Probenvorbereitung für die SDS-Page	47
4.4.3	SDS-Page	48
4.4.4	Tank Blot	49
4.4.5	Immundetektion	51
4.4.6	Wiederholung der Analyse mit HNSCCUM-02T und FaDu	52
4.5	Statistische Auswertung	53
5	Ergebnisse	54
5.1	Probengewinnung	54
5.2	Mikroskopische Analyse des Restgewebes nach Lyse	55
5.3	Auswertung der intratumoralen Zinkanreicherung nach Applikation von ZnO-Nanopartikeln und iRGD	55
5.4	Versuch zur Etablierung einer Positivkontrolle für die ERK-Aktivierung	58
6	Diskussion	60
6.1	Bewertung von Dosiswahl, Entnahmezeitpunkt und Tumortransplantation im CAM-Assay	60
6.2	Analyse der Zinkkonzentrationen in den Tumorproben	61
6.2.1	Erhöhter Zinkgehalt in der Kontrollgruppe	62
6.2.2	Mögliche Wechselwirkungen zwischen iRGD und Zn ²⁺	63
6.2.3	Geringe Streuung der Werte	63
6.3	Problematik der Positivkontrolle im Western Blot	65

7	Ausblick.....	66
8	Zusammenfassung.....	68
9	Literaturverzeichnis.....	70
10	Danksagung	V
11	Tabellarischer Lebenslauf	VI

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	bovines Serumalbumin
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMEM+	DMEM + 5% FCS + 2% P/S
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ED	Embryonaler Entwicklungstag
Eppi	Eppendorf Mikroreaktionsgefäß
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
EZM	extrazelluläre Matrixproteine
FCS	fetales Kälberserum
Gd-DTPA	Gadolinium-Diethylentriaminpentaessigsäure
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NO	Stickstoffmonoxid
NRP-1	Neuropilin-1
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PPC	personalisierte Proteinkorona
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	Trypsin/EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoracetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZIP	<i>Zrt- and Irt-like protein</i>

ZnO-NP Zinkoxid-Nanopartikel
ZnT.....Zink Transporter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intrazellulärer Zn-Transport.....	9
Abbildung 2: Zn-abhängige Aktivierung von ERK.....	14
Abbildung 3: Aktivierung Ras	15
Abbildung 4: Strukturformel iRGD	17
Abbildung 5: Bindungsmechanismus des iRGD-Peptids	18
Abbildung 6: Transmissionselektronenmikroskop (TEM)-Bild der ZnO-NP	24
Abbildung 7: Ablauf CAM-Assay	35
Abbildung 8: Befruchtetes Ei (Tag 3)	36
Abbildung 9: Beurteilung des Tumoreinwuchs	38
Abbildung 10: Ablauf der intravenösen Applikation.....	40
Abbildung 11: Zeitreihe.....	41
Abbildung 12: Dosisreihe.....	42
Abbildung 13: Belegung der 96-Well-Platte für Proteinbestimmung	43
Abbildung 14: Beispiel einer BSA-Eichgeraden zur Proteinbestimmung	44
Abbildung 15: Beispielhafter Auftrag zur kolorimetrischen Zn-Messung	45
Abbildung 16: Beispiel einer Zn-Eichgerade	46
Abbildung 17: Aufbau des Transferstapels	50
Abbildung 18: StainFree-Gel und StainFree-Blot.....	51
Abbildung 19: Quetschpräparat.....	55
Abbildung 20: Zn-Messung.....	57
Abbildung 21: pERK1/2-Expression in Tumorzellen nach Bestrahlung – Positivkontrolle.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	24
Tabelle 2: Laborgeräte	26
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 4: Software.....	32
Tabelle 5: Verdünnung der ZnO-NP.....	39
Tabelle 6: Verdünnung iRGD	39
Tabelle 7: Beispielrechnung Zinkgehalt	46
Tabelle 8: Zuordnung Strahlungsdosis und Lyse-Zeitpunkt.....	47
Tabelle 9: Beispielrechnung Entzugsvolumen	47
Tabelle 10: verwendete Antikörper.....	51
Tabelle 11: Zellzahlen, Strahlendosis und Lyse-Zeitpunkte bei Huh-7, FaDu und Hun	53
Tabelle 12: Übersicht Tumorproben.....	54
Tabelle 13: Gelbeladung Western Blot.....	59

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Ein Hauptforschungsgebiet der Arbeitsgruppe von Prof. J. Brieger ist die Zinktoxizität, mit besonderem Augenmerk auf den Einsatz von Zinkoxid-Nanopartikeln (ZnO-NP). Bei Nanopartikeln handelt es sich per definitionem um Strukturen mit einer Größe von 1–100 nm (Boverhof et al., 2015). Sie legen den Grundstein für das Forschungsfeld der Nanomedizin und gelten als Hoffnungsträger in der Krebstherapie. Zinkoxid-Nanopartikel wirken sowohl zyto- als auch genotoxisch, die Mechanismen dahinter sind jedoch weiterhin Forschungsbestand (Condello et al., 2016). So ist bekannt, dass nach Aufnahme von ZnO-NP in Zellen reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die Apoptose auslösen (Fu et al., 2014). Aber auch die extrazelluläre Freisetzung von Zn^{2+} kann DNA-Schäden verursachen und so zur Toxizität beitragen (Wiesmann, 2019). Eine mögliche Rolle spielt dabei der MAP-Kinase-Signalweg, dessen zellphysiologischer Zusammenhang mit Zink bereits 1996 nachgewiesen wurde (Hansson, 1996).

ZnO-NP werden als vielversprechendes Anti-Tumor-Mittel diskutiert. Wiesmann (2019) zählt diverse Studien auf, die eine erhöhte Toxizität der ZnO-NP gegenüber malignen Zellen beschreiben. Auch gegenüber Huh-7-Zellen, einer Zelllinie aus malignen Hepatozyten, konnte in vitro die toxische Wirkung der ZnO-NP nachgewiesen werden (Rahimi Kalateh Shah Mohammad et al., 2019). Mühl (2024), eine ehemalige Doktorandin der AG Brieger, wollte diese in vitro Daten in einem in vivo Modell verifizieren. Gewählt wurde hierfür der versuchstierfreie HET-CAM-Assay, bei dem humane 3D-Tumorzellkulturen auf die Chorion-Allantois-Membran (CAM) befruchteter Hühnereier transplantiert werden. Die CAM ist eine hoch vaskularisierte, extraembryonal gelegene Membran, die sich aufgrund der eingeschränkten Immunabwehr des Hühnerembryos gut für die Transplantation xenogener Gewebe eignet (Nowak-Sliwinska et al., 2014).

Die Ergebnisse von Mühl (2024) zeigten jedoch eine Diskrepanz zwischen den Daten in vitro und in ovo: Nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP ließ sich im CAM-Modell keine signifikante toxische Wirkung im Tumorgewebe nachweisen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine unzureichende Anreicherung der Nanopartikel im Tumor gewesen sein.

An dieser Stelle knüpft die vorliegende Arbeit an. Ziel ist es, die Anreicherung von ZnO-NP im Tumorgewebe zu erhöhen. Helfen soll dabei das iRGD-Peptid, ein vielversprechendes Agens, das die Penetration von Chemotherapeutika in maligne Zellen verbessert (Kang et al., 2020). Das zyklische iRGD-Peptid bindet spezifisch an Integrin-Rezeptoren, die ausschließlich an Tumor-Endothelzellen exprimiert werden und eine Co-Injektion genügt bereits, um die Wirkung zu entfalten (Sugahara et al., 2009, Sugahara et al., 2010). Eine erste klinische Phase-I-Studie

zeigte zudem keine dosislimitierende Toxizität von iRGD (Dean et al., 2022). Die Pharmakokinetik von iRGD weist zudem einen langanhaltenden tumorpenetrierenden Effekt auf, der im Mausmodell nach 24 h noch nachweisbar ist (Järveläinen et al., 2023).

Bisher existieren keine Daten zur kombinierten Gabe von iRGD und ZnO-NP. Studien mit fluoreszierenden *Quantum Dots* – zinkhaltigen Nanoteilchen, die zur In-vivo-Bildgebung von Tumoren zum Einsatz kommen – deuten jedoch darauf hin, dass iRGD die spezifische Anreicherung von Nanopartikeln im Tumor begünstigt (Przysiecka et al., 2016, Liu et al., 2017a).

Die aktuelle Literatur liefert damit eine fundierte Grundlage für die Hypothese, dass ZnO-NP in Kombination mit iRGD eine verbesserte Tumoradressierung ermöglichen könnten.

1.2 Forschungsfrage

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Erkenntnisse ergibt sich die zentrale Fragestellung dieser Arbeit:

Kann die intratumorale Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen durch die kombinierte Applikation von Zinkoxid-Nanopartikeln und iRGD-Peptid im CAM-Modell erhöht werden?

Ziel dieser Arbeit ist es, die Anreicherung von Zinkoxid-Nanopartikeln im Tumorgewebe zu erhöhen und dadurch eine gesteigerte Anti-Tumor-Wirkung im CAM-Assay zu erzielen. Zur Überprüfung der Fragestellung wird im CAM-Assay zunächst eine makroskopische Beurteilung des Tumoreinwuchses durchgeführt. Anschließend werden die Eier im Rahmen einer stratifizierten Randomisierung in drei Interventionsgruppen („ZnO-NP“, „iRGD“, „ZnO-NP + iRGD“) sowie eine Kontrollgruppe („Aqua dest.“) eingeteilt. Nach intravaskulärer Injektion der jeweiligen Lösungen werden die Tumore an Tag 14 entfernt und im weiteren Verlauf lysiert. Der direkte Nachweis einer potenziell erhöhten Anreicherung von ZnO-NP im Tumorgewebe soll durch eine kolorimetrische Messung der freien Zinkkonzentration erfolgen. Indirekt soll die erhöhte intratumorale Zinkkonzentration über eine gesteigerte Aktivierung des MAPK-Signalwegs im Western Blot nachgewiesen werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Einführung in die Tumorthherapie

Krebserkrankungen stellen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Im Jahr 2023 starben hierzulande rund 230.300 Menschen an den Folgen von Krebs (Destatis, 2025), im Vorjahr weltweit schätzungsweise 9,7 Millionen Menschen (IARC, 2024). Die Deutsche Krebsgesellschaft schätzt, dass in Deutschland pro Jahr etwa 50 von 100.000 Einwohnern an Krebs im Kopf-Halsbereich erkranken (DKG, 2017), wobei es sich bei über 90 % um Plattenepithelkarzinome handelt (Pai and Westra, 2009). Während sich die spezifischen Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumore – insbesondere Rauchen und Alkoholkonsum – gezielt vermeiden und HPV-assoziierte Malignitäten durch Impfungen präventiv verhindert werden können, sind die Nebenwirkungen vieler Krebstherapien unausweichlich (Diana and Corica, 2021, Taha et al., 2022). Die in der Chemotherapie eingesetzten Zytostatika greifen nicht nur Tumorzellen an, sondern auch gesunde, schnell proliferierende Körperzellen, wie sie in Haarfollikeln, dem Magen-Darm-Trakt und auch im Knochenmark vorkommen. Neue Behandlungsmethoden, die spezifisch an den Tumorzellen wirken, schüren die Hoffnung, die Therapieeffizienz zu steigern und dabei gleichzeitig die unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu reduzieren. Bei den Medikamentenklassen, die im Sinne dieser zielgerichteten Tumorthherapie wirken (siehe 2.1.1), handelt es sich unter anderem um monoklonalen Antikörper, Tyrosinkinase-Inhibitoren sowie Immuncheckpoint-Inhibitoren (Schirmacher, 2019). Im Zeitalter der *Targeted Therapy* gewinnt auch die Nanomedizin zunehmend an Bedeutung. Durch den Einsatz nanoskaliger Trägersysteme können Wirkstoffe gezielt zum Tumor transportiert werden und auch die Nanopartikel selbst tragen aufgrund ihrer besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften zur Anti-Tumor-Wirkung bei. Ein vielversprechendes Potenzial zeigen Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP) und gelten daher als innovative Hoffnungsträger in der Tumorthherapie (siehe 2.3).

Neben der operativen Entfernung von neoplastischem Gewebe und der medikamentösen Therapie bildet die Strahlentherapie die dritte große Säule der onkologischen Behandlung und findet sowohl unter kurativen als auch palliativen Aspekten Anwendung. Limitiert wird dieser Therapieansatz durch die Ausbildung von tumorzellulären Resistenzmechanismen, wodurch eine *Restitutio ad integrum* erschwert wird. Der Einsatz von Metall-basierten Nanopartikeln als Radiosensitizer kann dabei helfen, die therapeutische Effizienz der Bestrahlung unter Schonung gesunder Nachbarstrukturen zu verbessern (Kwatra et al., 2013).

2.1.1 Zielgerichtete Tumorthherapie

Die zielgerichtete Tumorthherapie macht es sich zur Aufgabe, Tumorzellen und deren Mikroumgebung selektiv anzugreifen und dadurch die therapeutische Wirksamkeit der Behandlung zu erhöhen. Dabei wird kategorisch zwischen aktiv und passiv wirkenden Therapieansätzen unterschieden.

Das passive *Drug Targeting* basiert auf dem Phänomen des EPR-Effekts (*Enhanced Permeability and Retention*). Die rapide Neovaskularisierung führt zur Ausbildung undichter Endothelverbände, die gepaart mit dem eingeschränkten Lymphabfluss eine Akkumulierung von Wirkstoffen im Tumorgewebe begünstigt. Zusätzlich steigert eine erhöhte Expression von Entzündungsmediatoren die Permeabilität der tumoralen Gefäße und trägt so zur vaskulären Leckage bei (Wu, 2021). Die Ausprägung des EPR-Effekts variiert stark zwischen einzelnen Individuen und selbst innerhalb eines Tumors gibt es hinsichtlich der Gefäßdurchlässigkeit Varianzen. Pharmakologische und physikalische Anpassungen konnten bereits dabei helfen, den EPR-Effekt zu verstärken. Als physikalische Methoden zur Steigerung der Gefäßpermeabilität sind die Hyperthermie, die Radiotherapie und die Photodynamische Therapie zu nennen (Ikeda-Imafuku et al., 2022). Aber auch die Sonoporation, eine Methode, bei der Ultraschall mit Mikrobläschen kombiniert wird, konnte bereits einen positiven Einfluss auf den EPR-Effekt aufweisen (Theek et al., 2016, Dimcevski et al., 2016). Zu den pharmakologischen Strategien zählen die „Normalisierung“ der Tumorgefäßstruktur durch Verwendung von VEGF- und Tyrosinkinase-Inhibitoren, die die Durchblutung verbessern bei gleichzeitiger Reduktion des interstitiellen Flüssigkeitsdrucks (Jain, 2013, Chen et al., 2017, Zhang et al., 2016). Der Einsatz von Fibrinolytika soll der tumorbedingten Hyperkoagulabilität entgegenwirken und den Blutfluss durch Abbau von Mikrothromben wiederherstellen (Kirtane et al., 2017). Des Weiteren können vasodilatatorische Substanzen wie z.B. NO-Donatoren die Gefäßpermeabilität erhöhen (Islam et al., 2018). Auch die Überproduktion von extrazellulären Matrixproteinen (EZM) kann den Arzneimitteltransport innerhalb eines Tumors einschränken. Durch Verabreichung von Enzymen wie Hyaluronidase, die am Abbau der EZM beteiligt sind, kann folglich die Arzneimittelpenetration verbessert werden, wie es bereits in einer randomisierten Phase-II-Studie bei Patienten mit metastasiertem duktalem Pankreaskarzinom gezeigt werden konnte (Hingorani et al., 2018).

Aufgrund der Heterogenität des EPR-Effekts wird weiterhin nach alternativen Strategien geforscht, die eine gezielte Wirkstoffanreicherung auch in Tumoren ermöglichen, die keine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit aufweisen. Aktives *Drug Targeting* soll bei der Adressierung von Arzneimitteln im Zielgewebe helfen und so die therapeutische Effizienz steigern. Der Ansatz basiert auf der Verwendung von Liganden, die spezifisch an tumorassoziierte Antigene oder Rezeptoren binden. Zum Einsatz kommen dabei Antikörper, Aptamere, Peptide und kleine Moleküle, die an verschiedene Arzneimittelträger, darunter auch Nanopartikel, gekoppelt

werden. Vorteile dieser aktiven zielgerichteten Tumorthherapie sind eine erhöhte therapeutische Wirksamkeit, die Möglichkeit der Dosisreduktion sowie die Minimierung systemischer Nebenwirkungen (Dutta et al., 2021, Fan et al., 2023). Ein Spezialgebiet ist das *Vascular Targeting*, bei dem gezielt die Endothelzellen angesteuert werden, die die Blutgefäße im Tumor auskleiden. Auf den Tumor-Endothelzellen werden bestimmte Oberflächenmoleküle überexprimiert, die mit spezifischen Liganden gezielt angesteuert werden können. Aufgrund ihres generalisierten Vorkommens stellen sie eine potenzielle Zielstruktur in nahezu allen Tumortypen dar (Chen and Cai, 2014). Ein wichtiger Vertreter dieser Liganden ist das iRGD-Peptid, dessen Bindungsmechanismus in 2.4.3 näher erläutert wird.

2.2 Freies Zink

Zink (Zn) ist ein ubiquitär vorkommendes, essenzielles Spurenelement und nach Eisen das zweithäufigste Spurenelement im menschlichen Körper (Gammoh and Rink, 2017). Es liegt überwiegend intrazellulär vor und akkumuliert zu 30–40 % im Nucleus (Chen et al., 2024). Die Gesamt-Zn-Konzentration in einer humanen Zelle wird mit 200–300 μM angegeben. Das intrazelluläre Level an freien Zink-Ionen (Zn^{2+}) allerdings ist sehr niedrig und liegt physiologischerweise lediglich im Bereich von 10–100 Pikomolar. Grund dafür ist die hohe Pufferkapazität der Zelle gegenüber Zn^{2+} (Maret, 2013, Maret, 2015). Etwa 10% des menschlichen Proteoms ist potenziell Zn-bindend (Andreini et al., 2006). Die koordinative Bindung der Zink-Ionen an die Proteine erfolgt vorwiegend über die Seitenketten der Aminosäuren Cystein und Histidin (Auld, 2001).

Zu den Zn-bindenden Proteinen zählen eine Vielzahl an katalytisch aktiven Metalloenzymen sowie Zinkfingerproteine, die mit ihrer schleifenförmigen DNA-bindenden Proteindomäne die Genexpression gezielt regulieren (Cassandri et al., 2017, Maret, 2013). Zink hilft zudem bei der Stabilisierung von bestimmten Proteinstrukturen, wie z.B. dem Tumorsuppressor p53, für dessen korrekte Faltung und Funktion die zelluläre Verfügbarkeit von Zn^{2+} obligat ist (Loh, 2010). Bis zu 20 % des intrazellulären Zinks liegt gebunden an Metallothioneine vor, wobei es sich um kleine Proteine handelt, die einen sehr hohen Cystein-Gehalt aufweisen und dadurch mit bis zu sieben Zink-Ionen einen Komplex bilden können. Sie speichern Zn^{2+} und können es bei Bedarf rapide freisetzen, wodurch sie maßgeblich an der feinen Regulation der Zn-Homöostase beteiligt sind (Gammoh and Rink, 2017).

Beschrieben wird auch die Rolle von Zn^{2+} als intrazelluläres Signalmolekül. Externe Stimuli können eine Erhöhung der Zinkkonzentration in der Zelle bewirken, wodurch verschiedene Zellprozesse beeinflusst werden, so auch der MAPK-Signalweg, der in 2.3.5.2 näher erläutert wird (Chen et al., 2024). Man unterscheidet dabei zwischen der „frühen Zinkwelle“ als unmittelbare Zellreaktion und einem „späten Zinksignal“, welches transkriptionsabhängig ist und zu einer dauerhaften Veränderung der Zn-Homöostase beiträgt (Fukada et al., 2011).

2.2.1 Zink-Homöostase

Zellen reagieren sehr sensibel auf Schwankungen der Zinkkonzentration. Aus diesem Grund bestreben die Zellen, die ohnehin schon niedrige Konzentration an Zn^{2+} auf einem gleichmäßigen Level zu halten (Bozym et al., 2010). An der Einhaltung des homöostatischen Gleichgewichts sind sowohl das so genannte *Buffering* als auch *Muffling* beteiligt. Erstes bezeichnet die Pufferfähigkeit der Zelle durch Bindung von Zn^{2+} an Proteine, zweites die Fähigkeit der Zelle, das freie Zink in Zellkompartimente einzuschließen oder in den Extrazellulärraum zu transportieren (Colvin et al., 2010).

Reguliert wird die Zn-Homöostase durch den Transkriptionsfaktor MTF-1 (*Metal responsive transcription factor 1*), der als zellulärer Zinksensor auf Änderungen der Zinkkonzentration reagiert und entsprechend die Genexpression von Proteinen anpasst, die am Zinkstoffwechsel beteiligt sind. Dazu zählen nachweislich die o.g. Metallothioneine sowie ZnT1, einer der Efflux-Transporter, die in Kapitel 2.3.3 näher erläutert werden (Günther et al., 2012, Maret, 2013, Hardyman et al., 2016). Eine chronische Dysregulation der Zn-Homöostase kann pathobiologische Folgen haben. Unphysiologische Zinkspiegel werden bspw. bei Diabetes mellitus Typ 2, Krebserkrankungen wie dem Prostatakarzinom und Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose beobachtet (Fukunaka and Fujitani, 2018, Costello and Franklin, 2016, Choi et al., 2017).

Auch mit neurodegenerativen Krankheitsbildern wird Zink in Verbindung gebracht. So fördert Zn die Aggregation von Tau-Fibrillen und Amyloid-Plaques, die eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Alzheimer-Erkrankung spielen (Lei et al., 2021). Ebenso wird eine Mitverantwortlichkeit von Zn an der Entstehung des Morbus Parkinson sowie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) diskutiert (Skalny et al., 2021, Sirabella et al., 2018).

2.3 Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP)

2.3.1 Nanomedizin

Bei Nanopartikeln handelt es sich per definitionem um Strukturen mit einer Größe von 1–100 nm (Boverhof et al., 2015). Sie legen den Grundstein für das junge hochinnovative Forschungsfeld der Nanomedizin, welches Nanotechnologien zur Prävention, Überwachung und Behandlung von Krankheiten einsetzt (Liz-Marzán et al., 2022). Aufgrund ihrer geringen Größe und speziellen Oberflächeneigenschaften besitzen Nanopartikel eine hohe biologische Aktivität, sodass sie leichter in Zellen eindringen, mit Biomolekülen interagieren und gezielt biologische Prozesse beeinflussen können (Rasmussen et al., 2010, Liu et al., 2023).

Als Pionier der Nanomedizin gilt der deutsche Mediziner und Nobelpreisträger Paul Ehrlich (1854–1915). Er prägte den Begriff der „Zauberkegeln“ und rückte mit der Entwicklung eines spezifisch wirkenden Syphilis-Therapeutikums seiner Vision näher,

„chemisch zielen [zu] lernen“ (Strebhardt and Ullrich, 2008). Das erste Nano-Arzneimittel kam 1995 mit Doxil®, einem liposomalen Tumorthapeutikum auf den Markt und ebnete die klinische Manifestation der Nanomedizin (Barenholz, 2012). Durch ihre Fähigkeit der *Targeted Drug Delivery* gelten Nanopartikel als Hoffnungsträger in der Krebstherapie und sollen im Gegensatz zu konventionellen Therapeutika nicht nur einer verminderten Resistenzbildung unterliegen, sondern auch das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen reduzieren (Anjum et al., 2021). Im Kampf gegen Krebszellen werden dabei sowohl organische Nanostrukturen wie Liposomen und Polymere eingesetzt als auch anorganische Nanopartikel, die bspw. aus metallischen oder siliziumhaltigen Komponenten bestehen (Fan et al., 2023).

Mit aktuellem Stand (2024) sind über 20 Nanopartikel-Formulierungen als Krebstherapeutikum für den klinischen Gebrauch zugelassen und über 100 befinden sich in der (prä)klinischen Entwicklung (Lammers, 2024).

2.3.2 Anwendungsbereich und Synthese der ZnO-NP

Die tumortoxische Wirkung von Metalloxid-Nanopartikeln, zu denen auch die ZnO-NP zählen, wurde in einer Vielzahl von *in vitro* Studien nachgewiesen (Rasmussen et al., 2010). Gleichzeitig zeigen ZnO-NP aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität eine geringere systemische Toxizität als andere Metalloxid-Nanopartikel (Anjum et al., 2021). Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) stuft Zinkoxid als GRAS (Generally Recognized As Safe) ein. Es handelt sich demnach um eine allgemein als sicher anerkannte Substanz, deren Verwendung in der derzeit üblichen Dosierung und Anwendungsweise als unbedenklich gilt.

Das Einsatzspektrum der ZnO-NP ist breit gefächert. Eines der Hauptanwendungsgebiete ist die Kosmetikindustrie, wo die ZnO-NP aufgrund ihrer Fähigkeit UV-Licht zu absorbieren als Sonnenschutzmittel zum Einsatz kommen (Smijts and Pavel, 2011). Zudem macht ihre antibakterielle Wirkung sie zu einem beliebten Inhaltsstoff von Hautpflegeprodukten, die die Wundheilung fördern sollen (Lansdown et al., 2007). Auch in der Zahnmedizin gibt es ein Anwendungspotenzial für ZnO-NP, was einer Übersichtsarbeit von Pushpalatha et al. (2022) entnommen werden kann. Hierin werden 45 Forschungsarbeiten mit Schwerpunkt der Anwendung von ZnO-NP im Dentalbereich aufgelistet. In den Studien werden die ZnO-NP bspw. in Füllungskompositen, Spüllösungen, Adhäsivsystemen, Zementen, Zahnpasten sowie zur Beschichtung von Implantaten verwendet. In der Literatur wird zudem eine antidiabetische Eigenschaft der ZnO-NP beschrieben (Shoaib et al., 2024).

Die grüne Synthese ist eine umweltfreundliche Methode zur Herstellung von ZnO-NP unter Vermeidung toxischer Chemikalien und energieintensiver physikalischer Prozesse. Dabei dienen biologische Quellen wie Pflanzenextrakte und Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Fungi) als Reduktionsmittel (El-Saadony et al., 2024). Tabrez et al. (2022) demonstrieren die

vielversprechende Anti-Tumor-Wirkung von aus Kürbiskernextrakt synthetisierten ZnO-NP auf Brustkrebszellen der Linie MDA-MB-231, indem sie Änderungen der Zellmorphologie, die Induktion von Apoptose und die vermehrte Produktion von ROS nachweisen. In Bezug auf ihre antimikrobielle Eigenschaft haben biosynthetisierte ZnO-NP bereits eine Überlegenheit gegenüber konventionellen Antibiotika bewiesen (Naseer et al., 2020).

Durch ihre Anti-Tumor-Wirkung, ihre antimikrobielle Aktivität und ihre Funktion als Nanocarrier bei gleichzeitig hoher Biokompatibilität stellen ZnO-NP ein vielversprechendes Agens in der Biomedizin dar (Mishra et al., 2017).

2.3.3 Dissoziation, Wechselwirkungen und Internalisierung der ZnO-NP

Zinkoxid-Nanopartikel neigen zur Dissoziation, insbesondere im Milieu mit niedrigem pH-Wert (Avramescu et al., 2017). So kommt es aufgrund des Warburg Effekts zu einer Ansäuerung der Tumormikroumgebung und dadurch vermehrt zur Freisetzung von Zn^{2+} (Sasidharan et al., 2011, Liberti and Locasale, 2016). Über ZIP-Transporter werden die extrazellulären Zink-Ionen aktiv ins Zytosol transportiert. Von dort gelangt Zn^{2+} über Transporter der ZnT-Familie in Zellorganelle und Vesikel (siehe Abbildung 1). Dabei reichert sich Zn^{2+} größtenteils im Zellkern an, wie es Heim et al. (2015) anhand von Zellen der Linie A549 nachgewiesen haben. Als divalentes Metallion ist Zink nicht in der Lage, die Zellmembran mittels passiver Diffusion zu überwinden (Kloubert and Rink, 2015).

Eine Analyse mehrerer Studien zeigt, dass die aktive Zellaufnahme Größen-abhängig ist und durch Verwendung von Nanopartikeln mit einer Größe von 30–50 nm optimiert werden kann (Shang et al., 2014). Nach Aufnahme in zelluläre Vesikel beschleunigt der saure pH-Wert in den Endosomen, insbesondere aber in den Lysosomen die Dissoziation der ZnO-NP und fördert somit die Freisetzung von Zn^{2+} (Bisht and Rayamajhi, 2016).

Die Umhüllung von ZnO-NP mit Coatings kann stabilisierend wirken und so vor vorzeitiger Dissoziation schützen. Auf diese Weise werden Nanopartikel sicher durch die Blutbahn transportiert und potenziell toxische Off-Target-Effekte vermieden, wie Wiesmann (2019) anhand des verzögerten Einsetzens der toxischen Wirkung von ZnO-NP mit Silica-Beschichtung darlegte. Die Silica-Beschichtung verhindert die Produktion von ROS und die Freisetzung von Zn^{2+} , was zu einer reduzierten Toxizität der ZnO-NP führt (Tongu et al., 2014, Camaioni et al., 2021, Chia and Leong, 2016).

2.3.4 Die Proteinkorona

Einen weiteren Einfluss auf die Nanopartikel und deren Interaktion mit Zellen hat die sogenannte Proteinkorona. In biologischen Fluiden wie dem Blutplasma weisen Nanopartikel eine Affinität zur Adsorption von Proteinen auf, die anschließend die Partikeloberfläche umhüllen (Agarwal and Shanmugam, 2020). Ursächlich dafür können unter anderem elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sein, wie sie Lousinian et al. (2013) zwischen Fibrinogen und ZnO-NP beobachten konnten, aber auch Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen (Nienhaus and Nienhaus, 2023). Hinsichtlich des Aufbaus setzt sich die Proteinkorona aus einer „harten“ inneren Schicht und einer „weichen“ äußeren Schicht zusammen, wobei die äußere keinen direkten Verbund zum Nanopartikel aufweist und daher konsekutiv einer größeren Dynamik unterliegt (Önal Acet et al., 2024).

In einer *in vitro* Studie von Giau et al. (2019) wurde die Formation der Proteinkorona auf ZnO-NP nach Inkubation in Serum-haltigem Zellkulturmedium analysiert. Dabei konnten nach 5 und 60 min jeweils über 30 Proteine charakterisiert werden, darunter Apolipoprotein, Komplementfaktoren, Hitzeschockprotein sowie Proteine, die an der Koagulation beteiligt sind.

Bereits vor über einer Dekade gab es die Hypothese, dass die Verteilung und Wirkung von Nanopartikeln im Organismus größtenteils von der biomolekularen Komposition des Nanopartikel-Korona-Komplexes determiniert wird (Monopoli et al., 2012). Heutzutage ist es weithin anerkannt, dass die Proteinkorona die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Nanopartikel ändert und so direkten Einfluss auf deren Distribution, Wirkung und Toxizität hat (García Vence et al., 2020). Durch Modifizierung der adhärenen Proteine, z.B. durch Einbau Rezeptor-assoziiierter Proteine, könnte dadurch in Zukunft ein zielgerichteter Transport der Nanopartikel zur Zielzelle ermöglicht werden (Corbo et al., 2016, García Vence et al., 2020). Die gezielte Beeinflussung der Toxizität kann eine erhöhte Sicherheit bei der Anwendung der

Nanopartikel bis zur Zielzelle gewährleisten. Bei Inkubation von HepG2 Zellen mit ZnO-NP, die eine vorbeschichtete Proteinkorona aufwiesen, waren Dissoziation und ROS-Bildung gehemmt und daraus folgend die Zytotoxizität geringer als im Vergleich zur Behandlung mit den nicht modifizierten ZnO-NP (Yin et al., 2015).

Das neue Konzept der „personalisierten Proteinkorona“ (PPC) basiert auf der Erkenntnis mehrerer Studien, die zeigen, dass die Komposition der Proteinhülle krankheitsspezifisch ist. Die Charakterisierung dieser PPC im klinischen Alltag eröffnet neue Perspektiven in der individualisierten Nanomedizin (Corbo et al., 2017, García Vence et al., 2020).

2.3.5 Toxizität von ZnO-NP

Zinkoxid-Nanopartikel wirken sowohl zyto- als auch genotoxisch, d.h. sie können sowohl die Zellen selbst als auch deren DNA schädigen und so den Zelltod einleiten. Das Absterben der Zelle nach Behandlung mit ZnO-NP erfolgt dabei in Anbetracht der Studienlage hauptsächlich in Form von Apoptose (Wiesmann, 2019). Darüber hinaus lassen sich aber auch Nekrose (Wilhelmi et al., 2013, Kim et al., 2015, García Hevia et al., 2016) und Autophagie beobachten (Bai et al., 2017, Yang et al., 2021). Nach neusten Erkenntnissen zeigt sich zudem Nekroptose, eine hybride Form des Zelltods, die Merkmale von programmiertem und nekrotischem Zelltod vereint (Farasat et al., 2020, Ahlam et al., 2021). Ebenso wird über eine von ZnO-NP induzierte Ferroptose berichtet (Zhang et al., 2020).

Die Zytotoxizität von ZnO-NP beruht wesentlich auf der extrazellulären Freisetzung von Zn^{2+} . Bei Erreichen eines toxischen Schwellenwerts entstehen Zellschäden, wie es Wiesmann (2019) durch Inkubation von A549-Zellen mit $ZnCl_2$ als Repräsentant freier Zink-Ionen nachweisen konnte. Doch auch die direkte Interaktion der ZnO-NP mit der Zellmembran und die Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle sollen zur zytotoxischen Eigenschaft beitragen. Nach Internalisierung kann es durch intrazellulär freigesetzte Zn^{2+} oder partikelspezifische Wechselwirkungen ebenfalls zu Schäden kommen (Song et al., 2010, Wiesmann, 2019). Eine zentrale Rolle bei der zytotoxischen Wirkung spielen dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Schädigung der Mitochondrien, was in Kapitel 2.3.5.1 näher erläutert wird.

Die Genotoxizität von ZnO-NP konnte bereits in mehreren Zelllinien aufgezeigt werden, der ursächliche Mechanismus ist jedoch weiterhin Forschungsbestand (Condello et al., 2016). Mehrere Studien nutzen den Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen nach Anwendung von ZnO-NP (Ng et al., 2017, Moratin et al., 2018, Fernández-Bertólez et al., 2024). Beschrieben werden sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche (Heim et al., 2015, Wiesmann, 2019). Mittels Mikrokern-Test konnten genotoxische Effekte durch ZnO-NP bisher nur *in vitro*, nicht aber in Tierstudien gezeigt werden (Mittag et al., 2021). Zusätzlich zur Beteiligung von ROS bestätigen Fernández-Bertólez et al. (2024) die bisherige Annahme,

dass die Freisetzung von Zn^{2+} aus den Nanopartikeln eine wesentliche Rolle bei der Genotoxizität spielt. Es kann jedoch Stand jetzt nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Mechanismen an der genotoxischen Wirkung von ZnO-NP partizipieren.

Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Interaktion der ZnO-NP mit dem p53-Signalweg, der Zellzyklus, Apoptose und auch Seneszenz reguliert. Ng et al. (2011) zeigen in ihrer Studie, dass die genotoxischen Effekte der ZnO-NP letztlich zu einer Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen. Dabei hat der Mutations-Status des codierenden Gens einen wesentlichen Einfluss auf die zelluläre Wirkung der Nanopartikel: ZnO-NP weisen eine höhere Toxizität gegenüber Zellen mit Wildtyp p53 auf als gegenüber Zellen mit deaktiviertem p53-Gen. Im Gegensatz dazu zeigen Padmanabhan et al. (2019), dass bei Ovarialkarzinomzellen (HGSOc) die Zytotoxizität der ZnO-NP unabhängig ist vom p53 Mutationsstatus. Diese Diskrepanz deutet darauf hin, dass der Einfluss von p53 auf die Wirkung von ZnO-NP zelltypspezifisch sein könnte und durch weitere Faktoren moduliert wird. Ein weiterer Aspekt betrifft die Rolle von Zink-Ionen, die aus den Partikeln freigesetzt werden. Zn^{2+} kann zur Stabilisierung von p53 beitragen, was ebenfalls die p53-Aktivierung nach ZnO-NP-Exposition unterstützen könnte (Loh, 2010).

Die biomedizinische Anwendung von ZnO-NP wird durch deren systemtoxische Wirkungen limitiert. *In vivo* wurden sowohl nach intravenöser Applikation als auch nach oraler Verabreichung hepatotoxische und nephrotoxische Effekte dokumentiert. Zudem kann die inhalative Exposition zu pulmonalen Schädigungen führen (Fujihara and Nishimoto, 2024). Dem gegenüber steht eine Studie von Barakat et al. (2020), in der ZnO-NP bei kombinierter Gabe mit Cisplatin renoprotektive Eigenschaften zugeschrieben wurden. Eine erste toxikologische Analyse der ZnO-NP im CAM-Assay wurde bereits durchgeführt. Die mittlere letale Dosis (LD_{50}) von intravaskulär injizierten ZnO-NP lag bei $17,5 \mu M$ ($1,4 \text{ mg/ml}_{\text{eggcontent}}$) und war somit signifikant höher als die der äquivalenten Menge an Zn^{2+} ($LD_{50} 4,6 \mu M$) (Buhr et al., 2021).

2.3.5.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird eine Zelle oxidativem Stress ausgesetzt, der schlussendlich zum Zelltod führen kann. Auch nach Applikation von ZnO-NP entstehen ROS, deren Präsenz indirekt durch das Absinken des Antioxidans Glutathion und den Anstieg des Malondialdehyd-Spiegels nachgewiesen werden kann (Khan et al., 2021, Nabil et al., 2020) oder auch direkt über die Verwendung fluoreszierender Marker (Wingett et al., 2016, Wiesmann, 2019). Die Entstehung der ROS ist sowohl auf die Freisetzung der Zn^{2+} als auch die elektro-chemischen Charakteristiken des Halbleiters Zinkoxid zurückzuführen.

Zinkoxid ist ein Halbleitermaterial mit einer großen Bandlücke, die typischerweise $3,3 \text{ eV}$ beträgt. Bei Anregung der ZnO-NP durch UV-Licht oder Ultraschall (Bogdan et al., 2017) wird

ein Valenzelektron auf das Leitungsband übertragen und so ein energiereiches Elektronen-Loch-Paar generiert. Dieses kann an der Oberfläche der ZnO-NP die Bildungsreaktionen verschiedener Sauerstoffradikale katalysieren. Die negativ geladenen Elektronen im Leitungsband wirken als Reduktionsmittel und katalysieren klassischerweise die Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu hoch reaktiven Hyperoxid-Anionen ($O_2^{\bullet-}$). Die Löcher im Valenzband fungieren als starke Elektronenakzeptoren und katalysieren die Oxidation von Wasser (H_2O) und Hydroxid-Ionen (OH^-) zu Hydroxyl-Radikalen (OH^{\bullet}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Bogdan et al., 2017). Durch ihre photokatalytischen Eigenschaften können ZnO-NP die Bildung von ROS verstärken und dadurch ihre zytotoxische Wirkung erheblich steigern. Dies erklärt ihr hohes therapeutisches Anwendungspotenzial in der Photodynamischen Therapie (PDT) mit UV-Licht (Yi et al., 2020, Fatima et al., 2022).

Ein intrazellulärer Überschuss an Zn^{2+} kann das mitochondriale Membranpotenzial senken, die Bildung von ROS in den Mitochondrien erhöhen und so die Freisetzung von Cytochrom C bedingen. In der Folge kommt es zur Caspasen-Aktivierung, resultierend im apoptotischen Zelltod (Fu et al., 2014, Wiesmann, 2019, Anjum et al., 2021).

2.3.5.2 Zn^{2+} als Aktivator des MAP-Kinase-Signalwegs

Der MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen-activated protein*) reguliert eine Vielzahl an zellulären Prozessen, darunter Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Santarpia et al., 2012). Dabei handelt es sich um einen Signaltransduktionsweg, welcher durch verschiedene Faktoren aktiviert werden kann und eine kaskadenartige Phosphorylierung von mindestens drei Kinasen initiiert.

Bereits seit 1996 ist bekannt, dass es einen zellphysiologischen Zusammenhang zwischen Zink und dem MAP-Kinase-Signalweg gibt. So konnte Hansson (1996) nachweisen, dass extrazelluläre Zink-Ionen eine erhöhte Phosphorylierungsrate der ERK1/2 Kinasen bewirken, welche die dritte Stufe des Raf-MEK-ERK-Signalwegs bilden. Über die zinkabhängige Aktivierung von ERK wurde in kolorektalen Krebszellen eine Induktion der Transkription des Proteins p21 beobachtet, wodurch der Zellzyklus angehalten wird (Park et al., 2002).

Eine Annahme ist, dass Zn^{2+} die unspezifische Inhibition von Phosphatasen bewirkt, was zu einer verlängerten Aktivierung von ERK führt (Wilson et al., 2012, Haase and Maret, 2003). Anson et al. (2021) konnten jedoch zeigen, dass als Auslöser für diesen Mechanismus freie Zn^{2+} Konzentrationen notwendig sind, die weit oberhalb des physiologischen intrazellulären Levels liegen. Daher spielt dieser Mechanismus wohl eher eine untergeordnete Rolle bei der Aktivierung von ERK.

Park et al. (2002) vermuteten bereits, dass das Protoonkogen Ras an der zinkabhängigen ERK-Aktivierung beteiligt sein könnte. Die Erkenntnis, dass nicht nur ERK, sondern auch AKT durch Zn^{2+} aktiviert wird, bestätigt Ras als Knotenpunkt des Signalwegs (siehe Abbildung 2).

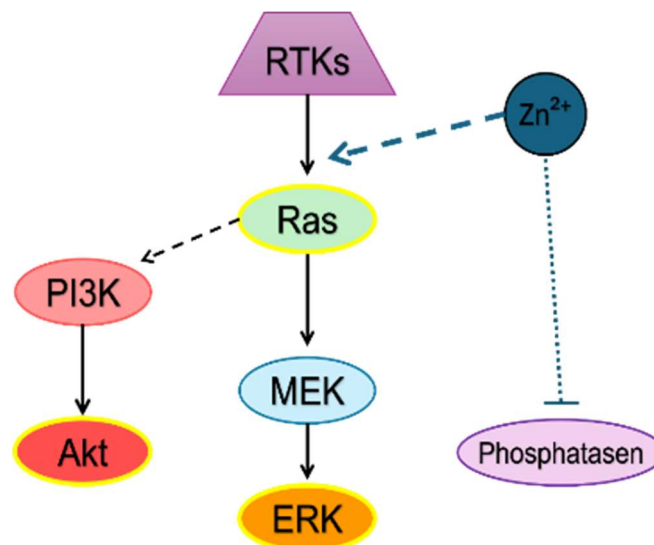


Abbildung 2: Zn-abhängige Aktivierung von ERK

Das GTP-abhängige Ras Protein nimmt eine zentrale Rolle in der Zink-abhängigen Aktivierung von ERK ein. Ras wird durch aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) stimuliert. Auch Zn^{2+} kann Ras indirekt aktivieren. Nachfolgend aktiviert Ras nicht nur den MEK/ERK-Signalweg, sondern auch Akt über die Phosphorylierung von PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase). Die Aktivierung von ERK und Akt nach Gabe von Zn^{2+} bestätigt Ras als Knotenpunkt beider Signalwege. Die unspezifische Hemmung von Phosphatasen durch Zn^{2+} kann zu einer verlängerten Aktivierung der Kinasen beitragen. In Anlehnung an (Anson et al., 2021).

Der genaue Mechanismus der Aktivierung von Ras durch Zink bleibt zwar ungeklärt, eine mögliche Erklärung hierfür bildet jedoch die Freisetzung von ROS (siehe 2.3.5.1). Die ROS bewirken eine Modifizierung von Ras durch Oxidation der Aminosäure Cystein über eine Glutathiolation, Nitrosation oder Oxidation. Dies bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP, wodurch Ras in einen aktivierten Zustand überführt wird (siehe Abbildung 3). Das aktive Ras-GTP ist in der Lage, den MAP-Kinase-Signalweg zu aktivieren und somit die sukzessive Phosphorylierung von Raf-1, MEK und ERK1/2 einzuleiten (Kramer-Drauberg and Ambrogio, 2021, Messina et al., 2019, Heo and Campbell, 2006).

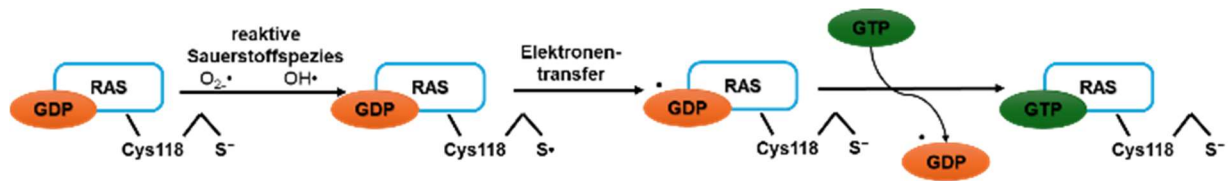


Abbildung 3: Aktivierung Ras

Unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies entsteht ein reaktionsfreudiges Thiyl-Radikal am Cystein-Rest C118 des Ras-Proteins. Ein Elektronentransfer zwischen dem Cystein-Rest und GDP bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP, wodurch RAS aktiviert wird. In Anlehnung an (Kramer-Drauberg and Ambrogio, 2021).

Einen aussagekräftigen Nachweis über die Aktivierung von pERK1/2 kann ein Western Blot liefern, wie es bereits an kolorektalen Karzinomzellen (HT29) sowie Zellen des Zervixkarzinoms (HeLa) nach Behandlung mit ZnCl₂ gezeigt wurde (Park et al., 2002, Anson et al., 2021).

2.3.6 ZnO-NP in der Tumorthherapie

In einer Übersichtsarbeit von Anjum et al. (2021) werden ZnO-NP als potenzielle Kandidaten im Kampf gegen Krebs betitelt. Über 40 Studien werden aufgelistet, die die antitumorale Aktivität von ZnO-NP in verschiedenen Krebszelllinien belegen, darunter Leber-, Lungen-, Brust- und Knochenkrebs sowie Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms. Die Autoren weisen darauf hin, dass die therapeutische Potenz je nach Krebsart variiert, was sich in den unterschiedlichen IC₅₀-Werten der berücksichtigten Studien widerspiegelt.

Die Anwendungsmöglichkeiten der ZnO-NP in der Tumorthherapie sind vielfältig. Aufgrund ihrer inhärenten zyto- und genotoxischen Eigenschaften (siehe 2.3.5) ist ein monotherapeutischer Einsatz als Chemotherapeutikum denkbar. Aber auch der Einsatz als *Nanocarrier* für etablierte Chemotherapeutika stellt nach aktueller Studienlage eine Möglichkeit dar (Mishra et al., 2017). Mit dem Zytostatikum Doxorubicin beladene ZnO-NP zeigten bei der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 eine höhere Anti-Tumor-Aktivität im Vergleich zur jeweiligen Einzelwirkstoffbehandlung, während sie gleichzeitig eine geringere Toxizität gegenüber gesunden Zellen aufwiesen (Sharma et al., 2016).

Erforscht wird auch der Einsatz von ZnO-NP als Adjuvanz in der Radiotherapie. Aufgrund ihrer besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften besitzen sie das Potenzial als Radiosensitizer zu fungieren, wodurch die therapeutisch notwendige Strahlendosis reduziert werden könnte. Anhaltspunkt dafür liefert unter anderem eine Studie von Meyer et al. (2019), in der bereits eine subzytotoxische Konzentration von ZnO-NP die klonogene Überlebensrate von FaDu nach Bestrahlung signifikant senken konnte.

Gegenüber Huh-7-Zellen konnte *in vitro* bereits eine toxische Wirkung von ZnO-NP gezeigt werden (Rahimi Kalateh Shah Mohammad et al., 2019). Den Nachweis liefern die erhöhte

Expression des proapoptotischen Bax-Gens und des Tumorsuppressorgens TP53, die Messung der Leberenzyme, eine histopathologische Analyse sowie ein MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Yang et al. (2021) bestätigen abermals die erhöhte Expression von p53 nach Inkubation von Huh-7-Zellen mit ZnO-NP und beschreiben zudem verstärkte Autophagie und eine gesteigerte Caspase-3-Aktivität. Besondere Beachtung gilt zudem der Beobachtung, dass ZnO-NP auf Tumorzellen toxischer wirken als auf nicht-maligne Zellen, wie es Wiesmann et al. (2019) durch einen Vergleich der Zellaktivität von A549 und Fibroblasten zeigen konnten.

Die Erkenntnisse über die tumortoxische Wirkung von ZnO-NP beschränken sich derzeit fast ausschließlich auf Daten aus der Zellkultur. Ida Mühl, eine ehemalige Doktorandin der AG Brieger, wollte die *in vitro* Ergebnisse in einem *in vivo* Modell verifizieren und wählte dafür den CAM-Assay mit befruchteten Hühnereiern. Als Resultat ihrer Arbeit zeigt sich jedoch eine Diskrepanz in der Datenlage, da in den Huh-7-Tumoren auf der CAM nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP keine toxische Wirkung nachweisbar war (Mühl, 2024).

Ursächlich hierfür könnte eine unzureichende Anreicherung der Nanopartikel im Tumorgewebe sein. An dieser Stelle soll mein Promotionsvorhaben anknüpfen. Ziel ist es, die Konzentration von ZnO-NP im Tumorgewebe zu erhöhen. Helfen soll dabei das iRGD-Peptid (siehe 2.4), ein vielversprechendes Agens, dass die Penetration von Chemotherapeutika in malignen Zellen verbessern kann (Kang et al., 2020).

2.4 iRGD-Peptid

2.4.1 iRGD als Tumor-homing-Peptid

Das iRGD-Peptid gehört zu den sogenannten *Tumor-homing* Peptiden, einer Reihe an Oligopeptiden, die spezifisch an Tumorzellen und -endothelien binden und diese penetrieren. Um diese Peptide zu isolieren, wurden für verschiedene tumorspezifische Oberflächenmoleküle mittels einer Phagen-Bibliothek rekombinante Liganden sequenziert (Kondo et al., 2021). Die beiden Hauptanwendungsgebiete dieser *Tumor-homing* Peptide sind der zielgerichtete Transport von Anti-Tumor-Mitteln im Sinne eines aktiven *Drug Targetings* sowie die onkologische Bildgebung (Kondo et al., 2021). Der Einsatz des iRGD-Peptids stellt einen vielversprechenden alternativen Ansatz zum passiven EPR-Effekt dar, der üblicherweise zur Anreicherung nanomedizinischer Wirkstoffe in Tumorgewebe genutzt wird.

2.4.2 Struktur des iRGD-Peptids

Das iRGD-Peptid, welches auch als CEND-1 bezeichnet wird, weist eine zyklische Ringstruktur auf und setzt sich aus den neun Aminosäuren Cys-Arg-Gly-Asp-Lys-Gly-Pro-Asp-Cys (CRGDKGPDC) zusammen (siehe Abbildung 4). Die Summenformel lautet $C_{37}H_{60}F_3N_{13}O_{16}S_2$, woraus sich eine relative Molekülmasse von 1064,08 ergibt. Erstmals identifiziert wurde iRGD von Sugahara et al. (2009) mittels Phagen-Display im Mausmodell mit metastasierendem Prostatakarzinom. Nur diejenigen Phagen, die das Peptid exprimierten, welches ein Arginin-Glycin-Aparaginsäure-Motiv (RGD) innerhalb der oben genannten Aminosäuresequenz aufwies, wurden von den Prostatakrebszellen aufgenommen. Daraus leitet sich der Name *internalizing-RGD*, kurz iRGD ab (Sugahara et al., 2009).

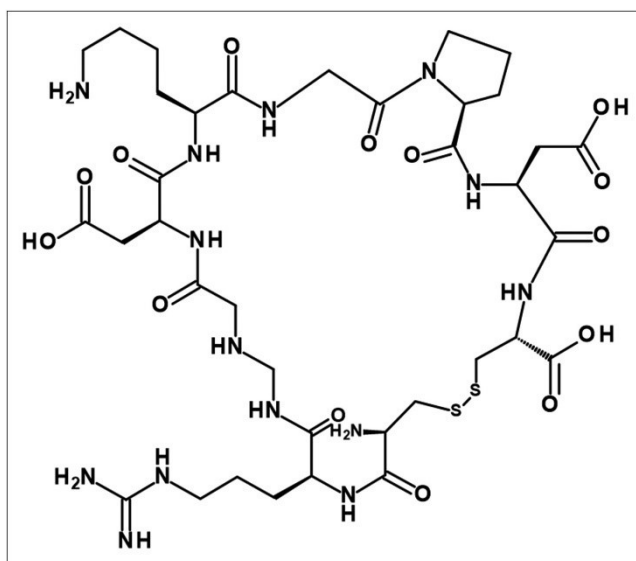


Abbildung 4: Strukturformel iRGD

Das zyklische Peptid, zusammengesetzt aus neun Aminosäuren (Thirumalai et al., 2023).

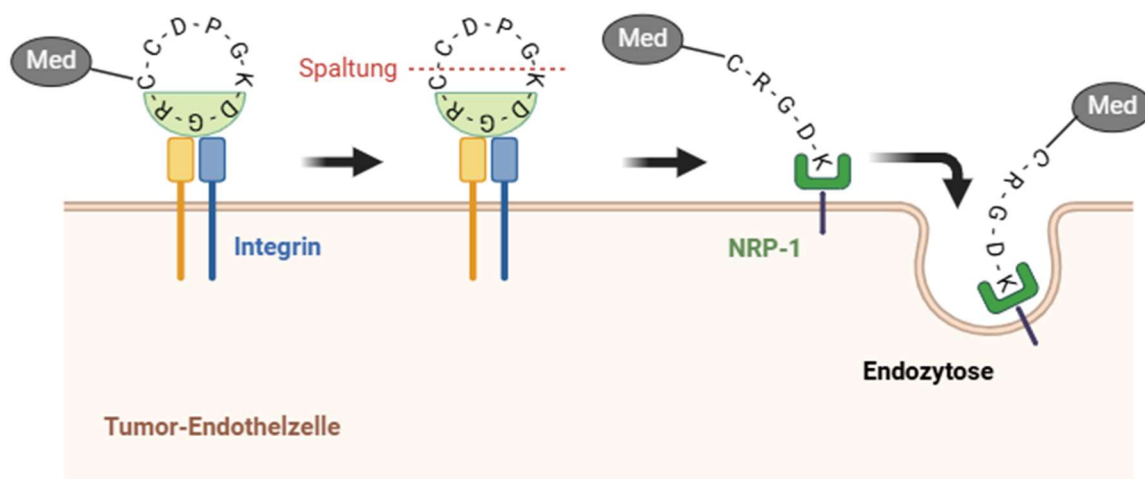
2.4.3 Bindung an tumorspezifische Rezeptoren

Sugahara et al. (2009) konnten zeigen, dass iRGD an $\alpha\beta3$ and $\alpha\alpha5$ Integrin-Rezeptoren bindet. Integrine gehören zu den Zelladhäsionsmolekülen und sind membranständige Heterodimere. Sie setzen sich aus nicht-kovalent gebundenen α - und β -Untereinheiten zusammen, die wiederum verschieden miteinander kombinierbar sind (Barczyk et al., 2010). Insgesamt existieren mindestens 24 verschiedene Integrin-Rezeptoren, die anhand ihrer Bindungsspezifität wiederum in vier Unterfamilien eingeteilt werden können. Eine dieser Unterfamilien bilden die acht RGD-bindenden Integrine, zu denen auch $\alpha\beta3$ and $\alpha\alpha5$ gehören (Ludwig et al., 2021). Zu betonen ist, dass diese speziellen Integrin-Rezeptoren spezifisch an Tumor-Endothelzellen vorkommen. In gesunden Endothelien werden sie kaum bis gar nicht ausgebildet. Nach Bindung an diese Integrin-Rezeptoren wird das zyklische

iRGD-Peptid proteolytisch gespalten, wobei die aktivierte Protease bisher jedoch unbekannt ist (Sugahara et al., 2009).

2.4.4 Verstärkung der Tumorpenetration durch Aktivierung eines rezeptorvermittelten Endozytose-Mechanismus

Das entstandene Spaltprodukt CRGDK exponiert am C-Terminus ein sogenanntes *C-end rule* (CendR) Motiv mit folgender Sequenz: R/KXXR/K. Dieses Motiv bindet anschließend an den Transmembranrezeptor Neuropilin-1 (NRP-1), wodurch eine Aktivierung der Endozytose hervorgerufen wird und das in Vesikeln verpackte Peptid von den Tumorendothelzellen aufgenommen wird (siehe Abbildung 5) (Sugahara et al., 2009). Laut Pang et al. (2014) soll dieser molekularbiologische Vorgang der Makropinozytose ähneln.



Created in BioRender.com 

Abbildung 5: Bindungsmechanismus des iRGD-Peptids

In Anlehnung an Kang et al. (2020).

Das abgespaltene Fragment weist im Gegensatz zum zyklischen iRGD eine höhere Affinität gegenüber NRP-1 als gegenüber der Integrine auf, wodurch eine Translokation zu diesem Rezeptor begünstigt wird (Sugahara et al., 2009). NRP-1 wird in mehreren Tumorarten überexprimiert, so auch im hepatozellulären Karzinom, welches im Rahmen dieser Doktorarbeit als Tumormodell zum Einsatz kommt (Bielenberg et al., 2006, Berge et al., 2011).

Mittels eines transzytotischen Transportmechanismus gelangt das iRGD-Peptid über die Tumor-Endothelschicht in das Tumorstroma und von dort aus in das Tumorparenchym. Sowohl das iRGD-Peptid sowie die beigefügte Co-Medikation können dort von Tumorzellen internalisiert werden, sodass ein aktives *Drug Targeting* ermöglicht wird (Ruoslahti, 2022).

2.4.5 Koadministration von iRGD zur Effizienzsteigerung von Anti-Tumor-Mitteln

Durch die Gabe von iRGD wird eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität und somit eine verbesserte Penetration des Tumorgewebes erreicht. Nicht nur das Peptid kann dadurch von den Tumorzellen internalisiert werden, sondern auch zusätzlich verabreichte Anti-Tumor-Mittel. Eine kovalente Bindung an das Peptid ist nicht notwendig, wodurch chemische Modifizierungen von etablierten Therapeutika umgangen werden können. Sugahara et al. (2010) zeigten erstmalig, dass eine Co-Injektion der Medikamente genügt, um den Tumor mit diesen zu penetrieren. Untersucht wurde dies anhand von zehn Wirkstoffen, die im Größenbereich eines 0,6 kDa Moleküls bis hin zu einem 130 nm Partikel lagen. Die in der hiesigen Arbeit applizierten ZnO-NP liegen mit einer Größe von 20 nm somit innerhalb dieser Dimensionen. Bei der Co-Injektion der Krebsmedikamente war im Gegensatz zur Konjugation zudem eine bessere Anti-Tumor-Wirkung bei geringerer Medikamentendosis zu beobachten. Ruoslahti (2017) bezeichnet die endozytotische Aufnahme der koadministrierten Substanzen als *bystander effect*, zu Deutsch: Zuschauer effekt.

Bei den Medikamenten, die bisher in Kombination mit iRGD –konjugiert oder koadministriert– in Studien zum Einsatz kamen, handelt es sich um die Zytostatika Doxorubicin und Gemcitabin, Tyrosinkinase-Inhibitoren, monoklonale Antikörper und mit Zytostatika beladene Nanopartikel (bspw. Nab-Paclitaxel) (Ruoslahti, 2017, Kang et al., 2020, Thirumalai et al., 2023). Die Effizienzsteigerung der Wirkstoffe konnte bereits in mehreren Tumorarten nachgewiesen werden, u.a. bei Brustkrebs, Prostatakarzinom, Lungenkrebs, aber auch dem Hepatozellulären Karzinom (Ruoslahti, 2017). Im Mausmodell mit Huh-7-Xenografts konnte der *bystander effect* des iRGD schon nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen war die Anreicherung des koadministrierten Evans Blue Farbstoffs im Tumor nach Injektion von iRGD 2,6-fach erhöht (Schmithals et al., 2015).

2.4.6 iRGD im Anwendungsbereich der onkologischen Bildgebung

Neben der Anreicherung von Krebsmedikation ermöglicht die Applikation von iRGD auch die gezielte Anreicherung von Kontrastmitteln im Tumorgewebe. Dementsprechend hoch ist das Potenzial für einen adjuvanten Einsatz des Peptids in kontrastmittelgestützten Bildgebungsverfahren. Mehrere Studien zeigen eine Erhöhung der MRT-Signalintensität im Tumor durch verstärkte Anreicherung des Kontrastmittels Gd-DTPA bei Konjugation mit iRGD oder zusätzlicher Injektion von iRGD (Schmithals et al., 2015, Xin et al., 2016, Järveläinen et al., 2023). Schmithals et al. (2015) sehen in der klinischen Anwendung von Gd-DTPA-verstärkter MRT zudem eine non-invasiv Methode zur prätherapeutischen Beurteilung der Sensitivität eines Tumors gegenüber iRGD. Auch Sugahara et al. (2009) beschreiben bereits das Potenzial von iRGD hinsichtlich einer Optimierung der Visualisierung von Tumoren, nachdem sie iRGD an Nanowürmer aus Eisenoxid gekoppelt hatten. Sowohl im MRT als auch

in der konfokalen Lasermikroskopie war die ausgeprägtere Akkumulation der iRGD-Nanowürmer im Tumor sichtbar. Zwei weitere Studien, deren Augenmerk ebenfalls auf der konfokalen Lasermikroskopie liegt, belegen die effizientere Tumorpenetration von photolumineszierenden *Quantum dots*, halbleiterbasierten Nanostrukturen, durch Assemblierung mit iRGD oder vorheriger Injektion von iRGD (Przysiecka et al., 2016, Liu et al., 2017a).

2.4.7 Inhibierender Effekt von iRGD auf spontane Metastasierung

Körpereigene Mediatoren wie VEGF, Bradykinin und NO erhöhen die vaskuläre Permeabilität, was einerseits die Anreicherung von Wirkstoffen im Tumor begünstigen kann. Andererseits fördern sie auch die Intra- und Extravasation von Tumorzellen und somit die Metastasenbildung (Fukumura et al., 2006, Tomita et al., 2021). Die anfängliche Sorge, dass dies auch auf das iRGD-Peptid zutreffen könnte, wurde jedoch belegt: in tumortragenden Mäusen, die mit iRGD behandelt worden waren, fanden sich keine makroskopischen Metastasen und auch mittels Immunfluoreszenz und PCR waren keine humanen DNA-Fragmente in anderen Organen nachweisbar (Sugahara et al., 2010). Darüber hinaus konnten Sugahara et al. (2015) in einer späteren Studie sogar eine anti-metastatische Wirkung von iRGD ausarbeiten, welche abhängig ist von der Bindung des CendR-Motivs an NRP-1. Den potenziellen Mechanismus dahinter liefert ein Transwell-Assay, bei dem sich iRGD als Repellent offenbart, welches eine negative Chemotaxis bewirkt und damit die Migration der Tumorzellen verhindert. Hamilton et al. (2015) bekräftigen den anti-metastatischen Effekt, indem sie belegen, dass bereits eine Einzeldosis an iRGD-beschichteten Nanopartikeln die Progression von Brustkrebsmetastasen im Hirn eindämmen kann. Voraussetzung hierfür ist die systemische Applikation in einem frühen Metastasierungsstadium. Bei Konjugation von iRGD an Nanopartikel zeigt sich dieser Effekt statistisch signifikant, während sich bei Verabreichung der freien Form lediglich ein Trend abzeichnet. Die Koinzidenz von Tumorpenetrierender und anti-metastatischer Wirkung machen das iRGD-Peptid zu einem zukunftssträchtigen Agens in der Krebstherapie.

2.4.8 Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Anwendungssicherheit von iRGD

Järveläinen et al. (2023) haben die pharmakokinetischen Eigenschaften von iRGD erstmals untersucht. Sowohl in verschiedenen Tiermodellen als auch bei Patienten mit metastasierendem Pankreaskarzinom wurde iRGD einmalig intravenös appliziert und im Anschluss die Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und den verschiedenen Spezies miteinander verglichen. Dabei imponierte eine rapide Verteilungsphase, gefolgt von einer linearen Elimination mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit bei der Maus von 25 min, beim Menschen von 2 h. Zur Beurteilung der Gewebsverteilung wurde bei Mäusen mit Mammakarzinom unter Anwendung von radiomarkiertem iRGD eine Autoradiographie

durchgeführt, bei der sich nach 30 min eine Anreicherung des Peptids in den meisten Organen sowie dem Tumor zeigte. Nach 3 h war es in fast allen gesunden Geweben eliminiert und nur noch im Darm- und Harntrakt, insbesondere den Nieren nachweisbar, was auf eine überwiegend renale Elimination schließen lässt. Im Tumor hingegen ging von dem Tracer auch nach 3 h noch ein Signal aus, was wiederum die tumorspezifische Wirkung unterstreicht. Eine Anreicherung im zentralen Nervensystem wurde nicht beobachtet, sodass davon auszugehen ist, dass iRGD die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann.

Hinsichtlich der Pharmakodynamik ist zu erwähnen, dass der durch iRGD induzierte tumorpenetrierende Effekt auch nach über 24 noch aktiviert sein soll, was eine verlängerte therapeutische Wirksamkeit begünstigen könnte (Liu et al., 2017b, Järveläinen et al., 2023).

In einer ersten Phase-I-Studie aus Australien erhielten Patienten mit metastasierendem Pankreaskarzinom iRGD als Monotherapie oder in Kombination mit den Chemotherapeutika Gemcitabin und Nab-Paclitaxel. Während dieser ersten Humanstudie konnte keine dosislimitierende Toxizität von iRGD beobachtet werden, was einen klinischen Einsatz des Peptids bekräftigt (Dean et al., 2022).

2.5 Chorion-Allantois-Membran-Assay (CAM-Assay)

2.5.1 Der CAM-Assay als Alternative für Tierversuche

Der Cam-Assay gilt als Bindeglied zwischen Zellkultur und Tiermodell und stellt ein einfaches, kostengünstiges und zeitsparendes *in-vivo*-Modell für präklinische Forschungszwecke dar (Döring, 2017). Beim CAM-Assay werden experimentelle Studien an befruchteten und bebrüteten Vogeleiern durchgeführt, wahlweise *in* oder *ex ovo*. Klassischerweise kommen hierbei Hühnereier zum Einsatz, unlängst erfolgten jedoch auch erste Versuche der Methodenetablierung bei Verwendung von Wachtel- und Straußeneiern (Rasmussen et al., 2021, Pomraenke et al., 2023).

Der CAM-Assay wird laut §7 des deutschen Tierschutzgesetzes als versuchstierfreie Methode gewertet und ermöglicht somit die Handlung nach dem 3R-Prinzip, mit den drei Leitwörtern „*Replacement, Refinement, Reduction*“. Begründer dieses ethischen Handlungsprinzips sind die britischen Wissenschaftler Russel und Burch. Bereits 1959 positionierten sie sich für die Nutzung alternativer Methoden, für eine verringerte Anzahl an Versuchstieren sowie eine Optimierung der Versuchsbedingungen (Russell and Burch, 1959). Die EU-Tierversuchsrichtlinie von 2010 verankert dieses Ethos auch auf europäischer Gesetzesebene (EU, 2010).

Doch obwohl der CAM-Assay hierzulande als Alternative für Tierversuche zählt, wird die gesellschaftliche Kritik an dieser Forschungsmethode größer. Grund dafür ist die Frage nach

dem zeitlichen Einsetzen des Schmerzempfindens beim Hühnerembryo. Zur Beantwortung dieser Frage hat das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft eine Studie in Auftrag gegeben mit folgenden Resultaten: Ab dem embryonalen Entwicklungstag (ED) 16 steigen Blutdruck und Herzfrequenz nach einem mechanischen Reiz signifikant an (Weiss et al., 2023). Eine signifikante Zunahme der Schnabelbewegung nach mechanischem Reiz ab ED15 kann als nozifensiver Reflex gedeutet werden (Suss et al., 2023). Physiologische neuronale Signale sind im EEG ab ED13 messbar, die Fähigkeit zur Nozizeption ab diesem Entwicklungstag also potenziell gegeben (Kollmansperger et al., 2023).

Zusammenfassend kann eine Schmerzempfindung des Hühnerembryos ab ED13 demnach nicht mehr ausgeschlossen werden, sodass in den letzten beiden Tagen eines 14-tägigen CAM-Assays laut aktuellem Forschungsstand keine Schmerzfreiheit gesichert ist. Da die CAM selbst keine Innervation aufweist, ist anzunehmen, dass von lokalen Manipulationen hieran kein noxischer Stimulus hervorgeht (Ribatti, 2016).

2.5.2 Aufbau und Funktionen der CAM

Bei der Chorion-Allantois-Membran handelt es sich um eine embryonal gelegene Membran des befruchteten Vogeleis, die sich unterhalb der Eischale befindet. Gebildet wird sie ab ED3–4 durch Verschmelzung der mesodermalen Schicht der Allantois, dem embryonalen Harnreservoir mit der mesodermalen Schicht des Chorions, der äußeren Fruchthülle. Die CAM selbst ist dreischichtig aufgebaut. Die äußere, zur Eischale gewandte Schicht, wird durch das ektodermale mehrschichtige Chorion-Epithel gebildet. Intermediär liegt das von Gefäßen durchzogene Mesenchym, welches aus der Fusion von Chorion und Allantois hervorgeht. Die innere, zum Embryo gerichtete Schicht, stellt das endodermale Allantois-Epithel dar (Romanoff, 1960). An ED10 ist das Wachstum der CAM weitgehend abgeschlossen, sodass sie die Innenseite der Eischale vollständig auskleidet und sich schließlich bis ED13 auch vollständig differenziert hat (Nowak-Sliwinska et al., 2014, Leeson and Leeson, 1963). Anfangs noch avaskulär, entwickelt sie sich durch Bildung eines komplexen Gefäßnetzwerkes zu einem hochvaskularisierten Gewebe, welches über zwei Arterien und eine Vene mit dem embryonalen Blutkreislauf verbunden ist (Ribatti, 2016).

Die CAM kann als Äquivalent der Plazenta von Säugetieren betrachtet werden und übernimmt mehrere Funktionen während der Entwicklungsphase des aviären Embryos (Makanya et al., 2016). Dazu gehören der Gasaustausch zwischen Embryo und Umgebungsluft, der Calcium-Transport von der Eischale zum Embryo, die Reabsorption von Wasser und Elektrolyten aus der Allantoishöhle sowie die Regulation des Säure-Basen-Haushalts im Embryonalwasser (Gabielli and Accili, 2010).

2.5.3 Tumor-Transplantate im CAM-Assay

Die hohe Gefäßdichte in der CAM liefert optimale Konditionen für die Einsprossung von Blutgefäßen in transferiertes Tumorgewebe. Der Beginn der Tumorangiogenese wird 72 h nach Transplantation beschrieben (Knighton et al., 1977). Auch die natürliche Immundefizienz macht die CAM zu einem idealen Nährboden für Tumortransplantate. Erst zehn bis zwölf Tage nach der Bebrütung beginnen die T- und B-Lymphozyten mit der Differenzierung und das embryonale Immunsystem entwickelt sich allmählich (Janse and Jeurissen, 1991, Jankovic et al., 1975, Fischer et al., 2022). Der zelluläre Immunstatus der bebrüteten Hühnereier im CAM-Assay gleicht dem von immunkomprimierten Mäusen, die als Modell standardmäßig in der Tumorforschung zum Einsatz kommen (Döring, 2017, Li et al., 2017). Die vollständige Immunkompetenz des Hühnerembryos wird erst an ED18 erreicht, sodass während des zweiwöchigen CAM-Assays nicht mit einer Abstoßungsreaktion gegen xenogene Transplantate zu rechnen ist (Garcia et al., 2021, Fischer et al., 2022).

3 Material

3.1 Zelllinie

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um Huh-7-Zellen, gewonnen aus malignen Hepatozyten. Diese sind 1982 aus dem Lebertumor eines 57-jährigen männlichen japanischen Patienten isoliert worden (Nakabayashi et al., 1982). Charakteristisch sind ein epithelähnliches Aussehen sowie ein adhärentes Wachstum der Zellen. Die Zelllinie wurde beim RIKEN BioResource Research Center erworben.

Eine PCR-Untersuchung auf Mykoplasmen hat regelmäßig nach dem Auftauen der kryokonservierten Zellen stattgefunden. Zu keinem Zeitpunkt der Versuche konnte eine Kontamination der Zellen festgestellt werden.

3.2 Hühnereier

Verwendet wurden befruchtete *Lohmann LSL-Classic* Eier mit weißer Schale, die bei dem Geflügelzuchtbetrieb Lohmann Deutschland GmbH & Co. KG (Ankum, Deutschland) bestellt wurden. Die Lieferung durch den Kurierdienst erfolgte i.d.R. zwei Tage vor Versuchsstart. Bis dahin wurden die Eier in einem kühlen Raum aufbewahrt.

3.3 Zinkoxid-Nanopartikel

Die ZnO-NP wurden in Form von Zink(II) Oxid Pulver von der Firma IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, Deutschland) bezogen. Die durchschnittliche Partikelgröße beträgt 20 nm und das Molekulargewicht 81.39 g/mol. Sie wiesen eine sphärische Morphologie auf (siehe Abbildung 6). Das aliquotierte Pulver wurde in sterilem destilliertem Wasser (Aqua dest.) suspendiert und eine Stocklösung angesetzt. Anschließend erfolgte eine Verdünnungsreihe (siehe 4.2.6).

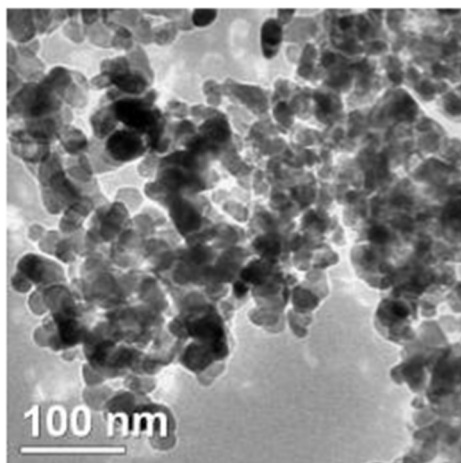


Abbildung 6: Transmissionselektronenmikroskop (TEM)-Bild der ZnO-NP

Quelle: Technical Data Sheet Zinc(II) oxide, Produkt Nr. NO-0011-HP (IoLiTec, 2024)

3.4 iRGD-Peptid

Das *iRGD-Peptid 1 TFA* stammt von der Firma MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA). Es liegt als TFA-Salz vor und hat eine Molekulare Masse von 1064,08 g/mol. Zur Applikation wurde es, entsprechend der gewünschten Konzentration, in sterilem Aqua dest. gelöst (siehe 4.2.6).

3.5 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Albumin Fraktion V, $\geq 98\%$, pulv. für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat $\geq 98\%$, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine Calf Serum, Iron Supplemented, VWR Life Science Seradigm	Avantor Inc. (Radnor PA, USA)
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

DC™ Protein Assay, Reagent A DC™ Protein Assay, Reagent S	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
DC™ Protein Assay, Reagent B	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
DC™ Protein Assay, Reagent S	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DTT (Diethiothreitol)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium, DMEM/F-12 (1:1) (1x)	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Flächendesinfektionsmittel, terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Glycerin ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin, ≥99%, zur Synthese	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Händedesinfektionsmittel, Softa-Man®	B.Braun SE (Melsungen, Deutschland)
iRGD-Peptid 1 TFA	MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
Isopropylalkohol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG (Stuttgart, Deutschland)
Membranmatrix Matrigel®, LDEV-free	Corning, Inc. (Corning NY, USA)
Methanol, Puriss: p.a.	Honeywell International Inc. (Morristown NJ, USA)
Mycoplasmen-Detektionsset, Venor®GeM Classic	Minerva Biolabs® (Berlin, Deutschland)
Natriumchlorid ≥99,8%, mit Antibackmittel	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter, 10 bis 180 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Penicillin/Streptomycin, 10.000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, PhosSTOP™ EASYpack	Roche Holding (Basel, Schweiz)
Proteasehemmer-Cocktail, EDTA-frei, cOmplete™	Roche Holding (Basel, Schweiz)
Salzsäure ROTIPURAN® 37 %, p.a., ISO, max. 0,005 ppm Hg, rauchend	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
SDS ultrapure ≥99,5%; für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Steriles Aqua dest., Aqua ad injectabilia, 50 ml, Lösungsmittel zur Herstellung von Parenteralia	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)

TEMED ≥99 %, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12 %	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
TRIS, PUFFERAN® ≥99,9%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Trypsin-EDTA Solution, 10x, 5 g porcine trypsin and 2 g EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Tween® 20, Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Wasser, für Molekularbiologie, 18 Megaohm	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Western Lightning® Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus Oxidizing Reagent Plus	PerkinElmer Inc. (Waltham MA, USA)
ZnO-Nanopartikel	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, Deutschland)
Zinc Assay Kit (Colorimetric), # NBP3-24548	Novus Biologicals USA (Centennial, CO, USA)

Unsteriles Aqua dest wurde aus der klinikeigenen Leitung entnommen und für die Anwendung im CAM-Assay (siehe 4.2) autoklaviert.

3.6 Laborgeräte

Tabelle 2: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Absaugsystem mit Vakuumpumpe, VACUSAFE	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Autoklav, Tuttnauer Systec	Systec GmbH (Linden, Deutschland)
Bestrahlungseinheit Gammacell 2000, Quelle: Cs ¹³⁷	Mølgaard Medical (Risø, Dänemark)
Blotting-Roller	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
Brutmaschine, Modell 3000/d ohne Wendung	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH (Hammelburg, Deutschland)
Brutschrank, Thermo HERAcCell 150i Double CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Cell Freezing Container, CoolCell	Biocision (Larkspur CA, USA)
Eismaschine	Intercontinentale Ziegler Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
Gefrierschrank, -20 °C	Robert Bosch GmbH (Gerlingen, Deutschland)
Gefrierschrank, Hera freeze™, -80 °C	Heraeus (Hanau, Deutschland)

Gel-Elektrophorese Kammer inklusive Gelplatten mit festen Abstandshaltern (1,0 mm) und Silikondichtung (1,0 mm), Probenkamm und Klammern	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Kühlschrank, +8 °C	Liebherr-International S.A. (Bulle, Schweiz)
Laborabzug nach DIN 12924	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, Deutschland)
Magnetrührer, Fisherbrand™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Magnetrührer, MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Mikroliterspritze, MICROLITER™, 50 µl	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Mikroskop Nikon TMS, Inverted Phase Contrast Microscope	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Mikroskop, Orthoplan Durchlichtmikroskop	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Mini-Zentrifuge	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Multipipette, Eppendorf Multipette® Plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Operationsmikroskop, OPMI® pico	Carl Zeiss Meditec AG (Jena, Deutschland)
Photometer, Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Pipettierhilfe, PIPETBOY	INTEGRA Bioscience Deutschland GmbH (Biebertal, Deutschland)
Pipette, Eppendorf Reference® 0,5-10 µl 2-20 µl 10-100 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage Kern, PCB8000-1	Kern und Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Sicherheitswerkbank, HERAsafe®	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG (Hanau, Deutschland)
Stickstofftank, Nitrogen-tank CRYO-4000	Chart Ind. (Burnsville MN, USA)
Tankblot, Eco Mini Buffer Tank EB	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Thermoschüttler, Thermomixer Komfort 535	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, Fisher Bioblock Scientific Top-Mix 11118	Fisher Scientific GmbH (Schwerte; Deutschland)
Wärmewasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik) GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Zählkammer, Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (LaudaKönigshofen, Deutschland)
Zentrifuge, Thermo Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Zentrifuge, Thermo Scientific™ Multifuge X4 Pro	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Zentrifuge, Universal 16 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)

Verwendete Scheren, Pinzetten und Spatel sind im Vorhinein autoklaviert worden.

3.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-Well Zellkulturplatte, Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific (Roskilde, Dänemark)
Abwurfsammelbehälter für Aufziehkanülen	P.J. Dahlhausen und Co. GmbH (Köln, Deutschland)
Aufziehkanülen, Microlance™ 3, steril 21 G	Becton, Dickinson and Company (Fraga, Huesca, Spanien)
Einwegskalpell No.11	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd. (Osaka, Japan)
Einwegspritzen 10 ml	Becton, Dickinson and Company (Fraga, Huesca, Spanien)
Feindosierungsspritzen 1 ml, Omnican® F	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Fixierpflaster, Leukopor® 1,25 cm x 9,2 m 2,5 cm x 9,2 m	BSN medical GmbH (Hamburg, Deutschland)
Nitril Handschuhe, SensiCare®Ice	Medline International Germany GmbH (Kleve, Deutschland)
Klebefolie, tesafilm®	Beiersdorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, Deutschland)
Labor-Verpackungsfolie, Bemis™ Curwood Parafilm™ "M"	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)

Mikroreaktionsgefäß, Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikrotestplatten, ROTILABO®	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Mikrotiterplatten, CellStar® 96-Well	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Multipipette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Multipipettenspitzen, Combitips® advanced 1 ml 5 ml 10 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pasteurpipetten, Pastette®, unsteril 3 ml	Alpha Laboratories Limited (Eastleigh, Hampshire, Vereinigtes Königreich)
Pasteurpipetten aus Glas	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Petrischalen aus Polystyrol 94/16 mm 145/20 mm	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen 0,5-10 µl 20 µl 200 µl 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark GmbH (Koblenz, Deutschland)
Serologische Pipetten, CELLSTAR®, steril 5 ml 10 ml 25 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Silbernitrat-Kaliumnitrat Ätzstäbchen	BANO Healthcare GmbH (St. Anton/ Arlberg, Österreich)
Zellkulturflaschen, CELLSTAR® TC steril, filter-Schraubverschluss 25 cm ² 75 cm ² 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellschaber, 280 mm	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen, CELLSTAR® konischer Boden, Schraubverschluss, steril 15 ml 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Die Pipettenspitzen, Mikroreaktionsgefäße und Pasteurpipetten sind vor der Benutzung autoklaviert worden.

3.8 Zellkulturmedium, Puffer und Zusätze

3.8.1 Zellkulturmedium

Einer 500 ml Flasche *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) wurden 5% v/v fetales Kälberserum (FCS) und 2% v/v Penicillin/Streptomycin (P/S) hinzugefügt (im Folgenden als DMEM+ bezeichnet). Alle drei Bestandteile waren zuvor im Wasserbad für mind. 30 Minuten erwärmt worden. Die Lagerung des DMEM+ erfolgte bei 8°C, weshalb es vor jeder weiteren Benutzung für ca. 20 Minuten im Wasserbad erwärmt wurde. Zu ersten Kultivierung der Zellen nach dem Auftauen wurde DMEM mit 10% FCS und 2% P/S verwendet, um ein stärkeres Wachstum zu erzielen.

3.8.2 Puffer für die Zn-Messung

Laemmli-Puffer (1-fach Lysepuffer)

Für 500 ml:

- 3,8 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) = 63mM
- 0,5 g Natriumdodecylsulfat (SDS) = 1%

ad 500 ml Wasser für Molekularbiologie, pH 7,0 eingestellt

Nach dem Aliquotieren in 50 ml Falcons Hinzugabe von:

- 1 Tablette cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail pro 50 ml

3.8.3 Puffer für die SDS-Page

Ladepuffer (4-fach)

Für 100 ml:

- 43,6 ml Aqua dest.
- 10 ml (=400 mM TRIS-HCl mit einem pH von 7,25) (2 M Stammlösung)
- 4 g SDS = 8%
- 46,4 ml Glycerin

Ladepuffer (1-fach)

Für 20 ml:

- 15 ml Aqua dest.
- 5 ml Vierfach-Lysepuffer
- 1/2 Tablette, cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail
- 2 Tabletten. PhosSTOP™ EASYpack, Phosphatase Inhibitor Cocktail

Elektrophoresepuffer (5-fach)

Für 100 ml:

- 3 g TRIS = 2,5 mM
- 14,4 g Glycin = 19 mM

Elektrophoresepuffer (1-fach)

Für 500 ml:

- 100 ml Elektrophoresepuffer (5-fach)
- 5 ml 10 % SDS

ad 500 ml Aqua dest.

3.8.4 Puffer für den Western Blot

Transferpuffer für Tank Blot (5-fach)

Für 1000 ml:

- 15,17 g TRIS = 124 mM
- 72,9 g Glycin = 1060 mM

ad 1000 ml Aqua dest.

Transferpuffer für Tank Blot (1-fach)

Für 1000 ml:

- 200 ml Transferpuffer (5-fach)
- 200 ml Methanol = 20 %
- 600 ml kaltes Aqua dest.
- 3,7 ml 10 % SDS = 0,037 %

Tris-Buffered Saline (TBS, 10-fach)

Für 1000 ml:

- 24,2 g TRIS = 200 mM
- 80 g NaCl = 1,4 M

ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,6 eingestellt

Waschpuffer TBST₂₀ (1-fach)

Für 1000 ml:

- 100 ml TBST (10-fach)

- 900 ml Aqua dest.
- 1 ml Tween® 20 = 0,1 %

Stripping-Puffer

Für 1000 ml:

- 1,876 g Glycin = 25 mM

ad 1000 ml Aqua dest., pH 2,0 eingestellt

1 % SDS-Lösung

Für 1000 ml:

- 10 g SDS = 1%

ad 1000 ml Aqua dest.

3.9 Software

Tabelle 4: Software

Software	Hersteller
BioRender	Science Suite Inc. (Toronto, ON, Kanada)
EndNote 20	Clarivate Analytics (Boston, MA, USA)
GraphPad Prism 10	Graphpad Software, Inc (Boston, MA, USA)
Image Lab	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
Microsoft 365, <i>Version 2503</i>	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt, um das Risiko einer mikrobiellen Kontaminationen zu minimieren.

4.1.1 Auftauen der Zellen

Das aus dem Stickstofftank entnommene Huh-7-Kryoröhrchen wurde zunächst unter warmes Leitungswasser gehalten, bis der Inhalt aufgetaut war. Anschließend erfolgte zügig die Weiterverarbeitung an einer Sicherheitswerkbank, um Zellschäden durch das bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkenden Frostschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) so gering wie möglich zu halten. Dafür wurden die Huh-7-Zellen gemeinsam mit 8 ml DMEM+ in

ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, welches im Anschluss bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 min bei 21 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein Becherglas abgekippt und das verbliebene Zellpellet mithilfe einer Pipettierhilfe sowie einer serologischen 10 ml Pipette in 5 ml DMEM+ resuspendiert. Es folgte die Aussaat in eine 175 cm² große Zellkulturflasche, in der bereits 20 ml Medium vorgelegt waren. Mittels horizontaler, schiebender Bewegungen wurden die Zellen gleichmäßig auf dem Boden der Zellkulturflasche verteilt und dann im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

4.1.2 Makro- und mikroskopische Betrachtung

Immer am Tag nach einer Aussaat wurden die Zellkulturflaschen lichtmikroskopisch begutachtet, wobei kontrolliert wurde, ob die Zellen möglichst gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt waren. Auch im weiteren Verlauf der Kultivierung erfolgte mindestens alle drei Tage unter dem Lichtmikroskop die Beurteilung des Zellwachstums, mit besonderem Augenmerk auf die Zelldichte. Bei einer Konfluenz von 70–90% konnten die Zellen passagiert werden.

Die Farbe des Nährmediums wurde makroskopisch bewertet. Ein erhöhter Nährstoffverbrauch führte zu einer Ansäuerung des Mediums. Der enthaltene pH-Indikator zeigte folglich einen Farbumschlag von Rot nach Orange. In dem Fall wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt.

4.1.3 Zellpassage

Zunächst wurde das verbrauchte Nährmedium dekantiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit 10 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen und auch dieses abgekippt. Nun erfolgte die Zugabe von 5 ml einfach-konzentrierter Trypsin/EDTA-Lösung (TE), die mit Schwenkbewegungen gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt wurde. Für 3-5 min kam die Zellkulturflasche dann in den Inkubator, um die enzymatische Aktivität des Trypsins zu verstärken. Durch seitliches Klopfen wurde das Ablösen der Zellen von dem Flaschenboden ermöglicht. Es folgte die zügige Zugabe von 8 ml DMEM+ um weitere Proteolyse zu inhibieren. Das gesamte Volumen der Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm und 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Anschluss mit 8 ml DMEM+ resuspendiert. In eine 175 cm² Zellkulturflasche wurden 23 ml DMEM+ vorgelegt und 2 ml dieser Zelllösung beigemischt. Die Zellpassagierung schließt mit der Platzierung der Zellkulturflasche im 37 °C warmen Brutschrank ab.

4.1.4 Erstellung der 3D-Kulturen

An Tag 6 des CAM-Assays (siehe 4.2) wurden die 3D-Kulturen erstellt, mit denen die CAM am Folgetag besiedelt werden sollte. Für die Erstellung einer einzelnen 3D-Kultur wurden jeweils

5 Mio. Huh-7-Zellen benötigt. Um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Huh-7-Zellen im Vorhinein über mehrere Passagen expandiert. An Tag 0 erfolgte dabei die Aussaat der Zellen auf 4–6 175 cm² Zellkulturflächen. An Tag 3 wurden die Zellen weiter passagiert und auf Petrischalen ausgesät. Für rund 60 3D-Kulturen waren 25 konfluente 145 cm² Petrischalen erforderlich.

Die Bearbeitung der Petrischalen erfolgte zeitlich versetzt in zwei Durchgängen, wobei in jedem Durchgang jeweils die Hälfte der Petrischalen bearbeitet wurde. Es erfolgte die Zugabe von 3 ml TE und nach 3-5 min im Inkubator konnten die Zellen durch seitliches Klopfen vom Boden gelöst werden. Rasch wurden 3 ml DMEM+ beigefügt, die Zellen in dieser Lösung resuspendiert und in mehrere 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 1500 rpm für 5 min wurde der Überstand abgekippt, die Zellpellets mit je 5 ml DMEM+ aufgenommen, in ein einzelnes Zentrifugenröhrchen überführt und der Inhalt auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Nun erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (0,4%) gemischt und die Zählkammer damit benetzt. Es wurden immer die vitalen (nicht blau gefärbten) Zellen in mind. zwei schräg gegenüberliegenden Eckquadraten gezählt und die Zellzahl im Anschluss mit folgender Formel berechnet:

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

Da jede 3D-Kultur 5 Mio. Zellen enthalten sollte, wurde die Gesamtzellzahl durch 5 Mio. dividiert. Das Ergebnis war die Menge an Zellkulturmedium, mit dem das Zellpellet nach erneutem Zentrifugieren resuspendiert werden musste, um eine Stocklösung von 5 Mio. Zellen pro ml zu erhalten. Je 1 ml dieser Zelllösung wurde in je ein 1,5 ml Eppendorf Mikroreaktionsgefäß (Eppi) gefüllt und diese wurden dann bei 1400 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellpellet mit 20 µl Matrigel, welches auf Eis gelagert war, unter rührenden Bewegungen resuspendiert. Dieser Schritt musste zügig erfolgen, da sich das Matrigel bei Raumtemperatur schnell verfestigt. Das Gemisch an Zellsuspension und Matrigel, welches die 3D-Kultur bildet, konnte nun punktuell auf eine 6-Well-Platte pipettiert werden. Pro Well wurden dabei maximal vier 3D-Kulturen aufgetragen. Im Brutschrank konnten diese 30 min lang fest werden, ehe zum Abschluss 2,5 ml DMEM+ in jede Vertiefung beigefügt wurden und die Platte über Nacht im Brutschrank gelagert wurde.

4.1.5 Kryokonservierung

Bei Bedarf wurden die Huh-7-Zellen in möglichst niedrigen Passagen kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen nach dem unter 4.1.3 beschriebenen Protokoll vom Boden der

Zellkulturflasche abgelöst und zentrifugiert. FCS wurde mit 10% v/v DMSO vermischt und das Zellpellet mit dieser Lösung aufgenommen und resuspendiert. In die Kryoröhrchen wurde je 1 ml dieser Zelllösung gegeben und diese anschließend in einem CoolCell® Behälter bei -80 °C um ein Grad Celsius pro Minute heruntergekühlt. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

4.2 CAM-Assay

Beim durchgeführten CAM-Assay handelte es sich um ein 14-tägiges Experiment mit Beginn an Tag 0. Einen schematischen Überblick über den Ablauf zeigt Abbildung 7. Aus Huh-7-Zellen wurden zunächst 3D-Kulturen erstellt und befruchtete Hühnereier mit diesen besiedelt. Die Eier, die einen eingewachsenen Tumor aufwiesen, erhielten an Tag 13 eine Injektion von wahlweise ZnO-NP, iRGD, ZnO-NP+iRGD oder Aqua dest. An Tag 14 endete der CAM-Assay mit der Entnahme der Tumore, die im weiteren Verlauf für eine Messung der freien Zinkkonzentration verwendet werden sollten.

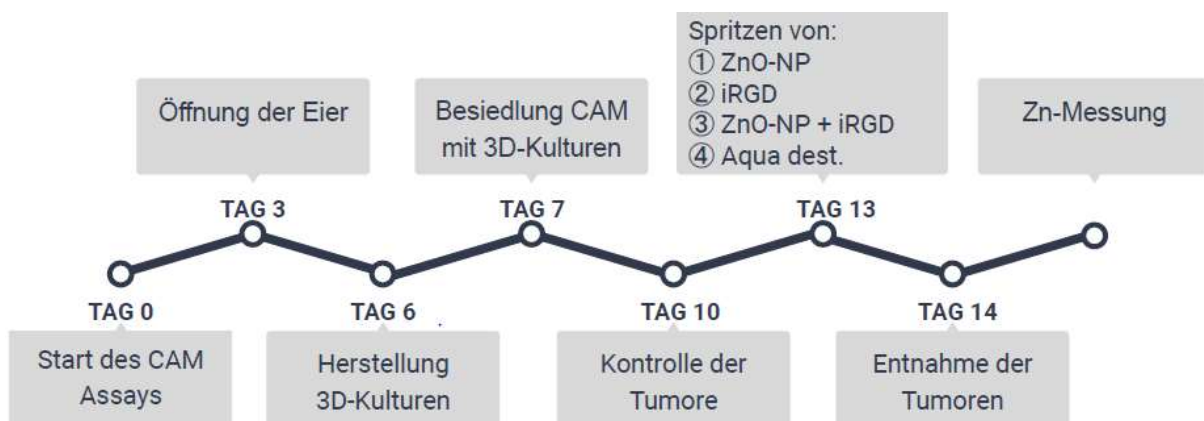


Abbildung 7: Ablauf CAM-Assay

4.2.1 Bestückung des Brutkastens

An Tag 0 wurden zunächst alle Verunreinigungen auf den Eiern mittels eines Präzisionswischbuchs und autoklaviertem Aqua dest. entfernt. Anschließend wurden die gesäuberten Eier waagrecht in die Brutmaschinen einsortiert und oben markiert. Die Brutmaschinen sind zuvor desinfiziert und die dazugehörigen Wasserrinnen mit autoklaviertem Aqua dest. befüllt worden. Die Inkubation erfolgte bei 38 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Pro Versuch wurden i.d.R. zwei Brutkästen mit insgesamt 70 Eiern bestückt.

4.2.2 Öffnen der Eier

An Tag 3 erfolgte die Öffnung der Eier. Maximal drei Eier wurden hierbei gleichzeitig aus der Brutmaschine entnommen und in einer Eierschachtel positioniert. Dann wurde zuerst mit einer 21 G Kanüle ein Loch am stumpfen Pol der Eier gebohrt und die Kanüle mit der Öffnung nach unten schauend, schräg nach unten eingeführt. Mit einer 10 ml-Einwegspritze wurden anschließend 6 ml Eiweiß entzogen, dieses in ein Becherglas verworfen und die Punktionsstelle mit einem Klebefilm verschlossen.

Ein breites und beidseits jeweils ein schmales Vliespflaster wurden längs auf die markierte Oberseite des Eies geklebt, um die Eierschale zu stabilisieren. Im Folgenden wurde das Ei mit einer autoklavierten Schere fenestriert. Anhand des kleinen Sichtfensters konnte nun kontrolliert werden, ob das Ei befruchtet war oder nicht (siehe Abbildung 8). Unbefruchtete Eier wurden verworfen, alle befruchteten mit Parafilm® verschlossen und in den Brutkasten zurückgelegt.



Abbildung 8: Befruchtetes Ei (Tag 3)

Am dritten Entwicklungstag wird in den befruchteten Eiern ein sich formendes Blutgefäßsystem sichtbar und auch das Herz ist bereits erkennbar und kontrahiert rhythmisch.

4.2.3 Vitalitäts- und Kontaminationskontrolle

Die Vitalität der Hühnerembryonen wurde werktäglich überprüft. Avitale Embryonen wurden unverzüglich aus dem Brutkasten entfernt. Zudem wurden die Eier auf Schimmelpilzbefall kontrolliert. Sichtbare Schimmelpilzsporen traten meist zunächst im Randbereich der Öffnung auf und befahlen im weiteren Verlauf den transferierten Tumor. Durch ein Wegschneiden der befallenen Eierschale sowie einer punktuellen Desinfektion mit Terralin® konnte eine weitere Ausbreitung des Schimmelpilz-Myzels oft verhindert werden. Eier, deren Tumore mit Schimmel befallen waren, wurden verworfen. Die Wasserrinnen wurden an Tag 3, 7 und 10 immer mit frischem autoklaviertem Aqua dest. befüllt.

4.2.4 Besiedlung der CAM

An Tag 7 erfolgte die Besiedlung der CAM mit der 3D-Kultur. Die Eier wurden hierfür einzeln oder paarweise entnommen und im ersten Schritt die Öffnung mit einer Schere erweitert. Als zweites wurde nun eine geeignete Stelle auf der CAM ausfindig gemacht, auf der die 3D-Kultur platziert werden sollte. Gewählt wurde im Idealfall ein kleines, möglichst zentral gelegenes Blutgefäß. Mit einem kompaktierten fussselfreien Präzisionswischtuch wurde an der Stelle zunächst der Flüssigkeitsfilm entfernt. Durch dieses „Antrocknen“ der CAM konnte nicht nur ein Verrutschen des Tumors verhindert, sondern auch bereits eine kleine Blutung provoziert werden. Bei Bedarf wurde die Blutung mit einem Einwegskalpell verstärkt. Mit Hilfe eines Spatels wurde die 3D-Kultur aus der 6-Well-Platte aufgenommen und auf die gewünschte Stelle transferiert. Zum Abschluss wurden 20 µl Matrigel darauf pipettiert, um das Wachstum der Tumorzellen zu fördern und ein Austrocknen zu verhindern. Ziel ist es gewesen, dass die Tumore in den darauffolgenden Tagen einen Anschluss an das Gefäßsystem der CAM entwickelten.

4.2.5 Kontrolle des Tumoreinwuchs

Die finale Beurteilung des Einwuchs der Tumore in die CAM erfolgte am Morgen von Tag 13. Ein nicht eingewachsener Tumor zeigte sich plan, matt und gräulich. Eingewachsene Tumore hingegen waren erhaben, hatten eine glänzende weißliche Optik und wirkten zum Teil blasig. Auch kleine Einblutungen im Randbereich der eingewachsenen Tumore waren möglich. Die Eier mit den Tumoren, die nicht eingewachsen schienen, wurden verworfen. Die Eier mit den inokulierten Tumoren wurden nochmals in die zwei Kategorien „mäßig eingewachsen“ und „gut eingewachsen“ unterteilt (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9: Beurteilung des Tumoreinwuchs

Beim linken Ei erscheint der Tumor nicht eingewachsen. Das mittlere Ei weist einen „mäßig eingewachsenen“ Tumor auf, das rechte Ei einen „gut eingewachsenen“ Tumor. Die Bildaufnahmen wurden an Tag 12 angefertigt.

4.2.6 Intravaskuläre Applikation von ZnO-NP und iRGD

An Tag 14 fand die Injektion in das Gefäßsystem der CAM statt. Dafür wurde die Öffnung der Eier nochmals vergrößert. Im Sinne einer stratifizierten Randomisierung erfolgte die zufällige Einteilung der Eier beider Tumoreinwuchs-Kategorien in die drei Interventionsgruppen „ZnO-NP“, „iRGD“, „ZnO-NP + iRGD“ und eine Kontrollgruppe, die steriles Aqua dest. erhalten sollte.

Die aliquotierten ZNO-NP wurde zunächst in sterilem Aqua dest. gelöst, um eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml. Die Stocklösung wurde auf dem Vortex gründlich durchmischt und 5 min im Ultraschallbad platziert. Die Stocklösung wurde einer Verdünnungsreihe (Tabelle 5) durchzogen, um eine Konzentration von 0,9 mg/ml zu erhalten.

Tabelle 5: Verdünnung der ZnO-NP

	Konzentration ZnO	Volumen ZnO-NP Suspension	Volumen Aqua dest.
Stocklösung	10,0 mg/ml	<i>Einwaage</i>	<i>Einwaage</i>
Verdünnung 1	1,8 mg/ml	300 µl	1.367 µl
Verdünnung 2	0,9 mg/ml	800 µl	800 µl

Auch das pulverförmige iRGD-Peptid wurde in sterilem Aqua dest. gelöst und anschließend mehrfach verdünnt, bis es in einer Konzentration von 8 µmol/ml vorlag (Tabelle 6). Die Konzentration von 8 µmol/ml basierte auf der im *Data Sheet* vom Hersteller angegebenen Dosis von 4 µmol/kg (MedChemExpress, 2024). Ein durchschnittlich 60 g schweres Ei sollte demnach eine Stoffmenge von 0,24 µmol erhalten (4 µmol/kg x 0,06 kg = 0,24 µmol). Das entspricht bei einem Injektionsvolumen von 30 µl (0,03 ml) einer benötigten Konzentration der iRGD-Peptidlösung von 8 µmol/ml (8 µmol/ml x 0,03 ml = 0,24 µmol). Restbestände der iRGD-Stocklösung (16 µmol/ml) wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zur nächsten Nutzung gelagert.

Tabelle 6: Verdünnung iRGD

	Konzentration	iRGD	Volumen Aqua dest.
Stocklösung	16 µmol/ml	10 mg iRGD	588 µl
Verdünnung	8 µmol/ml	<i>z.B. 225 µl iRGD-Lösung</i>	<i>225 µl</i>

Für die kombinierte Gruppe „ZnO-NP + iRGD“ wurde zunächst eine Stocklösung aus den ZnO-NP mit einer Konzentration von 20 mg/ml hergestellt. Es folgte eine Verdünnung dieser Lösung hinzu 1,8 mg/ml. Aus dieser Lösung wurden je nach Bedarf bspw. 225 µl entnommen und mit dem gleichen Volumen an iRGD-Stocklösung (16 µmol/ml) vermischt. Dies ergab eine Suspension, deren Konzentration an ZnO-NP und iRGD denen der jeweiligen Einzelgruppen entsprach, d.h. 0,9 mg/ml ZnO-NP und 8 µmol/ml iRGD.

Um das Totraumvolumen auszugleichen, wurden pro zu injizierendem Ei 50 µl Lösung vorbereitet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass z.B. mit einer Gesamtmenge von 500 µl Lösung mindestens 10 Eier injiziert werden konnten. Für jede Gruppe von Eiern, die eine ZnO-NP-Suspension erhielten, wurde die ZnO-NP-Stocklösung unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt und innerhalb von einer Stunde vollständig verbraucht.

Die intravaskuläre Applikation (siehe Abbildung 10) fand unter Nutzung eines OP-Mikroskops mit 12,5x Vergrößerung statt. Injiziert wurden je 30 µl der zugeordneten Lösung in ein mittelgroßes Gefäß der CAM. Genutzt wurde hierfür eine 1 ml-Feindosierungsspritze mit einer integrierten 30 G Kanüle, die zur einfacheren Applikation vorgebogen wurde. Die entstandene Blutung konnte mit einem Silbernitrat-Kaliumnitrat-Ätzstäbchen gestillt werden.

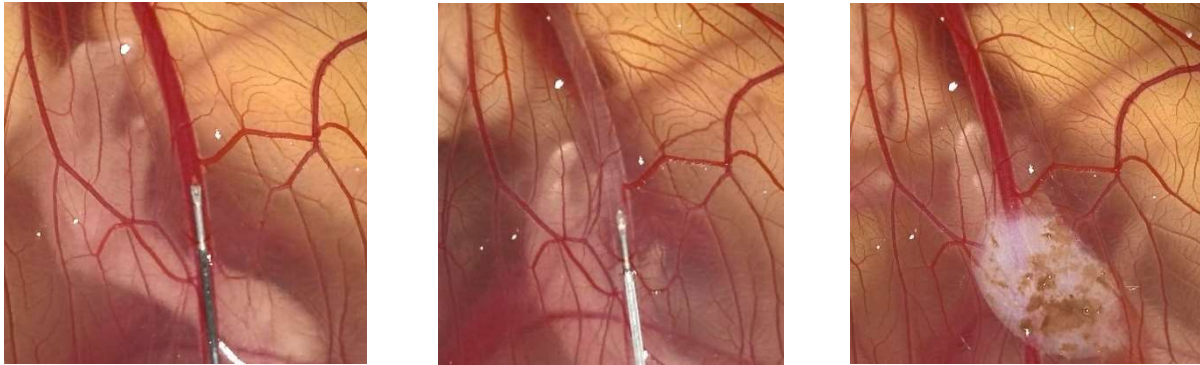


Abbildung 10: Ablauf der intravenösen Applikation

Auf dem linken Bild zu sehen ist die Einführung der Kanüle in ein geeignetes Gefäß der CAM, auf dem mittleren Bild die Verdrängung des intravasalen Blutes während der Applikation der Lösung und auf dem rechten Bild die Injektionsstelle nach erfolgter Ätzung. Die Bilder entstammen einer Videoaufnahme mit dem OP-Mikroskop.

4.2.7 Tumorentnahme

18 h nach der Injektion wurden die Tumore entnommen. Hierfür wurde die Eierschale zunächst beidseits quer eingeschnitten und aufgebrochen. Der Inhalt des Eies wurde in eine Petrischale transferiert und der Embryo zügig durch Dekapitation getötet. Nun wurde der Tumor herausgetrennt und das CAM-Gewebe am Tumorrand möglichst präzise entfernt. Der Tumor wurde kurz in Aqua dest. geschwenkt, um verbliebene Blutreste sanft auszuwaschen, und anschließend in ein bereits gewogenes 2 ml Eppi überführt. Zügig wurde das Füllgewicht bestimmt, das Eppi anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und am Folgetag in einen Gefrierschrank mit -80 °C gelagert. Durch Subtraktion des Leergewichts vom Füllgewicht des Eppis konnte das jeweilige Tumorgewicht ermittelt werden.

4.2.8 Zeit- und Dosisreihe

In einem Vorversuch war zunächst der optimale Zeitpunkt für die Tumorentnahme ermittelt worden. Hierfür wurde die Zinkkonzentration im Tumorgewebe bei Entnahme nach 6 h, 12 h und 18 h bestimmt. Den Eiern dieser drei Gruppen waren zuvor „ZnO-NP (0,9 mg/ml) + iRGD (8 μ mol/ml)“ oder „Aqua dest.“ injiziert worden. Eine Entnahme der Tumore 18 h nach der Injektion schien folgerichtig am günstigsten (siehe Abbildung 11).

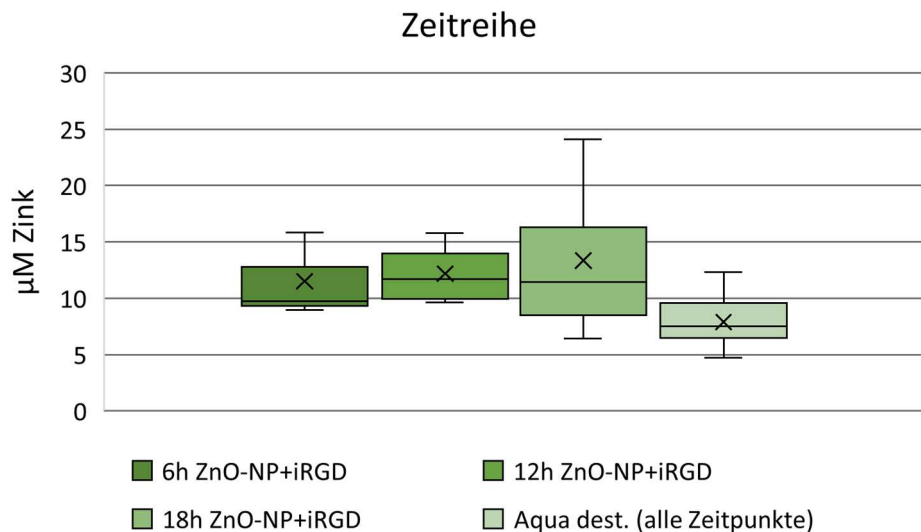


Abbildung 11: Zeitreihe

Boxplots der Zinkkonzentration in den lysierten Tumorproben (μ M Zn), die 6, 12 oder 18 Stunden nach Injektion von ZnO-NP+iRGD oder Aqua dest. explantiert wurden. Der Strich markiert den Median, das Kreuz den Mittelwert (n=23).

Um gegebenenfalls die benötigte Menge an iRGD verringern zu können, war vorweg eine Dosisreihe durchgeführt worden. Es erfolgte die intravaskuläre Applikation von ZnO-NP in Kombination mit wahlweise 8 μ mol/ml, 4 μ mol/ml und 0 μ mol/ml iRGD, während Aqua dest. in der Kontrollgruppe verwendet wurde. Der Tumor wurde nach 18 h explantiert und die darin befindliche Zinkkonzentration bestimmt. Die Konzentration von 8 μ mol/ml iRGD hat sich als die am besten geeignete für die Versuchsbedingungen erwiesen (siehe Abbildung 12). Neben der Bestimmung der Zinkkonzentration wurden sowohl in der Zeit- als auch in der Dosisreihe die Tumorgewichte sowie die Proteingehalte erfasst, um eine Normalisierung der Werte zu ermöglichen. In den dargestellten Abbildungen sind diese Daten jedoch nicht aufgeführt.

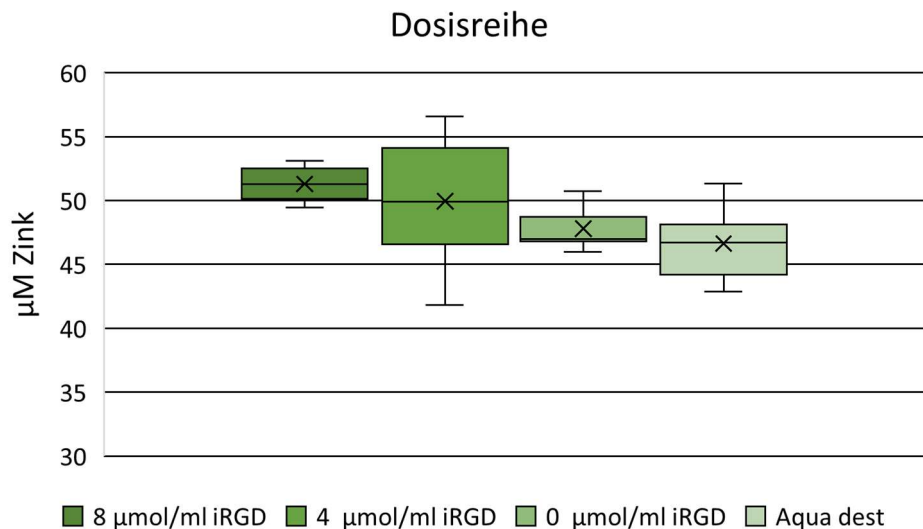


Abbildung 12: Dosisreihe

Boxplots der Zinkkonzentration ($\mu\text{M Zn}$) in den lysierten Tumorproben nach Injektion von 8, 4 oder 0 $\mu\text{mol/ml}$ iRGD sowie Aqua dest. Der Strich markiert den Median, das Kreuz den Mittelwert ($n=28$). In der Dosisreihe traten die höchsten Zinkkonzentrationen auf, die im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurden.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration der ZnO-NP basiert auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Die gewählte Konzentration von 0,9 mg/ml ZnO-NP basiert ursprünglich auf der Arbeit von Buhr et al. (2021) und entspricht in der verabreichten Menge von 30 μl etwa einem Drittel des LD_{50} -Werts.

4.3 Messung der Zinkkonzentration

4.3.1 Lyse des Tumorgewebes

Die CAM-Tumorproben wurden zunächst auf Eis aufgetaut und dann die fünffache Menge des Tumorgewichts in mg an Laemmli-Puffer in μl hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proben in drei Zyklen für je 30 s mit dem Ultraschallstab lysiert, bei einer Amplitude von 85% und einem *pulse* von 0,5 s. Nach jeder Probe wurde der Stab mit Ethanol desinfiziert und einem Tuch abgetrocknet, um Kontamination zu vermeiden. Bei 4° C wurden die Lysate anschließend bei 14 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppi überführt und daraus wiederum 20 μl für die Proteinbestimmung in ein 0,5 ml Eppi transferiert, in dem bereits 80 μl Laemmli-Puffer vorgelegt waren (1:5 verdünnt). Die Tumor-Lysate wurden stets auf Eis gelagert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C weggefroren.

Nach der Zelllyse verblieb in einigen Proben ein unauflösender Geweberest im Eppi. Um dessen Beschaffenheit zu überprüfen, wurde exemplarisch ein Quetschpräparat angefertigt. Das Präparat wurde mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

4.3.2 Proteinbestimmung

Um später den Zinkgehalt der Tumorproben auf das darin enthaltene Protein beziehen zu können, wurde eine quantitative Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Zuerst wurden Standard-Lösungen zur Erstellung einer Eichgeraden angesetzt. Dafür wurde bovines Serumalbumin (BSA) in Laemmli-Puffer in aufsteigender Konzentration verdünnt (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 mg/ml) und je 5 µl dieser Standardkonzentrationen immer in vier nebeneinanderliegenden Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Auch die 1:5 verdünnten Tumorlysate aus 4.3.1 wurden zu je 5 µl immer in vier Wells pipettiert, um eine Vierfachbestimmung zu ermöglichen. Die Bestückung der 96-Well-Platte wurde auf einer Vorlage sorgfältig dokumentiert (siehe Abbildung 13). Nun wurden *Protein Assay Reagent A* und *S* im Verhältnis 1:50 miteinander vermischt und mit einer Multipipette jeweils 25 µl dieser entstandenen Lösung *A'* den Wells beigefügt, sowie anschließend 200 µl des *Protein Assay Reagent B*. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die bestückte 96-Well-Platte in das Photometer eingesetzt, kurz geschüttelt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Sowohl der Mittelwert der Extinktionswerte als auch die Standardabweichung wurden bestimmt. Einzelne stark abweichende OD-Werte wurden eliminiert und Proben mit einer Standardabweichung von über 10% nachgemessen. Zur Ermittlung des Proteingehalts, wurde die Extinktion der Proben mit der BSA-Eichgeraden verglichen (siehe Abbildung 14).

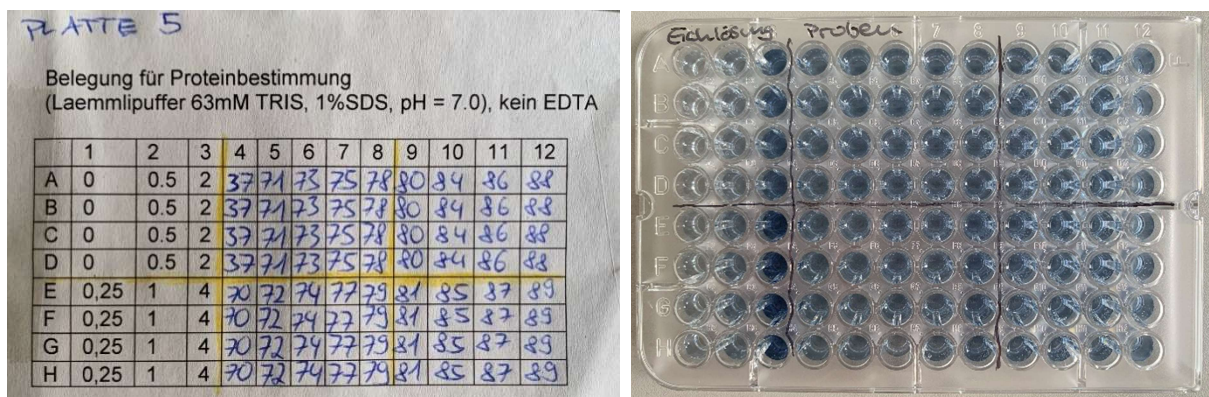


Abbildung 13: Belegung der 96-Well-Platte für Proteinbestimmung

Links: Ausgefüllte Vorlage für die Belegung einer 96-Well-Platte. In Spalte 1, 2 und 3 werden die BSA-Eichlösungen aufgetragen, in Spalte 4–12 die Tumorproben.

Rechts: Der Farbgradient der Eichlösungen in aufsteigender Konzentration ist deutlich zu erkennen.

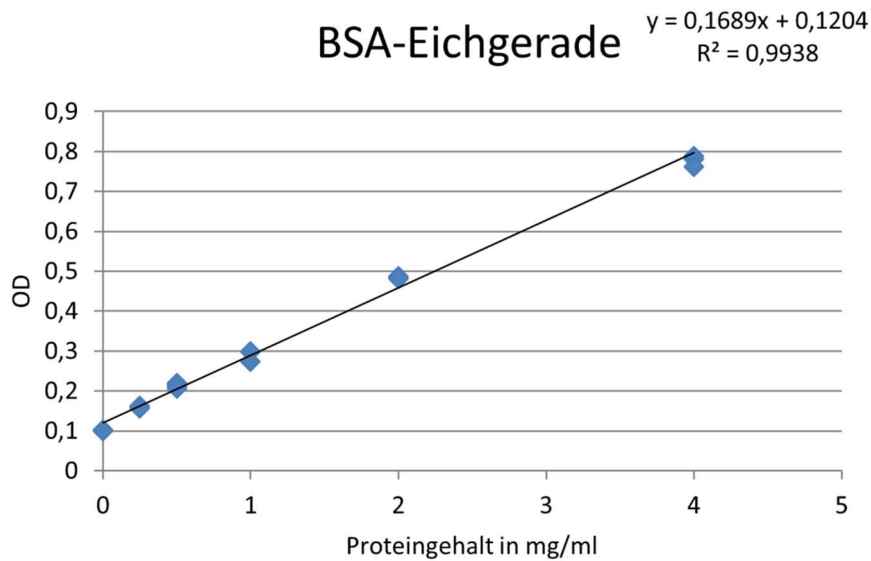


Abbildung 14: Beispiel einer BSA-Eichgeraden zur Proteinbestimmung

Dargestellt wurde die optische Dichte (OD) in Bezug zum Proteingehalt in mg/ml. Hierfür wurden auf der y-Achse die Extinktionswerte und auf der x-Achse der Proteingehalt der BSA-Eichlösungen aufgetragen. Mittels linearer Regressionsanalyse konnte eine Geradengleichung berechnet werden. Diese wurde anschließend nach x aufgelöst [$x = (y - b)/m$] und der Proteingehalt der einzelnen Proben errechnet, wobei eine Multiplikation mit dem Faktor 5 notwendig war, da die Proben 1:5 mit Laemmli-Puffer verdünnt worden waren. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei allen BSA-Eichgeraden über 0,9 und somit nahe an 1, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem linearen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und dem Proteingehalt in mg/ml ausgegangen werden konnte.

4.3.3 Kolorimetrische Analyse

Zur Bestimmung des Zinkgehalts (Zn) in den Tumor-Lysaten wurde das kolorimetrische *Zinc Assay Kit* der Firma (Novus Biologicals, 2024) Biologicals verwendet, welches einen Nachweisbereich von 0,748–46,2 μM und eine Sensitivität von 0,418 $\mu\text{mol/L}$ aufweist. Im ersten Schritt wurden aus einem 1,54 mmol/l Zink-Standard (*Reagenz 1*) Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen zur Erstellung einer Eichgerade präpariert (0; 3,85; 7,7; 11,55; 15,4; 23,1; 30,8; 46,2 $\mu\text{mol/l}$). Hierbei kam anstelle von deionisiertem Wasser der Messpuffer als Verdünnungsmittel zum Einsatz, wobei es sich Laemmli-Puffer handelte, der im Verhältnis 1:1 mit dem im Kit enthaltenen Präzipitationspuffer (*Reagenz 2*) vermischt wurde. Dies gewährleistete, dass pH-Werte und Ionenstärken während der Verdünnung konstant blieben, was die Genauigkeit der anschließenden Messungen erhöhen sollte.

In beschriftete 1,5 ml Eppis wurden mit einer Multipipette 70 μl des Präzipitationspuffers vorgelegt und anschließend 70 μl der Probenüberstände aus 4.3.1 beigefügt, welche zuvor auf Eis aufgetaut worden waren. Im Anschluss an die Proteinfällung wurden die Eppis für 10 min bei 4° C und 14 000 rpm zentrifugiert, sodass der Überstand im Folgenden für die Detektion genutzt werden konnte.

Zur Durchführung einer Doppelbestimmung erfolgt nun die Befüllung der 96-Well-Platte mit jeweils 2 x 50 µl der Eichlösungen und der Probenüberstände (siehe Abbildung 15). Die Lokalisation der verschiedenen Lösungen und Proben wurde sorgfältig auf einer Vorlage notiert. Frisch vor der Nutzung wurden Reagenz 2 (Chromogenes Agens) und Reagenz 3 (Pufferlösung) im Verhältnis 1:99 gemischt, um die Detektionslösung zu erhalten. Je 200 µl dieser Detektionslösung wurden in die Wells pipettiert, bevor die Platte anschließend auf dem Photometer geschüttelt wurde. Nach 5 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Mithilfe der Zn-Eichgerade (siehe Abbildung 16) konnte nun der Gehalt an freiem Zink in den CAM-Tumore bestimmt werden, angegeben in µmol/l. Wichtig war dabei die Multiplikation der Messwerte mit dem Faktor 2, da die Proben mit dem Präzipitationspuffer 1:1 verdünnt worden waren (siehe Tabelle 7).

Jeder Versuchsdurchgang wurde auf einer separaten Mikrotiterplatte mit jeweils eigenen Eichlösungen aufgetragen.



Abbildung 15: Beispielhafter Auftrag zur kolorimetrischen Zn-Messung

In Reihe A und B sind jeweils paarig untereinander die acht Zink Standardlösungen aufgetragen, in den Reihen C bis H die Tumorproben. Der Farbgradient der Standardlösungen reicht von gelb über orange bis hin zu korallenrot.

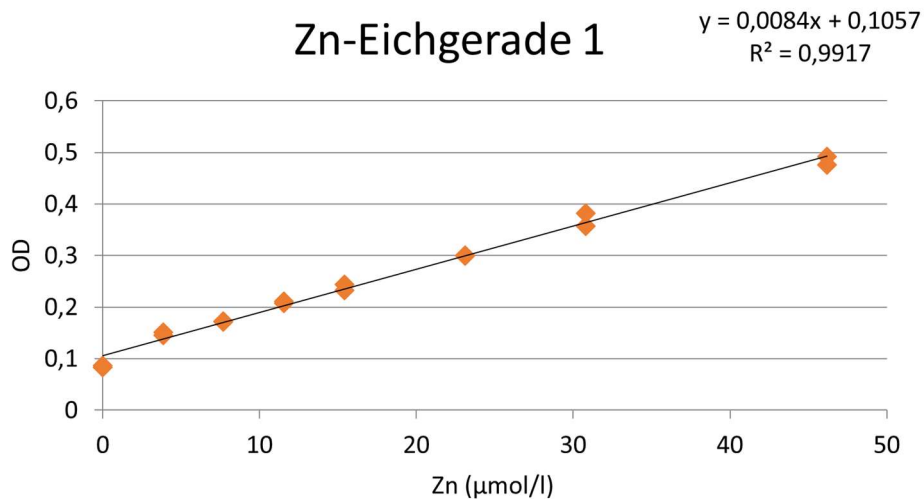


Abbildung 16: Beispiel einer Zn-Eichgerade

Abgebildet ist die Zn-Eichgerade der Platte 1. Auf der y-Achse wurden die Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte bei 570 nm aufgetragen, auf der x-Achse die Konzentration an freiem Zink in $\mu\text{mol/l}$. Der Hersteller gibt eine Detektionsspanne von 0,748–46,2 $\mu\text{mol/l}$ an. Nachdem die lineare Gleichung nach x aufgelöst worden war, konnte jeder OD-Wert für y eingesetzt und die korrelierende Zinkkonzentration berechnet werden. Die Steigung m war bei allen Zn-Eichgeraden nahezu identisch (0,0080–0,0084). Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei allen Zn-Eichgeraden über 0,9 und somit nahe an 1, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem linearen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der Konzentration an freiem Zink in $\mu\text{mol/l}$ ausgegangen werden kann

Tabelle 7: Beispielrechnung Zinkgehalt

$$\text{Zn } (\mu\text{mol/l}) = (\text{OD-Wert} - 0,1057) / 0,0084 * 2$$

4.4 Strahleninduzierte Aktivierung von ERK als Positivkontrolle für Zn-abhängige Phosphorylierung in Huh-7 Zellen

Vor der Überprüfung der CAM-Tumorproben auf eine Zn-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 war es zunächst das Ziel eine Positivkontrolle zu generieren. Dafür sollte die strahleninduzierte Aktivierung des ERK-Signalwegs genutzt werden, welche in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe nachgewiesen worden war.

4.4.1 Kultivierung und Bestrahlung von Huh-7

Je 400.000 Huh-7 Zellen wurden zunächst in acht 25 cm^2 große Zellkulturflaschen ausgesät und kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 70% erreicht hatten. Je zwei Zellkulturflaschen wurden eine der vier Gruppen zugeordnet, die sich hinsichtlich der Bestrahlung und der Lyse-Zeitpunkte unterschieden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Zuordnung Strahlungsdosis und Lyse-Zeitpunkt

Anzahl Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Strahlungsdosis	Zeitpunkt der Lyse
2	0 Gy	15 min
2	0 Gy	1h
2	8 Gy	15 min
2	8 Gy	1 h

In einer mit Wärmeakkus beladenen Thermobox wurden alle acht Zellkulturflaschen hochkant zum Bestrahlungsgerät im Nebengebäude transportiert. Die Bestrahlung erfolgte dort durch einen Gammastrahler mit einer Cs¹³⁷ Quelle. Unmittelbar nach Abschluss des Bestrahlungsvorgangs wurde mit der Zeitmessung begonnen. Es folgte der Rücktransport in das HNO-Labor, wo die Zellkulturflaschen bis zum Ablauf der Zeit im Brutschrank gelagert wurden. Nach 15 min bzw. 1 h wurde das Medium abgekippt sowie eisgekühltes PBS zugegeben, verteilt und abgeschüttet. Die Flaschen wurden anschließend schräg auf Eis gelagert, sodass sich das restliche PBS sammelte und abpipettiert werden konnte. Nun wurden 400 µl Ladepuffer (1-fach) zugefügt, auf dem Flaschenboden verteilt und dieser plan auf Eis gelegt. Mithilfe von Zellschabern konnte das Zell-Lysat nun abgetragen und in 1,5 ml Eppis überführt werden, wobei der Flascheninhalt innerhalb der einzelnen Gruppen gepoolt wurde. Abschließend wurden die Zell-Lysate für 30 s mit dem Ultraschallstab behandelt und bei -80° C eingefroren.

4.4.2 Probenvorbereitung für die SDS-Page

Mithilfe einer Proteinbestimmung nach Lowry (Vorgehen analog zu 4.3.2) wurde zunächst die in den Zell-Lysaten enthaltene Menge an Protein quantifiziert. Dafür wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und für jede Probe der Mittelwert an Protein in µg/ml ermittelt.

Ziel war es anschließend, die Proben so zu verdünnen, dass alle Geleinschichten mit der gleichen Menge an Protein befüllt werden konnten, wobei das max. Auftragsvolumen pro Tasche im Mini-Gel bei 20 µl lag. Angesetzt wurde hierfür zunächst die doppelte Menge des Auftragsvolumen und somit 40 µl. Dafür wurde berechnet, wie viel Volumen aus den Tumor-Lysaten entnommen werden muss, um ein Entzugsvolumen mit 40 µg Gesamtprotein zu erhalten (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Beispielrechnung Entzugsvolumen

$$\text{Entzugsvolumen} = \frac{\text{Proteingehalt Entzugsvolumen} * 1000}{\text{MW des Gesamtproteins in } \mu\text{g/ml}} = \frac{40 \mu\text{g} * 1000}{1300 \mu\text{g}/\mu\text{l}} = 31 \mu\text{l}$$

Aufgefüllt wurde dieses Entzugsvolumen mit Ladepuffer (1-fach), 1 µl 5% Bromphenolblau zur Visualisierung und 100 mM DTT zur Reduktion der Disulfidbrücken, bis ein Gesamtvolumen von 40 µl erreicht wurde. Der verwendete Ladepuffer enthielt Glycerin, welches ein Absinken der Probe in die Tasche des Sammelgels bewirkt, sowie SDS, ein anionisches Detergens, welches die Denaturierung der Proteine bewirkt und deren Eigenladung verdeckt. Die Proben wurden zum Abschluss für 10 min bei 95° C im Thermoschüttler aufgeköcht, abzentrifugiert und bis zur Befüllung des Gels auf Eis gelagert.

4.4.3 SDS-Page

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine hinsichtlich ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Durch die Versetzung der Proben mit SDS erhalten diese eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld in Richtung Pluspol, wobei eine Proportionalität zwischen Masse und Ladung vorliegt. Kleine Proteine wandern leichter durch die Gelmaschen, während große Proteine das Gel langsamer passieren. Das Gel wird daher auch als „molekulares Sieb“ bezeichnet, dessen Maschen kleiner werden, umso höher der prozentuale Anteil an Polyacrylamid ist.

4.4.3.1 Gießen der Gele

Die Trenn- und Sammelgele wurden mit dem TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit 12% der Firma *BioRad* händisch gegossen. Für das Trenngel wurden je 4 ml von *Resolver A* und *Resolver B* miteinander kombiniert, für das Sammelgel je 2 ml von *Stacker A* und *Stacker B*. Zu beiden Gelen wurden 10% APS und 4 µl TEMED hinzugegeben, zwei Reagenzien, die gemeinsam die Polymerisation der Acrylamide katalysieren. Zwischen zwei abgedichtete Mini-Glasplatten wurde nun zuerst das Trenngel eingegossen und mit Isopropylalkohol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde der Alkohol abgeschüttet, mit destilliertem Wasser gründlich entfernt und die Glasplatten wurden vorsichtig mit einem Tuch getrocknet. Abschließend wurde das frisch angesetzte Sammelgel auf das Trenngel pipettiert, ein Probenkamm eingesetzt und das vollständige Aushärten des Gels abgewartet.

4.4.3.2 Befüllen der Geltaschen

Zunächst wurden die Geltaschen auf der Glasplatte nachgezeichnet, anschließend der Probenkamm herausgezogen und die Silikondichtung entfernt. Die Gelplatte wurden nun in der Elektrophorese-Kammer fixiert und diese mit Elektrophoresepuffer (1-fach) aufgefüllt. Mithilfe einer Mikroliterspritze aus Glas wurden die Geltaschen ebenfalls mit dem Elektrophoresepuffer gespült. Im Anschluss erfolgte die Beladung der Geltaschen: auf Spur 1 wurden 5 µl einer vorgefärbten Proteinleiter (10–180 kDa) aufgetragen, auf den restlichen Spuren je 20 µg Gesamtprotein der vorbereiteten Proben aus 4.4.2.

4.4.3.3 Gel-Elektrophorese

Der Marker und die Proben wurden mit 10 mA/Gel und maximaler Spannung im Sammelgel einlaufen gelassen. Die Höhe der Proteine war dabei an der bromphenolblauen Lauffront erkennbar und sollte ungefähr gleich auf allen Spuren sein. Sobald die Proteine das Sammelgel durchquert und das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 20 mA/Gel erhöht. Mit dem Auslaufen der 10 kDa Proteinbande am unteren Ende des Gels wurde die Elektrophorese beendet. Die Gelplatten wurden anschließend geöffnet, das Gel grob zugeschnitten und in den Transferpuffer (1-fach) für den Tank Blot überführt. Am ChemiDoc™ MP Imaging System konnte nun ein Bild des *Stain-Free* Gels angefertigt werden.

4.4.4 Tank Blot

Während der Gel-Elektrophorese (4.4.3.3) wurden bereits die Vorbereitungen für den Tank Blot vorgenommen. Entsprechend der Größe des Gels wurden hierfür zwei *Whatman*-Papiere und eine PVDF-Membran zugeschnitten. Die Membran wurde zum Aktivieren kurz in Methanol eingetaucht, danach kurz in Aqua dest. gespült und anschließend in Transferpuffer (1-fach) gelagert. Auch die *Whatman*-Papiere sowie zwei Schwämme wurden im Transferpuffer befeuchtet. Nun konnte der Transferstapel nach vorgegebenem Schema zusammengesetzt werden (siehe Abbildung 17) wobei etwaige Luftblasen zwischen den Schichten mithilfe eines Blotting-Rollers entfernt wurden.

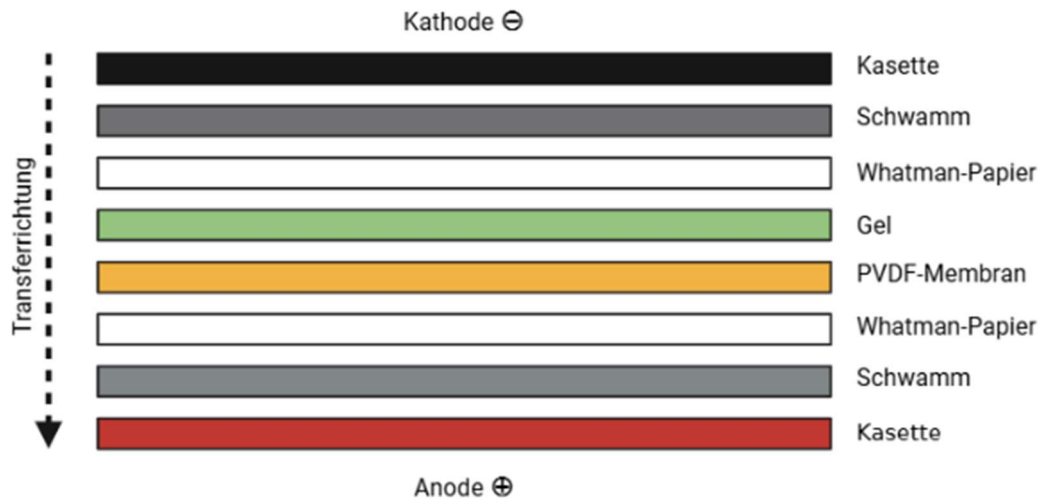
Created in BioRender.com 

Abbildung 17: Aufbau des Transferstapels

Abgebildet ist der Aufbau des Transferstapels innerhalb der Blot-Kassette. Die rote Seite der Kassette zeigt zur Anode, die schwarze Seite zur Kathode. Der Stromfluss erfolgt von Minuspol zu Pluspol und gibt die Transferrichtung der negativ geladenen Proteine vor.

Im nächsten Schritt wurde das Blotting-Sandwich in den Transfer-Tank eingegliedert und ausreichend Transferpuffer beigefügt, bis die Kassette bedeckt war. Bei 4 °C im Kühlraum erfolgte dann über Nacht 14 h lang die vertikale Elektrophorese. Am *Power Supply* wurde dafür eine konstante Spannung von 17 Volt eingestellt. Im Zuge des Transfers sind die aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran übertragen worden und blieben dort haften. Zum Schluss wurde von dem *StainFree*-Blot ein Bild an dem ChemiDoc™ MP Imaging System angefertigt (siehe Abbildung 18).

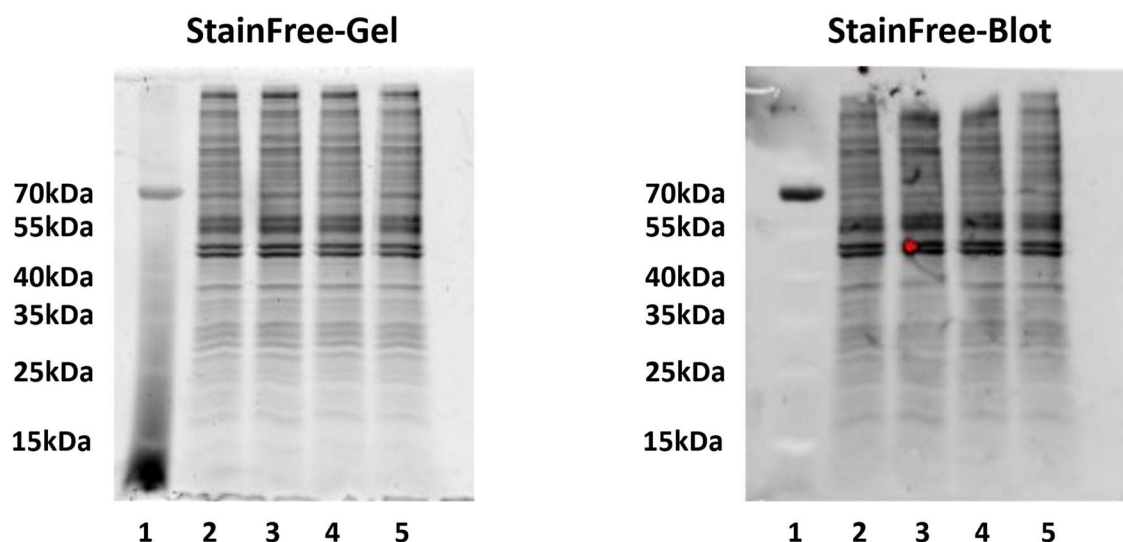


Abbildung 18: *StainFree*-Gel und *StainFree*-Blot

Exemplarisch sind hier links ein *StainFree*-Gel vom 25.06.24, rechts ein *StainFree*-Blot vom 26.06.24 zu sehen. Auf Spur 1 ist die Proteinleiter abgebildet, mithilfe derer das Molekulargewicht der Proteine bestimmt werden kann, in dem Fall im Bereich von 15 bis 70 kDa. Auf Spur 2–5 sind die Zell-Lysate aufgetragen.

4.4.5 Immundetektion

Im Anschluss an den gelungenen Proteintransfer folgte die Immundetektion auf der PVDF-Membran, wobei drei verschiedene Proteine visualisiert werden sollten: ERK1/2, p-ERK1/2 und GAPDH als Ladekontrolle (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: verwendete Antikörper

Protein	ERK1/2	Phospho-ERK1/2	GAPDH
1. Antikörper	BioTechne #MAB1576	BioTechne #MAB1018	Sigma Aldrich #G8795
Anwendung	0,5 µg/ml in 5% BSA/TBST ₂₀ (in 5% Milchpulver/TBST ₂₀)	0,5 µg/ml in 5% BSA/TBST ₂₀	1:5000 in 5% BSA/TBST ₂₀
Spezies	Rabbit	Mouse	Mouse
Molekülmasse	44 kDa (ERK1) 42 kDa (ERK2)	44 kDa (pERK1) 42 kDa (pERK2)	37 kDa
Blockierung	5% Milchpulver	5% Milchpulver	5% Milchpulver
2. Antikörper	Anti-rabbit IG, HRP-linked	Anti-mouse IG, HRP-linked	Anti-mouse IG, HRP-linked
Anwendung	1:5000 in 5% Milchpulver	1:5000 in 5% Milchpulver	1:5000 in 5% Milchpulver

Dafür wurde die Blotmembran zunächst dreimal für 5 min im Waschpuffer TBST₂₀ (siehe 3.8.4) auf einem 3D-Schüttler gereinigt, ehe sie dann 60 min lang auf einem Wippschüttler in Milchpulver blockiert wurde. Durch die Anlagerung von Milchpulver werden freie Stellen auf der Membran besetzt und unspezifische Antikörperbindungen verhindert. Es folgte ein erneuter Waschzyklus (3x 5 min) mit TBST₂₀, um im Anschluss die Inkubation mit dem Erstantikörper durchzuführen. Die Antikörper-Lösung wurde in eine Inkubationsbox überführt, die Membran hineingelegt und die Box über Nacht auf einem Wippschüttler bei 4° C belassen. Am nächsten Morgen wurde die Blotmembran erneut gewaschen und mit der Lösung für den Zweitantikörper benetzt, wobei dieser immer aus der gleichen Spezies wie der Erstantikörper stammen muss. Die Inkubation erfolgte 60 min lang auf einem Wippschüttler und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde die Membran zu gleichen Teilen mit beiden Reagenzien des *Western Lightning® Plus ECL* benetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion wird von der am Zweitantikörper-gebundenen Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min konnte mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System die Immundetektion vollzogen werden.

Zum Lösen der Antikörper wurde die PVDF-Membran einmal für 5 min in TBST₂₀ gewaschen, erst 30 min lang in Glycin haltigem Stripping-Puffer, dann weitere 30 min in 1% SDS-Lösung inkubiert und nochmals zweimal 10 min in TBST₂₀ gewaschen. Diese Schritte erfolgten alle auf dem 3D-Schüttler.

Für die Immundetektion von p-ERK1/2, ERK1/2 und GAPDH war der Ablauf jeweils analog, beginnend mit der Blockierung der Membran. Ein Trocknen der Membran nach erfolgter Detektion war möglich, zur weiteren Verwendung dann eine Aktivierung in Methanol notwendig.

4.4.6 Wiederholung der Analyse mit HNSCCUM-02T und FaDu

Da durch die Bestrahlung mit anschließender Immundetektion bei den Huh-7 Zellen keine Positivkontrolle für die Aktivierung von ERK1/2 generiert werden konnte, wurde der Versuch wiederholt, wobei neben den Huh-7 Zellen zwei weitere Zelllinien zum Einsatz kamen: HNSCCUM-02T und FaDu. In beiden Fällen handelt es sich um eine Zelllinie aus einem Plattenepithelkarzinom, erstere aus der Zunge, letztere aus dem Hypopharynx stammend. Die Zelllinie HNSCCUM-02T wurde im eigenen Labor etabliert, FaDu können beim Leibnitz-Institut DSMZ erworben werden.

In Schritt 4.4.1 wurden hierfür von jeder Zelllinie vier 25 cm² große Zellkulturflaschen ausgesät, die ausgesäte Zellzahl sowie die Bestrahlungsdosis variierte dabei, angepasst an frühere Erfahrungswerte der Arbeitsgruppe (siehe Tabelle 11). Das Lysieren der Zellen wurde noch im Bestrahlungsraum durchgeführt und konnte daher bereits nach 5 min erfolgen.

Tabelle 11: Zellzahlen, Strahlendosis und Lyse-Zeitpunkte bei Huh-7, FaDu und Hun

Zelllinie	Ausgesäte Zellzahl	Strahlendosis	Zeitpunkt der Lyse	
Huh-7	500.000	0 Gy	5 min	1 h
		8 Gy	5 min	1 h
FaDu	300.000	0 Gy	5 min	1 h
		8 Gy	5 min	1 h
HNSCCUM-02T	500.000	0 Gy	5 min	1 h
		30 Gy	5 min	1 h

Alle weiteren in 4.4 beschriebenen Laborschritte erfolgten analog, mit einer Abweichung bei der Immundetektion in 4.4.5: zur Vermeidung störender Hintergrundbanden wurde der ERK1/2 Antikörper in der Blockierungslösung, d.h. 5 % Milchpulver verdünnt (siehe Tabelle 10).

4.5 Statistische Auswertung

Die Probengewinnung beim CAM-Assay erfolgte in vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen, innerhalb derer die Eier wiederum in vier Gruppen unterteilt waren. Die Anzahl an Eiern, die in die Auswertung einbezogen werden konnten, lag pro Gruppe zwischen 5–12.

Zunächst wurden alle ermittelten Werte innerhalb der vier Gruppen auf Ausreißer überprüft. Hierfür wurde die ROUT-Methode (*Robust Outlier Method*) mit einer max. gewünschten Falscherkennungsrate von $Q=1\%$ angewendet. Nach Elimination der Ausreißer folgte ein Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung, welcher in jeder Gruppe bestanden wurde. Die Voraussetzungen zur Durchführung eines *two-way* ANOVA waren somit gegeben.

Die bereinigten Daten, d.h. alle Einzelwerte ohne Ausreißer, wurden zur Beurteilung der Verteilung in einem Streudiagramm gruppenweise aufgetragen. Im Anschluss wurde für jede Gruppe innerhalb eines Versuchsdurchgangs der Mittelwert gebildet. Die im Balkendiagramm dargestellten Mittelwerte berechnen sich aus den Mittelwerten der vier unabhängigen Versuchsdurchläufen und sind mit zugehöriger Standardabweichung angegeben ($N=4$).

Die statistische Analyse wurde mit einem *two-way* ANOVA durchgeführt und der multiple Mittelwertsvergleich mittels Bonferroni-Korrektur. Alle statistischen Tests und Diagramme wurden mit GraphPad Prism erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Probengewinnung

In vier unabhängigen Versuchsdurchgängen wurden insgesamt 144 Eier injiziert, wobei insgesamt 135 Tumorproben generiert werden konnten (siehe Tabelle 12). Es handelt sich dabei ausnahmslos um Tumore aus Eiern, die zum Zeitpunkt der Entnahme, also 18 h nach Injektion, noch vital waren. Tumorproben aus Eiern, die *post injectionem* verstorben sind, wurden verworfen. Das mittlere Tumorgewicht der Proben lag in den vier Durchgängen bei 40 mg, 34 mg, 38 mg und 30 mg, woraus sich ein ungewichtetes Gesamtmittel von 35,5 mg ergibt. Das ungewichtete Mittel des Proteingehalts über alle vier Durchgänge lag bei 7,1 mg/ml Protein.

Tabelle 12: Übersicht Tumorproben

Gruppe	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3	Durchgang 4
Aqua dest.	n = 9	n = 7	n = 6	n = 11
iRGD	n = 9	n = 9	n = 6	n = 10
ZnO-NP	n = 9	n = 8	n = 5	n = 12
ZnO-NP + iRGD	n = 9	n = 8	n = 6	n = 11
Gesamtprobenzahl	n = 36	n = 32	n = 23	n = 44
Mittleres Tumorgewicht	40 mg	34 mg	38 mg	30 mg
Mittlerer Proteingehalt	7,0 mg/ml	7,2 mg/ml	6,7 mg/ml	7,4 mg/ml

Mithilfe der ROUT-Methode konnten sechs Ausreißer identifiziert werden, wobei es sich um die Proben 79, 92, 123, 129, 134 und 135 handelte. Vier dieser Proben entstammten der „Aqua dest.“-Gruppe und je eine der „ZnO-NP“- sowie der „ZnO-NP+iRGD“-Gruppe. Aus den ursprünglich N = 135 Proben wurden diese sechs Ausreißer ausgeschlossen, sodass N = 129 in die finale statistische Analyse eingingen.

5.2 Mikroskopische Analyse des Restgewebes nach Lyse

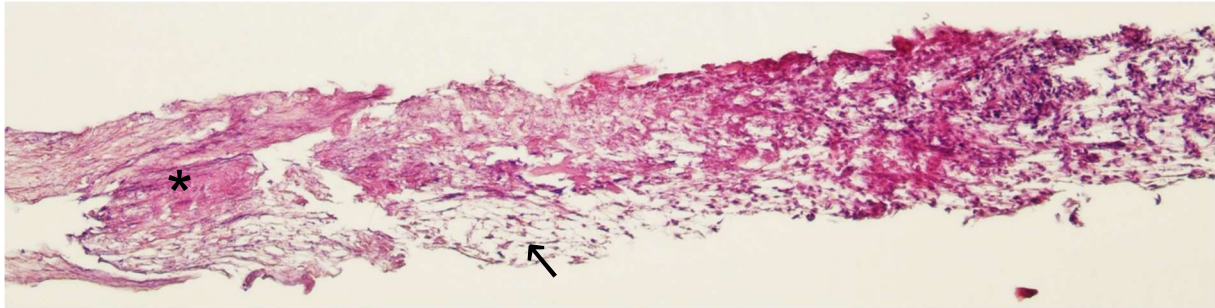


Abbildung 19: Quetschpräparat

Lichtmikroskopische Abbildung eines Quetschpräparats des unauflösbaren Geweberestes nach Lyse einer Tumorseite (Hämatoxylin/Eosin-Färbung, 100x).

Zur Beurteilung der Zusammensetzung des Geweberestes, der nach Lyse der Tumorseiten im Mikroreaktionsgefäß verblieben ist, wurde ein Quetschpräparat angefertigt und histologisch mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung analysiert (siehe Abbildung 19). Im Präparat zeigt sich ein dichtes, faserreiches Areal (markiert mit einem Sternchen), das typischerweise fibrotischem Gewebe entspricht. Der Pfeil weist auf einen kleinen Anteil des lockeren, dünn geschichteten CAM-Gewebes hin. In der rechten Hälfte der Aufnahme finden sich Überreste von Tumorzellen, deren Zellverband aufgelöst und fragmentiert erscheint. Vereinzelt sind verbliebene basophile Tumorzellkerne erkennbar.

Diese Beobachtungen bestätigen, dass die Lyse der Tumorseiten weitgehend erfolgreich war und das verbliebene Material überwiegend aus fibrotischem Gewebe, CAM und aufgelösten Tumorzellresten besteht.

5.3 Auswertung der intratumoralen Zinkanreicherung nach Applikation von ZnO-Nanopartikeln und iRGD

In dem nun folgenden Teil meiner Dissertation sollen die Ergebnisse der Analyse der Zinkkonzentration im Tumor nach intravaskulärer Applikation von Zinkoxid-Nanopartikeln in Kombination mit iRGD-Peptid im CAM Assay dargestellt werden. Ziel war es zu untersuchen, ob mithilfe des tumorspezifischen iRGD-Peptids eine verstärkte Anreicherung von Zink-Ionen im Tumorgewebe erreicht werden kann. Zur differenzierten Bewertung wurden vier Versuchsgruppen miteinander verglichen: Gruppe 1 erhielt ausschließlich ZnO-NP, Gruppe 2 wurde mit dem iRGD-Peptid behandelt, während Gruppe 3 eine kombinierte intravaskuläre Gabe von ZnO-NP und iRGD erhielt. Gruppe 4 diente als Kontrollgruppe und erhielt steriles Aqua dest. Um eine Normalisierung der Messergebnisse zu ermöglichen, wurden ergänzend das Tumorgewicht sowie der Proteingehalt der Proben bestimmt. Die Tumore wurden vor der Analyse gewogen und zur Erfassung des Proteingehalts wurde eine quantitative

Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Auf diese Weise konnten die Zinkwerte sowohl auf das Tumorgewicht als auch auf den Proteingehalt bezogen werden. Im Fokus der Auswertung stand der Vergleich der intratumoralen Zinkgehalte zwischen den Gruppen, um den potenziellen Einfluss des iRGD-Peptids auf die Tumorpenetration und Zinkanreicherung zu beurteilen. Die statistischen Verfahren zur Analyse der Messergebnisse sind ausführlich in Kapitel 4.5 beschrieben.

Zur Evaluierung der Zinkanreicherung im Tumor wurden drei verschiedene Messparameter herangezogen: (A) die absolute Zinkkonzentration in μM , (B) die Zinkkonzentration normiert auf den Proteingehalt ($\mu\text{M Zn/mg/ml Protein}$) und (C) die freie Zinkmenge bezogen auf das Tumorgewicht (nmol Zn/g Tumor) (siehe Abbildung 20).

In allen drei Messgruppen zeigt sich nach Durchführung eines *two-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen der „iRGD“- und Kombinationsgruppe „iRGD + ZnO-NP“. Insbesondere bei der auf den Proteingehalt bezogenen Zinkkonzentration war der Unterschied mit einem p-Wert von 0,009 hoch signifikant. Auch in der absoluten Zinkmessung (μM) und bei Bezug auf das Tumorgewicht (nmol Zn/g Tumor) wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 0,023$ bzw. $p = 0,021$).

Auffällig ist eine stufenweise Zunahme der mittleren Zinkwerte über die Behandlungsgruppen hinweg: Der höchste mittlere Zinkwert wurde jeweils in der Kombinationsgruppe „ZnO-NP + iRGD“ gemessen, während die niedrigsten Werte in der „iRGD“-Gruppe ohne Nanopartikel nachgewiesen wurden. Die „ZnO-NP“-Gruppe ohne iRGD lag in allen drei Messungen zwischen der reinen Peptid- und der Kombigruppe. Diese treppenartige Abstufung deutet darauf hin, dass die Kombination aus ZnO-Nanopartikeln und dem tumorpenetrierenden iRGD-Peptid die Anreicherung von Zink im Tumorgewebe erhöht.

Die Kontrollgruppe „Aqua dest.“ wies in allen drei Messparametern jeweils die zweithöchsten Mittelwerte auf und lag somit durchweg oberhalb der Werte beider Monotherapien, jedoch unterhalb der Kombinationsgruppe.

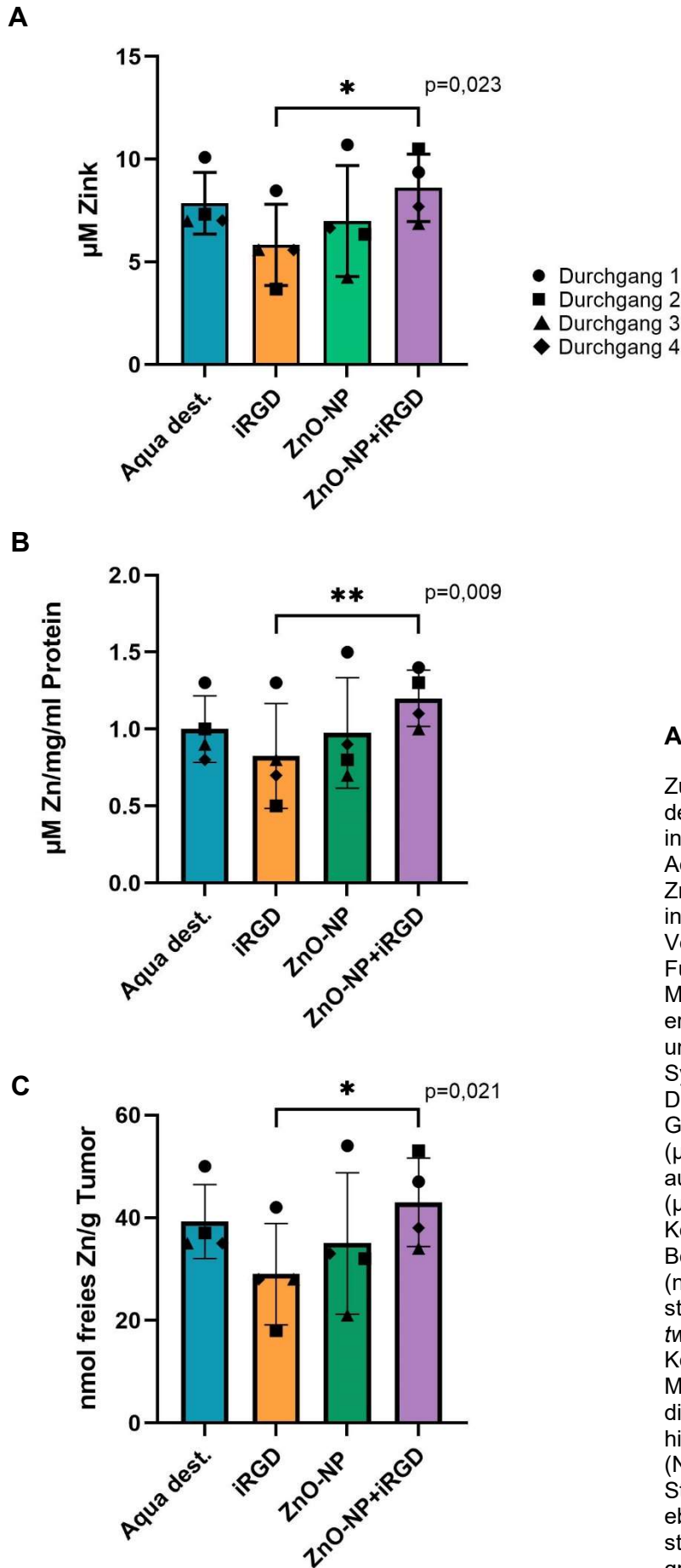


Abbildung 20: Zn-Messung

Zu sehen ist der mittlere Zinkgehalt der Tumorproben nach intravaskulärer Applikation von Aqua dest., iRGD, ZnO-NP und ZnO-NP + iRGD. Die Daten wurden in vier unabhängigen Versuchsdurchgängen erhoben. Für jeden Durchgang wurde der Mittelwert der jeweiligen Gruppe ermittelt, dargestellt durch unterschiedliche geometrische Symbole (●, ■, ▲, ◆). Die drei Diagramme zeigen (A) die Gesamtkonzentration von Zink (μM), (B) den Zinkgehalt bezogen auf den Proteingehalt ($\mu\text{M Zn/mg/ml Protein}$) und (C) die Konzentration an freiem Zink in Bezug auf das Tumorgewicht ($\text{nmol freies Zn/g Tumor}$). Zur statistischen Analyse wurde der *two-way ANOVA* mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, um die Mittelwerte der vier Gruppen über die vier Versuchsdurchgänge hinweg miteinander zu vergleichen ($N=4$). Die dazugehörigen Standardabweichungen sind ebenfalls abgebildet. Die statistische Auswertung und grafische Darstellung erfolgten mittels Graph Pad Prism.

5.4 Versuch zur Etablierung einer Positivkontrolle für die ERK-Aktivierung

Der direkte Nachweis von Zink über die Bestimmung erhöhter intratumoraler Konzentrationen sollte durch einen indirekten Zn-Nachweis ergänzt werden. Ziel war es, eine mögliche Zinkanreicherung in den Tumorproben über die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs sichtbar zu machen. Methodisch bot sich ein Western Blot zur Detektion von phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) an.

Zur Validierung der Antikörper und als Positivkontrolle für die pERK1/2-Detektion wurde die strahleninduzierte Aktivierung des ERK-Signalwegs in drei Tumorzelllinien untersucht: HNSCCUM-02T, FaDu und Huh-7. Die Huh-7 und FaDu wurden mit 8 Gy bestrahlt, die HNSCCUM-02T mit 30 Gy und anschließend nach 5 min oder 1 h geerntet und lysiert. Als Ladekontrolle diente GAPDH (siehe Abbildung 21).

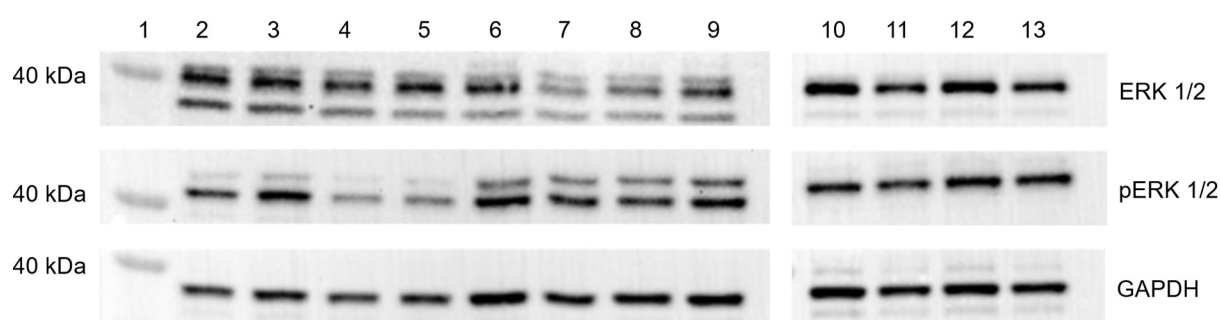


Abbildung 21: pERK1/2-Expression in Tumorzellen nach Bestrahlung – Positivkontrolle

Zu sehen sind die Proteinbanden von ERK1/2, phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) sowie der Ladekontrolle GAPDH. Spur 1 zeigt die 40 kDa-Marke des *Prestained* Proteinmarkers. Die weitere Gelbelastung ist in Tabelle 13 aufgeführt. Die Proben aus den Spuren 10–13 wurden auf einem separaten Gel aufgetragen. Die Banden für ERK1 und ERK2 liegen erwartungsgemäß bei etwa 44 kDa bzw. 42 kDa. Die phosphorylierten Formen (pERK1/2) zeigen dieselbe Molekülgröße. GAPDH verläuft bei etwa 37 kDa. Auffällig ist die Zusatzbande bei der Detektion von ERK1/2 auf Höhe von ca. 35 kDa, deren Herkunft nicht zugeordnet werden konnte. Diese könnte auf ein Abbauprodukt oder eine unspezifische Antikörperreaktion zurückzuführen sein.

In den HNSCCUM-02T-Zellen zeigte sich bereits 5 Minuten nach Bestrahlung mit 30 Gy eine deutlich intensivere pERK1/2-Bande im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, was auf eine strahleninduzierte Aktivierung des ERK-Signalwegs hinweist. Allerdings war auch in der unbestrahlten Probe eine leichte pERK1/2-Expression nachweisbar, die vermutlich auf zellulären Stress infolge von Transport und Lyse zurückzuführen ist. Nach 1 h war die pERK1/2-Expression deutlich reduziert bzw. kaum noch nachweisbar. Dies belegt eine erfolgreiche, transiente Aktivierung des Signalwegs und bestätigt gleichzeitig die Funktionalität des verwendeten Antikörpers. In den FaDu und Huh-7 Zellen zeigte sich dagegen bereits im unbehandelten Zustand eine dauerhaft erhöhte Expression von pERK1/2, sodass eine

zusätzliche Aktivierung durch Bestrahlung nicht nachweisbar war. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser konstitutiven Aktivierung könnte in einer Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 liegen, die in beiden Zelllinien beschrieben ist. Dieser Zusammenhang soll im Rahmen der Diskussion näher erörtert werden.

Der angestrebte indirekte Nachweis von Zink über die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung in Tumorproben der Zelllinie Huh-7 erwies sich als nicht zielführend, da der ERK-Signalweg in diesen Zellen bereits dauerhaft aktiviert ist. Eine zusätzliche Aktivierung durch Zink war daher nicht eindeutig nachweisbar, weshalb dieser Versuchsansatz nicht weiterverfolgt wurde.

Tabelle 13: Gelbeladung Western Blot

Spur	Probe	Strahlendosis	Zeitpunkt der Lyse
1	Prestained Marker	-	-
2	HNSCCUM-0T2	0 Gy	5 min
3	HNSCCUM-02T	30 Gy	5 min
4	HNSCCUM-02T	0 Gy	1 h
5	HNSCCUM-02T	30 Gy	1 h
6	FaDu	0 Gy	5 min
7	FaDu	8 Gy	5 min
8	FaDu	0 Gy	1 h
9	FaDu	8 Gy	1 h
10	Huh-7	0 Gy	5 min
11	Huh-7	8 Gy	5 min
12	Huh-7	0 Gy	1 h
13	Huh-7	8 Gy	1 h

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, Zinkoxid-Nanopartikel gezielt in Tumorzellen anzureichern, wobei das tumorpenetrierende iRGD-Peptid die Aufnahme unterstützen sollte. Hierfür wurden aus Huh-7-Zellen Tumortransplantate im CAM-Assay generiert und intravaskulär mit ZnO-NP sowie iRGD behandelt. Der direkte Nachweis einer erhöhten Zinkanreicherung nach kombinierter Gabe erfolgte über die Bestimmung der Zinkkonzentration in den lysierten Tumorproben. Ergänzend sollte das Vorhandensein freier Zink-Ionen indirekt über eine Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs im Western Blot nachgewiesen werden. Nachfolgend sollen die hieraus gewonnenen Ergebnisse sowie Problematiken der angewandten Methoden diskutiert werden.

6.1 Bewertung von Dosiswahl, Entnahmezeitpunkt und Tumortransplantation im CAM-Assay

Die Entnahme der Tumore erfolgte einheitlich 18 h nach intravaskulärer Applikation von Aqua dest., iRGD, ZnO-NP und ZnO-NP + iRGD. Dieser Zeitpunkt erwies sich in Vorversuchen als günstig. Zudem wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass der tumorpenetrierende Effekt von iRGD noch bis zu 24 Stunden nach Verabreichung anhält (Liu et al., 2017b). Somit war bis zum Zeitpunkt der Entnahme eine aktive Wirkung des Peptids anzunehmen. Ob ein späterer Entnahmezeitpunkt zu höheren Zinkanreicherungen geführt hätte, ist fraglich, da bei einem Überschreiten der Zinkspeicherkapazität mit einer Ausscheidung des Spurenelements in die Allantois zu rechnen ist (Ribatti, 2017). Limitiert wird der Entnahmezeitpunkt nach Injektion an ED13 zudem von der gesetzlich vorgeschriebenen Maximaldauer des CAM-Assays, welche 14 Tage nicht überschreiten darf.

Sowohl die gewählte Dosis des iRGD-Peptids (8 $\mu\text{mol/ml}$) als auch der ZnO-NP (0,9 mg/ml) erwiesen sich als gut verträglich, da nach der Applikation kein erhöhtes Embryonensterben beobachtet wurde. Angesichts des von Buhr et al. (2021) bestimmten LD_{50} -Werts ist die systemische Toxizität der eingesetzten ZnO-NP-Konzentration als gering einzustufen. Daraus lässt sich auch schließen, dass das iRGD-Peptid in der verwendeten Dosis keine zusätzliche systemische Toxizität verursachte.

Auch das punktuelle Antrocknen der CAM an der Stelle, an der die 3D-Kulturen aufgebracht wurden, erwies sich als vorteilhaft für die Durchführung des CAM-Assays, da so eine hohe Einwuchsrate der Tumortransplantate erreicht werden konnte. Die dabei verwendeten unsterilen Präzisionswischtücher waren nicht mit einer erhöhten Schimmelbildung assoziiert und stellten demnach kein Risiko für eine mikrobielle Kontamination dar.

Die Beurteilung des Tumoreinwuchs in die CAM erfolgte lediglich makroskopisch. Mit bloßem Auge wurden Eier ausgeschlossen, deren Tumore plan, trocken und gräulich erschienen und somit keinen Hinweis auf einen Einwuchs zeigten. Erhabene, blasige Tumore hingegen wurden als eingewachsen eingestuft und anhand ihres Erscheinungsbildes sowie ihrer Größe weiter klassifiziert. Eine objektive, standardisierte Messmethode zur Beurteilung des Tumoreinwuchses wäre aus wissenschaftlicher Sicht jedoch fundierter. Hierfür würden sich histologische Schnitte eignen, die eine Gefäßeinsprossung sichtbar machen, oder eine sonografische Untersuchung des CAM-Tumors nach J.Eckrich et al. (2020).

6.2 Analyse der Zinkkonzentrationen in den Tumorproben

Die gemessenen Konzentrationen an freien Zink-Ionen in den lysierten Tumorproben lagen mit Werten zwischen 0–20 μM allesamt auf einem sehr niedrigen Niveau und entsprachen damit einem Bruchteil der Gesamt-Zn-Konzentration, die in humanen Zellen laut Literatur zwischen 200–300 μM liegen soll. Zurückzuführen ist dies auf die hohe Pufferkapazität der Zellen gegenüber dem divalenten Kation (Maret, 2015). Die mittels kolorimetrischem Assay ermittelten Zinkionenkonzentrationen im Mikromolar-Bereich liegen deutlich über den physiologischen Konzentrationen an freiem Zn^{2+} im Zytosol, die üblicherweise im Pikomolar-Bereich liegen. Es ist anzunehmen, dass die Werte den gesamten „labilen“ Zink-Pool widerspiegeln, also sowohl die freien Zink-Ionen des Zytosols als auch Zink-Ionen, die erst infolge des gewählten Lysierungsverfahrens freigesetzt wurden.

Bei der Anwendung des Ultraschallstabes wird das Prinzip der akustischen Kavitation genutzt. Dabei entstehen gasgefüllte Bläschen, die schlagartig implodieren. Die dabei freigesetzten mechanischen Kräfte sind stark genug, um Zellmembranen zu zerstören und so einen effektiven Zellaufschluss zu ermöglichen (Shehadul Islam et al., 2017). Auch intrazelluläre Membranen können dabei zerstört werden, sodass in Zellorganellen gespeichertes Zn^{2+} in das Lysat übergehen könnte. Darüber hinaus führt die Ultraschallbehandlung zu einer verstärkten Wärmebildung (Zhao et al., 2024). Trotz Eiskühlung könnte es lokal zur Denaturierung von Proteinen kommen, wodurch mit Zink eingegangene Koordinationsbindungen aufgehoben würden. In der Literatur ist zudem beschrieben, dass bei niedrigfrequenter Ultraschallbehandlung reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden (Miljevic et al., 2014). Diese könnten Zink-bindende Liganden potenziell oxidieren und dadurch die Freisetzung von Zn^{2+} aus schwach gebundenen Proteinkomplexen begünstigen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die zugrundeliegenden Mechanismen der Zn^{2+} -Freisetzung nach der Behandlung mit dem Ultraschallstab näher zu beleuchten.

Zur Bestimmung des Gesamtzinkgehalts wäre der ergänzende Einsatz einer Atomabsorptionsspektrometrie (ASS) sinnvoll. Damit ließe sich neben der freien auch die gesamte intrazellulär gebundene Zinkfraktion erfassen, um so eine probenspezifische

Aussage über den Zinkgehalt unabhängig von der individuellen zellulären Pufferkapazität zu treffen. Mithilfe dieser Methode konnten in A549-Zelllysaten bereits erfolgreich erhöhte Zn^{2+} Konzentrationen nach Behandlung mit ZnO-NP bestimmt werden (Heim et al., 2015).

Die Analyse der Zinkkonzentrationen ergab, dass der höchste Mittelwert in der Gruppe mit kombinierter Gabe von ZnO-NP und iRGD erzielt wurde (siehe Abbildung 20). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die gleichzeitige Applikation beider Substanzen zu einer erhöhten Aufnahme von Zink im Tumorgewebe führte und unterstützt damit den in der Literatur beschriebenen tumorpenetrierenden Effekt des iRGD-Peptids (Ruoslahti, 2017). Die im Balkendiagramm erkennbare treppenartige Abstufung zwischen den drei Interventionsgruppen (iRGD, ZnO-NP und ZnO-NP + iRGD) sowie der signifikante Unterschied zwischen der Peptidgruppe und der Kombinationsgruppe unterstreichen den unterstützenden Effekt von iRGD auf die intratumorale Aufnahme der ZnO-NP. Dieser Trend zeigte sich ebenfalls bei der Auswertung der Zinkkonzentrationen in Relation zum Proteingehalt und Tumorgewicht, was die Robustheit des Ergebnisses zusätzlich bestätigt.

6.2.1 Erhöhter Zinkgehalt in der Kontrollgruppe

Auffällig sind der erhöhte Zinkgehalt in der Kontrollgruppe mit Aqua dest., deren Mittelwert bei allen drei Messparametern den zweithöchsten Rang einnimmt (siehe Abbildung 20). Damit liegt er, anders als erwartet, nicht auf dem Niveau der iRGD-Gruppe, in der ebenfalls kein Zink appliziert wurde. Es stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis mit der niedrigen Osmolarität des Aqua dest. korreliert. Bei dem verwendeten *Aqua ad injectabilia* handelt es sich um eine stark hypotone Lösung, die – zumindest in der Theorie – bei direktem Kontakt mit Zellen zu osmotischen Schädigungen führen könnte. Eine frühere Untersuchung im CAM-Assay zeigte jedoch keine relevanten Unterschiede in den Überlebensraten der Embryonen sowohl nach Applikation von hyperosmolarer NaCl-Lösung als auch hypoosmolarem deionisiertem Wasser (Buhr et al., 2021).

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Zinkkonzentrationen in der Aqua dest.-Gruppe könnte in der hypoosmolaren Eigenschaft der injizierten Lösung liegen. Der osmotisch bedingte Wassereinstrom in die Tumorzellen kann zur Anschwellung führen. Um ein Platzen der Zellen zu verhindern, werden osmotische Ausgleichsmechanismen aktiviert und intrazellulär gebundene Ionen freigesetzt. So könnte auch vermehrt Zn^{2+} aus zellulären Speichern freigesetzt worden sein, um das osmotische Gleichgewicht wiederherzustellen. Dies würde eine erhöhte Gesamt-Zinkkonzentration in den Tumorslysaten erklären, ohne dass eine externe Zufuhr stattgefunden hat.

Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in einer osmotischen Schädigung der Erythrozyten. Die Applikation von Aqua dest. führt zu einer hypotonen Umgebung, die eine Hämolyse der roten

Blutkörperchen begünstigen kann. Dabei wird zellulärer Inhalt, einschließlich gebundenem Zink, freigesetzt. Zink liegt in Erythrozyten überwiegend gebunden an die Enzyme Carboanhydrase und Superoxiddismutase vor (Ohno et al., 1985). Die Zinkkonzentration innerhalb der Erythrozyten liegt bei Erwachsenen im Bereich von 138–230 $\mu\text{mol/l}$ (Rodic et al., 2022). Die Freisetzung der Zink-Ionen im Rahmen einer Hämolyse könnte die gemessene Zinkkonzentration in den lysierten Tumorproben verfälschen.

Osmotische Reaktionen von Zellen, insbesondere die Hämolyse von Erythrozyten in hypotoner Umgebung, erfolgen in der Regel innerhalb weniger Minuten (Goodhead and MacMillan, 2017). Fraglich ist es daher, ob zum Zeitpunkt der Tumorentnahme –also 18 h nach Injektion von Aqua dest.– noch immer direkte Auswirkungen der osmotischen Schädigung messbar sind.

6.2.2 Mögliche Wechselwirkungen zwischen iRGD und Zn^{2+}

Die Messwerte der Zn-Analyse liegen allesamt auf einem sehr ähnlichen Niveau. Insbesondere die Mittelwerte der gemessenen Zinkkonzentrationen der Aqua dest., ZnO-NP- und ZnO-NP + iRGD weichen nur geringfügig voneinander ab. So liegen die mittleren Zinkkonzentrationen dieser drei Gruppen bei 7,86 μM , 6,99 μM und 8,61 μM . Die mittlere Zinkkonzentration von 5,83 μM in der iRGD-Gruppe scheint vergleichsweise niedrig. Daher kommt die Überlegung, dass bei Aqua, ZnO-NP und der Kombigruppe physiologische Zn-Werte gemessen wurden und diese bei iRGD alleinig verringert vorlagen. Grund hierfür könnten Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und den Zink-Ionen sein. Denkbar ist eine Bindung von Zn^{2+} an funktionelle Gruppe oder Aminosäurereste (v.a. Cystein, Aspartat) des iRGD-Peptids, wie sie in der Literatur für zahlreiche Proteine beschrieben wird (Auld, 2001). Dies könnte die intrazelluläre Zinkpufferkapazität erhöhen, da so ein weiteres Peptid als Bindungsmöglichkeit für Zn^{2+} zur Verfügung steht.

Eine Bindung von Zn^{2+} an iRGD könnte zudem eine Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Peptids bewirken. Die Konformationsänderung könnte negative Auswirkungen auf die Bindung an Integrine haben und den tumorpenetrierenden Effekt des iRGD-Peptids abschwächen. In der Folge wäre auch die Aufnahme der ZnO-Nanopartikel in die Tumorzellen nur geringfügig verbessert.

6.2.3 Geringe Streuung der Werte

Obwohl zwischen der ZnO-NP- und der ZnO-NP + iRGD-Gruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde, zeigen die Werte der intratumoralen Zinkkonzentration über alle Gruppen hinweg eine geringe Streuung. Plausibel wäre daher die Interpretation, dass nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP, sowohl alleinig verabreicht oder in Kombination mit iRGD kein konsistenter Effekt auf die intratumorale Zinkkonzentration zu erkennen ist. Der

signifikante Unterschied zwischen nur zwei der insgesamt vier Gruppen könnte daher auch auf eine biologische Variabilität oder einen statistischen Zufall zurückzuführen sein, anstatt auf einen therapeutischen Effekt hinzuweisen.

Der Großteil der gemessenen Zinkkonzentrationen lag im unteren bis mittleren Drittel des vom Hersteller angegebenen validierten Messbereichs des Assays (0,748–46,2 $\mu\text{mol/l}$). Da lediglich einzelne Werte unterhalb der Nachweisgrenze (0,418 $\mu\text{mol/l}$) lagen und zudem extreme Ausreißer ausgeschlossen wurden, ist von einer ausreichenden Messgenauigkeit auszugehen. Deshalb kann angenommen werden, dass die geringe Streuung der Daten nicht auf methodische Einschränkungen zurückzuführen ist, sondern die reale Zinkanreicherung im Tumorgewebe abbildet.

Eine Variabilität zwischen den verschiedenen Messparametern lässt sich nicht erkennen, da die gemessenen Zinkkonzentrationen – sowohl in absoluten Werten als auch normalisiert auf den Proteingehalt und das Tumorgewicht – vergleichbare gruppenspezifische Unterschiede zeigen und zu einer ähnlichen Interpretation führen. Schaut man sich die einzelnen Versuchsdurchgänge an, so fällt auf, dass in einzelnen Durchgängen – wie etwa in Durchgang 1 – insgesamt höhere absolute Zinkwerte gemessen wurden als in anderen, z. B. Durchgang 3. Die relativen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen blieben jedoch in allen Durchgängen vergleichbar und in ähnlicher Größenordnung, sodass die grundsätzliche Interpretation der Ergebnisse dadurch nicht beeinflusst wurde.

Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es bisher keine veröffentlichte wissenschaftliche Arbeit, in der das kolorimetrische Novus *Zinc Assay Kit* von Novus Biologicals verwendet wurde. Der Hersteller gibt lediglich exemplarisch Referenzwerte für humanes Serum, Urin, Milch sowie Rattenserum an. Diese liegen im Bereich zwischen 5–25 $\mu\text{mol/l}$ und bestätigen prinzipiell die Anwendbarkeit des Assays für flüssige Proben (Novus Biologicals, 2024). Validierte Referenzwerte oder spezifische Daten für komplexere Proben wie die in dieser Arbeit untersuchten lysierten Tumorproben sind bisher nicht verfügbar.

Interessant ist der Vergleich mit einem bereits etablierten kolorimetrischen Zink Assay Kit wie QuantiChrom™, welches sich ebenfalls zum Messen von Zink-Ionen in Serum, Plasma, Speichel, Urin etc. eignen soll. Der Detektionsbereich dieses Assays ist niedriger und wird mit einem Maximalwert von 10 μM angegeben (BioAssay Systems, 2021). Eine Studie verwendete das Kit zur Bestimmung der Zinkkonzentration in homogenisiertem Tumorgewebe, das aus Prostatakrebs-Xenografts in Nacktmäusen gewonnen wurde (Dambal et al., 2017). Die Autoren normalisieren die Zinkwerte auf den Proteingehalt, geben jedoch nur prozentuale Unterschiede anstelle von absoluten Zinkkonzentrationen an. Dies erschwert eine direkte Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit erhobenen absoluten Konzentrationswerten.

Eine weitere mögliche Erklärung für die insgesamt niedrigen intratumoralen Zinkwerte nach Gabe von ZnO-NP – sowohl allein als auch in Kombination mit iRGD – könnte in einer begrenzten Bioverfügbarkeit der Nanopartikel liegen. Möglicherweise dissoziierten die verwendeten ZnO-NP nur unzureichend zu freien Zink-Ionen oder penetrierten die Tumorzellen nicht effektiv, wodurch die Zinkanreicherung limitiert wurde. Das in dieser Arbeit verabreichte Zink(II) Oxid Pulver von der Firma IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH war bereits von mehreren Doktoranden der AG Brieger im Rahmen von CAM-Assays verwendet worden, signifikante therapeutische Effekte konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Preuß, 2022, Mühl, 2024). Dies steht im Kontrast zu anderen publizierten Ergebnissen derselben Arbeitsgruppe, in denen ZnO-Nanopartikel *in vitro* eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung gegenüber Tumorzellen zeigten. So wurde in einer Untersuchung von Wiesmann et al. (2019) der intrazelluläre Zinkanstieg nach ZnO-NP-Behandlung mithilfe des fluoreszenzbasierten Farbstoffs FluoZin™-3-AM direkt visualisiert. Bereits wenige Minuten nach Zugabe der Nanopartikel zeigte sich eine deutliche Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz, was auf eine rasche Ionenfreisetzung und Aufnahme durch die Tumorzellen hindeutet. Die dabei eingesetzten Nanopartikel wurden jedoch nicht kommerziell erworben, sondern von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Tremel (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert und charakterisiert. Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit der verschiedenen Nanopartikelvarianten sind daher nicht auszuschließen.

6.3 Problematik der Positivkontrolle im Western Blot

Ziel war es, die Anreicherung von Zn^{2+} im Tumorgewebe indirekt über die Aktivierung von pERK1/2 im Western Blot nachzuweisen. Dafür sollte zunächst eine Positivkontrolle etabliert werden, wobei die Aktivierung von pERK nach Bestrahlung als Referenz dienen sollte. In einem ersten Versuch mit Huh-7 konnte keine suffiziente Positivkontrolle erstellt werden, weshalb der Versuch mit zwei weiteren Zelllinien wiederholt wurde.

Dabei zeigten sowohl Huh-7 als auch FaDu bereits im unbestrahlten Zustand eine erhöhte Expression von pERK1/2. Diese dauerhafte Aktivierung könnte auf eine Veränderung in den upstream liegenden Signalwegen zurückzuführen sein. Naheliegend ist dabei eine gestörte Funktion des Transkriptionsfaktors p53. Unter physiologischen Bedingungen wird p53 nur geringfügig exprimiert, zeigt jedoch eine deutliche Expressionszunahme nach DNA-Schädigung, etwa durch Bestrahlung. Genetische Mutationen können jedoch zu einer Überexprimierung von funktionsgestörtem p53 führen.

In Huh-7 Zellen liegt eine Punktmutation an Position 220 des Tumorsuppressorgens TP53 vor, bei der die Aminosäure Tyrosin durch Cystein ersetzt wird (Y220C). Daraus resultiert eine *loss-of-function* Mutation des Transkriptionsfaktors p53, wodurch dessen Fähigkeit zur

Einleitung von Apoptose sowie zur Regulation von Signaltransduktionswegen stark eingeschränkt ist (Mitchell et al., 2017). Das Fehlen p53-vermittelter, negativ regulatorisch wirkender Mechanismen könnte somit eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalwegs begünstigen und die beobachtete dauerhafte Aktivierung von pERK1/2 erklären. Entsprechende Zusammenhänge sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Drosten et al., 2014, Sauer et al., 2010). Auch in der FaDu-Zelllinie liegt eine TP53-Gen Mutation vor, die mit einem Funktionsverlust von p53 assoziiert ist (Eicheler et al., 2002).

Bei den HNSCCUM-02T Zellen konnte im Western Blot 5 min nach Bestrahlung mit 30 Gy eine erhöhte Expression von pERK1/2 beobachtet werden, die nach 1h deutlich abnahm, was einer typischen transienten Aktivierung von p53 nach DNA-Schädigung entspricht. Damit lag eine repräsentative Positivkontrolle vor. Entgegen dieser Beobachtung wird jedoch auch für HNSCCUM-02T Zellen eine p53-Mutation beschrieben. Es soll sich dabei um eine *gain-of-function* Mutation handeln, die zu einer ungewöhnlich hohen, strahlungsunabhängigen Expression von p53 führt (Wiesmann, 2019). In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe konnten mit den HNSCCUM-02T-Zellen jedoch keine soliden Tumore auf der CAM gebildet werden, weshalb sich diese Zelllinie als unzuverlässig erwies und für den CAM-Assay nicht in Frage kam (Watermann et al., 2019).

7 Ausblick

Um einen möglichen Einfluss von Aqua dest. auf das osmotische Gleichgewicht der Tumor-Transplantate auszuschließen, sollte der CAM-Versuch in zukünftigen Studien unter Verwendung isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) anstelle von deionisiertem Wasser in der Kontrollgruppe wiederholt werden.

Für weiterführende Untersuchungen empfiehlt sich die Ergänzung des kolorimetrischen Zink-Assays durch eine Bestimmung des Gesamtzinkgehalts mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS). Mit dem kolorimetrischen Zink-Assay konnte lediglich die Konzentration freier Zink-Ionen im Tumorlysat bestimmt werden. Intrazellulär liegt Zink jedoch überwiegend gebunden vor. Durch den Einsatz von AAS könnten daher präzisere und umfassendere Aussagen über den tatsächlichen Zinkgehalt im Tumorgewebe getroffen und die Aussagekraft der Analysen erhöht werden.

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, dass eine Zinkanreicherung indirekt über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs nachweisbar ist, wäre der Einsatz einer alternativen Tumorzelllinie im CAM-Modell sinnvoll. Voraussetzung hierfür ist, dass diese Zelllinie keine dauerhafte ERK1/2-Phosphorylierung aufweist. Mit einer stabilen Positivkontrolle ließe sich die Signalantwort von pERK1/2 nach Gabe von Zinkoxid-Nanopartikeln gezielt untersuchen.

Inwiefern sich andere Zelllinien zur Herstellung einer 3D-Kultur und als Tumortransplantat im CAM-Assay eignen, muss erst geprüft werden.

8 Zusammenfassung

Klassische Chemotherapeutika schädigen nicht nur entartete Zellen, sondern greifen auch physiologisch intakt Körperzellen an. Angestrebt werden daher zielgerichtete Tumortherapien, die eine höhere therapeutische Effizienz bei gleichzeitiger Reduktion unerwünschter Arzneimittelwirkungen aufweisen. Wichtige Vertreter des aktiven *Drug Targeting* sind Nanopartikel – winzige Strukturen, die nicht nur den gezielten Transport zur Zielzelle ermöglichen, sondern aufgrund ihrer biochemisch-physikalischen Eigenschaften auch eine intrinsische Anti-Tumor-Wirkung entfalten können. Zink-basierte Nanopartikel zeichnen sich durch eine hohe Bioverfügbarkeit aus und zeigen sowohl zyto- als auch genotoxische Effekte. Sie gelten daher als vielversprechende Kandidaten in der modernen Krebstherapie.

Die tumortoxische Wirkung der Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP) konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, in einem komplexeren System wie dem CAM-Assay war ein Nachweis bisher jedoch nicht möglich. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der unzureichenden Anreicherung der ZnO-NP im Tumorgewebe liegen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Anreicherung von ZnO-NP im Tumorgewebe nach intravaskulärer Applikation in einem CAM-Modell zu untersuchen und durch den kombinierten Einsatz des tumorpenetrierenden Peptids iRGD gezielt zu verstärken. Das Peptid bindet vaskuläre tumorspezifische Liganden, wodurch ein Endozytose-Mechanismus aktiviert und die intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel verstärkt werden soll. Zu diesem Zweck wurden dreidimensionale hepatozelluläre Tumorzellkulturen auf die Chorionallantoismembran (CAM) von befruchteten Hühnereiern transplantiert und nach erfolgreichem Tumoreinwuchs intravenös mit Aqua dest., iRGD, ZnO-NP oder einer Kombination aus ZnO-NP und iRGD behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurden die Tumoren explantiert, gewogen, lysiert und hinsichtlich ihrer Zinkkonzentration untersucht. Zur Quantifizierung der freien Zink-Ionen (Zn^{2+}) wurde ein kolorimetrischer Zink-Assay durchgeführt; die Messwerte wurden anhand des Probengewichts und des Proteingehalts normalisiert. Insgesamt wurden 135 Tumorproben aus vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen analysiert.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der intratumoralen Zinkkonzentration zwischen der iRGD-Gruppe und der Kombinationsgruppe (ZnO-NP + iRGD), während die übrigen Gruppen vergleichbare Zinkwerte aufwiesen. Die mittleren Zinkkonzentrationen bewegten sich mit Werten zwischen 0–20 μM insgesamt im unteren bis mittleren Bereich des validierten Messintervalls. Die geringe Streuung der Messwerte deutet auf eine gleichmäßige intratumorale Zinkanreicherung. Die Kontrollgruppe wies unerwartet erhöhte Werte auf, was auf osmotische Effekte hindeuten könnte.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der kombinierte Einsatz von ZnO-NP und iRGD die intratumorale Zinkanreicherung geringfügig verbessern kann. Allerdings blieb ein klarer gruppenspezifischer Effekt weitgehend aus, was möglicherweise auf eine unzureichende Dissoziation der ZnO-NP und damit auf eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit zurückzuführen ist. Weitere Studien sind erforderlich, um die Freisetzung und Wirkung von Zinkoxid-Nanopartikeln im in vivo-System gezielter zu analysieren und zu optimieren.

9 Literaturverzeichnis

- AGARWAL, H. & SHANMUGAM, V. 2020. A review on anti-inflammatory activity of green synthesized zinc oxide nanoparticle: Mechanism-based approach. *Bioorganic Chemistry*, 94, 103423.
- AHLAM, A. A., SHANIBA, V. S., JAYASREE, P. R. & MANISH KUMAR, P. R. 2021. Spondias pinnata (L.f.) Kurz Leaf Extract Derived Zinc Oxide Nanoparticles Induce Dual Modes of Apoptotic-Necrotic Death in HCT 116 and K562 Cells. *Biological Trace Element Research*, 199, 1778-1801.
- ANDREINI, C., BANCI, L., BERTINI, I. & ROSATO, A. 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*, 5, 196-201.
- ANJUM, S., HASHIM, M., MALIK, S. A., KHAN, M., LORENZO, J. M., ABBASI, B. H. & HANO, C. 2021. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers (Basel)*, 13.
- ANSON, K. J., CORBET, G. A. & PALMER, A. E. 2021. Zn(2+) influx activates ERK and Akt signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- AULD, D. S. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*, 14, 271-313.
- AVRAMESCU, M. L., RASMUSSEN, P. E., CHÉNIER, M. & GARDNER, H. D. 2017. Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24, 1553-1564.
- BAI, D. P., ZHANG, X. F., ZHANG, G. L., HUANG, Y. F. & GURUNATHAN, S. 2017. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *Int J Nanomedicine*, 12, 6521-6535.
- BARAKAT, L. A. A., BARAKAT, N., ZAKARIA, M. M. & KHIRALLAH, S. M. 2020. Protective role of zinc oxide nanoparticles in kidney injury induced by cisplatin in rats. *Life Sciences*, 262, 118503.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 339, 269-80.
- BARENHOLZ, Y. 2012. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160, 117-134.
- BERGE, M., ALLANIC, D., BONNIN, P., DE MONTRION, C., RICHARD, J., SUC, M., BOVIN, J. F., CONTRERES, J. O., LOCKHART, B. P., POCARD, M., LEVY, B. I., TUCKER, G. C., TOBELEM, G. & MERKULOVA-RAINON, T. 2011. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling. *J Hepatol*, 55, 866-75.
- BIELENBERG, D. R., PETTAWAY, C. A., TAKASHIMA, S. & KLAGSBRUN, M. 2006. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res*, 312, 584-93.
- BIOASSAY SYSTEMS 2021. QuantiChrom™ Zinc Assay Kit (DIZN-250) – Instruction Manual. BioAssay Systems.
- BISHT, G. & RAYAMAJHI, S. 2016. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine (Rij)*, 3, 9.
- BOGDAN, J., PŁAWIŃSKA-CZARNAK, J. & ZARZYŃSKA, J. 2017. Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review. *Nanoscale Research Letters*, 12, 225.
- BOVERHOF, D. R., BRAMANTE, C. M., BUTALA, J. H., CLANCY, S. F., LAFRANCONI, M., WEST, J. & GORDON, S. C. 2015. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul Toxicol Pharmacol*, 73, 137-50.
- BOZYM, R. A., CHIMIANTI, F., GIBLIN, L. J., GROSS, G. W., KORICHNEVA, I., LI, Y., LIBERT, S., MARET, W., PARVIZ, M., FREDERICKSON, C. J. & THOMPSON, R. B. 2010. Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235, 741-50.
- BUHR, C. R., ECKRICH, J., KLUENKER, M., BRUNS, K., WIESMANN, N., TREMEL, W. & BRIEGER, J. 2021. Determination of the LD(50) with the chick embryo chorioallantoic

- membrane (CAM) assay as a promising alternative in nanotoxicological evaluation. *Nanotoxicology*, 15, 690-705.
- BUNDESAMT, S. & (DESTATIS). 2025 *Weltkrebstag: Zahl der stationären Krebsbehandlungen 2023 gegenüber Vorjahr gestiegen* [Online]. Available: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2025/01/PD25_N005_231.html [Accessed 22. März 2025].
- CAMAIONI, A., MASSIMIANI, M., LACCONI, V., MAGRINI, A., SALUSTRI, A., SOTIRIOU, G. A., SINGH, D., BITOUNIS, D., BOCCA, B., PINO, A., BARONE, F., PROTA, V., IAVICOLI, I., SCIMECA, M., BONANNO, E., CASSEE, F. R., DEMOKRITOU, P., PIETROIUSTI, A. & CAMPAGNOLO, L. 2021. Silica encapsulation of ZnO nanoparticles reduces their toxicity for cumulus cell-oocyte-complex expansion. *Part Fibre Toxicol*, 18, 33.
- CASSANDRI, M., SMIRNOV, A., NOVELLI, F., PITOLLI, C., AGOSTINI, M., MALEWICZ, M., MELINO, G. & RASCHELLÀ, G. 2017. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, 3, 17071.
- CHEN, B., YU, P., CHAN, W. N., XIE, F., ZHANG, Y., LIANG, L., LEUNG, K. T., LO, K. W., YU, J., TSE, G. M. K., KANG, W. & TO, K. F. 2024. Cellular zinc metabolism and zinc signaling: from biological functions to diseases and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9, 6.
- CHEN, F. & CAI, W. 2014. Tumor vasculature targeting: a generally applicable approach for functionalized nanomaterials. *Small*, 10, 1887-93.
- CHEN, Q., XU, L., CHEN, J., YANG, Z., LIANG, C., YANG, Y. & LIU, Z. 2017. Tumor vasculature normalization by orally fed erlotinib to modulate the tumor microenvironment for enhanced cancer nanomedicine and immunotherapy. *Biomaterials*, 148, 69-80.
- CHIA, S. L. & LEONG, D. T. 2016. Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating. *Heliyon*, 2, e00177.
- CHOI, B. Y., JUNG, J. W. & SUH, S. W. 2017. The Emerging Role of Zinc in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*, 18.
- COLVIN, R. A., HOLMES, W. R., FONTAINE, C. P. & MARET, W. 2010. Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2, 306-317.
- CONDELLO, M., DE BERARDIS, B., AMMENDOLIA, M. G., BARONE, F., CONDELLO, G., DEGAN, P. & MESCHINI, S. 2016. ZnO nanoparticle tracking from uptake to genotoxic damage in human colon carcinoma cells. *Toxicol In Vitro*, 35, 169-79.
- CORBO, C., MOLINARO, R., PARODI, A., TOLEDANO FURMAN, N. E., SALVATORE, F. & TASCIOTTI, E. 2016. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*, 11, 81-100.
- CORBO, C., MOLINARO, R., TABATABAEI, M., FAROKHZAD, O. C. & MAHMOUDI, M. 2017. Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. *Biomater Sci*, 5, 378-387.
- COSTELLO, L. C. & FRANKLIN, R. B. 2016. A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. *Arch Biochem Biophys*, 611, 100-112.
- DAMBAL, S., BAUMANN, B., MCCRAY, T., WILLIAMS, L., RICHARDS, Z., DEATON, R., PRINS, G. S. & NONN, L. 2017. The miR-183 family cluster alters zinc homeostasis in benign prostate cells, organoids and prostate cancer xenografts. *Scientific Reports*, 7, 7704.
- DEAN, A., GILL, S., MCGREGOR, M., BROADBRIDGE, V., JARVELAINEN, H. A. & PRICE, T. 2022. Dual alphaV-integrin and neuropilin-1 targeting peptide CEND-1 plus nab-paclitaxel and gemcitabine for the treatment of metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: a first-in-human, open-label, multicentre, phase 1 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 7, 943-951.
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT (DKG). 2017. *Definition und Häufigkeit von Kopf-Hals-Tumoren* [Online]. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko->

- internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/definition-und-haeufigkeit.html [Accessed 22. März 2025].
- DIANA, G. & CORICA, C. 2021. Human Papilloma Virus vaccine and prevention of head and neck cancer, what is the current evidence? *Oral Oncology*, 115, 105168.
- DIMCEVSKI, G., KOTOPOULIS, S., BJÄNES, T., HOEM, D., SCHJØTT, J., GJERTSEN, B. T., BIERMANN, M., MOLVEN, A., SORBYE, H., MCCORMACK, E., POSTEMA, M. & GILJA, O. H. 2016. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J Control Release*, 243, 172-181.
- DÖRING, F. 2017. *Das Tumor-Chorioallantoismembran-Modell als Bindeglied von Zellkultur und Tiermodell*, Greifswald, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
- DROSTEN, M., SUM, E. Y. M., LECHUGA, C. G., SIMÓN-CARRASCO, L., JACOB, H. K. C., GARCÍA-MEDINA, R., HUANG, S., BEIJERSBERGEN, R. L., BERNARDS, R. & BARBACID, M. 2014. Loss of p53 induces cell proliferation via Ras-independent activation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 15155-15160.
- DUTTA, B., BARICK, K. C. & HASSAN, P. A. 2021. Recent advances in active targeting of nanomaterials for anticancer drug delivery. *Advances in Colloid and Interface Science*, 296, 102509.
- ECKRICH, J., KUGLER, P., BUHR, C. R., ERNST, B. P., MENDELER, S., BAUMGART, J., BRIEGER, J. & WIESMANN, N. 2020. Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Sci Rep*, 10, 18585.
- EICHELER, W., ZIPS, D., DORFLER, A., GRENNAN, R. & BAUMANN, M. 2002. Splicing mutations in TP53 in human squamous cell carcinoma lines influence immunohistochemical detection. *J Histochem Cytochem*, 50, 197-204.
- EL-SAADONY, M. T., FANG, G., YAN, S., ALKAFAS, S. S., EL NASHARTY, M. A., KHEDR, S. A., HUSSINI, A. M., GHOSH, S., DLADLA, M., ELKAFAS, S. S., IBRAHIM, E. H., SALEM, H. M., MOSA, W. F. A., AHMED, A. E., MOHAMMED, D. M., KORMA, S. A., EL-TARABILY, M. K., SAAD, A. M., EL-TARABILY, K. A. & ABUQAMAR, S. F. 2024. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Biomedical Applications - A Review. *Int J Nanomedicine*, 19, 12889-12937.
- EU 2010. *Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*.
- FAN, D., CAO, Y., CAO, M., WANG, Y., CAO, Y. & GONG, T. 2023. Nanomedicine in cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 293.
- FARASAT, M., NIAZVAND, F. & KHORSANDI, L. 2020. Zinc oxide nanoparticles induce necroptosis and inhibit autophagy in MCF-7 human breast cancer cells. *Biologia*, 75, 161-174.
- FATIMA, H., JIN, Z. Y., SHAO, Z. & CHEN, X. J. 2022. Recent advances in ZnO-based photosensitizers: Synthesis, modification, and applications in photodynamic cancer therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 621, 440-463.
- FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N., ALBA-GONZÁLEZ, A., TOUZANI, A., RAMOS-PAN, L., MÉNDEZ, J., REIS, A. T., QUELLE-REGALDIE, A., SÁNCHEZ, L., FOLGUEIRA, M., LAFFON, B. & VALDIGLESIAS, V. 2024. Toxicity of zinc oxide nanoparticles: Cellular and behavioural effects. *Chemosphere*, 363, 142993.
- FISCHER, D., FLUEGEN, G., GARCIA, P., GHAFFARI-TABRIZI-WIZSY, N., GRIBALDO, L., HUANG, R. Y., RASCHE, V., RIBATTI, D., ROUSSET, X., PINTO, M. T., VIALLET, J., WANG, Y. & SCHNEIDER-STOCK, R. 2022. The CAM Model-Q&A with Experts. *Cancers (Basel)*, 15.
- FU, P. P., XIA, Q., HWANG, H. M., RAY, P. C. & YU, H. 2014. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal*, 22, 64-75.

- FUJIHARA, J. & NISHIMOTO, N. 2024. Review of Zinc Oxide Nanoparticles: Toxicokinetics, Tissue Distribution for Various Exposure Routes, Toxicological Effects, Toxicity Mechanism in Mammals, and an Approach for Toxicity Reduction. *Biol Trace Elem Res*, 202, 9-23.
- FUKADA, T., YAMASAKI, S., NISHIDA, K., MURAKAMI, M. & HIRANO, T. 2011. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*, 16, 1123-34.
- FUKUMURA, D., KASHIWAGI, S. & JAIN, R. K. 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 6, 521-34.
- FUKUNAKA, A. & FUJITANI, Y. 2018. Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 476.
- GABRIELLI, M. G. & ACCILI, D. 2010. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 940741.
- GAMMOH, N. Z. & RINK, L. 2017. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients*, 9.
- GARCÍA HEVIA, L., VALIENTE, R., MARTÍN-RODRÍGUEZ, R., RENERO-LECUNA, C., GONZALEZ, J., FERNÁNDEZ, L., AGUADO, F., VILLEGAS, J. & FANARRAGA, M. 2016. Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis. *Nanoscale*, 8.
- GARCIA, P., WANG, Y., VIALLET, J. & MACEK JILKOVA, Z. 2021. The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. *Front Immunol*, 12, 791081.
- GARCÍA VENCE, M., CHANTADA-VÁZQUEZ, M. D. P., VÁZQUEZ-ESTÉVEZ, S., MANUEL CAMESELLE-TEIJEIRO, J., BRAVO, S. B. & NÚÑEZ, C. 2020. Potential clinical applications of the personalized, disease-specific protein corona on nanoparticles. *Clinica Chimica Acta*, 501, 102-111.
- GIAU, V.-V., PARK, Y.-H., SHIM, K.-H., SON, S.-W. & AN, S.-S. A. 2019. Dynamic changes of protein corona compositions on the surface of zinc oxide nanoparticle in cell culture media. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 13, 90-97.
- GOODHEAD, L. K. & MACMILLAN, F. M. 2017. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Advances in Physiology Education*, 41, 298-305.
- GÜNTHER, V., LINDERT, U. & SCHAFFNER, W. 2012. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823, 1416-1425.
- HAASE, H. & MARET, W. 2003. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res*, 291, 289-98.
- HAMILTON, A. M., AIDOUDI-AHMED, S., SHARMA, S., KOTAMRAJU, V. R., FOSTER, P. J., SUGAHARA, K. N., RUOSLAHTI, E. & RUTT, B. K. 2015. Nanoparticles coated with the tumor-penetrating peptide iRGD reduce experimental breast cancer metastasis in the brain. *J Mol Med (Berl)*, 93, 991-1001.
- HANSSON, A. 1996. Extracellular zinc ions induces mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, 328, 233-8.
- HARDYMAN, J. E., TYSON, J., JACKSON, K. A., ALDRIDGE, C., COCKELL, S. J., WAKELING, L. A., VALENTINE, R. A. & FORD, D. 2016. 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*, 8, 337-43.
- HEIM, J., FELDER, E., TAHIR, M. N., KALTBEITZEL, A., HEINRICH, U. R., BROCHHAUSEN, C., MAILÄNDER, V., TREMEL, W. & BRIEGER, J. 2015. Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale*, 7, 8931-8.
- HEO, J. & CAMPBELL, S. L. 2006. Ras Regulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Biochemistry*, 45, 2200-2210.
- HINGORANI, S. R., ZHENG, L., BULLOCK, A. J., SEERY, T. E., HARRIS, W. P., SIGAL, D. S., BRAITEH, F., RITCH, P. S., ZALUPSKI, M. M., BAHARY, N., OBERSTEIN, P. E., WANG-GILLAM, A., WU, W., CHONDROS, D., JIANG, P., KHELIFA, S., PU, J.,

- ALDRICH, C. & HENDIFAR, A. E. 2018. HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 36, 359-366.
- IKEDA-IMAFUKU, M., WANG, L. L.-W., RODRIGUES, D., SHAHA, S., ZHAO, Z. & MITRAGOTRI, S. 2022. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation. *Journal of Controlled Release*, 345, 512-536.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). 2024. *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services* [Online]. Available: <https://www.iarc.who.int/news-events/global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services/> [Accessed 22. März 2025].
- ISLAM, W., FANG, J., IMAMURA, T., ETRYCH, T., SUBR, V., ULBRICH, K. & MAEDA, H. 2018. Augmentation of the enhanced permeability and retention effect with nitric oxide-generating agents improves the therapeutic effects of nanomedicines. *Molecular cancer therapeutics*, 17, 2643-2653.
- JAIN, R. K. 2013. Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. *Journal of Clinical Oncology*, 31, 2205-2218.
- JANKOVIC, B. D., ISAKOVIC, K., LUKIC, M. L., VUJANOVIC, N. L., PETROVIC, S. & MARKOVIC, B. M. 1975. Immunological capacity of the chicken embryo. I. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo. *Immunology*, 29, 497-508.
- JANSE, E. M. & JEURISSEN, S. H. 1991. Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo. *Immunobiology*, 182, 472-81.
- JÄRVELÄINEN, H. A., SCHMITHALS, C., VON HARTEN, M., KAKOSCHKY, B., VOGL, T. J., HARRIS, S., HENSON, C., BULLEN-CLERKSON, G. & PIIPER, A. 2023. Assessment of the Pharmacokinetics, Disposition, and Duration of Action of the Tumour-Targeting Peptide CEND-1. *Int J Mol Sci*, 24.
- KANG, S., LEE, S. & PARK, S. 2020. iRGD Peptide as a Tumor-Penetrating Enhancer for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Polymers (Basel)*, 12.
- KHAN, M. J., AHMAD, A., KHAN, M. A. & SIDDIQUI, S. 2021. Zinc Oxide Nanoparticle Induces Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma Cells Through Reactive Oxygen Species and DNA Degradation. *Biol Trace Elem Res*, 199, 2172-2181.
- KIM, J.-H., JEONG, M. S., KIM, D.-Y., HER, S. & WIE, M.-B. 2015. Zinc oxide nanoparticles induce lipoxygenase-mediated apoptosis and necrosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, 90, 204-214.
- KIRTANE, A. R., SADHUKHA, T., KIM, H., KHANNA, V., KONIAR, B. & PANYAM, J. 2017. Fibrinolytic Enzyme Cotherapy Improves Tumor Perfusion and Therapeutic Efficacy of Anticancer Nanomedicine. *Cancer Research*, 77, 1465-1475.
- KLOUBERT, V. & RINK, L. 2015. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct*, 6, 3195-204.
- KNIGHTON, D., AUSPRUNK, D., TAPPER, D. & FOLKMAN, J. 1977. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer*, 35, 347-56.
- KOLLMANSPERGER, S., ANDERS, M., WERNER, J., SALLER, A. M., WEISS, L., SUSS, S. C., REISER, J., SCHNEIDER, G., SCHUSSER, B., BAUMGARTNER, C. & FENZL, T. 2023. Nociception in Chicken Embryos, Part II: Embryonal Development of Electroencephalic Neuronal Activity In Ovo as a Prerequisite for Nociception. *Animals (Basel)*, 13.
- KONDO, E., IIOKA, H. & SAITO, K. 2021. Tumor-homing peptide and its utility for advanced cancer medicine. *Cancer Sci*, 112, 2118-2125.
- KRAMER-DRAUBERG, M. & AMBROGIO, C. 2021. Discoveries in the redox regulation of KRAS. *Int J Biochem Cell Biol*, 131, 105901.
- KWATRA, D., VENUGOPAL, A. & ANANT, S. 2013. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Translational Cancer Research*, 2, 330-342.
- LAMMERS, T. 2024. Nanomedicine Tumor Targeting. *Adv Mater*, 36, e2312169.

- LANSDOWN, A. B., MIRASTSCHIJSKI, U., STUBBS, N., SCANLON, E. & AGREN, M. S. 2007. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen*, 15, 2-16.
- LEESON, T. S. & LEESON, C. R. 1963. The Chorio-Allantois of the Chick. Light and Electron Microscopic Observations at Various Times of Incubation. *J Anat*, 97, 585-95.
- LEI, P., AYTON, S. & BUSH, A. I. 2021. The essential elements of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 296, 100105.
- LI, Q. X., FEUER, G., OUYANG, X. & AN, X. 2017. Experimental animal modeling for immunoncology. *Pharmacol Ther*, 173, 34-46.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.
- LIU, X., BRAUN, G. B., QIN, M., RUOSLAHTI, E. & SUGAHARA, K. N. 2017a. In vivo cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging. *Nat Commun*, 8, 343.
- LIU, X., LIN, P., PERRETT, I., LIN, J., LIAO, Y. P., CHANG, C. H., JIANG, J., WU, N., DONAHUE, T., WAINBERG, Z., NEL, A. E. & MENG, H. 2017b. Tumor-penetrating peptide enhances transcytosis of silicasome-based chemotherapy for pancreatic cancer. *J Clin Invest*, 127, 2007-2018.
- LIU, Y., YI, Y., ZHONG, C., MA, Z., WANG, H., DONG, X., YU, F., LI, J., CHEN, Q., LIN, C. & LI, X. 2023. Advanced bioactive nanomaterials for diagnosis and treatment of major chronic diseases. *Front Mol Biosci*, 10, 1121429.
- LIZ-MARZÁN, L. M., NEL, A. E., BRINKER, C. J., CHAN, W. C. W., CHEN, C., CHEN, X., HO, D., HU, T., KATAOKA, K., KOTOV, N. A., PARAK, W. J. & STEVENS, M. M. 2022. What Do We Mean When We Say Nanomedicine? *ACS Nano*, 16, 13257-13259.
- LOH, S. N. 2010. The missing Zinc: p53 misfolding and cancer. *Metallomics*, 2, 442-449.
- LOUSINIAN, S., MISSOPOLINO, D. & PANAYIOTOU, C. 2013. Fibrinogen adsorption on zinc oxide nanoparticles: A Micro-Differential Scanning Calorimetry analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 395, 294-299.
- LUDWIG, B. S., KESSLER, H., KOSSATZ, S. & REUNING, U. 2021. RGD-Binding Integrins Revisited: How Recently Discovered Functions and Novel Synthetic Ligands (Re-)Shape an Ever-Evolving Field. *Cancers (Basel)*, 13.
- MAKANYA, A. N., DIMOVA, I., KOLLER, T., STYP-REKOWSKA, B. & DJONOV, V. 2016. Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *PLoS One*, 11, e0152821.
- MARET, W. 2013. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr*, 4, 82-91.
- MARET, W. 2015. Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics*, 7, 202-11.
- MEDCHEMEXPRESS 2024. *Data Sheet iRGD peptide 1 TFA*
- MESSINA, S., DE SIMONE, G. & ASCENZI, P. 2019. Cysteine-based regulation of redox-sensitive Ras small GTPases. *Redox Biol*, 26, 101282.
- MEYER, T. J., SCHERZAD, A., MORATIN, H., GEHRKE, T. E., KILLISPERGER, J., HAGEN, R., WOHLLEBEN, G., POLAT, B., DEMBSKI, S., KLEINSASSER, N. & HACKENBERG, S. 2019. The Radiosensitizing Effect of Zinc Oxide Nanoparticles in Sub-Cytotoxic Dosing Is Associated with Oxidative Stress In Vitro. *Materials*, 12, 4062.
- MILJEVIC, B., HEDAYAT, F., STEVANOVIC, S., FAIRFULL-SMITH, K. E., BOTTLE, S. E. & RISTOVSKI, Z. D. 2014. To Sonicate or Not to Sonicate PM Filters: Reactive Oxygen Species Generation Upon Ultrasonic Irradiation. *Aerosol Science and Technology*, 48, 1276-1284.
- MISHRA, P. K., MISHRA, H., EKIELSKI, A., TALEGAONKAR, S. & VAIDYA, B. 2017. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 22, 1825-1834.
- MITCHELL, J. K., MIDKIFF, B. R., ISRAELOW, B., EVANS, M. J., LANFORD, R. E., WALKER, C. M., LEMON, S. M. & MCGIVERN, D. R. 2017. Hepatitis C Virus Indirectly Disrupts DNA Damage-Induced p53 Responses by Activating Protein Kinase R. *mBio*, 8.

- MITTAG, A., HOERA, C., KÄMPFE, A., WESTERMANN, M., KUCKELKORN, J., SCHNEIDER, T. & GLEI, M. 2021. Cellular Uptake and Toxicological Effects of Differently Sized Zinc Oxide Nanoparticles in Intestinal Cells. *Toxics*, 9.
- MONOPOLI, M. P., ÅBERG, C., SALVATI, A. & DAWSON, K. A. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7, 779-786.
- MORATIN, H., SCHERZAD, A., GEHRKE, T., ICKRATH, P., RADELOFF, K., KLEINSASSER, N. & HACKENBERG, S. 2018. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59, 247-259.
- MÜHL, I. 2024. *Analyse zellulärer Apoptose und DNA-Schäden im Tumor nach intravaskulärer Applikation von Zinkoxid-Nanopartikeln im CAM Assay*, Osnabrück, Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- NABIL, A., ELSHEMY, M. M., ASEM, M., ABDEL-MOTAAL, M., GOMAA, H. F., ZAHRAN, F., UTO, K. & EBARA, M. 2020. Zinc Oxide Nanoparticle Synergizes Sorafenib Anticancer Efficacy with Minimizing Its Cytotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 1362104.
- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. & SATO, J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42, 3858-63.
- NASEER, M., ASLAM, U., KHALID, B. & CHEN, B. 2020. Green route to synthesize Zinc Oxide Nanoparticles using leaf extracts of Cassia fistula and Melia azadarach and their antibacterial potential. *Scientific Reports*, 10, 9055.
- NG, C. T., YONG, L. Q., HANDE, M. P., ONG, C. N., YU, L. E., BAY, B. H. & BAEG, G. H. 2017. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and Drosophila melanogaster. *International journal of nanomedicine*, 1621-1637.
- NG, K. W., KHOO, S. P. K., HENG, B. C., SETYAWATI, M. I., TAN, E. C., ZHAO, X., XIONG, S., FANG, W., LEONG, D. T. & LOO, J. S. C. 2011. The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 8218-8225.
- NIENHAUS, K. & NIENHAUS, G. U. 2023. Mechanistic Understanding of Protein Corona Formation around Nanoparticles: Old Puzzles and New Insights. *Small*, 19, e2301663.
- NOVUS BIOLOGICALS 2024. Zinc Assay Kit (Colorimetric) – Datasheet NBP3-24548. *Version 20.1, aktualisiert 3. März, 2024*. 20.1 ed.: Novus Biologicals,.
- NOWAK-SLIWINSKA, P., SEGURA, T. & IRUELA-ARISPE, M. L. 2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17, 779-804.
- OHNO, H., DOI, R., YAMAMURA, K., YAMASHITA, K., IIZUKA, S. & TANIGUCHI, N. 1985. A study of zinc distribution in erythrocytes of normal humans. *Blut*, 50, 113-6.
- ÖNAL ACET, B., GÜL, D., STAUBER, R. H., ODABAŞI, M. & ACET, Ö. 2024. A Review for Uncovering the “Protein-Nanoparticle Alliance”: Implications of the Protein Corona for Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 14, 823.
- PADMANABHAN, A., KAUSHIK, M., NIRANJAN, R., RICHARDS, J. S., EBRIGHT, B. & VENKATASUBBU, G. D. 2019. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative and proteotoxic stress in ovarian cancer cells and trigger apoptosis independent of p53-mutation status. *Applied Surface Science*, 487, 807-818.
- PAI, S. I. & WESTRA, W. H. 2009. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*, 4, 49-70.
- PANG, H. B., BRAUN, G. B., FRIMAN, T., AZA-BLANC, P., RUIDIAZ, M. E., SUGAHARA, K. N., TEESALU, T. & RUOSLAHTI, E. 2014. An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nat Commun*, 5, 4904.
- PARK, K. S., AHN, Y., KIM, J. A., YUN, M. S., SEONG, B. L. & CHOI, K. Y. 2002. Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21(Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol*, 137, 597-607.

- POMRAENKE, M., BOLNEY, R., WINKENS, T., PERKAS, O., PRETZEL, D., THEIS, B., GREISER, J. & FREESMEYER, M. 2023. A Novel Breast Cancer Xenograft Model Using the Ostrich Chorioallantoic Membrane-A Proof of Concept. *Vet Sci*, 10.
- PREUß, D. 2022. *Untersuchung der kombinierten Behandlung von Tumoren im Chorionallantoismembran-Modell mit Zinkoxidnanopartikeln und Radiotherapie*, Idstein, Hochschule Fresenius Fachbereich Chemie & Biologie.
- PRZYSIECKA, L., MICHALSKA, M., NOWACZYK, G., PEPLINSKA, B., JESIONOWSKI, T., SCHNEIDER, R. & JURGA, S. 2016. iRGD peptide as effective transporter of CuInZnS_{2+x} quantum dots into human cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 146, 9-18.
- PUSHPALATHA, C., SURESH, J., GAYATHRI, V. S., SOWMYA, S. V., AUGUSTINE, D., ALAMOUDI, A., ZIDANE, B., MOHAMMAD ALBAR, N. H. & PATIL, S. 2022. Zinc Oxide Nanoparticles: A Review on Its Applications in Dentistry. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 917990.
- RAHIMI KALATEH SHAH MOHAMMAD, G., SEYEDI, S. M. R., KARIMI, E. & HOMAYOUNI-TABRIZI, M. 2019. The cytotoxic properties of zinc oxide nanoparticles on the rat liver and spleen, and its anticancer impacts on human liver cancer cell lines. *J Biochem Mol Toxicol*, 33, e22324.
- RASMUSSEN, J. W., MARTINEZ, E., LOUKA, P. & WINGETT, D. G. 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7, 1063-1077.
- RASMUSSEN, S. V., BERLOW, N. E., PRICE, L. H., MANSOOR, A., CAIRO, S., RUGONYI, S. & KELLER, C. 2021. Preclinical therapeutics ex ovo quail eggs as a biomimetic automation-ready xenograft platform. *Sci Rep*, 11, 23302.
- RIBATTI, D. 2016. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*, 141, 70-77.
- RIBATTI, D. 2017. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*, 70, 97-101.
- RODIC, S., MCCUDDEN, C. & VAN WALRAVEN, C. 2022. Relationship between Plasma Zinc and Red Blood Cell Zinc Levels in Hospitalized Patients *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 7, 1412-1423.
- ROMANOFF, A. L. 1960. *The avian embryo; structural and functional development*, New York,, Macmillan.
- RUOSLAHTI, E. 2017. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 110-111, 3-12.
- RUOSLAHTI, E. 2022. Molecular ZIP codes in targeted drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2200183119.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. *The principles of humane experimental technique*, Methuen.
- SANTARPIA, L., LIPPMAN, S. M. & EL-NAGGAR, A. K. 2012. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16, 103-19.
- SASIDHARAN, A., CHANDRAN, P., MENON, D., RAMAN, S., NAIR, S. & KOYAKUTTY, M. 2011. Rapid dissolution of ZnO nanocrystals in acidic cancer microenvironment leading to preferential apoptosis. *Nanoscale*, 3, 3657-69.
- SAUER, L., GITENAY, D., VO, C. & BARON, V. T. 2010. Mutant p53 initiates a feedback loop that involves Egr-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells. *Oncogene*, 29, 2628-37.
- SCHIRRMACHER, V. 2019. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*, 54, 407-419.
- SCHMITHALS, C., KOBERLE, V., KORKUSUZ, H., PLELI, T., KAKOSCHKY, B., AUGUSTO, E. A., IBRAHIM, A. A., ARENCIBIA, J. M., VAFAIZADEH, V., GRONER, B., KORF, H. W., KRONENBERGER, B., ZEUZEM, S., VOGL, T. J., WAIDMANN, O. & PIIPER, A. 2015. Improving Drug Penetrability with iRGD Leverages the Therapeutic Response to Sorafenib and Doxorubicin in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*, 75, 3147-54.

- SHANG, L., NIENHAUS, K. & NIENHAUS, G. U. 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology*, 12, 5.
- SHARMA, H., KUMAR, K., CHOUDHARY, C., MISHRA, P. K. & VAIDYA, B. 2016. Development and characterization of metal oxide nanoparticles for the delivery of anticancer drug. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44, 672-679.
- SHEHADUL ISLAM, M., ARYASOMAJAJULA, A. & SELVAGANAPATHY, P. R. 2017. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8, 83.
- SHEN, C., JAMES, S. A., DE JONGE, M. D., TURNEY, T. W., WRIGHT, P. F. & FELTIS, B. N. 2013. Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicol Sci*, 136, 120-30.
- SHI, D. 2017. Cancer Cell Surface Negative Charges: A Bio-Physical Manifestation of the Warburg Effect. *Nano LIFE*, 07, 1771001.
- SHOAI, A., SHAHID, S., MANSOOR, S., JAVED, M., IQBAL, S., MAHMOOD, S., BAHADUR, A., JABER, F. & ALSHALWI, M. 2024. Tailoring of an anti-diabetic drug empagliflozin onto zinc oxide nanoparticles: characterization and in vitro evaluation of anti-hyperglycemic potential. *Scientific Reports*, 14, 2499.
- SIRABELLA, R., VALSECCHI, V., ANZILOTTI, S., CUOMO, O., VINCIGUERRA, A., CEPPARULO, P., BRANCACCIO, P., GUIDA, N., BLONDEAU, N., CANZONIERO, L. M. T., FRANCO, C., AMOROSO, S., ANNUNZIATO, L. & PIGNATARO, G. 2018. Ionic Homeostasis Maintenance in ALS: Focus on New Therapeutic Targets. *Front Neurosci*, 12, 510.
- SKALNY, A. V., ASCHNER, M. & TINKOV, A. A. 2021. Zinc. *Adv Food Nutr Res*, 96, 251-310.
- SMIJS, T. G. & PAVEL, S. 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl*, 4, 95-112.
- SONG, W., ZHANG, J., GUO, J., ZHANG, J., DING, F., LI, L. & SUN, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett*, 199, 389-97.
- STREBHARDT, K. & ULLRICH, A. 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8, 473-480.
- SUGAHARA, K. N., BRAUN, G. B., DE MENDOZA, T. H., KOTAMRAJU, V. R., FRENCH, R. P., LOWY, A. M., TEESALU, T. & RUOSLAHTI, E. 2015. Tumor-Penetrating iRGD Peptide Inhibits Metastasis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14, 120-128.
- SUGAHARA, K. N., TEESALU, T., KARMALI, P. P., KOTAMRAJU, V. R., AGEMY, L., GIRARD, O. M., HANAHAN, D., MATTREY, R. F. & RUOSLAHTI, E. 2009. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell*, 16, 510-20.
- SUGAHARA, K. N., TEESALU, T., KARMALI, P. P., KOTAMRAJU, V. R., AGEMY, L., GREENWALD, D. R. & RUOSLAHTI, E. 2010. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*, 328, 1031-5.
- SUSS, S. C., WERNER, J., SALLER, A. M., WEISS, L., REISER, J., ONDRACEK, J. M., ZABLOTSKI, Y., KOLLMANSPERGER, S., ANDERS, M., POTSCHKA, H., SCHUSSER, B., FENZL, T. & BAUMGARTNER, C. 2023. Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus. *Animals (Basel)*, 13.
- TABREZ, S., KHAN, A. U., HOQUE, M., SUHAIL, M., KHAN, M. I. & ZUGHAIBI, T. A. 2022. Biosynthesis of ZnO NPs from pumpkin seeds' extract and elucidation of its anticancer potential against breast cancer. *Nanotechnology Reviews*, 11, 2714-2725.
- TAHA, H. M., ROZEK, L. S., CHEN, X., LI, Z., ZARINS, K. R., SLADE, A. N., WOLF, G. T. & ARTHUR, A. E. 2022. Risk of Disease Recurrence and Mortality Varies by Type of Fat Consumed before Cancer Treatment in a Longitudinal Cohort of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *The Journal of Nutrition*, 152, 1298-1305.
- THEEK, B., BAUES, M., OJHA, T., MÖCKEL, D., VEETIL, S. K., STEITZ, J., VAN BLOOIS, L., STORM, G., KIESSLING, F. & LAMMERS, T. 2016. Sonoporation enhances liposome accumulation and penetration in tumors with low EPR. *J Control Release*, 231, 77-85.

- THIRUMALAI, A., GIRIGOSWAMI, K., PALLAVI, P., HARINI, K., GOWTHAM, P. & GIRIGOSWAMI, A. 2023. Cancer therapy with iRGD as a tumor-penetrating peptide. *Bull Cancer*, 110, 1288-1300.
- TOMITA, T., KATO, M. & HIRATSUKA, S. 2021. Regulation of vascular permeability in cancer metastasis. *Cancer Sci*, 112, 2966-2974.
- TONGU, M., HASHIMOTO, H., YAMADA, T., KIMURA-KATAOKA, K., YASUDA, T., AKIYOSHI, H., FUJITA, Y., TAKESHITA, H. & FUJIHARA, J. 2014. Comparison of acute toxicity of ZnO and silica-coated ZnO nanoparticles in mice after single intravenous injection: preliminary experiment to apply to biological imaging. *Shimane J Med Sci*, 31, 7-11.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2020. *SCOGS Database – Zinc Oxide* [Online]. Available: https://www.hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=SCOGS&sort=SCOG_S_Report_Number&order=ASC&showAll=true&type=advanced&search=%C2%A4Zinc%20Oxid%C2%A4%C2%A4 [Accessed 09.02.2025].
- WATERMANN, A., GIERINGER, R., BAUER, A. M., KURCH, S., KIESSLICH, R., TREMEL, W., GOSEPATH, J. & BRIEGER, J. 2019. Fluorescein- and EGFR-Antibody Conjugated Silica Nanoparticles for Enhancement of Real-time Tumor Border Definition Using Confocal Laser Endomicroscopy in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Nanomaterials (Basel)*, 9.
- WEISS, L., SALLER, A. M., WERNER, J., SUSS, S. C., REISER, J., KOLLMANSPERGER, S., ANDERS, M., POTSCHEKA, H., FENZL, T., SCHUSSER, B. & BAUMGARTNER, C. 2023. Nociception in Chicken Embryos, Part I: Analysis of Cardiovascular Responses to a Mechanical Noxious Stimulus. *Animals (Basel)*, 13.
- WIESMANN, N. 2019. *Analysis of the toxicity mechanism of zinc oxide nanoparticles aiming at their application as innovative anti-tumor agent*, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, FB 04 Medizin, FB 09 Chemie, Pharmazie u. Geowissensch.
- WIESMANN, N., KLUENKER, M., DEMUTH, P., BRENNER, W., TREMEL, W. & BRIEGER, J. 2019. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 51, 226-234.
- WILHELMI, V., FISCHER, U., WEIGHARDT, H., SCHULZE-OSTHOFF, K., NICKEL, C., STAHLMECKE, B., KUHNBUSCH, T. A., SCHERBART, A. M., ESSER, C., SCHINS, R. P. & ALBRECHT, C. 2013. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One*, 8, e65704.
- WILSON, M., HOGSTRAND, C. & MARET, W. 2012. Picomolar concentrations of free zinc(II) ions regulate receptor protein-tyrosine phosphatase beta activity. *J Biol Chem*, 287, 9322-6.
- WINGETT, D., LOUKA, P., ANDERS, C. B., ZHANG, J. & PUNNOOSE, A. 2016. A role of ZnO nanoparticle electrostatic properties in cancer cell cytotoxicity. *Nanotechnol Sci Appl*, 9, 29-45.
- WU, J. 2021. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*, 11, 771.
- XIN, X., SHA, H., SHEN, J., ZHANG, B., ZHU, B. & LIU, B. 2016. Coupling Gd-DTPA with a bispecific, recombinant protein anti-EGFR-iRGD complex improves tumor targeting in MRI. *Oncol Rep*, 35, 3227-35.
- YANG, R., WU, R., MEI, J., HU, F. R. & LEI, C. J. 2021. Zinc oxide nanoparticles promotes liver cancer cell apoptosis through inducing autophagy and promoting p53. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 25, 1557-1563.
- YI, C., YU, Z., REN, Q., LIU, X., WANG, Y., SUN, X., YIN, S., PAN, J. & HUANG, X. 2020. Nanoscale ZnO-based photosensitizers for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, 101694.
- YIN, H., CHEN, R., CASEY, P. S., KE, P., DAVIS, T. & CHEN, C. 2015. Reducing the cytotoxicity of ZnO nanoparticles by pre-formed protein corona in supplemented cell culture medium. *RSC Advances*, 5.

- ZHANG, B., SHI, W., JIANG, T., WANG, L., MEI, H., LU, H., HU, Y. & PANG, Z. 2016. Optimization of the tumor microenvironment and nanomedicine properties simultaneously to improve tumor therapy. *Oncotarget*, 7, 62607.
- ZHANG, C., LIU, Z., ZHANG, Y., MA, L., SONG, E. & SONG, Y. 2020. "Iron free" zinc oxide nanoparticles with ion-leaking properties disrupt intracellular ROS and iron homeostasis to induce ferroptosis. *Cell Death & Disease*, 11, 183.
- ZHAO, F., WANG, Z. & HUANG, H. 2024. Physical Cell Disruption Technologies for Intracellular Compound Extraction from Microorganisms. *Processes*, 12, 2059.

10 Danksagung

Der Umbruch zwischen Uni-Alltag und Arbeitswelt ist bekanntlich groß. Nachdem das Examen in der Tasche war, habe ich mich dazu entschieden, das Jahr 2024 vollständig der Forschung zu widmen und den Zahnbohrer zunächst unangetastet zu lassen. Ich blicke zurück auf ein lehrreiches und forderndes Laborjahr, geprägt von vielen neuen Gesichtern, die mich auf meinem Weg zur Promotion auf unterschiedlichste Weise unterstützt und daher eine persönliche Danksagung verdient haben.

Danke an meinen Doktorvater für seine stets verlässliche Unterstützung. Seine strukturierte Betreuung half mir, das Ziel nie aus den Augen zu verlieren. Die regelmäßigen Präsentationen im Seminar gaben mir Ansporn, immer tiefer in mein Forschungsthema einzutauchen und Ergebnisse, wie auch wissenschaftliche Literatur kritisch zu hinterfragen.

Danke für die hohe fachliche Kompetenz, die motivierenden Worte sowie die ausführliche Expertise im Material- und Methodenteil.

Danke an die Mitarbeiterinnen des Labors für Molekulare Tumorbologie für die sorgfältige und geduldige Einarbeitung in alle für mich relevanten Labortechniken. Das allzeit offene Ohr und die ununterbrochene Hilfsbereitschaft habe ich sehr wertgeschätzt. Danke außerdem für die Unterstützung dabei, jede noch so große rechnerische oder technische Hürde zu überwinden.

Danke an alle Teilnehmenden des wöchentlichen Labor-Seminars für den fachlichen Austausch und das Interesse an meinen Forschungsfortschritten.

Danke an alle Mitarbeitenden des Cafés 102 für den unersättlichen Kaffeinnachschub an langen Nachmittagen. Das Café war während meines Studiums und auch in der Promotionszeit ein wichtiger Zufluchtsort und hat jede Mittagspause mit meinen Kommilitonen auf besondere Weise bereichert.

Danke an alle meine Freunde, mit denen ich Leid und Freude gleichermaßen teilen konnte, die mir mit ihrer Erfahrung zur Seite standen und mit denen ich jeden erreichten Meilenstein gebührend feiern durfte.

Zuletzt: Danke an meine Familie, allen voran meine Mutter, für die emotionale und finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

11 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Brassard
Vorname: Juliette Aimee
Geburtsdatum: 21.10.1999
Geburtsort: Bad Kreuznach

Bildungsweg

seit 03/2024 **Aufnahme der Promotion**
AG Brieger Universitätsmedizin Mainz

01/2024 **Approbation als Zahnärztin**

10/2018–12/2023 **Studium der Zahnmedizin**
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Abschluss: Staatsexamen

08/2009–03/2018 **Gymnasium an der Stadtmauer, Bad Kreuznach**
Abschluss: Abitur

Berufserfahrung

seit 01/2025 **Zahnärztin in Vorbereitungszeit**
ZMK Lübeck
Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Lübeck

06/2024–12/24 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
TTP-Register, 3.Med. Klinik und Poliklinik, Mainz

09/2021 – 07/2023 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Privatambulanz der Hautklinik, Mainz