

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

Analyse zellulärer Apoptose und DNA-Schäden im Tumor  
nach intravaskulärer Applikation von Zinkoxid-Nanopartikeln  
im CAM Assay

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

Vorgelegt von

Ida Marie Aloe Mühl

aus

Recklinghausen

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Brieger

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

Tag der Promotion: 08. August 2024

## Zusammenfassung

Tumorerkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen, und es besteht ein großer Bedarf, Tumorthérapien effizienter, verträglicher und zielgerichteter zu machen. Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP) könnten aufgrund ihrer besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften eine innovative Möglichkeit zur selektiven Tumorthérapie darstellen. Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens sollte daher ihre *in vitro* gezeigte toxische Wirkung auf Tumorzellen mit nachfolgender zellulärer Apoptose in einem *in vivo* Modell, dem CAM-Assay, verifiziert werden. Hierzu wurden *in ovo* humane Tumorzellen auf der extraembryonalen, reich vaskularisierten Chorionallantoismembran (CAM) zu einem Tumor herangezüchtet, der dann Anschluss an das Gefäßsystem des Hühnerembryos erlangte. Mittels Western Blot wurden dann das phosphorylierte Histon ( $\gamma$ H2AX) als Hinweis auf DNA-Schäden und die *Cleaved* Caspase-9 (CIC-9) als Hinweis auf Apoptosen nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP im Tumor untersucht. Insgesamt wurden aus drei voneinander unabhängigen Durchgängen des CAM-Assays 56 Tumorlysate gewonnen, in denen die Proteinexpression von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 nach intravaskulärer Gabe von ZnO-NP oder sterilem destillierten Wasser (Aqua dest.) als Kontrolle untersucht wurde. Dabei spielte die Etablierung eines geeigneten Puffersystems zur Gewebelyse und nachgeschalteter Immundetektion eine wichtige Rolle. Zur Gewebelyse erwies sich der RIPA-Puffer v.a. aufgrund der schlechten Löslichkeit von  $\gamma$ H2AX in RIPA-Puffer als unbrauchbar. Ein Einfach-Lysepuffer zeigte eine deutlich überlegene Löslichkeit für das  $\gamma$ H2AX und reproduzierbare Ergebnisse in der Immundetektion von  $\gamma$ H2AX und CIC-9. In allen untersuchten Tumorproben gelang der Nachweis des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX und des Apoptosemarkers CIC-9, jedoch ließen sich beim Vergleich zwischen der Applikation von sterilem Aqua dest. und der Gabe von 270  $\mu$ g ZnO-NP pro Ei keine signifikanten Unterschiede bezüglich der DNA-Schäden oder der zellulären Apoptosen im Tumor nachweisen. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ließen sich somit keine toxischen Effekte durch ZnO-NP in den Tumoren auf der CAM nachweisen. Die Ursachen für die Diskrepanz zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Daten muss nun in nachfolgenden Untersuchungen aufgeklärt werden.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Literaturdiskussion.....	1
1.1. Einführung .....	1
1.2. Zinkoxid Nanopartikel (ZnO-NP) als Option zur Tumorthherapie .....	2
1.2.1. ZnO-NP als Adjuvanz in der Tumorthherapie .....	2
1.3. Transport von ZnO-NP zum Tumor und Internalisierung in die Zelle.....	3
1.4. Toxizität von ZnO-NP .....	5
1.4.1. Zyto- und Genotoxizität von ZnO-NP .....	5
1.4.2. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.....	5
1.4.3. ROS und ihre Auswirkungen auf die Tumorzelle.....	6
1.4.4. Auswirkung der aus den ZnO-NP freigesetzten Zn <sup>2+</sup> .....	7
1.5. Nachweis von DNA-Schäden und Apoptose nach Applikation von ZnO-NP.....	7
1.5.1. $\gamma$ H2AX als DNA-Schadensmarker .....	7
1.5.2. Caspasen und <i>Cleaved Caspasen</i> als Apoptosemarker .....	8
1.6. Tumorforschung <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i> .....	8
1.7. Zytotoxizität, Immuntoxizität und epigenetische Veränderungen nach ZnO-NP Gabe <i>in vivo</i> .....	9
1.8. ZnO-NP als potentielles Tumorthapeutikum <i>in vivo</i> .....	10
1.9. CAM-Assay.....	11
1.9.1. Chorionallantoismembran (CAM).....	12
1.9.2. Nanopartikel im CAM-Assay .....	14
1.10. Ziele .....	15
2 Material.....	16
2.1. Zellen.....	16
2.1.1. Zelllinie .....	16
2.1.2. Mykoplasmen Detektion .....	16
2.2. Befruchtete Hühnereier.....	16
2.3. Zinkoxid Nanopartikel .....	16
2.3.1. Charakterisierung der ZnO-NP .....	16
2.4. Chemikalien.....	17
2.5. Verbrauchsmaterialien.....	19
2.6. Geräte .....	21

2.7.	Software .....	23
2.8.	Puffer und Zellkulturmedium .....	23
2.8.1.	Puffer zur Probenaufbereitung .....	23
2.8.2.	Puffer zur Probenanalyse .....	24
2.8.3.	Lösungen für die Zellkultur.....	25
3	Methoden.....	27
3.1.	Zellkultur.....	27
3.1.1.	Kultivieren der Zellen .....	27
3.1.2.	Begutachtung der Zellkultur .....	27
3.1.3.	Kryokonservierung.....	27
3.1.4.	Passagieren der Zellen.....	28
3.1.5.	Erstellung der 3D-Zellkulturen .....	28
3.2.	CAM-Assay.....	30
3.2.1.	Versuchsstart.....	30
3.2.2.	Eröffnung der Eier .....	31
3.2.3.	Erweitertes Öffnen der Eier.....	31
3.2.4.	Besiedlung der CAM mit Tumorzellen.....	32
3.2.5.	Begutachtung des Tumorstadiums.....	32
3.2.6.	Intravaskuläre Applikation von ZnO-NP .....	33
3.2.7.	Tumorentnahme .....	33
3.2.8.	Organentnahme.....	34
3.3.	Herstellung der Tumor-Lysate.....	34
3.3.1.	Zugabe von RIPA-Puffer bei der Tumorentnahme .....	34
3.3.2.	Zugabe von Einfach-Lysepuffer nach der Tumorentnahme.....	35
3.3.3.	Lysieren und Zentrifugieren der Tumorproben .....	35
3.4.	Probenanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immundetektion .....	36
3.4.1.	Proteinbestimmung.....	36
3.4.2.	Probenaufbereitung .....	37
3.4.2.1.	Probenvorbereitung bei der Verwendung von RIPA-Puffer .....	38
3.4.2.1.1.	Zugabe von Ladepuffer .....	39
3.4.2.2.	Probenvorbereitung bei der Verwendung von Einfach-Lysepuffer.....	39
3.4.2.2.1.	Zugabe von Ladepuffer .....	39
3.4.2.3.	Denaturierung der Proben .....	40
3.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
3.4.3.1.	Herstellung der Gele.....	40
3.4.3.2.	Befüllen der Gel-Taschen .....	41

3.4.3.3.	Gel-Elektrophorese.....	41
3.4.4.	Wet blot .....	42
3.4.5.	Immundetektion .....	43
3.4.5.1.	Lösen der Antikörper von der Membran.....	44
3.5.	Positivkontrollen .....	45
3.6.	Statistische Auswertung.....	47
4	Ergebnisse.....	49
4.1.	Methodenoptimierung: Etablierung eines geeigneten Puffersystems .....	49
4.1.1.	Immundetektionen der Proben in RIPA-Puffer .....	49
4.1.2.	Proben in RIPA-Puffer: Kurzer Lagerungszeitraum.....	49
4.1.3.	Proben in RIPA-Puffer: Langer Lagerungszeitraum .....	50
4.1.3.1.	RIPA-Probenverdünnungen mit Ladepuffer und Bedeutung des Lagerungszeitraums.....	50
4.1.4.	Immundetektion Einfach-Lysepuffer vs. RIPA-Puffer .....	52
4.2.	Datenerhebung.....	53
4.2.1.	Immundetektionen der Proben in Einfach-Lysepuffer.....	53
4.2.2.	Übersicht der Probenentnahmen im CAM-Assay.....	53
4.2.3.	Probenausschluss .....	54
4.2.4.	Immundetektionen von $\gamma$ H2AX .....	55
4.2.4.1.	Auswertung der relativen $\gamma$ H2AX Expression.....	56
4.2.5.	Immundetektion von <i>Cleaved</i> Caspase-9 .....	57
4.2.5.1.	Auswertung der relativen CIC-9 Expression.....	58
5	Diskussion .....	59
5.1.	Etablierung eines geeigneten Puffersystems zur Gewebelyse und Immundetektion von Histonen und Caspasen.....	59
5.2.	Expression von $\gamma$ H2AX und CIC-9 .....	61
5.2.1.	Nachweis von $\gamma$ H2AX nach ZnO-NP Applikation .....	61
5.2.2.	Nachweis von $\gamma$ H2AX-ub1 .....	62
5.2.3.	Caspasen und <i>Cleaved</i> Caspasen nach ZnO-NP .....	62
5.2.4.	Einflussgrößen im CAM-Assay .....	63
6	Fazit.....	65
7	Ausblick .....	65
8	Literaturverzeichnis.....	V
9	Anhang.....	XI
9.1.	Probenentnahmen .....	XI
9.2.	Immundetektion .....	XII
9.2.1.	Membranen 1-7 der Immundetektion von $\gamma$ H2AX und $\beta$ Aktin.....	XII

9.2.2.	Membranen 8-14 der Immundetektion von CIC-9 und $\beta$ -Aktin .....	XIX
10	Lebenslauf .....	XXVI

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebener Name
<b>ANOVA</b>	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CAM</b>	Chorionallantoismembran
<b>CIC-9</b>	<i>Cleaved Caspase-9</i> , gespalten an Asparagin 330
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMEM+</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit 2% P/S und 5% FCS
<b>DSB</b>	DNA-Doppelstrangbrüche
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HRP</b>	<i>Horse Radish Peroxidase/Meerrettich-Peroxidase</i>
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Puffer</i>
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>Revolution per Minute</i> )
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-Buffered Saline</i>
<b>TBST</b>	<i>Tris-Buffered Saline</i> mit Tween® 20
<b>TE</b>	Trypsin/EDTA-Lösung, 1x
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskop
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zink-Ionen
<b>ZnCl</b>	Zink-Chlorid
<b>ZnO-NP</b>	Zinkoxid-Nanopartikel
<b>γH2AX</b>	H2A, Mitglied der Histonfamilie X, phosphoryliert an Serin 139
<b>γH2AX-ub1</b>	Monoubiquitiniertes γH2AX

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Internalisierung von ZnO-NP und Zn <sup>2+</sup> in die Zelle .....	4
Abbildung 2: Entstehung von ROS auf der Oberfläche von ZnO-NP .....	6
Abbildung 3: Aufbau Chorionallantoismembran .....	13
Abbildung 4: Schematischer Querschnitt eines befruchteten Eies .....	14
Abbildung 5: TEM-Aufnahme der verwendeten ZnO-NP .....	17
Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf des CAM-Assays .....	30
Abbildung 7: Eröffnetes Ei an Tag 6 des Versuches .....	31
Abbildung 8: Eingewachsener Tumor an Tag 12 des Versuches .....	32
Abbildung 9: Auftrag zur Proteinbestimmung in der 96-Well Platte .....	37
Abbildung 10: Beispiel zur BSA-Eichgerade mit abgebildeter Geradengleichung .....	37
Abbildung 11: Aufbau der <i>wet blot</i> Kassette .....	42
Abbildung 12: <i>Stain-Free</i> Gel und <i>Stain-Free</i> Blot .....	43
Abbildung 13: Positivkontrollen für <i>Cleaved Caspase-9</i> .....	46
Abbildung 14: Positivkontrolle Huh-7 20µg/ml ZnCl vom 25.04.2022 .....	47
Abbildung 15: Immundetektion von γH2AX nach einem kurzen Lagerungszeitraum .....	49
Abbildung 16: Immundetektion von γH2AX nach einem langen Lagerungszeitraum .....	50
Abbildung 17: Immundetektion alte Probeverdünnungen vs. neue Probenverdünnungen ....	51
Abbildung 18: Immundetektion Einfach-Lysepuffer vs. RIPA-Puffer .....	52
Abbildung 19: <i>Stain-Free</i> Gel und korrespondierende β-Aktin Immundetektion A .....	54
Abbildung 20: <i>Stain-Free</i> Gel und korrespondierende β-Aktin Immundetektion B .....	54
Abbildung 21: Immundetektion γH2AX und β-Aktin .....	55
Abbildung 22: Relative γH2AX Expression .....	56
Abbildung 23: Immundetektion <i>Cleaved Caspase-9</i> und β-Aktin .....	57
Abbildung 24: Relative <i>Cleaved Caspase-9</i> Expression .....	58
Abbildung 25: Membran 1 .....	XII
Abbildung 26: Membran 2 .....	XIII
Abbildung 27: Membran 3 .....	XIV
Abbildung 28: Membran 4 .....	XV
Abbildung 29: Membran 5 .....	XVI
Abbildung 30: Membran 6 .....	XVII
Abbildung 31: Membran 7 .....	XVIII
Abbildung 32: Membran 8 .....	XIX
Abbildung 33: Membran 9 .....	XX
Abbildung 34: Membran 10 .....	XXI
Abbildung 35: Membran 11 .....	XXII

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36: Membran 12 .....	XXIII
Abbildung 37: Membran 13 .....	XXIV
Abbildung 38: Membran 14 .....	XXV

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien .....	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	19
Tabelle 3: Geräte.....	21
Tabelle 4: Software .....	23
Tabelle 5: Verdünnung der ZnO-NP .....	33
Tabelle 6: Herstellung der Tumor-Lysate.....	34
Tabelle 7: Puffersystem RIPA-Puffer vs. Einfach-Lyspuffer .....	38
Tabelle 8: Beispielrechnung für die Probenverdünnung mit RIPA-Puffer .....	38
Tabelle 9: Beispielrechnung für die Zugabe von Ladepuffer zu den Probenverdünnungen...	39
Tabelle 10: Beispielrechnung für den Proteinauftrag bei Proben in RIPA-Puffer.....	39
Tabelle 11: Beispielrechnung für den Proteinauftrag bei Proben in Einfach-Lysepuffer .....	39
Tabelle 12: Übersicht über die Antikörper und die Blockierungen bei der Immundetektion ...	43
Tabelle 13: Evaluation unterschiedlicher Positivkontrollen bezüglich ihrer Eignung bei der Detektion von <i>Cleaved Caspase-9</i> .....	46
Tabelle 14: Übersicht der Probenentnahmen im CAM-Assay .....	53
Tabelle 15: Probenentnahme Durchgang 6-8 .....	XI

## 1 Literaturdiskussion

### 1.1. Einführung

Weltweit erkrankten 2020 laut des *World Cancer Research Funds* ca. 18 Millionen Menschen an einer Tumorerkrankung (WCRF, 2020), und Tumorerkrankungen waren 2021 mit 22,4% die zweithäufigste Todesursache deutschlandweit (Destatis, 2022). Tumorerkrankungen treten überwiegend bei Menschen ab dem 65 Lebensjahr auf, sind jedoch nicht auf diese Altersgruppe beschränkt. In Anbetracht des demographischen Wandels ist die Tumorthherapie eine der wichtigsten Aufgaben der Medizin des 21. Jahrhunderts. Laut der *World Health Organization* gehören zu den Therapieoptionen bei Tumorerkrankungen sowohl Operationen, Anti-Tumorthapeutika und/oder die Radiotherapie. Je nach Art, Lokalisation und Fortschreiten der Tumorerkrankung werden dabei individuelle Therapieabläufe notwendig (WHO, 2023). Chemotherapeutika spielen aufgrund ihrer systemischen Wirkung in der Tumorthherapie eine übergeordnete Rolle, da sie auch in fortgeschrittenem Stadium anwendbar sind und bei Inoperabilität des Tumors zum Einsatz kommen können. Ein großer Nachteil ist, dass sie ebenfalls aufgrund der systemischen Wirkung Normalgewebe in ihrer Funktion schädigen und anhand der dadurch entstehenden Symptome nur limitiert anwendbar sind. Organsysteme mit sich schnell teilenden Zellen werden von den Chemotherapeutika stark angegriffen und führen häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen. Hier zu nennen sind u.a. die Schleimhäute des Verdauungstraktes, welche zu Stomatitis, Diarrhoe mit starker Übelkeit und massivem Erbrechen führen können. Eine der gravierendsten Nebenwirkungen ist die Toxizität auf die Zellen der Blutbildung im Knochenmark und die damit einhergehende Immunsuppression. Die Immunsuppression im Rahmen der systemischen Chemotherapie kann letale Folgen für die Patienten haben. Die Dosiserhöhung der aufeinanderfolgenden Gabe von Chemotherapeutika kann zudem zu einer Resistenz der Tumorzellen führen, d.h. die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Therapie nimmt ab (Markman et al., 2013, Anjum et al., 2021). In den letzten Jahrzehnten wurde daran geforscht, die Applikation von Chemotherapeutika verpackt in Nanopartikeln zu ermöglichen, um systemische Nebenwirkungen zu verringern. Klinische Anwendung finden solche Nanopartikel seit einigen Jahren z.B. bei metastasiertem Brustkrebs. Die Wirkstoffe sind Docetaxel konjugiert mit Polyethylenglykol (PEG), Doxorubicin konjugiert mit PEG und Paclitaxel gebunden an Albumin. (Mu et al., 2017) Dies sind Formulierungen, die sich die besonderen Eigenschaften von Nanopartikeln zunutze machen. Nanopartikel haben mit ihrer Größe von ca. 1-100 nm eine große Oberfläche im Verhältnis zum Volumen und dadurch viele reaktive Atome auf ihrer Oberfläche, die in Interaktion mit ihrer Umgebung treten können (Nel et al., 2006). Ihre Größe, welche vergleichbar ist mit Enzymen des menschlichen Körpers, und ihre

Oberflächenbeschaffenheit ermöglichen es Nanopartikeln, vermehrt mit Tumorzellen zu interagieren und von diesen aufgenommen zu werden.

### **1.2. Zinkoxid Nanopartikel (ZnO-NP) als Option zur Tumorthherapie**

Für eine Verbesserung der Tumorthherapie werden immer neue Möglichkeiten gesucht, das Tumorstadium zu hemmen, ohne dabei schwere systemische Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen. Die Möglichkeit ZnO-NP zu applizieren, welche idealerweise lokal im Tumor wirken können, stellt potentiell eine Option zur Verbesserung der selektiven Tumorthherapie dar. Die systemischen Nebenwirkungen einer Chemotherapie oder der Radiotherapie könnten hierdurch in Zukunft verringert werden, wenn gesunde Zellen von einer alleinigen oder ergänzenden Behandlung mit ZnO-NP nicht nachhaltig in ihrer Vitalität bedroht werden würden. Hinweise auf solch einen Effekt ergaben bereits Zellkulturversuchsreihen der eigenen Arbeitsgruppe. Tumorzellen der Zelllinie A549 und Fibroblasten zeigten bei einer Behandlung mit 50 µg/ml ZnO-NP nach acht Stunden eine verminderte Zellaktivität. Die Fibroblasten besaßen jedoch die Fähigkeit, sich von dieser Behandlung zu erholen und ihre Zellaktivität nicht weiter zu verringern, während die Tumorzellen in ihrer Zellaktivität nachhaltig eingeschränkt waren (Wiesmann et al., 2019). Auch für die in dieser Arbeit verwendeten Huh-7 Zellen konnte eine toxische Wirkung der ZnO-NP *in vitro* bereits nachgewiesen werden. Dies erfolgte mittels Nachweises von p53 und verschiedener Bax-Proteine, welche die Apoptose einleiten (Rahimi Kalateh Shah Mohammad et al., 2019). In der Forschung werden ZnO-NP zur selektiven Tumorthherapie in den letzten Jahrzehnten zunehmend untersucht (Rasmussen et al., 2010, Anjum et al., 2021). Die Vulnerabilität von Tumorzellen gegenüber ZnO-NP konnte dabei bereits vor Jahren gezeigt werden (Hanley et al., 2008). Der genaue Wirkmechanismus und die damit einhergehende Toxizität der ZnO-NP ist noch Gegenstand aktueller Forschung und wird in den Kapiteln 1.3 und 1.4 näher erläutert. Aufgrund der geringen Toxizität von Zink, im Vergleich zu anderen Metallen, hat die Verwendung von ZnO-NP in der Tumorforschung zunehmend an Relevanz gewonnen, und ZnO-NP gehören derzeit in der Tumorforschung zu den vielversprechendsten metallischen Nanopartikeln (Anjum et al., 2021). ZnO-NP zählen außerdem laut *US Food and Drug Administration* (FDA) zu den *Generally Regarded As Safe* (GRAS) Substanzen und können in niedrigen Dosen leicht vom Körper eliminiert werden (Sharma et al., 2015). Zudem ist Zink international verfügbar und ZnO-NP können kostengünstig chemisch, physikalisch oder pflanzenbasiert synthetisiert werden (Król et al., 2017, George et al., 2022).

#### **1.2.1. ZnO-NP als Adjuvanz in der Tumorthherapie**

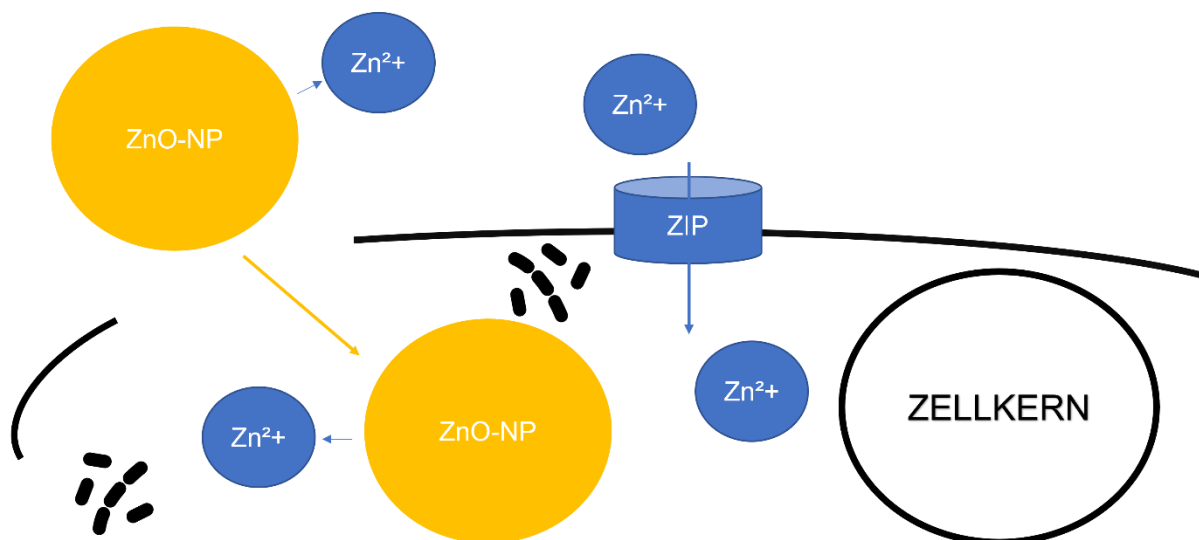
ZnO-NP könnten in der Tumorthherapie sowohl als alleinstehendes Therapeutikum genutzt werden, als auch als Adjuvanz dienen. Bei strahlenresistenten Adenokarzinomzellen (A549)

und Huh-7 Zellen konnten ZnO-NP den Zelltod einleiten (Wiesmann et al., 2021). Die Behandlung mit ZnO-NP könnte möglicherweise bei residualen Tumoren adjuvant zur Bestrahlung genutzt werden. ZnO-NP als Carrier für klassische Chemotherapeutika zeigten eine größere Zytotoxizität als die reine Gabe von Chemotherapeutika (Hu and Du, 2020). Bei der Kombination einer sub-letalen Konzentration von 10 µg/ml ZnO-NP und einer *Tumor Treating Fields*-Therapie, welche mittels elektrischer Felder die Zellteilung der Tumorzellen stört, zeigte sich ebenfalls ein synergetischer Effekt. Die Letalität verschiedener Zellen wurde dabei um ca. 20-30% erhöht (Shawki et al., 2022).

### 1.3. Transport von ZnO-NP zum Tumor und Internalisierung in die Zelle

Der EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*) beschreibt die passive Anreicherung von Nanopartikeln z.B. ZnO-NP in Tumorgeweben. Nach diesem Konzept erwartet man die Anreicherung von ZnO-NP im Tumor aufgrund permeabler Gefäße, wie sie typisch in Tumoren sind. Zudem würden die ZnO-NP aus dem Tumor nur schwer abtransportiert, da das hierfür notwendige vollständig entwickelte Lymphsystem in Tumorgewebe fehlt. Ob der EPR-Effekt den Transport von ZnO-NP zum Tumor ermöglicht, ist u.a. von der Durchlässigkeit der Gefäße im Tumor abhängig. Die Durchlässigkeit der neu gebildeten Gefäße im Tumor variiert dabei stark und wird von verschiedenen vaskulären Modulatoren wie Angiotensin II oder Bradykinin beeinflusst, welche wiederum durch verschiedenen Antagonisten beeinflussbar sind (Maeda et al., 2000). Der EPR-Effekt ist als mögliche Theorie zu verstehen, welche nicht allein ursächlich für den Transport von ZnO-NP zum Tumor ist. In der vorliegenden Arbeit wurden ZnO-NP nach Erstellen einer Suspension appliziert (siehe 1.9). In solch einer Suspension liegt Zink sowohl fest gebundenen in den ZnO-NP als auch in seiner ungebundenen ionischen Form dar ( $Zn^{2+}$ ). Anhand von mit Silica umhüllten ZnO-NP ( $ZnO@SiO_2$ ) und fluoreszierenden Markern konnte *in vitro* eine Internalisierung der Nanopartikel in die Zelle gezeigt werden (Wiesmann et al., 2019). Die Internalisierung und Akkumulation von Nanopartikeln im Zytoplasma und Zellkern konnte *in vitro* mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) nachgewiesen werden (Heim et al., 2015, Condello et al., 2016, Zhang et al., 2020). Wie die ZnO-NP in die Zelle gelangen, ist noch nicht abschließend geklärt, weshalb im Folgenden verschiedene Mechanismen zur Internalisierung von ZnO-NP in die Tumorzelle erörtert werden (siehe Abbildung 1). Der Warburg Effekt, welcher die aerobe Glykolyse von Tumoren beschreibt, führt zu einer negativen Ladung der Tumorzellen und erleichtert möglicherweise die Interaktion von positiv geladenen ZnO-NP mit den Tumorzellen. Das Zeta-Potenzial beschreibt die Ladung der Oberfläche von ZnO-NP in einer Dispersion und bestimmt ihre kolloidale Stabilität. Je stärker das Zeta-Potenzial (mV) negativ oder positiv ist, desto stärker sind die ZnO-NP geladen und kolloidal stabil (Wiesmann et al., 2020). Die positive Ladung der Oberfläche von ZnO-NP

entsteht bei einem physiologischen pH von 7,4 durch die Aufnahme von  $H^+$ -Ionen an die vorhandenen  $OH^-$ -Gruppen. Die positive Ladung wird bei niedrigen pH-Wert assoziiert mit Tumoren, durch den isoelektrischen Punkt der ZnO-NP von 9-10 begünstigt (Thomas et al., 2022). Die positive Oberflächenladung der Nanopartikel könnte somit auf zellulärer Ebene durch Interaktion mit der negativen Zellmembran bei der Internalisierung der ZnO-NP eine entscheidende Rolle spielen (Clogston, 2011, Nabil et al., 2020). Auf zellulärer Ebene wird auch die endosomal-lysosomale Aufnahme der ZnO-NP in die Tumorzelle diskutiert (Condello et al., 2016, Ancona et al., 2018, Liao et al., 2020). Die Internalisierung und eine gezielte Ansteuerung von Tumorzellen könnte zudem durch eine Rezeptor-Liganden Oberflächenmodifizierung der ZnO-NP erfolgen (Anjum et al., 2021). Neben der Internalisierung von ZnO-NP spielt auch die Internalisierung von  $Zn^{2+}$  eine Rolle. Die ZnO-NP zerfallen bei einem niedrigen pH aufgrund des Warburg-Effekts im Tumor extrazellulär und es entstehen  $Zn^{2+}$  (siehe Abbildung 1) (Liberti and Locasale, 2016). Es konnte anhand von A549 Zellen gezeigt werden, dass die  $Zn^{2+}$  vor allem im Nucleus akkumulieren, währenddessen ZnO-NP nur vereinzelt im Cytoplasma nachweisbar waren (Heim et al., 2015). Extrazelluläre aus den ZnO-NP freigesetzte  $Zn^{2+}$  können bei einer hohen extrazellulären Zinkkonzentration aktiv über die Zink-Importeur Transporter (ZIP) in die Zelle gebracht werden (siehe Abbildung 1). Der zytoplasmatische Zinkspiegel in der Zelle wird somit erhöht (Kloubert and Rink, 2015). Der passive Transport erfolgt über erleichterte Diffusion mittels divalenter Metallionentransporter (DMT) und ermöglicht ein schnelles Einströmen der  $Zn^{2+}$  in die Zelle.



**Abbildung 1: Internalisierung von ZnO-NP und  $Zn^{2+}$  in die Zelle**

*Dargestellt sind hier schematisch die extrazellulär ankommenden ZnO-NP in orange, welche die Membran über verschiedene Mechanismen, wie u.a. passive Anreicherung, Endozytose oder aufgrund ihrer Ladung überwinden können. Die genauen Mechanismen zur Internalisierung von ZnO-NP sind noch Gegenstand aktueller Forschung und sollen hier nur stark vereinfacht dargestellt werden. Extrazellulär dissoziieren einige  $Zn^{2+}$ , welche über den ZIP aktiv in die Zelle gebracht werden können. Auch intrazellulär lösen sich weitere  $Zn^{2+}$  aus den internalisierten ZnO-NP.*

## **1.4. Toxizität von ZnO-NP**

Zink ist ein natürlich im menschlichen Körper vorkommendes Spurenelement und Bestandteil von ca. 300 menschlichen Enzymen (Bisht and Rayamajhi, 2016). Die Zinkhomöostase ist sehr fein reguliert und starke Veränderung der Zinkkonzentration können toxisch wirken. Nanopartikel können aufgrund ihrer Größe kumulativ eine hohe Dosis an Zink transportieren und über in 1.3 beschriebene Mechanismen in die Tumorzelle gelangen. Die in dieser Arbeit verwendeten ZnO-NP hatten eine nahezu sphärische Form und eine Größe von 20 nm. Nanopartikel dieser Größe sind bis zu  $10^4$  mal kleiner als eine menschliche Zelle und haben daher die Möglichkeit, in einen direkten Kontakt mit Molekülen und Zellorganellstrukturen zu treten (Saallah and Lenggoro, 2018). Im Folgendem sollen die Zyto- und Genotoxizität von ZnO-NP beschrieben werden (siehe 1.4.1) und Theorien zum potentiellen Wirkmechanismus von ZnO-NP *in vitro* näher betrachtet werden (siehe 1.4.2-1.4.4).

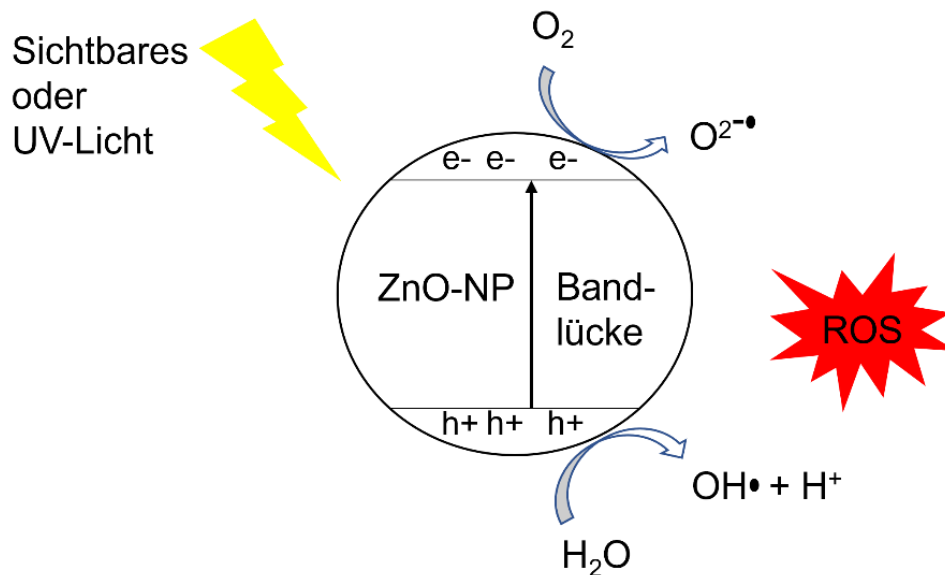
### **1.4.1. Zyto- und Genotoxizität von ZnO-NP**

ZnO-NP können sowohl Tumorzellen schädigen und damit als zytotoxisch angesehen werden als auch das Erbgut der Tumorzelle beeinflussen und genotoxische Veränderungen der DNA hervorrufen (Akhtar et al., 2012, Sharma et al., 2012, Choudhury et al., 2017, Ancona et al., 2018, Vighetto et al., 2019, Liao et al., 2020). Die Zytotoxizität wird vermutlich vor allem bestimmt durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (siehe 1.4.2) und die Wirkung von ROS auf die Tumorzelle (siehe 1.4.3). Der genaue Mechanismus zur Entstehung der Genotoxizität ist noch nicht abschließend geklärt, wobei die Auswirkung von ROS auf die Zelle und auch die Auswirkung der aus den ZnO-NP freigesetzten  $Zn^{2+}$  (siehe 1.4.4) einen Einfluss auf DNA-Schäden haben könnten.

### **1.4.2. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies können auf der Oberfläche der ZnO-NP aufgrund der elektrochemischen Eigenschaften einer großen Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband entstehen, welche durch das Vorhandensein von einem Elektronen-Loch-Paar gekennzeichnet ist (siehe Abbildung 2). Dabei liegen an der Oberfläche sowohl ein angeregtes Elektron als auch eine Elektronenfehlstelle vor, welche die notwendige Energie zur Bildung der ROS ermöglichen (Wiesmann, 2019). Bei der Kombination von photodynamischer Therapie mit Lipid umhüllten ZnO-NP konnte trotz sub-toxischer ZnO-NP Konzentrationen ein zytotoxischer Effekt auf Tumorzellen nachgewiesen werden (Ancona et al., 2018). Dieser Effekt entstand aufgrund der erhöhten Bildung von ROS durch UV-Licht Exposition. Neben der Photokatalyse hat auch der pH der ZnO-NP-Suspension einen Einfluss auf die Oberflächenladung der ZnO-NP und die Bildung von ROS (Fanyao and Morais, 2001). Die

Kombination von Ultraschall und Zink-Nanokristallen zeigte ebenfalls eine erhöhtes Vorkommen von ROS (Vighetto et al., 2019).



**Abbildung 2: Entstehung von ROS auf der Oberfläche von ZnO-NP**

Darstellung angelehnt an (Sivakumar et al., 2018)

### 1.4.3. ROS und ihre Auswirkungen auf die Tumorzelle

ZnO-NP haben nach der Internalisierung mittels ROS die Fähigkeit, Membranlipide, Proteinmoleküle und die DNA zu schädigen (Liao et al., 2020). Sie können somit als zyto- und genotoxisch eingestuft werden. Im Zytotoxizitätstests zeigten Zellen, welche mit Zink-Chlorid ( $ZnCl_2$ ) behandelt wurden, gegenüber den Zellen, die mit ZnO-NP behandelt wurden, nach 24 h die Fähigkeit zur Regeneration, während die mit ZnO-NP behandelten Zellen eine weiter sinkende Zellviabilität aufwiesen (Wiesmann et al., 2019). Die Zytotoxizität zeigte sich *in vitro* ebenfalls durch eine Aktin-Depolymerisation im Cytoplasma und einer Vergrößerung des Nucleus (Choudhury et al., 2017, Pati et al., 2016). In der Tumorzelle kann aufgrund der ROS zudem das mitochondriale Membranpotential sinken. Infolgedessen wird u.a. das Bcl2-assoziierte X Protein (Bax) hochreguliert und die Expression von Bcl2-Genen hochreguliert, sodass über den p53-Weg die Apoptose eingeleitet wird (Sharma et al., 2012, Kim et al., 2019, Thomas et al., 2022). Der durch ZnO-NP entstandene oxidative Stress konnte *in vitro* und *in vivo* u.a. durch das Absinken des Antioxidans Glutathion (GSH) nachgewiesen werden (Nabil et al., 2020, Khan et al., 2021). Dies gilt als Anzeichen, dass die Zellen den durch ROS erzeugten oxidativen Schaden nicht mehr abwehren können. Durch den oxidativen Stress kann in Tumorzellen neben der Apoptose auch eine Autophagie eingeleitet werden (Yang et al., 2021). Auch die Nekrose in Verbindung mit einer Apoptose konnte nach der Behandlung mit ZnO-NP vereinzelt gezeigt werden (García-Hevia et al., 2016).

#### 1.4.4. Auswirkung der aus den ZnO-NP freigesetzten Zn<sup>2+</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass 25% der Zn<sup>2+</sup> extrazellulär aus den ZnO-NP freigesetzt wurden (Wiesmann et al., 2019). Intrazellulär entstehen bei dem Zerfall von ZnO-NP im Phagolysosom ebenfalls Zn<sup>2+</sup> (Condello et al., 2016). Bei dem Vergleich der Toxizität zwischen ZnO-NP und ZnCl konnte *in vitro* eine ähnliche Wirkung beider beobachtet werden (Deng et al., 2009, Heim et al., 2015, Wiesmann et al., 2019). Dieser Zusammenhang scheint durch die freien Zn<sup>2+</sup> zu entstehen, welche extrazellulär freigesetzt werden. Anhand der Behandlung von Tumorzellen mit ZnCl<sub>2</sub> konnte zudem gezeigt werden, dass die extrazellulären Zn<sup>2+</sup> möglicherweise direkte DNA-Schäden erzeugen, welche sich durch die Darstellung von Doppelstrangbrüchen (DSB) nachweisen ließen (Heim et al., 2015). Aufgrund der positiven Ladung der Zn<sup>2+</sup> sind diese prädestiniert für eine Bindung an die negativ geladenen Nukleinsäuren der DNA, wie gezeigt an anderen Metall-Ionen (Morris, 2014). Die freiwerdenden Zn<sup>2+</sup> scheinen folglich ebenfalls einen Beitrag zur Toxizität der ZnO-NP zu leisten.

#### 1.5. Nachweis von DNA-Schäden und Apoptose nach Applikation von ZnO-NP

Der Nachweis von  $\gamma$ H2AX-Banden in der Immundetektion dient dem indirekten Nachweis von DNA-Schäden. Im Rahmen der DNA-Reparatur wird das Histon H2AX an Serin 139 zu  $\gamma$ H2AX phosphoryliert und ist auf DSB zurückzuführen (Scully and Xie, 2013). Die Entdeckung von  $\gamma$ H2AX erfolgte nach der  $\gamma$ -Bestrahlung von Zellen, welche dadurch DNA-Schäden erlitten und  $\gamma$ H2AX exprimierten. Dieses erstmals nachgewiesene Histon erhielt daraufhin das Präfix „ $\gamma$ “ (Rogakou et al., 1998). Die Caspasen gehören zu den wichtigsten Enzymen zellulärer Apoptose und lassen sich unterteilen in Initiator- und Effektor-Caspasen. Dabei gehören zu den Initiator-Caspasen u.a. die Caspase -8 und -9. Zu den Effektor-Caspasen gehört u.a. die Caspase -3 und -7., welche proteolytisch aktiviert werden und zahlreiche zelluläre Proteine zerstören können (Rassow, 2012). Der Nachweis einer *Cleaved* Caspase bildet die proteolytische Spaltung der Pro-Caspase in ihre aktive Form ab. Zyto- und genotoxische Effekte von Zink-Nanokompositionen konnten *in vitro* und *ex vivo* mittels Immundetektion von  $\gamma$ H2AX nach 24 h und mittels Immundetektion verschiedener Caspasen nach 48 h in Myelomzellen aufgezeigt werden (Cholujova et al., 2022).

##### 1.5.1. $\gamma$ H2AX als DNA-Schadensmarker

Mittels  $\gamma$ H2AX *Immunofluorescence Assay* konnten DNA-Schäden *in vitro* signifikant 15 min nach einer Behandlung von A549 Zellen mit 100  $\mu$ g/ml ZnO-NP nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch 4 h nach Behandlung keine signifikanten DNA-Schäden (Heim et al.,

2015). Das  $\gamma$ H2AX konnte *in vitro* 12 h nach einer Behandlung von humaner Ovarialkrebszellen (SK-OV-3) mit 30  $\mu$ g/ml ZnO-NP mittels Immundetektion nachgewiesen werden (Bai et al., 2017). Die relative  $\gamma$ H2AX Expression nach Immundetektion zeigte *in vitro* zudem eine steigende Intensität von 12 h zu 24 h nach der Behandlung von Fibrosarkomzellen (HT-1080) mit 50  $\mu$ g/ml ZnO-NP (Arakha et al., 2017). Eine Durchflusszytometrie ermöglichte die Detektion von  $\gamma$ H2AX 4, 6 und 24 h nach der Behandlung von Adenokarzinomzellen des Dickdarms (LoVo) mit 28  $\mu$ g/ml ZnO-NP. Wobei sich hier ein signifikantes Ergebnis erst nach 24 h zeigte (Condello et al., 2016). Die *in vitro* Behandlung von Blasenkrebszellen (T24) mit 10  $\mu$ g/ml ZnO-NP brachte in der Immundetektion nach 48 h kaum den Nachweis von  $\gamma$ H2AX und sprach gegen DNA-Schäden (Zhang et al., 2020). Auch ein *in vivo* Nachweis von  $\gamma$ H2AX war bei Mäusen nach oraler Gabe von 500 mg/kg Körpergewicht ZnO-NP über 6 Tage möglich. Es führte zu DNA-Schäden im Knochenmark und in den Blutzellen, welche anhand des Vorhandenseins von  $\gamma$ H2AX mittels Fluoreszenz dargestellt werden konnten. (Pati et al., 2016)

### 1.5.2. Caspasen und *Cleaved* Caspasen als Apoptosemarker

Mittels Immundetektion konnte *in vitro* ein signifikanter Nachweis von Caspase- 3 und Caspase- 9 12 h nach der Behandlung von multiplen Myelomzellen (RPMI8226) mit 10  $\mu$ g/ml und 20  $\mu$ g/ml ZnO-NP einer Größe von 20 nm gegenüber der Kontrollgruppe aufgezeigt werden (Li et al., 2020). Die Caspase- 9 konnte zudem *in vitro* 12 h nach einer Behandlung humaner Ovarialkrebszellen (SK-OV-3) mit 30  $\mu$ g/ml ZnO-NP einer Größe von 30 nm in der Immundetektion nachgewiesen werden (Bai et al., 2017). In der Immundetektion waren 24 h nach Behandlung drei verschiedener Zelllinien mit modifizierten ZnO-NP die *Cleaved* Caspase -3, -7 und -9 sichtbar (Kim et al., 2019). Im Tumor-Mausmodell gelang nach der täglichen intraperitonealen Gabe von 5 mg/kg Körpergewicht ZnO-NP über vier Wochen mittels Durchflusszytometrie ein Nachweis der Caspase -3 im Tumor (Nabil et al., 2020).

### 1.6. Tumorforschung *in vitro* vs. *in vivo*

In der Tumorforschung besteht die Notwendigkeit *in vivo* Experimente durchzuführen, um jene physiologisch relevanten Daten erheben zu können, welche bei *in vitro* Experimenten nicht betrachtet werden können. *In vitro* Zellkulturexperimente zeigen Zellwachstum und Zelldifferenzierung der Tumorzellen unter verschiedenen äußeren Einflüssen. Daraus können Rückschlüsse auf das *in vivo* Verhalten von Tumorzellen gezogen werden. Die biomechanische und biochemische Beschaffenheit des jeweils vom Tumor betroffenen Gewebes eines komplexen Organismus kann jedoch nicht betrachtet werden. Zudem lässt sich die Komplexität der Tumormikroumgebung in einer Zellkulturflasche aufgrund der Vielzahl an Zelltypen, die beteiligt sind, nur schwer nachstellen. Vor allem die Vaskularisierung eines

soliden Tumors ist in einer reinen Zellkultur nicht nachzuahmen. Die Endothelzellen der umliegenden Blutgefäße tragen zur Versorgung von Tumorzellen bei und ermöglichen dadurch Tumorzellwachstum und -differenzierung. (Hanahan and Weinberg, 2011). Die Tumormikroumgebung, welche den Tumor umgibt, fördert und limitiert das Wachstum und die Differenzierung von Tumorzellen (Arneth, 2020). Zellen der extrazellulären Matrix, wie tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs), können das Wachstum des Tumors fördern. Auch die den Tumor umgebenden nicht-malignen Zellen beeinflussen die Ausbreitung des Tumors. Zellen des spezifischen Immunsystems, wie B- und T-Immunkörper haben u.a. die Möglichkeit durch Antikörperbildung einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen zu nehmen. Die Betrachtung der Tumormikroumgebung ist *in vivo* Versuchen vorbehalten. Im Folgenden sollen die Toxizität der ZnO-NP *in vivo* (siehe 1.7) und ZnO-NP als potentiell Tumorthapeutikum *in vivo* näher betrachtet werden (siehe 1.8).

### **1.7. Zytotoxizität, Immuntoxizität und epigenetische Veränderungen nach ZnO-NP Gabe *in vivo***

Verschiedene Zelltypen können durch die Aufnahme von Zink in ihrer Funktion gestört werden. Die subkutane Injektion von 75 mg/kg Körpergewicht pflanzlich synthetisierten ZnO-NP über 60 Tage führte in der Leber von Ratten zu einer Erhöhung der Leberenzyme und einem strukturellen Umbau der Hepatozyten (Sattar Ali, 2022). Bei einer oralen Aufnahme von 300 mg/kg Körpergewicht für 14 Tage konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Nanopartikel im Mausmodell in der Leber akkumulierten. Daraus resultierte eine Hepatotoxizität mit DNA-Schäden und Apoptosen (Yang et al., 2015). Die orale Gabe von 500 mg/kg Körpergewicht über sechs Tage hatte im Mausmodell toxische Auswirkungen auf die Leber und zudem auf die Lunge und die Nieren (Pati et al., 2016). Nach oraler Gabe von ZnO-NP im Rattenmodell konnten darüber hinaus zytotoxische Effekte in Herz, Thymus und Milz beobachtet werden (Baky et al., 2013, Abass et al., 2017). Die intravaskuläre Gabe von 16 mg/kg Körpergewicht ZnO-NP in zwei aufeinanderfolgenden Tagen führte bei trächtigen Mäusen, zu einem Anstieg von  $\gamma$ H2AX und einem erhöhten Bax/Bcl-2 Verhältnis in den fetalen Oozyten. Die ovarielle Reserve der weiblichen Nachkommen, der mit ZnO-NP behandelten Mäusen, war zudem beeinträchtigt (Zhai et al., 2018). Isolierte Granulosazellen von Hühnern wurden mit 5  $\mu$ g/ml ZnO-NP behandelt und es zeigte sich ein direkter Einfluss auf die Expression von ca. 100 Proteinen, welche Entwicklung, Wachstum oder Fortpflanzung beeinflussen (Zhao et al., 2015). In testikulären Keimzellen von Mäusen zeigte sich nach intravaskulärer Injektion von bis zu 5 mg/kg Körpergewicht ZnO-NP eine morphologische Veränderung der Samenkanälchen und eine Abnormalität der Spermien mit möglichem Einfluss auf die männliche Fertilität (Han et al., 2016). Im Mausmodell konnten die pro-inflammatorischen

Auswirkungen auf die entnommenen Milzproben nach einer intravenösen Gabe von 0,2 mg/kg ZnO-NP gezeigt werden (Fujihara et al., 2015). Die Immuntoxizität wird aber kontrovers diskutiert und scheint von der Größe der Nanopartikel und der Ladung der ZnO-NP abzuhängen. In den von Mäusen entnommenen Milzproben war das Verhältnis von CD4+ T-Zellen zu CD8+ T-Zellen nach der Gabe von positiv geladenen und 100 nm großen ZnO-NP signifikant gesunken, sprich die T-Supressorzellen erhöht. Kleinere ZnO-NP oder welche der gleichen Größe, aber mit einer negativen Ladung, zeigten keine Immuntoxizität (Kim et al., 2014). Diese Konstellation spricht für eine leichte Inflammation eher bei einer hohen Gabe an positiv geladenen ZnO-NP. Epigenetische Effekte von  $Zn^{2+}$  konnten unter physiologischen Bedingungen anhand der Behandlung von Bakteriophagen mit  $Zn(NO_3)_2$  aufgezeigt werden. Dabei wurde das Interkalieren von  $Zn^{2+}$  mit der DNA anhand von Absorptionsveränderungen in der Spektrophotometrie und struktureller Veränderung der DNA in der Gelelektrophorese angenommen (Nejdl et al., 2014).

### **1.8. ZnO-NP als potentielles Tumorthapeutikum *in vivo***

Im Rahmen der molekularen Tumorforschung erfolgten bis dato insgesamt wenige *in vivo* Versuche zur Wirkung von ZnO-NP als Anti-Tumorthapeutikum. Im Fokus vieler Arbeiten stand vor allem die Toxizität bei der Gabe von ZnO-NP auf gesunde Zellen (siehe 1.7). Diese Nebenwirkungen bei der Gabe von ZnO-NP sind u.a. abhängig von der strukturellen Beschaffenheit, der Größe, der Ladung, der Applikation, der Dosis und der Dauer der Exposition von ZnO-NP. Um eine Gabe von ZnO-NP als Anti-Tumorthapeutikum zu ermöglichen, bedarf es Forschungsansätzen, welche die Toxizität von ZnO-NP auf Tumorzellen und gesunde Zellen gleichermaßen untersuchen, um ein besseres Verständnis der Wirkung von ZnO-NP als Anti-Tumorthapeutikum zu erlangen. Die intraperitoneale Gabe von 5 mg/kg ZnO-NP führte, bei vorheriger subkutaner Injektion von soliden Ehrlich-Karzinomzellen und anschließendem Wachstum eines soliden Tumors, im Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion des Tumorgewichtes. Zudem erfolgte in den entnommenen Tumorproben ein signifikanter Nachweis von frei gewordenem Cytochrom C als Apoptose Marker und der signifikante Nachweis von ROS (Nabil et al., 2020). ZnO-NP konjugiert mit Kaffeesäure (ZnO-CA-NP) erwiesen sich im Mausmodell, mit zuvor intramuskulär transplantierten solidem Ehrlich-Karzinom, als vielversprechendes Anti-Tumorthapeutikum und Radiosensitizer. Dabei erhielten die Mäuse über einen Zeitraum von drei Wochen eine tägliche intraperitoneale Gabe von 5 mg/100 g Körpergewicht ZnO-CA-NP mit und ohne 2 Gy Bestrahlung. Die Ergebnisse wurden anhand abnehmender Tumorgröße und -gewicht sowie sinkender Genexpression von Anti-Apoptosemarkern (Bcl-2 und NF- $\kappa$ B) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen mit solidem Ehrlich-Karzinom dargestellt

(Sayed et al., 2021). Die orale Gabe von 20 mg/kg Körpergewicht ZnO-NP konjugiert mit Syringinsäure (ZnO-SYR-NP) über 18 Wochen konnte bei Mäusen, welche zur Provokation eines Lungenkarzinoms zusätzlich eine orale Gabe von 50 mg/kg Körpergewicht Benzoapyren (BAP) erhielten, das Körpergewicht erhalten sowie der Zunahme des Lungengewichtes und dem Auftreten von Lungenkarzinomen entgegenwirken. Innerhalb der entnommenen Tumoren nahmen Tumormarker (CEA) und pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) bei der Gabe von ZnO-SYR-NP gegenüber den unbehandelten Tumoren ab. Histologisch konnten im BAP provozierten Lungengewebe proliferierende, dicht gepackte Alveolarzellen mit hyperchromatischen Nuclei dargestellt werden. Bei der Gabe von BAP und ZnO-SYR-NP zeigten sich im Lungengewebe nur vereinzelt hyperchromatische Nuclei. Die alleinige Gabe von ZnO-SYR-NP ohne BAP-Provokation zeigte eine der Kontrollgruppe ohne Lungenkarzinom typische Lungengewebsstruktur. Dadurch konnte zusätzlich die geringe Toxizität von ZnO-SYR-NP auf das Normalgewebe aufgezeigt werden (Yang et al., 2020). Bei der Konjugation von ZnO-NP mit anderen Stoffen ist zu bedenken, dass eine reine Betrachtung der Wirkung von ZnO-NP erschwert wird. Für eine sichere Anwendung der ZnO-NP in der Medizin müssen *in vivo* und v.a. an komplexen Organismen weitere Versuche zur selektiven Toxizität betrieben werden. Ein vielversprechendes Modell zur präklinischen Tumorforschung bietet der CAM-Assay (siehe 1.9).

### 1.9. CAM-Assay

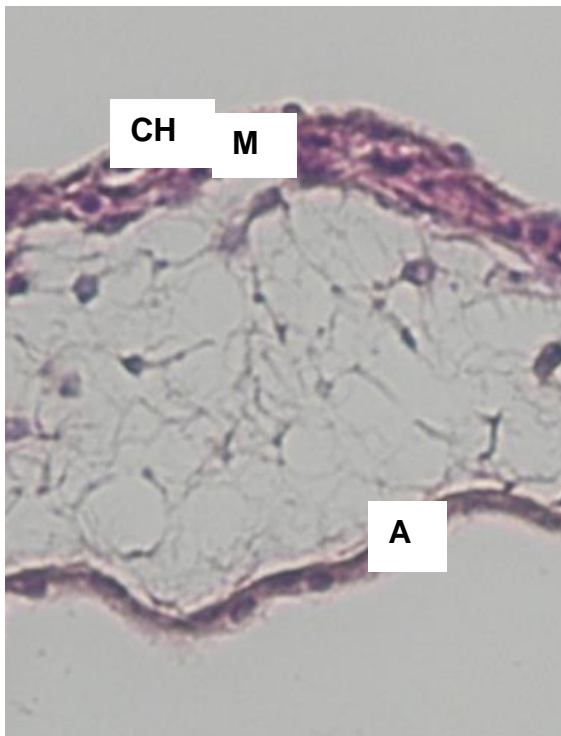
Der CAM-Assay ist ein präklinisches *in vivo* Experiment und ermöglicht mit einem geringen Versorgungsaufwand, kostengünstig und unbürokratisch Versuche an einem komplexen Organismus durchzuführen. Bei der CAM (siehe 1.9.1). handelt es sich um ein extraembryonales, nicht innerviertes Gefäßsystem des Hühnerembryonen, welches der humanen Plazenta ähnelt (Ribatti, 2014). Die am häufigsten verwendete Versuchstierart war 2021 in Deutschland die Maus mit 72,2%. Hühner und andere Vogelarten gehörten mit 1,4 % zu den am wenigsten verwendeten Versuchstierarten (BfR, 2022). Der CAM-Assay gilt nicht als Tierexperiment, weshalb keine Zahlen erhoben werden. Ein *in vivo* Experiment ermöglicht einen größeren Gewinn an Informationen als ein reines *in vitro* Experiment. Versuche an und mit Tieren unterliegen hohen ethischen Prinzipien und einer nutzenorientierten Durchführung. Nach dem „3R“ Prinzip - „*refine, reduce and replace*“- zu Tierversuchen gilt es, Tierversuche soweit möglich zu vermeiden, das Leiden der Tiere zu minimieren und schlussendlich mehr und mehr auf Tierversuche zu verzichten (Russell and Burch, 1959). Im Vergleich zu Versuchen mit Nagern bietet der CAM-Assay einige Vorteile. Die Versorgung der Hühnereier ist mit einem geringen Aufwand verbunden. Zur 14-tägigen Bebrütung der Hühnereier bedarf es keiner Tierstallanlage, sondern nur raumsparender Brutmaschinen. Zudem sind keine

Vorkenntnisse im Umgang mit den Hühnerembryonen notwendig. Fütterungskosten entfallen gänzlich. Auch Beschaffungs-, Strom- und Entsorgungskosten sind als gering einzuordnen. Nach ca. 21 Tagen wären die Hühnerembryonen schlupffähig. Die bürokratischen Hürden für der CAM-Assay sind niedrig, da laut Tierschutzgesetz § 7 der CAM-Assay kein Tierversuch ist, sowie die Tötung „nicht schlupffähiger Küken“ laut Tierschutzgesetz § 4c erlaubt ist (BfJ, 1972). In der Bebrütungszeit von 14 Tagen besteht eine natürliche Immunschwäche des Hühnerembryonen, aufgrund der Unreife von B- und T- Immunzellen (Janković et al., 1975). Dies ermöglicht es, Fremdmaterial ohne humorale Immunantwort in die CAM einzubringen (Ribatti, 2014). Zudem ist in dieser Zeit das Nervensystem der Hühnerembryonen noch nicht vollständig entwickelt und Schmerzreize werden nicht regelrecht wahrgenommen (Ribatti, 2016). In der Tumorforschung kann der CAM-Assay dazu benutzt werden, Tumore aus humanen Zellen heranzuzüchten, ohne direkte Schmerzen oder Beeinträchtigung des Hühnerembryos zu erzeugen. Dadurch wird eine ethisch vertretbare Methode zur Entwicklung neuer Therapieoptionen ermöglicht. Das Einwachsen des Tumors ist makroskopisch innerhalb weniger Tage beurteilbar. Der CAM-Assay ermöglicht schnelle Rückschlüsse auf die Tumorreifung und -ausbreitung. So konnte die Vaskularisierung an Tag 14 der Bebrütung in 81% der Tumore mit Ultraschographie visualisiert werden. Anhand repetitiver Ultraschographie an Tag 12,13 und 14 konnte in derselben Arbeit aufgezeigt werden, dass ein Tumor von Tag 12 auf Tag 13 um 129,5% und von Tag 13 auf Tag 14 um weitere 45,5% an Volumen zunahm (Eckrich et al., 2020). Das Einbringen von Tumorzellen in die CAM ermöglicht die Bildung eines komplexen Tumors und damit eine Annäherung an die Struktur solider Tumore. Es konnten bereits klinisch entnommene humane Tumorzellen auf die CAM transferiert werden, welche dann Anschluss an das Gefäßsystem des Hühnerembryonen erhielten (Vu et al., 2018, Merlos Rodrigo et al., 2021). Durch die direkte Verbindung der CAM mit dem Hühnerembryo ist es möglich, Rückschlüsse zur Toxizität verschiedener Arzneimittel nach intravaskulärer Applikation zu ziehen (Ribatti, 2017). Neue Therapieoptionen, wie die Applikation von ZnO-NP, können mithilfe des CAM-Assays in einem komplexen Organismus *in ovo* getestet werden (Buhr et al., 2020). Die Verfügbarkeit und Beschaffung der Hühnereier ist weltweit gegeben und ermöglicht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu Angiogenese, Tumorwachstum und Arzneimittelreaktionen mit diesem Modell. Insgesamt ergibt sich so eine sehr geeignete und zukunftsorientierte Methode zur Entwicklung dezidierter Tumorthérapien.

### **1.9.1. Chorionallantoismembran (CAM)**

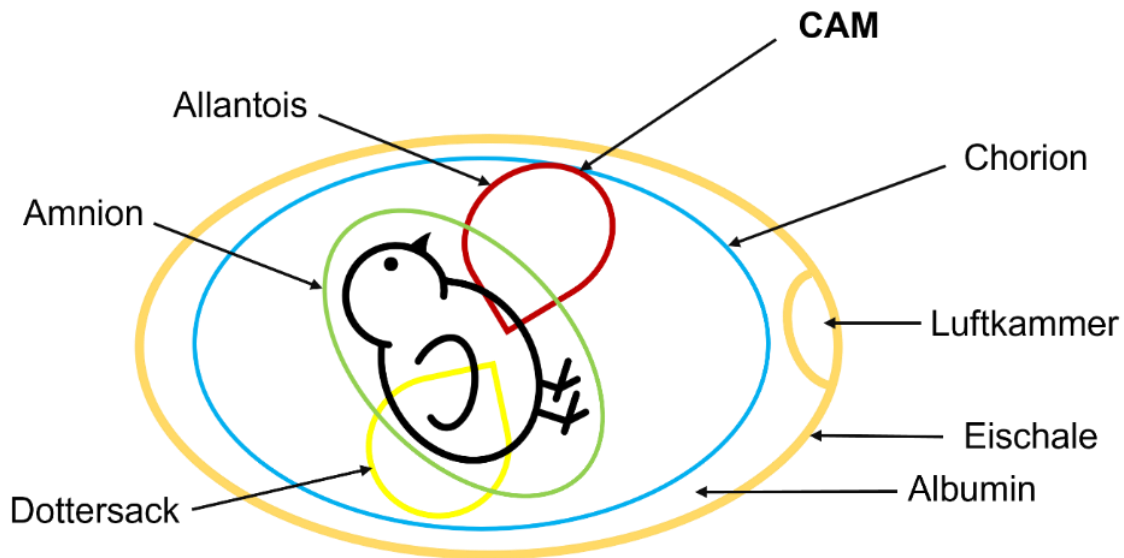
Die stark vaskularisierte CAM entsteht ventral des Hühnerembryos aus dem Zusammenwachsen von Allantois und Chorion zwischen Tag 3 und 4 der Bebrütung (Ribatti, 2014). Die Allantois dient als Reservoir für die embryonale Ausscheidung und geht aus dem Enddarm hervor. Das Chorion liegt am weitesten entfernt vom Embryo und berührt die

Eischale. Die CAM bildet eine epitheliale Doppelschicht mit dazwischenliegenden mesenchymalen Blutgefäßen (Gabrielli and Accili, 2010). Das ektodermale Chorion-Epithel ist dabei der Eischale zugewandt und das endodermale Allantois-Epithel dem Hühner-Embryo zugewandt (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4). Die Gefäße der CAM entwickeln sich ab Tag 4 der Bebrütung zu einem stark verzweigten Kapillarnetz (Gabrielli and Accili, 2010). Die dreischichtige Struktur umgibt das Hühnerembryo ca. an Tag 8 der Bebrütung zu 75% und an Tag 12 zu 100% (Leeson and Leeson, 1963). Von Tag 8 bis Tag 13 der Bebrütung wächst das Volumen der CAM um ca. 89% (Makanya et al., 2016). Die CAM liegt an Tag 12 der Bebrütung nah an der Eischale, somit sind die Gefäße zu dieser Zeit gut sichtbar und für intravaskuläre Applikationen leicht zugänglich. Die CAM ist durch eine Vene und zwei Arterien in direkter Verbindung mit dem Hühnerembryo (Ribatti, 2016). Die Verbindung dient dem Embryo als Gasaustauschfläche, der Möglichkeit zum Abbau stickstoffhaltiger Endprodukte und zum Kalziumtransport aus der Schale für die spätere Ossifikation (Westheide and Rieger, 2015).



**Abbildung 3: Aufbau Chorionallantoismembran**

*Zu sehen ist die dreischichtige Chorionallantoismembran mit einer 200-fachen Vergrößerung: Das zur Eischale gewandte mehrschichtige Chorion-Epithel (CH), das Mesenchym mit den darin enthaltenen Blutgefäßen innenliegend (M) und das zum Embryo gerichtete endodermale Amnion-Epithel (A).*



**Abbildung 4: Schematischer Querschnitt eines befruchteten Eies**

*Dargestellt ist ein schematischer Querschnitt durch ein befruchtetes Ei ca. an Tag 8 der Bebrütung. Der Hühnerembryo befindet sich in der Amnionhöhle und wird umgeben vom Amnion (grün). Aus dem Hühnerembryo hervor geht die Allantois mit ihren Gefäßen (rot) und verbindet sich mit dem Chorion (blau) zur CAM. Ebenso aus dem Hühnerembryo hervor geht der Dottersack (gelb), welcher u.a. der Ernährung des Hühnerembryonen dient.*

### 1.9.2. Nanopartikel im CAM-Assay

ZnO-NP können *in ovo* oberflächlich oder intravaskulär im CAM-Assay angewandt werden. Pflanzlich synthetisierte ZnO-NP wurden mittels Gelatine-Schwamm auf die CAM-Oberfläche gegeben und bei einer Konzentration von 150 µg/ml wurde eine signifikante Reduktion der Blutgefäße nachgewiesen. Die Morphologie der Hühnerembryonen war hingegen bei keiner der ZnO-NP Gaben beeinflusst (Sanaeimehr et al., 2018). Die Länge und Anzahl der Blutgefäße nahm bei einer Behandlung der CAM-Oberfläche mit 500 µg/ml ZnO-NP signifikant ab (Mohammad et al., 2019). Auch Silber- Nanopartikel hatten eine anti-angiogene Wirkung auf die Länge, Größe und Kreuzungen der Blutgefäße der CAM (Haque et al., 2021). Die negative Beeinflussung der Angiogenese könnte eine potentielle Anwendung von ZnO-NP als Anti-Tumorthapeutikum unterstützen. Im CAM-Assay konnte nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP mittels *in vivo* Mikroskopie und Immunhistochemie gezeigt werden, dass die Nanopartikel vor allem in Leber und Niere und teilweise auch im Herz akkumulierten. Ein Schaden in der Leber entstand jedoch lediglich bei hoher intravaskulärer Applikation von ZnO-NP (Buhr et al., 2021). Eine Implantierung von Tumorzellen im CAM-Assay und die anschließende Gabe von Doxorubicin beladenen Nanopartikeln an Tag 10 ermöglichten die Beurteilung der Aufnahme von Nanopartikeln mithilfe fluoreszierender Mittel. Diese gelang spezifisch im Tumor, wohingegen in Herz, Leber, Niere und Darm keine Aufnahme stattgefunden hatte (Vu et al., 2018). Platin- Nanopartikel zeigten ebenfalls eine Anti-Tumor

Aktivität nach intravaskulärer Applikation im CAM-Assay (Mitrevska et al., 2023). *In ovo* zeigten zudem Silber-Nanopartikel eine intramurale Aktivierung der Caspase-9 (Urbańska et al., 2015).

### **1.10. Ziele**

Das Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob durch die intravaskuläre Applikation von ZnO-NP im CAM-Assay Zellschäden an einem in der CAM eingewachsenen humanen Tumor entstehen. Der CAM-Assay ist ein *in vivo* Experiment und ermöglicht die Betrachtung eines komplexen Organismus, sowie die Miteinbeziehung der Tumormikroumgebung und der Tumervaskularisierung. Zur Charakterisierung der *in vivo*-Zytotoxizität sollten mittels Western Blot sowohl DNA-Schäden als auch Apoptosen untersucht werden. Der Nachweis der DNA-Schäden sollte mittels Histon H2A, phosphoryliert an Serin 139 ( $\gamma$ H2AX), und der Nachweis der Apoptosen mittels *Cleaved* Caspase-9, gespalten an Asparagin 330 (CIC-9), erfolgen.

## **2 Material**

### **2.1. Zellen**

#### **2.1.1. Zelllinie**

In der vorliegenden Arbeit wurden epitheliale, adhären wachsende Huh-7 Zellen verwendet, die eine Verdopplungszeit von ca. 48 h haben. Die Zelllinie Huh-7 wurde aus einem hepatozellulärem Karzinom eines 57 Jahre alten Mannes in Japan etabliert (Nakabayashi et al., 1982). Die Linie kann vom RIKEN BioResource Center bezogen werden.

#### **2.1.2. Mykoplasmen Detektion**

Nach Auftauen aus der Kryokonservierung wurden die Huh-7 Zellen mindestens vierteljährig auf das Vorhandensein von Mykoplasmen getestet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Mykoplasmen-Detektionssets (Minerva Biolabs®, Berlin, Deutschland).

### **2.2. Befruchtete Hühnereier**

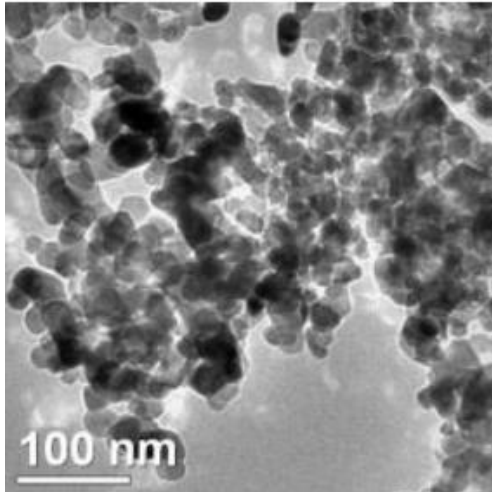
Die befruchteten *White Leghorn* Hühnereier wurden von der LSL Rhein-Main Geflügelvermehrung GmbH (Schaafheim, Deutschland) geliefert. Bis zum Versuchsstart (siehe 3.2.1) lagerten sie bei 12 °C für maximal 2 Tage.

### **2.3. Zinkoxid Nanopartikel**

Die ZnO-NP wurden von *IoLiTec-Ionic Liquids Technologies* GmbH (Heilbronn, Deutschland) bezogen. Sie wurden in ihrer Pulverform aliquotiert und zur Applikation in der gewünschten Konzentratione in sterilem destillierten Wasser (Aqua dest.) aufgenommen und einer Verdünnungsreihe unterzogen (siehe 3.2.6).

#### **2.3.1. Charakterisierung der ZnO-NP**

Makroskopisch betrachtet lagen die ZnO-NP in Form eines weißen Pulvers vor. Eine TEM Aufnahme der Firma *IoLiTec-Ionic Liquids Technologies* GmbH zeigt die nahezu sphärischen ZnO-NP mit einer Größe von 20 nm und einer Oberfläche von 50 m<sup>2</sup>/g (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: TEM-Aufnahme der verwendeten ZnO-NP**

Quelle des Bildes: Technical Data Sheet NO-0011-HP (IoLiTec, 2016)

## 2.4. Chemikalien

**Tabelle 1: Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
Albumin Fraktion V, $\geq 98\%$ , pulv. für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ammonium-peroxidsulfat ROTIPURAN® $\geq 98\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Bovine Calf Serum, Iron Supplemented, VWR Life Science Seradigm</i>	Avantor Inc. (Radnor PA, USA)
<i>Bromphenol Blau</i>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. KG (Heidelberg, Deutschland)
<i>DC™ Protein Assay, Reagent A</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
<i>DC™ Protein Assay, Reagent B</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
<i>DC™ Protein Assay, Reagent S</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
Detergenzlösung, Nonidet P 40	Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis IN, USA)
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® $\geq 99,8\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DTT (Diethiothreitol), <i>molecular biology grade</i>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM/F-12 (1:1) (1x)</i>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	Sigma-Aldrich Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

## Material

Chemikalie	Hersteller
EDTA, <i>Disodium Salt, Dihydrate, Miodecular Biology Grade</i>	Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla CA, USA)
<i>Enhanced Chemiluminescence Substrate, Western Lightning® Plus-ECL,</i>	PerkinElmer Inc. (Waltham MA, USA)
<i>FastCast™ Resolver A, 12%</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
<i>FastCast™ Stacker A</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
Flächendesinfektionsmittel, terralin® <i>liquid</i>	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Glycerin ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin, ≥99%, zur Synthese	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Händedesinfektionsmittel, Sterillium®	Paul Hartmann AG (Heidenheim an der Brenz, Deutschland)
Isopropylalkohol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG (Stuttgart, Deutschland)
Membranmatrix Matrigel®, <i>LDEV-free</i>	Corning, Inc. (Corning NY, USA)
Methanol, Puriss: p.a.	Honeywell International Inc. (Morristown NJ, USA)
Milchpulver, <i>Blotting grade</i> , pulv., fettarm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Mycoplasmen-Detektionsset, Venor®GeM Classic	Minerva Biolabs® (Berlin, Deutschland)
Natrium Deoxycholat, minimum 97%	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Natriumchlorid ≥99,8%, mit Antibackmittel	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Oxidizing Reagent Plus, Western Lightning® Plus-ECL</i>	PerkinElmer Inc. (Waltham MA, USA)
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa #26616</i>	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)
<i>Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, PhosSTOP™ EASYpack</i>	Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis IN, USA)
<i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets, cOmplete™</i>	Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis IN, USA)
Salzsäure rauchend 37% ROTIPURAN® p.a., ISO, max. 0,005 ppm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
SDS <i>ultrapure</i> ≥99,5%; für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Staurosporine from Streptomyces sp., for molecular biology, ≥95% (HPLC)</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)

## Material

Chemikalie	Hersteller
Steriles Aqua dest., <i>Aqua ad injectabilia</i> , 50 ml, Lösungsmittel zur Herstellung von Parenteralia	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
TEMED, ≥99% p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<i>TGX Stain-Free™ FastCast™ Stacker B</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
<i>TGX Stain-Free™ FastCast™ Resolver B</i>	BioRad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
TRIS, PUFFERAN® ≥99,9%, p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
<i>Trypsin-EDTA Solution, 10x, 5 g porcine trypsin and 2 g EDTA</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Tween® 20, Polyoxyethylen (20) -sorbitan-monolaurat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Zinc Chloride solution, 0,1M</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
ZnO-Nanopartikel	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, Deutschland)

Der verwendete Stickstoff für die Kryokonservierung und die Tumor- und Gewebeentnahme stammte aus dem Stickstofflager der technischen Abteilung der Universitätsmedizin Mainz. Unsteriles Aqua dest. wurde aus der Leitung entnommen und bei Bedarf autoklaviert (siehe 3.2.1).

## 2.5. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Well Zellkulturplatte, Nunclon™ <i>Delta Surface</i>	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)
Aufziehkanülen, Microlance™ 3, steril 30 G	Becton, Dickinson and Company (Drogheda, Irland)
Einwegskalpell No.11 No.21	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd. (Osaka, Japan)
Einwegspritzen 10 ml	Becton, Dickinson and Company (Fraga, Huesca, Spanien)
Einwegspritzen 1 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)

## Material

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Filterpapier, Whatman®	Sigma-Aldrich Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Handschuhe	Hebei Titans Hongsen Medical Technology Co., Ltd. (Hebei Province, Beijing, China)
Hypoallergenes Vlies Pflaster, 3M™ Micropore™ 1,25 cm x 5 m 2,5 cm x 5 m	3M Deutschland GmbH (Neuss, Deutschland)
Immobilon® -P <i>Transfer Membrane</i> , Polyvinylidenfluoridmembran	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Klebefolie, tesafilm®	Beiersdorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Labor-Verpackungsfolie, Bemis™ Curwood Parafilm™ "M"	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Mikroreaktionsgefäß, Eppendorf <i>Safe-Lock Tubes</i> 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatten, CellStar® 96-Well	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Multipipette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Petrischalen aus Polystyrol 145/20 mm	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Mikrotestplatten, ROTILABO®	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Multipipettenspitzen, Combitips® <i>advanced</i> 1 ml 5 ml 10 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pasteurpipetten, Pastette®, unsteril 3 ml	Alpha Laboratories Limited (Eastleigh, Hampshire, Vereinigtes Königreich)
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)

## Material

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Silbernitrat-Kaliumnitrat Ätzstäbchen	BANO Healthcare GmbH (St. Anton/ Arlberg, Österreich)
Zellkulturflaschen, CELLSTAR® TC steril, Filter- Schraubverschluss 25 cm <sup>2</sup> 75 cm <sup>2</sup> 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen, CELLSTAR® konischer Boden, Schraubverschluss, steril 15 ml 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Die Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

## 2.6. Geräte

**Tabelle 3: Geräte**

Gerät	Hersteller
Autoklav, Tuttnauer Systec	Systec GmbH (Linden, Deutschland)
Brutmaschine, Modell 3000/d ohne Wendung	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH (Hammelburg, Deutschland)
Brutschrank, Thermo HERAcell 150i <i>Double CO2 Incubator</i>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
<i>Cell Freezing Container, CoolCell</i>	Biocision (Larkspur CA, USA)
Eismaschine	Intercontinentale Ziegler Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
Gefrierschrank, -20 °C	Robert Bosch GmbH (Gerlingen, Deutschland)
Gefrierschrank, Hera freeze™, -80 °C	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Gel-Elektrophorese Kammer inklusive Gelplatten mit festen Abstandshaltern (1,0 mm) und Silikondichtung (1,0 mm), Probenkamm und Klammern	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
<i>Imaging System, ChemiDoc™ MP</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Kühlschrank, +8 °C	Liebherr-International S.A. (Bulle, Schweiz)
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG (Hanau, Deutschland)
Laborabzug nach DIN 12924	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, Deutschland)
Magnetrührer, Fisherbrand™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)

## Material

Gerät	Hersteller
Magnetrührer, MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop Nikon TMS, <i>Inverted Phase Contrast Microscope</i>	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)
Netzgerät für <i>SDS-PAGE, Power supply 1000/500</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Netzgerät für <i>wet blot, Power supply universal, PerfectBlue</i>	VWR International (Radnor PA, USA)
pH-Meter, Fisherbrand Hydrus 300	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Photometer, Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Pipette, Eppendorf Reference® 0,5-10 µl 2-20 µl 10-100 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipetierhilfe, PIPETBOY	INTEGRA Bioscience Deutschland GmbH (Biebertal, 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)
<i>Tank Blot, Criterion™ Blotter</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Thermoschüttler, Thermomixer Komfort 535	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Ultraschall-Homogenisator Mini20, Bandelin Electronic™ Sonopuls™	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)
Wipp-Schüttler, WS-10	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen, Deutschland)

## Material

Gerät	Hersteller
Zählkammer, Neubauer- <i>improved</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zentrifuge, Thermo Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA)
Zentrifuge, Universal 16 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)

Es wurden Scheren, Pinzetten und Spatel aus dem Laborbestand genutzt, diese wurden vor Benutzung autoklaviert.

## 2.7. Software

Tabelle 4: Software

Software	Entwickler
<i>Image Lab</i>	Bio-Rad Laboratories
Excel	Microsoft Corporation
<i>Graph Pad Prism</i>	GraphPad Software, Inc.

## 2.8. Puffer und Zellkulturmedium

### 2.8.1. Puffer zur Probenaufbereitung

#### 1. Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA-Puffer)

Für 100 ml:

- 790 mg Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (=65 mM)
- 900 mg Natriumchlorid (NaCl) (=150 mM)

TRIS und NaCl wurden nach dem Einwiegen in 75 ml Aqua dest. gelöst. Unter Hinzunahme von Salzsäure (HCl) wurde mit dem pH-Meter ein pH von 7,4 eingestellt.

Es erfolgte dann die Zugabe von:

- 10 ml 10% Nonidet P 40, Detergenzlösung = 1%
- 2,5 ml 10% Natrium Deoxycholat = 0,25%
- 1 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (= 1 mM) (100 mM Stammlösung)
- 11,5 ml steriles Aqua dest.
- 1/4 Tablette, *cOmplete™, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*
- 1 Tablette, *PhosSTOP™ EASYpack, Phosphatase Inhibitor Cocktail*

#### 2. Vierfach-Lysepuffer

- 15 ml Aqua dest.

## Material

- 10 ml (=400 mM TRIS-HCl mit einem pH von 7,25) (2 M Stammlösung)
- 4 g *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) = 8%
- 23 ml Glycerin

### 3. Einfach-Lysepuffer

- 15 ml Aqua dest.
- 5 ml Vierfach-Lysepuffer
- 1/2 Tablette, *cOmplete™, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*
- 2 Tabletten. *PhosSTOP™ EASYpack, Phosphatase Inhibitor Cocktail*

## 2.8.2. Puffer zur Probenanalyse

### 1. Dreifach-Ladepuffer

Für 10 ml:

- 3 ml 30% Glycerin
- 3 ml 6% SDS (20% SDS Stammlösung)
- 1,5 ml (= 300 mM Dithiothreitol (DTT)) (2 M Stammlösung)
- 0,75 ml (= 150 mM TRIS-HCl mit einem pH von 7,25) (2 M TRIS-HCL Stammlösung)
- 0,5 ml 1% Bromphenolblau
- 1,25 ml Aqua dest.
- 1 Tablette, *PhosSTOP™ EASYpack, Phosphatase Inhibitor Cocktail*
- 1/2 Tablette, *cOmplete™, Protease Inhibitor Cocktail Tablets*

### 2. Gelelektrophorese-Puffer

Für 2 l:

- 12,12 g TRIS (= 50 mM)
- 58 g Glycin (= 400 mM)
- 20 ml 10%SDS (= 0,01%)

Mit Aqua dest. wurde auf 2 l aufgefüllt.

### 3. Wet blot-Puffer

Für 2 l:

- 6,06 g TRIS (=25 mM)
- 29,3 g Glycin (=195 mM)

## Material

- 7,4 ml 10% SDS (=0,037%)
- 400 ml Methanol (=20%)

Mit Aqua dest. wurde auf 2 l aufgefüllt.

### 4. Tris-Buffered Saline (TBS-Puffer, 10x)

Für 2 l:

- 48,4 g TRIS
- 160 g NaCl

Unter Hinzunahme von HCl wurde mit Hilfe des pH-Meters ein pH von 7,6 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt.

### 5. Tris-Buffered Saline mit Tween® 20 (TBST 20- Puffer, 1x)

Für 2 l:

- 200 ml TBS-Puffer, 10x
- 2 ml Tween® 20 (= 0,1%)

Mit Aqua dest. wurde auf 2 l aufgefüllt

### 6. Stripping-Puffer

Für 1 l:

- 1,876 g Glycin (=25 mM)

Unter Hinzunahme von HCl wurde mit Hilfe des pH-Meters pH von 2,0 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

### 7. 1% SDS-Lösung

Für 1 l:

- 10 g SDS

Mit Aqua dest. wurde auf 1 l aufgefüllt.

## 2.8.3. Lösungen für die Zellkultur

Zu 500 ml Zellkulturmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) wurden 5% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) und 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S) zugefügt. Das hinzugegebene Antibiotikum P/S diente der Prävention bakterieller Kontaminationen. DMEM, FCS und P/S wurden zuvor im Warmwasserbad für mindestens 30 min erwärmt, bevor sie zu DMEM mit FCS und P/S (= DMEM+) zusammengeführt wurden. Vor jeder weiteren Benutzung des DMEM+ wurde dieses immer für mindestens 30 min erwärmt, da es zuvor bei 8 °C

## Material

gelagert wurde. Zum Lösen der Zellen von den Zellkulturplatten oder den Petrischalen wurden 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (10x) mittels der Zugabe von 45 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) zu Trypsin/EDTA-Lösung (1x) (= TE) verdünnt

### **3 Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### **3.1.1. Kultivieren der Zellen**

Das Arbeiten mit den Huh-7 Zellen erfolgte immer an einer sterilen Sicherheitswerkbank. Um die Huh-7 Zellen aus der Kryokonservierung in Kultur zu nehmen, wurden diese zunächst im Kryoröhrchen mittels warmen Wassers für 2 min erwärmt. Anschließend wurden die Huh-7 Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgefertigtem Zellkulturmedium DMEM+ überführt (siehe 2.8.3). Danach wurden die Huh-7 Zellen für 5 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde händisch abgekippt und verworfen. Das verbleibende Pellet aus Huh-7 Zellen wurde zügig in 5 ml DMEM+ resuspendiert. Das Resuspendieren erfolgte hierbei immer mit einer 10 ml serologischen Pipette und einer Pipettierhilfe. Ausgesät wurden die Huh-7 Zellen mit weiteren 5 ml DMEM+ in einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche. Um die Zellen gleichmäßig in der Zellkulturflasche zu verteilen, wurde diese händisch mit schnellem Schieben in alle horizontalen Richtungen auf planem Untergrund bewegt. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellkulturflasche im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und in einer 5% CO<sub>2</sub>-Umgebung inkubiert.

##### **3.1.2. Begutachtung der Zellkultur**

Am Tag nach der Entnahme aus der Kryokonservierung sowie mindestens alle drei Tage während der laufenden Zellkultur wurden die Zellen makroskopisch hinsichtlich der Farbe des Nährmediums und mikroskopisch auf etwaige Verunreinigungen hin untersucht. Ein Farbumschlag von Rot nach Orange sprach für den erhöhten Verbrauch des Nährmediums durch die Huh-7 Zellen. Bei Bedarf wurde das Medium gewechselt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Zudem erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung des Zellwachstums anhand der Zelldichte und der Zellmorphologie. Die Zellen zeigten eine gleichmäßige Proliferation mit einer Verdopplungszeit von ca. 48 h. Erst wenn sich in der Begutachtung eine ausreichende Zelldichte mit einer Konfluenz von ca. 90% und eine gleichmäßige Zellmorphologie zeigte, konnten die Zellen passagiert werden. Eine höhere Zelldichte führte zu einer verlangsamten Zellteilungsrate bzw. schlussendlich zum Absterben der Zellen.

##### **3.1.3. Kryokonservierung**

Zum Langzeit-Erhalt der Zellkulturen wurden die Huh-7 Zellen in einem Stickstofftank gelagert. Um das Einfrieren der Huh-7 Zellen zu ermöglichen, wurden diese nach der Begutachtung einer 175 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche mit 3 ml TE gelöst und nach Zugabe von 6 ml DMEM+

## Methoden

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in FCS mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Dabei diente das DMSO als Frostschutzmittel, um die Kristallbildung und die damit verbundenen Zellschäden zu vermeiden. Die Suspension wurde in vier Kryoröhrchen überführt, welche danach bei -80 °C im *CoolCell*-Behälter lagerten. Dieser ermöglichte, dass die Huh-7 Zellen im Gefrierschrank jeweils schrittweise 1 °C pro Minute heruntergekühlt wurden. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

### 3.1.4. Passagieren der Zellen

Im Rahmen der Zellkultivierung wurden die Huh-7 Zellen ungefähr alle 48-72 h passagiert. Zuvor wurden sie immer erneut begutachtet (siehe 3.1.2.). Das Nährmedium wurde dekantiert und die Zellkulturflasche mit ca. 6-8 ml PBS befüllt. Dieses wurde händisch durch horizontale Bewegungen der liegenden Zellkulturflasche, in alle Richtungen verteilt, und anschließend dekantiert. Darauf folgte das Lösen der Zellen von der Zellkulturplatte durch Hinzugabe von 3 ml TE. Die Enzymaktivität von TE wurde für einen Zeitraum von 2-3 min im Brutschrank durch den Temperaturanstieg erhöht. Die Enzymaktivität wurde schließlich mit DMEM+ gestoppt und das erfolgreiche Ablösen der Zellen makroskopisch und mikroskopisch begutachtet. Die Huh-7 Zellsuspension wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm und 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Danach wurde das Zellpellet in DMEM+ resuspendiert und die Zellen wurden neu ausgesät (siehe 3.1.1). Hierbei wurde je nach Pelletgröße und zuvor begutachteter Zelldichte entschieden, wie viele neue Zellkulturflaschen einer Größe, besiedelt werden konnten. Zum Beispiel wurden die Huh-7 Zellen einer konfluenten 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche auf zwei neue 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Die Passage wurde bei diesem sich wiederholenden Vorgang immer wieder um eins erhöht. Die Passage wurde bis maximal 30 fortgeführt, danach wurden Huh-7 Zellen einer niedrigeren Passage neu aufgetaut und kultiviert.

### 3.1.5. Erstellung der 3D-Zellkulturen

Zur Erstellung je einer 3D-Zellkultur wurden 5 Millionen Huh-7 Zellen benötigt. Je eine 3D-Zellkultur wiederum wurde benötigt, um ein Ei besiedeln zu können. Um ausreichend 3D-Kulturen für die vorhandenen Eier erstellen zu können, wurden die Huh-7 Zellen fortlaufend passagiert (siehe 3.1.4). An Tag 0 des CAM-Assays (siehe 3.2) wurden ca. acht 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Huh-7 Zellen besiedelt. Danach wurden diese an Tag 3 nach Begutachtung weiter passagiert und auf bis zu 30 Petrischalen mit einem Durchmesser von 145 mm ausgesät. An Tag 6 wurde die Erstellung der 3D-Zellkulturen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen von den Zellkulturplatten gelöst, zentrifugiert und in 40 ml DMEM+ resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 20 µl entnommen und mit 20 µl einer 0,4%

## Methoden

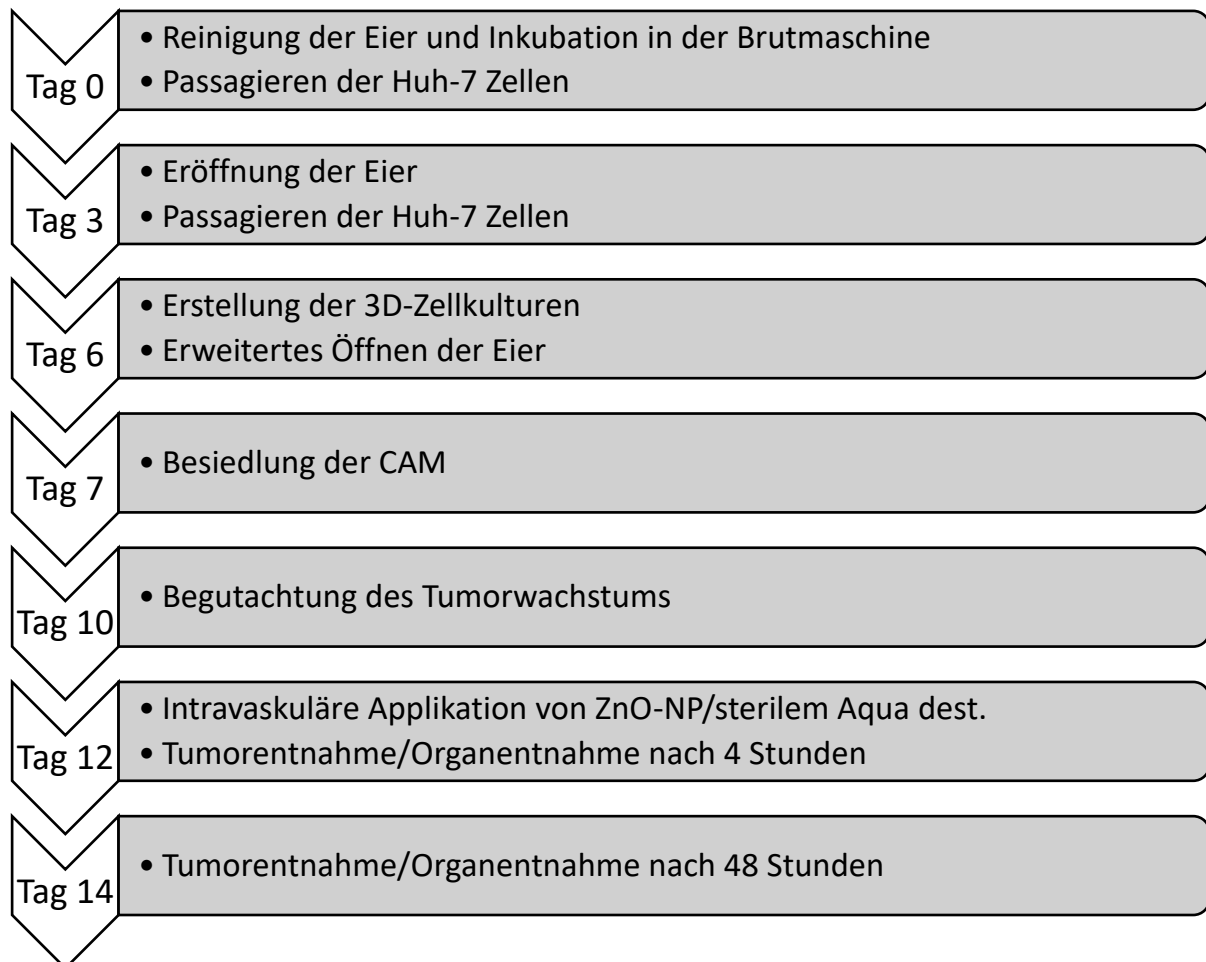
Trypanblau-Lösung gemischt. Dieses Gemisch wurde so aufgetragen, dass alle vier Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer benetzt waren und anschließend mikroskopisch gezählt werden konnten. Die Zellsuspension wurde währenddessen für 5 min bei 1500 rpm und 21 °C zentrifugiert. Die vorhandene Vitalzellzahl in der Zellsuspension wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

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

Die Zellzahl wurde wiederum durch fünf geteilt, um zu errechnen, wie viele 3D-Zellkulturen mit je 5 Millionen Huh-7 Zellen aus der vorhandenen Zellsuspension erstellt werden konnten. In der errechneten Anzahl wurden 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße bereitgestellt. Diese Anzahl ergab ebenfalls das Volumen mit dem das Zellpellet mit DMEM+ resuspendiert wurde. Danach konnte jedes Mikroreaktionsgefäß mit 1 ml und so mit je 5 Millionen Zellen befüllt werden. Diese wurden für 8 min bei 13.000 rpm und 21 °C in der Zentrifuge, Universal 16 R, zentrifugiert. Vom Überstand wurden vorsichtig zuerst 1000 µl und anschließend mit einer 20 µl Pipette der Rest entfernt und verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend zügig in 20 µl Matrigel resuspendiert. Dabei musste das Matrigel stets auf Eis gelagert sein, da es bei Erreichen der Raumtemperatur durch Polymerisation der löslichen Basalmembran fest geworden wäre. Diese Suspension von Huh-7 Zellen in Matrigel wurde in eine Vertiefung der 6-Well Zellkulturplatte aufgetragen. Bis zu vier 3D-Zellkulturen wurden in einer Vertiefung erstellt. Die 6-Well Zellkulturplatte, mit den aufgetragenen 3D-Zellkulturen wurde für 30 min im Brutschrank gelagert, bevor in jede Vertiefung 3 ml DMEM+ gegeben wurde, sodass diese völlig mit Nährmedium benetzt waren und für weitere 24 h im Brutschrank belassen werden konnten. Die Besiedlung der CAM mit den 3D-Zellkulturen wurde am Tag 7 des CAM-Assays durchgeführt (siehe 3.2.4)

### 3.2. CAM-Assay

Der CAM-Assay wurde an Tag 0 gestartet und endete an Tag 14 (siehe Abbildung 6). Während dieses Zeitraums erfolgte das Passagieren der Huh-7 Zellen mit Erstellung der 3D-Zellkulturen und das Eröffnen der Eier sowie die Besiedlung der CAM. Zudem wurde eine intravaskuläre Applikation von 0,3 ml ZNO-NP/sterilem Aqua dest. durchgeführt. Anschließend erfolgte eine zeitlich definierte Tumor- und Organentnahme.



**Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf des CAM-Assays**

#### 3.2.1. Versuchsstart

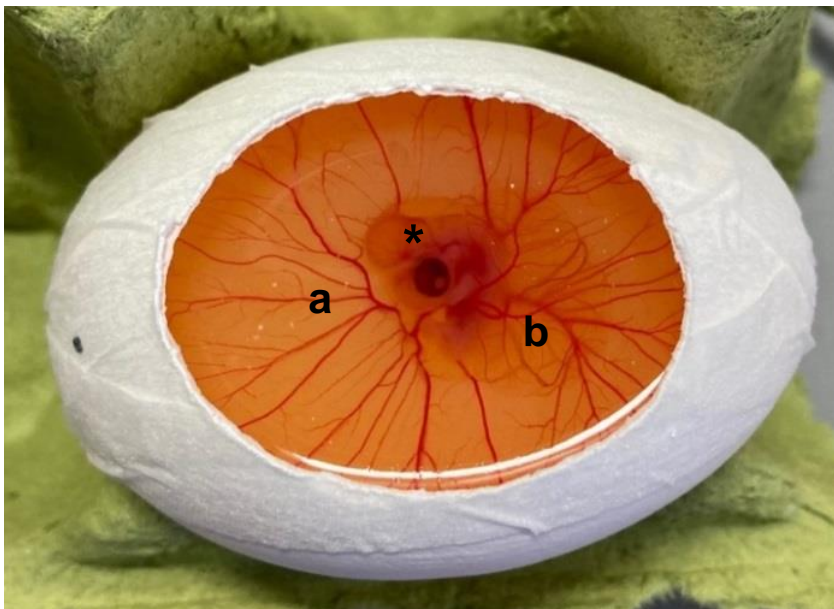
Ab Tag 0 des Versuches wurden bis zu 110 Eier in drei Brutmaschinen bei 37,5 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% in ebener Lage mit der Eröffnung nach oben bebrütet. Zuvor wurden die Eier mit Präzisionswischtüchern und autoklaviertem Aqua dest. gereinigt. Die Bebrütung erfolgte für maximal 14 Tage. An den Tagen 3, 7 und 10 wurde jeweils das autoklavierte Aqua dest. in den Brutmaschinen erneuert. Die Oberseite der Eier wurde beim Einlegen in die Brutmaschinen markiert und zeigte die Stelle der Eröffnung des jeweiligen Eies an.

### 3.2.2. Eröffnung der Eier

An Tag 3 des Versuches wurden die Eier eröffnet. Hierzu wurde jeweils nur ein Ei aus der Brutmaschine entnommen, um eine kurze Verweildauer von maximal 4 min außerhalb der Brutmaschine zu ermöglichen. Zunächst wurde das Ei am stumpfen Pol mit einer sterilen Aufziehkanüle der Größe 21 G punktiert, und mit einer 10 ml Einwegspritze wurden 6 ml Eiweiß entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, die Kanüle mit dem Schliff nach oben und in einem 45° Winkel einzuführen, um eine Punktion des Eigelbes möglichst zu vermeiden. Die Punktionsstelle wurde mit Klebeband sorgfältig verschlossen. Die an Tag 0 markierte Oberseite des Eies wurde anschließend eröffnet. Um ein Einreißen der Eierschale zu verhindern, wurde diese zuvor längs mit einem 2,5 cm breiten Vliespflaster verstärkt. Anschließend wurde das Ei mit einer autoklavierten Scherenspitze mittig punktiert und ein ovales Sichtfenster ausgeschnitten. Dieses Sichtfenster wurde danach sofort mit Parafilm verschlossen, und das Ei in die Brutmaschine überführt.

### 3.2.3. Erweitertes Öffnen der Eier

An Tag 6 wurde zu beiden Seiten des Sichtfensters ein 1,25 cm breites Vliespflaster aufgebracht. Anschließend konnte das Sichtfenster mit einer sterilen Schere erweitert werden (siehe Abbildung 7). Das erweiterte Öffnen der Eier erleichterte den Transfer der 3D-Zellkulturen auf die CAM.



**Abbildung 7: Eröffnetes Ei an Tag 6 des Versuches**

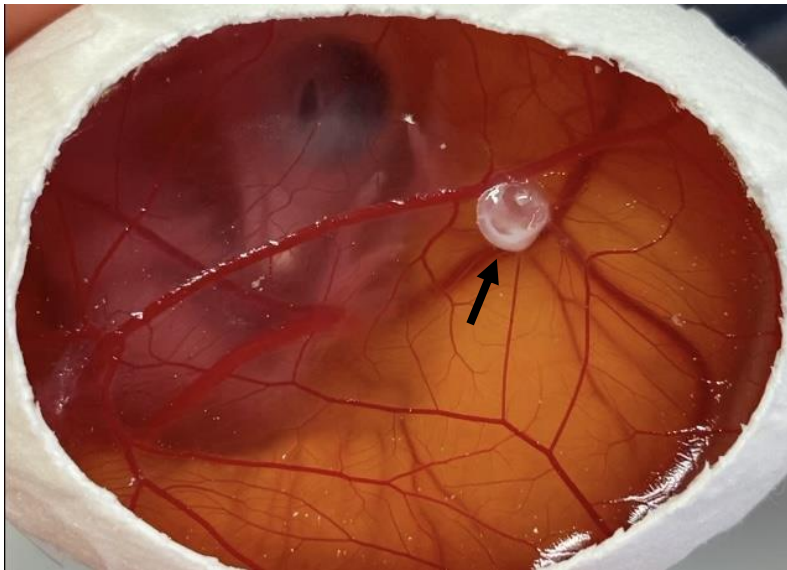
*Deutlich zu erkennen sind die mit Klebeband verstärkten Ränder der Eischale, welche der Stabilität dienten. Innerhalb des Eies ist mittig der Hühnerembryo (\*) mit seinen Dottersackgefäßen (a) und die sich entwickelnde CAM (b) mit ihren Blutgefäßverzweigungen zu sehen. Die CAM ist noch nicht vollständig entwickelt und umgibt den Hühnerembryo nicht gänzlich.*

### 3.2.4. Besiedlung der CAM mit Tumorzellen

An Tag 7 wurden die zuvor erstellten 3D-Zellkulturen (siehe 3.1.5) auf die CAM transferiert. Hierfür war es zunächst nötig, sehr kleine Gefäße der CAM in einem kleinen Bereich quer mit einem Einwegskalpell zu eröffnen. Durch dieses Vorgehen wurde ein Einwachsen der 3D-Zellkulturen durch den direkten Zugang zur Blutversorgung bzw. Irritation der CAM verbessert. Nachdem die 3D-Zellkultur mit einem Spatel händisch auf die CAM transferiert wurde, musste direkt auf diese 20 µl Matrigel pipettiert werden. Dies verhinderte das Austrocknen der Tumorzellen und ermöglichte das Wachstum des aus der 3D-Zellkultur entstehenden Tumors durch die zusätzliche Versorgung mit Nährstoffen.

### 3.2.5. Begutachtung des Tumorwachstums

Ab dem Tag 10 konnte das Tumorwachstum makroskopisch begutachtet werden (siehe Abbildung 8). Hierbei wurde darauf geachtet, ob der Tumor Anschluss an das Gefäßsystem erhalten hatte, vertikal in die CAM einwuchs und optisch vital (weiß, glänzend und evtl. blasig) aussah. Eier, bei denen die Tumore bis zum 12. Tag des Versuches nicht einwachsen, wurden aus dem Versuch entfernt. Bei diesen Eiern zeigte sich die 3D-Kultur auf der CAM als grau, eingetrocknet und flach.



**Abbildung 8: Eingewachsener Tumor an Tag 12 des Versuches**

*Zu sehen ist ein direkter Blick auf die CAM mit einem eingewachsenen Tumor (siehe Pfeil) an Tag 12. Der Tumor hat Anschluss an das Gefäßsystem erhalten und zeigt sich optisch vital glänzend. Da der Tumor vertikal in die Tiefe wächst, ist ein großer Teil des Tumors in der 2D-Ansicht nicht erkennbar. Unterhalb der CAM ist links oben im Bild der Hühnerembryo und rechts im Bild das Eigelb sichtbar.*

### 3.2.6. Intravaskuläre Applikation von ZnO-NP

An Tag 12 wurden die Eier nach Tumoreinwuchs in die Kategorien „mäßig“, „gut“ und „sehr gut“ eingeteilt. Anschließend wurden sie zufällig den zwei Gruppen „Intervention“ und „Kontrolle“ zugeordnet. Diese stratifizierte Randomisierung ermöglichte, dass in beiden Gruppen alle Kategorien von Tumoreinwuchs vertreten waren. Die Interventionsgruppe erhielt ZnO-NP und die Kontrollgruppe steriles Aqua dest.. Die aliquotierten ZnO-NP wurden zuvor verdünnt (siehe Tabelle 5). Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich an Vorarbeiten aus der Arbeitsgemeinschaft (Buhr et al., 2021). Die ZnO-NP wurden hierbei je nach Einwaage so in sterilem Aqua dest. suspendiert, dass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml entstand. Die Stocklösung wurde 5 min im Ultraschallbad belassen. Vor und nach dem Ultraschallbad wurden die ZnO-NP mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers suspendiert. Danach wurden aus dieser Stocklösung 300 µl entnommen und in 1367 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen und durch Auf- und Ab-Pipettieren gleichmäßig verteilt (Verdünnung 1). Aus der Verdünnung 1 wurden 800 µl entnommen und 1:1 mit 800 µl sterilem Aqua dest. gemischt (Verdünnung 2). Aus der Verdünnung 2 wurden 0,3 ml mit einer Konzentration von 900 µg/µl intravaskulär in die CAM appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt 0,3 ml steriles Aqua dest.. Die Punktion erfolgte mit einer sterilen Aufziehkanüle der Größe 30 G. Dabei wurden mittelgroße Gefäße punktiert, um das Nachbluten so gering wie möglich zu halten. Entstandene Blutungen wurden mit Silbernitrat-Kaliumnitrat Ätztstäbchen gestillt.

**Tabelle 5: Verdünnung der ZnO-NP**

Lösung	Volumen in µl	Verdünnung mit Aqua dest. steril in µl	Konzentration in µg/µl
Stocklösung	z.B. 350	z.B. 350	10.000
Verdünnung 1	300	1.367	1.800
Verdünnung 2	800	800	900

### 3.2.7. Tumorentnahme

An Tag 12 und Tag 14 wurden die Tumore zur weiteren Analyse entnommen. Die Interventions- und die Kontrollgruppe wurden dafür in je zwei Untergruppen eingeteilt. Die Untergruppen repräsentierten hierbei einen kurzen Zeitraum von 4 h zur Entnahme der Tumore an Tag 12 und einen langen Zeitraum von 48 h zur Entnahme der Tumore an Tag 14. Die erste Tumorentnahme wurde 4 h nach intravaskulärer Applikation durchgeführt. Hierzu wurde die Eischale zu beiden Seiten der Eröffnung mit einer Schere eingeschnitten und nach unten gebrochen. Der Hühnerembryo wurde in eine Petrischale überführt. Anschließend wurde mit der Gewebeschere der Kopf des Hühnerembryonen abgetrennt, um einen schnellen und möglichst schnellen Tod des Embryos sicher zu stellen. Danach wurde der eingewachsene

## Methoden

Tumor entnommen und mittels einer Pinzette in ein Mikroreaktionsgefäß transferiert. Die Tumorentnahme für den langen Zeitraum wurde in gleicher Weise 48 h nach intravaskulärer Applikation durchgeführt.

### 3.2.8. Organentnahme

Für nachfolgende Versuche wurden zeitgleich mit der Tumorentnahme ebenfalls Gehirn, Leber, Nieren und ein dem Tumor äquivalenter Teil der CAM entnommen. Anschließend wurden diese ebenfalls nach kurzer Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Die Organentnahme sollte dem späteren Nachweis der Verteilung von Zink im Organismus dienen. Diese Untersuchungen waren nicht Teil dieser Doktorarbeit.

### 3.3. Herstellung der Tumor-Lysate

Die Herstellung der Tumor-Lysate erfolgte in den Vorversuchen unter Zugabe von RIPA-Puffer am Tumorentnahmetag (siehe 3.3.1). Die Tumor-Lysate der Hauptversuche wurden mit Einfach-Lysepuffer an den Folgetagen der Tumorentnahmetage hergestellt (siehe 3.3.2). Das weitere Lysieren und Zentrifugieren erfolgte bei beiden Puffern in den Folgetagen (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Herstellung der Tumor-Lysate**

	Vorversuche	Hauptversuche
Tag der Tumorentnahme	Wiegen und definierte Zugabe von RIPA-Puffer. Einfrieren und lagern bei -20 °C.	Schockfrieren über Stickstoff und lagern bei -80 °C.
Folgetage	Lysieren und Zentrifugieren der Proben.	Wiegen und definierte Zugabe von Einfach-Lysepuffer. Lysieren und Zentrifugieren der Proben.

#### 3.3.1. Zugabe von RIPA-Puffer bei der Tumorentnahme

In den Vorversuchen wurden die Tumore an den Tagen 12 und 14 des CAM-Assays im Anschluss an die Tumorentnahmen gewogen. Dafür wurde das Leergewicht der Mikroreaktionsgefäße ermittelt und danach der Tumor hinzugegeben und erneut gewogen. Anschließend wurde jeder Tumor mit 700 µl PBS gewaschen und für maximal 15 s mittels Vortex-Schüttler bearbeitet. Die nicht in die CAM eingewachsenen Bestandteile des Tumors wurden so entfernt und die Probe grob von Blutbestandteilen gereinigt. Danach wurde der

Tumor in ein neu vorgefertigtes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und die dreifache Menge des Tumorgewicht in  $\mu\text{g}$  an RIPA-Puffer in  $\mu\text{l}$  (siehe 2.8.1) hinzugegeben. Die Proben in RIPA-Puffer lagerten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank.

### **3.3.2. Zugabe von Einfach-Lysepuffer nach der Tumorentnahme**

Die Proben der Hauptversuche wurden bei den Tumorentnahmen an Tag 12 und Tag 14 des CAM-Assays in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zugabe von Einfach-Lysepuffer (siehe 2.8.1) wurde an den Folgetagen durchgeführt. Nach dem Auftauen der Tumorproben auf Eis, wurde jeder Tumor einzeln mittels Leergewichtes des Mikroreaktionsgefäßes gewogen. Nach der Zugabe von  $700\text{ }\mu\text{l}$  PBS wurden die Tumore für maximal  $15\text{ s}$  mittels Vortex-Schüttler bearbeitet. Zuletzt wurde die Tumorprobe in ein neu vorgefertigtes  $1,5\text{ ml}$  Mikroreaktionsgefäß überführt und die dreifache Menge des Tumorgewicht in  $\mu\text{g}$  an Einfach-Lysepuffer in  $\mu\text{l}$  hinzugegeben.

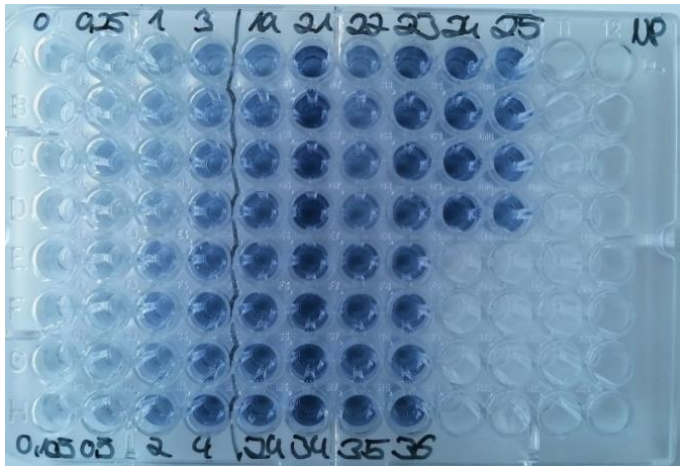
### **3.3.3. Lysieren und Zentrifugieren der Tumorproben**

Die Tumorproben in RIPA-Puffer bzw. Einfach-Lysepuffer wurden je dreimal für  $30\text{ s}$  bei einer Amplitude von  $90\%$  und einem *pulse* von  $0,5\text{ s}$  mit dem Ultraschallstab lysiert. Danach erfolgte das Zentrifugieren der Tumor-Lysate bei  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $13.000\text{ rpm}$  für  $20\text{ min}$  in der Zentrifuge, Biofuge fresco Heraeus. Der Überstand wurde in ein neu vorgefertigtes  $1,5\text{ ml}$  Mikroreaktionsgefäß überführt. Bei den in RIPA-Puffer lysierten Proben (siehe 3.4.2.1) wurde das verbleibende Pellet im Mikroreaktionsgefäß verworfen und der Überstand bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Der Überstand der Proben in Einfach-Lysepuffer (siehe 3.4.2.2) wurde bis zur Probenanalyse (siehe 3.4) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Bei den Proben in Einfach-Lysepuffer wurde ein geringfügig verbleibendes Pellet jedoch immer als *backup* bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Die Tumorproben wurden in allen Schritten intermittierend auf Eis gelagert.

### **3.4. Probenanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immundetektion**

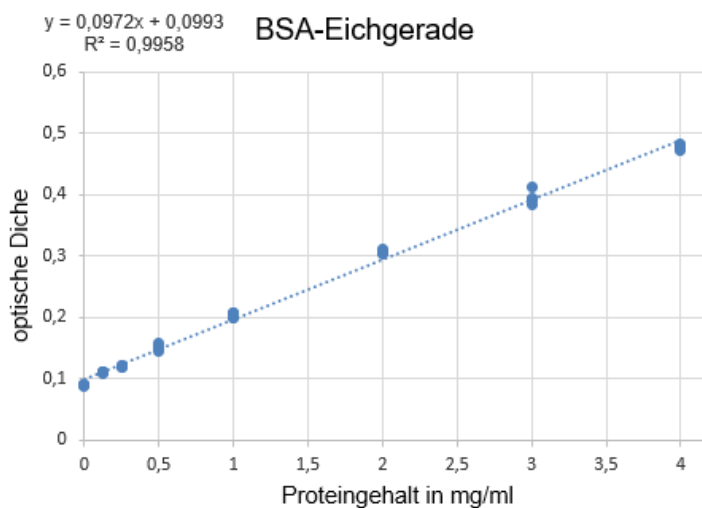
#### **3.4.1. Proteinbestimmung**

Um im Rahmen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*) (SDS-PAGE) (siehe 3.4.3) eine gleiche Menge an Protein in allen Proben ins Gel auftragen zu können, wurde eine quantitative Proteinbestimmung der Tumor-Lysate durchgeführt. Es wurde eine Eichgerade mit bovinem Serumalbumin (BSA) in RIPA-Puffer bzw. Einfach-Lysepuffer mit einer aufsteigenden Konzentration erstellt. Das BSA diente als Vergleichsprotein zu den in den Proben vorhandenen Proteinen. Die Proteinbestimmung erfolgte als Vierfachbestimmung in einer vertikal von A-H und horizontal von 1-12 beschrifteten 96-Well-Platte (siehe Abbildung 9). In den ersten 32 Vertiefungen (A-H und 1-4) wurden immer vertikal vier Wells mit je 5 µl unterschiedlicher Konzentration an BSA befüllt (0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 und 4,0 mg/ml). Von den Tumor-Lysaten wurden je 15 µl entnommen und mit 15 µl RIPA-Puffer bzw. Einfach-Lysepuffer 1:1 gemischt. Vor dem Auftrag in die 96-Well-Platte wurden diese Probenverdünnungen 15 s auf dem Vortex-Schüttler gemischt, danach kurz zentrifugiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dadurch wurde eine gleichmäßige Verteilung der Proteine gewährleistet. Anschließend wurden die Probenverdünnungen ebenfalls mit je 5 µl in vier vertikal aufeinander folgenden Wells aufgetragen, *Protein Assay Reagent A* und *1/50 Reagent S* wurden zu A' gemischt und je 25 µl davon mit Hilfe der Multipipette in jede Vertiefung der 96-Well-Platte gegeben. *Protein Assay Reagent B* wurde danach mit je 200 µl hinzugegeben. Das Gemisch von verdünntem Tumor-Lysat und Protein Assay inkubierte anschließend für 15 min im Dunkeln. Die photometrische Messung der Lichtabsorption erfolgte dann bei 750 nm im Photometer. Der Proteingehalt wurde anschließend mithilfe der BSA-Eichgerade ermittelt und in mg/ml bestimmt (siehe Abbildung 10). Es wurden ebenfalls der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Vierfachmessung der Proben ermittelt. Dabei war das Ziel, dass die Standardabweichung deutlich unter 10% liegt, um eine geringe Streuweite der Werte um den Mittelwert zu ermöglichen. Lag die Standardabweichung über 10%, musste die Messung wiederholt werden.



**Abbildung 9: Auftrag zur Proteinbestimmung in der 96-Well Platte**

Vertikal sind je vier Wells mit aufsteigender Konzentration an BSA oder einer Tumorprobe befüllt. Von A-H vertikal und von 1-4 horizontal sind die aufsteigenden Konzentrationen an BSA, welche die Eichgerade bilden, deutlich zu erkennen. Von A-D in 5-10 und E-H in 5-8 sind verschiedene Tumorproben aufgetragen.



**Abbildung 10: Beispiel zur BSA-Eichgerade mit abgebildeter Geradengleichung**

Auf der Y-Achse wurde der Mittelwert der gemessenen optischen Dichte der jeweiligen Probe aufgetragen. Anschließend wurde die Geradengleichung nach x aufgelöst und der Proteingehalt der jeweiligen Probe in mg/ml ermittelt, wobei dieser aufgrund der 1:1 Mischung mit RIPA-Puffer bzw. Einfach-Lysepuffer mit dem Faktor zwei multipliziert wurde.  $R^2 = 1$  gibt an, dass alle gemessenen Werte auf der Gerade liegen, wodurch die Güte der gemessenen Werte bestimmt wird. Zur Proteinbestimmung wurden Werte über  $R^2 = 0,9$  angestrebt, um eine hohe Korrelation des Proteingehaltes zur optischen Dichte zu gewährleisten.

### 3.4.2. Probenaufbereitung

Bei der Probenaufbereitung für die SDS-PAGE (siehe 3.4.3) wurden unterschiedliche Puffersysteme in den Vorversuchen und in den Hauptversuchen angewandt (siehe Tabelle 7). In den Vorversuchen wurden die Proben in RIPA-Puffer lysiert und die Proteinmenge pro ml mittels RIPA-Puffer angepasst (siehe 3.4.2.1). Anschließend wurde der Dreifach-Ladepuffer

## Methoden

zu den Probenverdünnungen mit RIPA-Puffer gegeben (siehe 3.4.2.1.1). In den Hauptversuchen wurden die Proben im Einfach-Lysepuffer lysiert, aber nicht verdünnt (siehe 3.4.2.2). Der Dreifach-Ladepuffer wurde in den Hauptversuchen zu dem entnommenen Auftragsvolumen der Tumor-Lysate in Einfach-Lysepuffer gegeben (siehe 3.4.2.2.1).

**Tabelle 7: Puffersystem RIPA-Puffer vs. Einfach-Lysepuffer**

Gewebelyse	Anpassung der Proteinmenge pro ml	Vorbereitung für die Gel-Elektrophorese
In RIPA-Puffer	Mittels RIPA-Puffer	Zugabe von Dreifach-Ladepuffer
In Einfach-Lysepuffer	Entfällt	Zugabe von Dreifach-Ladepuffer

### 3.4.2.1. Probenvorbereitung bei der Verwendung von RIPA-Puffer

Aus den Tumor-Lysaten in RIPA-Puffer wurden Verdünnungen mit einem Proteingehalt von 2 mg/ml hergestellt (siehe Tabelle 8). Dazu wurde ein definiertes Volumen von 25 µl des Tumor-Lysats entnommen und entsprechend dem gemessenen Proteingehalt mit RIPA-Puffer versetzt, um die Zielkonzentration zu erreichen. Zur Errechnung der benötigten Menge an RIPA-Puffer wurde zunächst der Proteingehalt des Tumor-Lysats dividiert durch zwei. Der daraus resultierende Faktor wurde mit dem Entnahmenvolumen (25 µl) multipliziert und ergab das neue Volumen der Probenverdünnung mit RIPA-Puffer. Von diesem wurde wiederum das Entnahmenvolumen (25 µl) subtrahiert. Das Ergebnis entsprach der benötigten Menge an RIPA-Puffer.

**Tabelle 8: Beispielrechnung für die Probenverdünnung mit RIPA-Puffer**

Proteingehalt Ist	Proteingehalt Soll = 2 mg/ml	Definiertes Volumen: Tumor-Lysat	Zugabe: RIPA-Puffer	Volumen: Probenverdünnung mit RIPA-Puffer
4 mg/ml	Faktor 2	25 µl	25 µl	50 µl

### 3.4.2.1.1. Zugabe von Ladepuffer

Der Dreifach-Ladepuffer (siehe 2.8.2) wurde 1:2 zu den Probenverdünnungen mit RIPA-Puffer (z.B. 25 µl + 50 µl) hinzugegeben (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Beispielrechnung für die Zugabe von Ladepuffer zu den Probenverdünnungen**

Volumen: Probenverdünnung mit RIPA-Puffer	Zugabe: Dreifach-Ladepuffer	Gesamtvolumen: Probenverdünnung
50 µl	25 µl	75 µl

Um den Proteinauftrag in der SDS-PAGE rechnerisch zu ermitteln, wurden bei den Proben in RIPA-Puffer die Verdünnung der Probe mit RIPA-Puffer und die Zugabe von Ladepuffer in die Rechnung mit einbezogen (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9). Die Proben wurden insgesamt 1:3 verdünnt (z.B. 25 µl + 25 µl + 25 µl). Die Zugabe von RIPA-Puffer und die Zugabe von Dreifach-Ladepuffer entspricht einem Verdünnungsfaktor der Tumor-Lysate von 3 (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Beispielrechnung für den Proteinauftrag bei Proben in RIPA-Puffer**

Proteingehalt Ist	Auftragsvolumen für 30 µg Protein unter Einbezug der Verdünnung in µl
4 mg/ml	$\frac{30 \mu\text{g} \times 1000}{4000 \mu\text{g}/\mu\text{l}} \times 3 = 22,5 \mu\text{l}$

### 3.4.2.2. Probenvorbereitung bei der Verwendung von Einfach-Lysepuffer

Die Tumor-Lysate in Einfach-Lysepuffer wurden für die weitere Probenanalyse nicht verdünnt. Das benötigte Entnahmenvolumen wurde anhand des Proteingehaltes und des avisierten Proteinauftrags in der SDS-PAGE ermittelt (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Beispielrechnung für den Proteinauftrag bei Proben in Einfach-Lysepuffer**

Proteingehalt	Auftragsvolumen für 30 µg Protein in µl
4 mg/ml	$\frac{30 \mu\text{g} \times 1000}{4000 \mu\text{g}/\mu\text{l}} = 7,5 \mu\text{l}$

### 3.4.2.2.1. Zugabe von Ladepuffer

Die Proben im Einfach-Lyse-Puffer wurden vor Auftrag in der SDS-PAGE je einmal für 30 s bei einer Amplitude von 90% und einem *pulse* von 0,5 s mit dem Ultraschallstab erneut homogenisiert. Danach wurde den Proben ein Dreifach-Ladepuffer (siehe 2.8.2) hinzugegeben, um die Wanderung der Proteine während der Gelelektrophorese im

## Methoden

elektrischen Feld zu ermöglichen. Dieser wurde 1:2 mit dem entnommenen Auftragsvolumen gemischt (z.B. 4  $\mu$ l + 8  $\mu$ l). Daraus ergab sich, wie in 3.4.2.1.1, eine Verdünnung von 1:3 des Dreifach-Ladepuffers (z. B. 4  $\mu$ l in 12  $\mu$ l). Somit lagen in den Tumor-Lysaten, welche mit Ladepuffer versetzt waren, Konzentrationen von 10% Glycerin, 2% SDS, 0,1 M DTT und 50 mM TRIS-HCl vor. Das Glycerin ermöglichte durch seine hohe Dichte das Absinken der Probenverdünnung beim Befüllen der Gel-Taschen. Das Tensid SDS wurde zur Denaturierung der Proteine eingesetzt. Durch die Entfaltung der Proteine und die Anlagerung mit SDS wurde die Eigenladung der Proteine überdeckt, und sie erhielten eine stark negative Ladung. Dies ermöglichte ein Wandern im elektrischen Feld nach Größe der Proteine und nicht nach ihrer Eigenladung. Das DTT diente der Reduktion der Disulfidbrücken und somit der vollständigen Entfaltung der Proteine.

### **3.4.2.3. Denaturierung der Proben**

Nach Zugabe des Dreifach-Ladepuffers (siehe 3.4.2.1.1 und 3.4.2.2.1) wurden die Proben in RIPA-Puffer und die Proben in Einfach-Lysepuffer für 10 min bei 95 °C mit dem Thermoschüttler aufgekocht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Danach wurden die Probenverdünnungen für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend konnten die Probenverdünnungen auf ein 12% Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Es wurden definierte Proteinmengen von 20  $\mu$ g, 30  $\mu$ g oder 50  $\mu$ g in die Geltaschen pipettiert, je nach zu detektierendem Protein im Western Blot.

### **3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Im Rahmen der SDS-PAGE wurden die Proteine der Tumor-Lysate im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Zugabe von Bromphenolblau im Dreifach-Ladepuffer machte den Fortschritt der Proteinwanderung während der Elektrophorese sichtbar. Das Polyacrylamid-Gel fungierte hierbei als eine Art Sieb, je größer der Prozentanteil an Polyacrylamid, desto kleiner waren die Poren im Gel. Kleine Proteine wanderten im Gel weiter vertikal in Richtung des Pluspols, aufgrund der Negativ-Ladung durch das SDS und der Siebfunktion des Polyacrylamids.

#### **3.4.3.1. Herstellung der Gele**

Zum Gießen der Gele wurden die Vorgaben des Herstellers *BioRad Laboratories* befolgt. Das Trenngel wurde aus *FastCast™ Resolver A, 12%* und *TGX Stain-Free™ FastCast™ Resolver B* hergestellt. Das Sammelgel wurde aus *FastCast™ Stacker A* und *TGX Stain-Free™ FastCast™ Stacker B* hergestellt. Zudem erfolgte bei Trenn- und Sammelgel die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zur Polymerisationskatalyse, ebenfalls nach Herstellerangaben. Das Gießen der Gele erfolgte stets unter dem Laborabzug. Zuerst wurde das Trenngel angemischt, blasenfrei in die

abgedichteten Gelplatten eingefüllt und mit ca. 6 ml Isopropylalkohol benetzt. Dieses diente der Glättung des Gelübergangs und dem Schutz vor Sauerstoff, welches die Polymerisation behindert hätte. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, konnte der Isopropylalkohol abgekippt und durch Spülen mit destilliertem Wasser vollständig entfernt werden. Das Sammelgel konnte danach auf das polymerisierte Trenngel aufgetragen werden. Ein dafür vorgesehener Probenkamm wurde in das Sammelgel eingeführt, sodass in dem Polyacrylamid-Gel durch die Kammzinken mehrere Taschen für den Probenauftrag entstanden.

### **3.4.3.2. Befüllen der Gel-Taschen**

Vor dem Befüllen der Gel-Taschen wurden diese in ihrer Form und Größe markiert und der Probenkamm sowie die Silikondichtung entfernt. Danach wurden die Gelplatten mit festem Abstandhalter blasenfrei in die mit Gelelektrophorese-Puffer (siehe 2.8.2) befüllte Elektrophorese-Kammer eingesteckt. Seitlich der Kammer wurden Klammern gespannt, welche der Abdichtung dienten. Anschließend wurden die Gel-Taschen und der untere Abstandhalter der Glasplatte mithilfe einer 10 ml Einwegspritze, einer 21 G Kanüle, und dem Gelelektrophorese-Puffer gespült. Der Probenauftrag war limitiert. Bei 14 Gel-Taschen wurde jeweils die erste und letzte Gel-Tasche frei gelassen, um einen geraden Lauf der Proteine in der Gel-Elektrophorese zu gewährleisten. Zudem wurde immer vor den Proben und vor der Positivkontrolle ein Proteinmarker PageRuler™ mit 8 µl aufgetragen. Dieser zeigte eine Auftrennung der Proteine in den Größen von 10 kDA bis 70 kDA an. Da die Membranen im weiteren Verlauf getrennt werden sollten, wurde zwischen Proben und Positivkontrolle eine Gel-Tasche frei gelassen (siehe Abbildung 12).

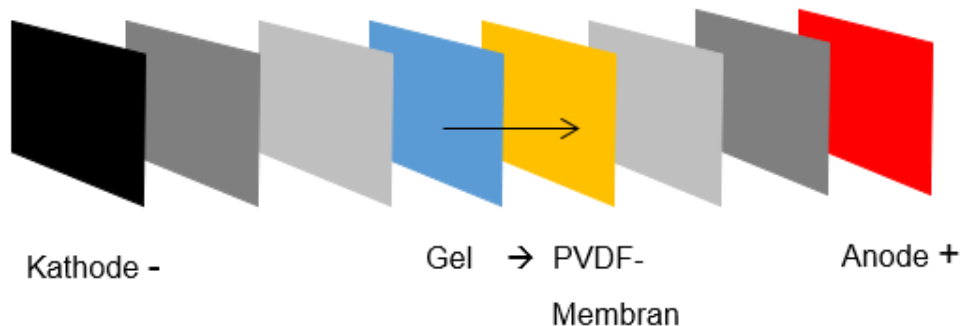
### **3.4.3.3. Gel-Elektrophorese**

Der *power supply* für die Gel-Elektrophorese des Sammelgels wurde bei zwei Gelen auf eine Laufzeit von 30 min mit einer Stromstärke von 40 mA und maximaler Spannung eingestellt. In dieser Zeit hatten die Proteine das Sammelgel vertikal durchwandert. Optisch konnte durch die bromphenolblaue Lauffront geprüft werden, ob alle Proteine im Sammelgel auf etwa gleicher Höhe waren. Bei zwei Gelen wurde für das Trenngel eine Laufzeit von 45 min mit einer Stromstärke von 80 mA und maximaler Spannung eingestellt. Für die nachfolgenden Immundetektionen (siehe 3.4.5) von CIC-9,  $\gamma$ H2AX und  $\beta$ -Aktin war es notwendig, Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 kDa und 50 kDa genau darstellen zu können. Hierzu wurde die 10 kDa Bande herauslaufen gelassen, damit sich die größeren Proteine möglichst weit im Gel auftrennen konnten (siehe Abbildung 12). Danach wurde die Gel-Elektrophorese beendet. Das 12% Polyacrylamid-Gel konnte aus den Gelplatten entfernt werden. Das Trenngel wurde in den *Wet blot*-Puffer (siehe 2.8.2) überführt und das Sammelgel wurde

verworfen. Anschließend konnte mithilfe des ChemiDoc™ MP *imaging System* das Bild des *Stain-Free Gels* (siehe Abbildung 12) erzeugt werden.

#### 3.4.4. Wet blot

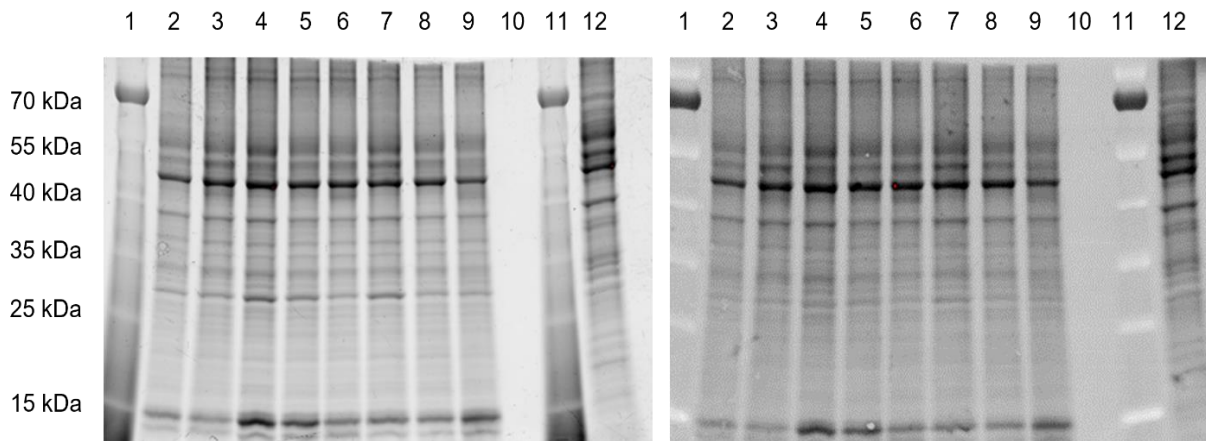
Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden mit der *wet blot*-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Diese wurde zunächst mit Methanol aktiviert, danach gründlich mit Aqua dest. gewaschen und in *wet blot*-Puffer inkubiert. Auch zwei Schwämme und zwei *Whatman*-Papiere wurden vollständig mit *wet blot*-Puffer benetzt. Im nächsten Schritt wurde die PVDF-Membran zusammen mit den *Whatman*-Papieren, den Schwämmen und dem Trenngel in eine Blotkassette eingespannt (siehe Abbildung 11). Dabei wurde auf den luftblasenfreien Kontakt der PVDF-Membran und dem Gel in der Blotkassette geachtet. Die PVDF-Membran durfte zu keiner Zeit nach Aktivierung trocknen. Deshalb wurde die befüllte Blotkassette in den *tank blot* mit *wet blot*-Puffer gegeben. Bei einer Spannung von 17 Volt, einer Stromstärke von ca. 85 mA und einer Temperatur von 4 °C erfolgte die horizontale Elektrophorese für einen Zeitraum von 14 h. Die Banden der aufgetrennten Proteine im Gel wurden dadurch auf die PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde der *Stain-Free Blot* mit dem ChemiDoc™ MP *Imaging System* aufgenommen und so der Proteintransfer kontrolliert (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 11: Aufbau der *wet blot* Kassette**

Die Proteine wandern im elektrischen Feld von der Kathode (schwarz) zu Anode (rot). Dabei werden diese horizontal vom Gel (blau) auf die PVDF-Membran (gelb) transferiert. Die Schwämme (dunkelgrau) liegen der Kathode und der Anode von innen an, darauf folgen innenliegend die *Whatman*-Papiere (hellgrau).

## Methoden



**Abbildung 12: Stain-Free Gel und Stain-Free Blot**

Dargestellt sind hier exemplarisch ein Stain-Free Gel (links vom 20.12.2022) und der dazugehörige Stain-Free Blot (rechts vom 21.12.2022). Der Proteinmarker in Lane 1 und in Lane 11 zeigt eine Auftrennung der Proteine von ca. 15 kDa bis ca. 70 kDa. Dargestellt wurden hier in den vertikal verlaufenden Lanes 2-9 Tumorproben. In der Lane 12 ist die Positivkontrolle aufgetragen. Das Bio-Rad Stain-Free System ermöglicht eine Visualisierung der Proteinauftrennung im Rahmen der SDS-PAGE und eine Kontrolle des Proteintransfers durch die wet blot Methode.

### 3.4.5. Immundetektion

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteine im *wet blot* schloss sich die Immundetektion auf der PVDF-Membran unter Hinzunahme verschiedener Antikörper und Blockierungen an (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Übersicht über die Antikörper und die Blockierungen bei der Immundetektion**

Protein	$\gamma$ H2AX	Cleaved Caspase-9	$\beta$ -Aktin
Antikörper	#9718 Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3)	#52873 Cleaved Caspase-9 (Asp3309) (E5ZN)	#A5441 Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin Clone AC-15
Größe	17 kDA	37 kDa	42 kDA
Spezies	Rabbit	Rabbit	Mouse
Blockierung	4% Milchpulver	3% Milchpulver	5% Milchpulver
1. Antikörper	1:1.000 in 5% BSA	1:1.000 in 3% BSA	1:10.000 in 5% Milchpulver
2. Antikörper	Anti-rabbit IG, HRP-linked 1:5000 in 4% Milchpulver	Anti-rabbit IG, HRP-linked 1:5000 in 3% Milchpulver	Anti-mouse IG, HRP-linked 1:5000 in 5% Milchpulver

Um eine möglichst gleichmäßige Benetzung der PVDF-Membran mit Antikörpern zu gewährleisten, wurde diese in eine passgenaue Inkubationsschale gelegt. Die während des *wet blot* dem Gel zugewandte Seite lag dabei nach oben gerichtet. Alle Schritte erfolgten auf dem Wipp-Schüttler. Milchpulver diente zur Blockierung unspezifischer Bindungen und inkubierte für 1 h bei Raumtemperatur. Gewaschen wurde die Membran anschließend mit

## Methoden

TBST (siehe 2.8.2), je dreimal für 5 min. Die Membran wurde nach dem Blockieren geteilt in eine Membran mit Proteinmarker und den Proben sowie in eine Membran mit Proteinmarker und der Positivkontrolle. Dieses Vorgehen ermöglichte eine bessere Detektion der Proteine in den entnommenen Tumorproben, da die Positivkontrolle in Vorversuchen ein sehr starkes Signal in der Immundetektion aufwies und eine Fokussierung auf die schwächeren Tumorproben erschwerte. Nach der Trennung einer Membran in zwei Membranen wurde der Erstantikörper gegen CIC-9,  $\gamma$ H2AX oder  $\beta$ -Aktin (siehe Tabelle 12) auf die Membran gegeben und inkubiert über Nacht bei 4 °C für mindestens 12 h. Beide Membranen erhielten immer Antikörperlösungen, welche einmalig angesetzt und anschließend auf die Membranen aufgeteilt wurden. Am nächsten Tag wurde erneut mit TBST gewaschen, je dreimal für 5 min, und anschließend der Zweitantikörper *Anti-rabbit* oder *Anti-mouse* aufgegeben. Der Zweitantikörper inkubierte bei Raumtemperatur für 1 h auf dem Wipp-Schüttler. Danach erfolgte wiederum die Waschung mit TBST je dreimal für 5 min. Anschließend wurden die beiden Komponenten des *Enhanced Chemiluminescence Substrate* (ECL) in einer 1:1 Mischung auf die Membran gegeben. Die ECL-Mischung wurde für jede Membran von Proben oder Positivkontrolle neu angesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Inkubation mit ECL zu gewährleisten. Die im ECL enthaltene Meerrettich-Peroxidase (HRP) und das Chemilumineszenz-Substrat inkubierte für 2 min auf der vollständig benetzten Membran, bevor mittels des *ChemiDoc™ MP imaging Systems* die Immundetektion dargestellt werden konnte.

### 3.4.5.1. Lösen der Antikörper von der Membran

Auf den Membranen wurde jeweils CIC-9 oder  $\gamma$ H2AX detektiert. Erst im Anschluss wurde  $\beta$ -Aktin detektiert. Damit der zuvor gebundene Antikörperkomplex von Erst- und Zweitantikörper sich wieder von der Membran lösen konnte, wurde die Membran nach der Immundetektion folgenden Waschschrritten unterzogen.

- 10 min TBST
- 30 min *Stripping*-Puffer
- 30 min 1% SDS-Lösung
- 10 min TBST

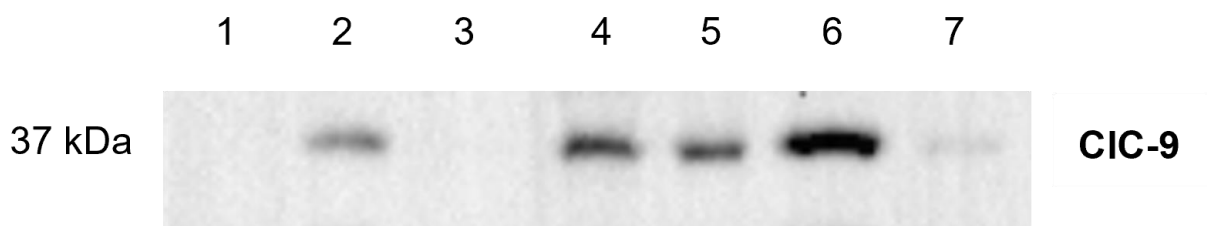
Alle Schritte erfolgten auf dem Wipp-Schüttler. Danach musste die Membran für die  $\beta$ -Aktin Immundetektion erneut blockiert und inkubiert werden, wie in 3.4.5 beschrieben.

### 3.5. Positivkontrollen

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Gele untereinander zu gewährleisten, war es notwendig, die Ergebnisse auf eine gemeinsame Positivkontrolle zu beziehen. Diese wurde mittels Zellkultur erstellt, da eine Tumorprobe *in ovo* zur Positivkontrolle nicht in ausreichender Menge generiert werden konnte. Die Positivkontrolle wurde bei der Immundetektion von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 mittels ChemiDoc™ MP *Imaging System* getrennt von den Proben und bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen, da die Positivkontrolle gegenüber den Tumor-Lysaten in Vorversuchen bei der Darstellung von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 ein sehr starkes Signal aufwies, welches das Signal von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 in den Tumor-Lysate erschwerte. Bei dem Auftrag von z.B. 30  $\mu$ g Protein der Tumorproben zur Darstellung von  $\gamma$ H2AX wurden 20  $\mu$ g Protein der Positivkontrolle aufgetragen. Anschließend konnte die Volumenintensität der Positivkontrolle über den Faktor 1,5 dem Proteinauftrag von 30  $\mu$ g gleichgesetzt werden. Für die Darstellung des  $\beta$ -Aktins wurden Proben und Positivkontrollen gemeinsam aufgenommen, da sich bei dem Referenzprotein kein Unterschied in den Tumor-Lysaten und der Positivkontrolle zeigte. Um eine geeignete Positivkontrolle zu generieren, wurden 700.000 Huh-7 Zellen pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und am nächsten Tag für jeweils vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnO-NP oder ZnCl<sub>2</sub> behandelt (siehe Tabelle 13). Danach wurde das Medium jeweils dekantiert und erneuert. Ab 20 h nach Behandlung erfolgte die makro- und mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen. Nach 23 h konnte der Überstand je in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Zellkulturflaschen wurden je mit 3 ml PBS gewaschen, welches ebenfalls ins Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die übrigen Zellen wurden mit je 2 ml TE gelöst. Danach wurde das TE mit 2 ml DMEM+ gestoppt und ebenfalls ins jeweilige Zentrifugenröhrchen überführt. Zentrifugiert wurden die Zentrifugenröhrchen für 5 min 1500 rpm und 21 °C. Der Überstand konnte verworfen werden. Anschließend wurden die Pellets je in 100  $\mu$ l RIPA-Puffer aufgenommen, 3-mal für 30 s bei einer Amplitude von 90% und einem *pulse* von 0,5 s mit dem Ultraschallstab lysiert und erneut für 5 min 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Danach wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 3.4.1). Die Positivkontrollen wurden, wie die Tumor-Lysate in Einfach-Lysepuffer für die SDS-PAGE aufbereitet (siehe 3.4.2). Die Immundetektion erfolgte zunächst nur für CIC-9 (siehe Abbildung 13).

**Tabelle 13: Evaluation unterschiedlicher Positivkontrollen bezüglich ihrer Eignung bei der Detektion von Cleaved Caspase-9**

Lane	Gelbeladung
1	Huh-7 unbehandelt
2	Huh-7 + ZnCl <sub>2</sub> , das äquimolare Mengen Zn <sup>2+</sup> wie in 50 µg/ml ZnO-NP enthält
3	Huh-7 + 50 µg/ml ZnO-NP
4	Huh-7 + ZnCl <sub>2</sub> , das äquimolare Mengen Zn <sup>2+</sup> wie in 30 µg/ml ZnO-NP enthält
5	Huh-7 + 30 µg/ml ZnO-NP
6	Huh-7 + ZnCl <sub>2</sub> , das äquimolare Mengen Zn <sup>2+</sup> wie in 20 µg/ml ZnO-NP enthält
7	Huh-7 + 20 µg/ml ZnO-NP

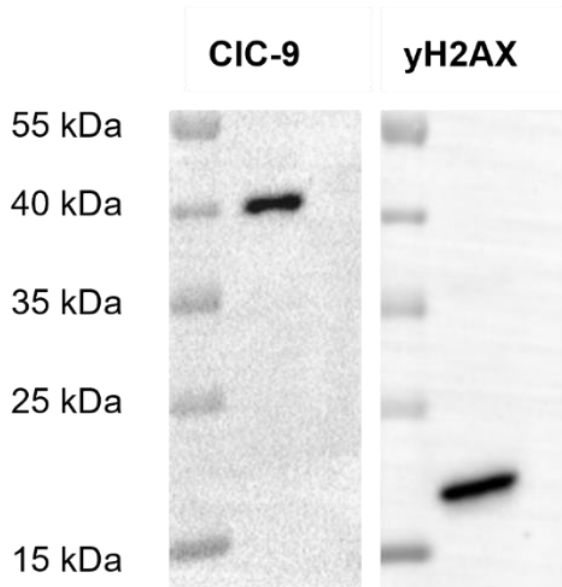
**Abbildung 13: Positivkontrollen für Cleaved Caspase-9**

Zu sehen sind die Proteinbanden der CIC-9 mit 37 kDa in der Immundetektion vom 09.04.2022 mit einem Proteinauftrag von je 40 µg. Für die Gelbeladung siehe Tabelle 13. In Lane 6 zeigte sich das beste Signal für die Behandlung von Huh-7 mit ZnCl<sub>2</sub>, das äquimolare Mengen Zn<sup>2+</sup> wie in 20 µg/ml ZnO-NP enthielt.

Um zu ermöglichen, dass die Positivkontrolle bei allen 14 erfolgten Gelen mitlaufen konnte, wurde eine größere Menge an Huh-7 Zellen ausgesät und mit der erforderlichen Menge ZnCl<sub>2</sub> für vier Stunden behandelt. Es wurden 5 Millionen Huh-7 Zellen in vier 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen ausgesät. Nach der Behandlung wurde das Medium dekantiert und erneuert. Ab 19 h nach Behandlung erfolgte die makro- und mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen. Der Überstand zweier Zellkulturflaschen wurde je in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden je mit 3 ml PBS gewaschen, welches ebenfalls ins Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die übrigen Zellen wurden je mit 3 ml TE gelöst. Danach wurde das TE mit 3 ml DMEM+ gestoppt und ebenfalls ins Zentrifugenröhrchen überführt. Zentrifugiert wurden die Zentrifugenröhrchen für 5 min 1500 rpm und 21 °C. Der Überstand konnte verworfen werden. Anschließend wurden die Pellets in je 600 µl RIPA-Puffer aufgenommen, 3-mal für 30 s bei einer Amplitude von 90% und einem *pulse* von 0,5 s mit dem Ultraschallstab lysiert und erneut für 5 min 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand beider Proben wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung der Positivkontrolle ergab einen Proteingehalt von 4,02 mg/ml. Für den Nachweis von γH2AX wurden 20 µg (4,97 µl) der Positivkontrolle und für

## Methoden

den Nachweis von CIC-9 50 µg (12,43 µl) der Positivkontrolle in der SDS-PAGE aufgetragen. Dafür wurden Aliquots von 20 µg und 50 µg erzeugt. Die Probenaufbereitung der Positivkontrollen für die SDS-PAGE erfolgte wie die Probenvorbereitung der Proben in Einfach-Lysepuffer (siehe 3.4.2.2) und mit der Denaturierung der Proben (siehe 3.4.2.3). Anschließend konnte die Positivkontrolle in der Immundetektion sowohl ein Signal für die CIC-9 als auch für das  $\gamma$ H2AX erzeugen (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Positivkontrolle Huh-7 20µg/ml ZnCl vom 25.04.2022**

Links ist die Immundetektion von CIC-9 bei 37 kDa vom 08.12.2022 mit 50 µg Proteinauftrag für die Positivkontrolle gezeigt. Das rechte Bild zeigt die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX bei 17 kDa vom 16.12.2022 mit 20 µg Proteinauftrag für die Positivkontrolle. Die Positivkontrolle wurde für die Darstellung von CIC-9 und  $\gamma$ H2AX immer getrennt von den Proben bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen.

### 3.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels Messung der Proteinbanden durch das *ChemiDoc™ MP imaging System* und *Image Lab*. Die Positivkontrolle wurde für die Darstellung von CIC-9 und  $\gamma$ H2AX immer getrennt von den Proben bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Das Signal der *in vitro* Positivkontrolle war deutlich stärker. So sollte eine bessere Darstellung der Banden von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 in den Proben aus der CAM ermöglicht werden. Für die CIC-9 und die getrennt aufgenommene Positivkontrolle ergab sich eine Belichtungszeit von 222,6 s. Für das  $\gamma$ H2AX und die getrennt aufgenommene Positivkontrolle ergab sich eine Belichtungszeit von 29,2 s. Die ECL-Mischung wurde für jede Aufnahme neu angesetzt. So konnten die durch das Programm ermittelten Werte immer auf die Positivkontrolle bezogen werden. Bei Unterschieden in der aufgetragenen Gesamtproteinmenge zwischen Proben aus der CAM und der Positivkontrolle wurde entsprechend rechnerisch korrigiert. Die Positivkontrolle wurde für

## Methoden

die Darstellung von  $\beta$ -Actin zusammen mit der Probe aufgenommen. Auch hier erfolgte die Auswertung mittels Bezuges auf die Positivkontrolle. Die Kontroll- und Interventionsgruppe wurde unterteilt in zwei weitere Gruppen, welche die Zeitpunkte 4 h und 48 h nach intravaskulärer Applikation repräsentierten. Die Versuche erfolgten in drei voneinander unabhängigen Durchgängen des CAM-Assays, in denen alle Gruppen mit mindestens drei Eiern repräsentiert waren. Mithilfe von *Graph Pad Prism* wurde jedes Ei in jeder Gruppe einzeln ausgewertet und die relative Expression von  $\gamma$ H2AX bzw. CIC-9 in einem Scatter-Plot dargestellt. Zusätzlich wurde für jeden Durchgang innerhalb der Gruppen ein Mittelwert gebildet. Die im Balkendiagramm dargestellten Mittelwerte zur relativen Expression von  $\gamma$ H2AX/CIC-9 wurden aus den Mittelwerten der drei unabhängigen Durchgänge gebildet und mit der dazugehörigen Standardabweichung für jede Gruppe einzeln aufgetragen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *two-way ANOVA* und Bonferroni Korrektur, um die Mittelwerte der Kontroll- und Interventionsgruppe zu beiden Zeitpunkten miteinander zu vergleichen.

## 4 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Analyse zellulärer Apoptosen und DNA-Schäden in Tumoren nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP oder sterilem Aqua dest. mithilfe des CAM-Assays dargestellt. Die Probenanalyse wurde mittels Western Blot (SDS-PAGE, *wet blot* und Immundetektion) durchgeführt. Zunächst sollen die Ergebnisse der Etablierung eines geeigneten Puffersystems gezeigt werden (siehe 4.1). Anschließend folgen die Ergebnisse der Datenerhebung der Immundetektionen von Proben in Einfach-Lysepuffer (siehe 4.2).

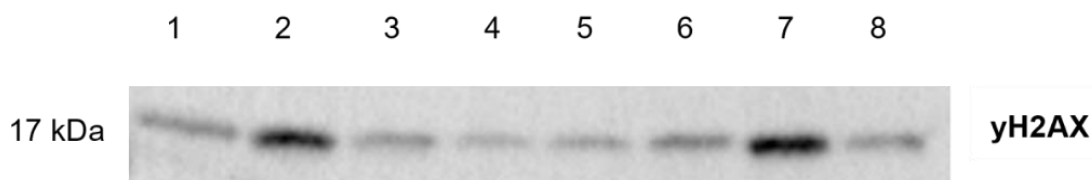
### 4.1. Methodenoptimierung: Etablierung eines geeigneten Puffersystems

#### 4.1.1. Immundetektionen der Proben in RIPA-Puffer

In Rahmen der Vorversuche wurden die aus dem CAM-Assay generierten Tumorproben am Tag der Tumorentnahme in einer definierten Menge an RIPA-Puffer aufgenommen und lysiert (siehe 3.3). Die Proben in RIPA-Puffer wurden anschließend für einen Zeitraum von ca. einem Monat (siehe 4.1.2) und für einen Zeitraum ca. sechs Monaten (siehe 4.1.3) bis zur Probenanalyse mittels Immundetektion bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

#### 4.1.2. Proben in RIPA-Puffer: Kurzer Lagerungszeitraum

Nach ca. einem Monat Lagerung bei -20 °C im Gefrierschrank wurden die Proben in RIPA-Puffer zur Herstellung der Tumor-Lysate (siehe 3.3) mit dem Ultraschallstab lysiert und danach zentrifugiert. Die Proben in RIPA-Puffer zeigten nach dem Zentrifugieren eine Zweiphasenbildung mit einem deutlich erkennbarem festen Pellet und einem flüssigen Überstand. Für den Western Blot wurde der Überstand der Probe verwendet und das Pellet verworfen. Anschließend wurden die Proben in RIPA-Puffer verdünnt und der Ladepuffer für die SDS-PAGE wurde hinzugegeben (siehe 3.4.2.1). Es erfolgte die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX bei ca. 17 kDa (siehe Abbildung 15).



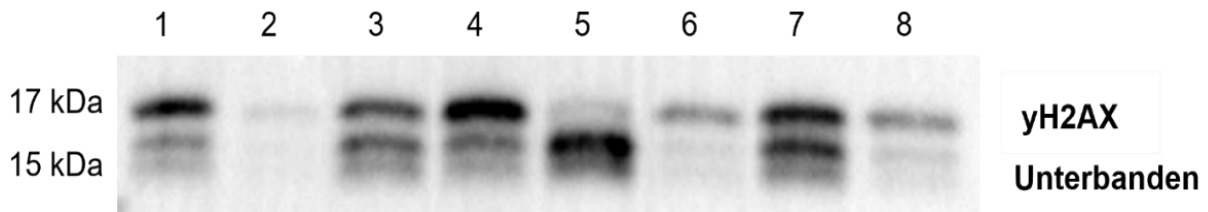
**Abbildung 15: Immundetektion von  $\gamma$ H2AX nach einem kurzen Lagerungszeitraum**

Zu sehen ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX bei 17 kDa. In Lane 1-6 sind Proben 4 h nach intravaskulärer Applikation von sterilem Aqua dest. abgebildet. In Lane 7-8 sind Proben 4 h nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP zu sehen. Alle hier abgebildeten Proben sind in RIPA-Puffer aufgenommen und wurden mit diesem weiter verdünnt, um die Proteinmenge anzupassen. Die Verdünnung mit RIPA-Puffer, die Zugabe von Ladepuffer und die Immundetektion erfolgten ca. einen Monat nach Probennahme (siehe Tabelle 7).

## Ergebnisse

### 4.1.3. Proben in RIPA-Puffer: Langer Lagerungszeitraum

Nach ca. sechs Monaten Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank wurden weitere in RIPA-Puffer aufgenommene Tumorproben wie in 4.1.2 beschrieben für die SDS-PAGE vorbereitet. Anschließend wurde eine Immundetektion von  $\gamma\text{H2AX}$  durchgeführt, welche Unterbanden in der  $\gamma\text{H2AX}$  Detektion bei der Immundetektion von  $\gamma\text{H2AX}$  präsentierte (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Immundetektion von  $\gamma\text{H2AX}$  nach einem langen Lagerungszeitraum**

Zu sehen ist die Immundetektion von  $\gamma\text{H2AX}$  bei 17 kDa mit darunter auftretenden Unterbanden bei ca. 15 kDa. In Lane 5 zeigte sich die Unterbande bei 15 kDa sogar stärker als die Bande bei 17 kDa. In Lane 1-4 sind Proben 4 h nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP abgebildet. In Lane 5-8 sind Proben 4 h nach intravaskulärer Applikation von sterilem Aqua dest. zu sehen. Alle hier abgebildeten Proben sind in RIPA-Puffer aufgenommen und wurden mit diesem weiter verdünnt, um die Proteinmenge anzupassen. Die Verdünnung mit RIPA-Puffer, die Zugabe von Ladepuffer und die Immundetektion erfolgten ca. sechs Monate nach Probennahme (siehe Tabelle 7).

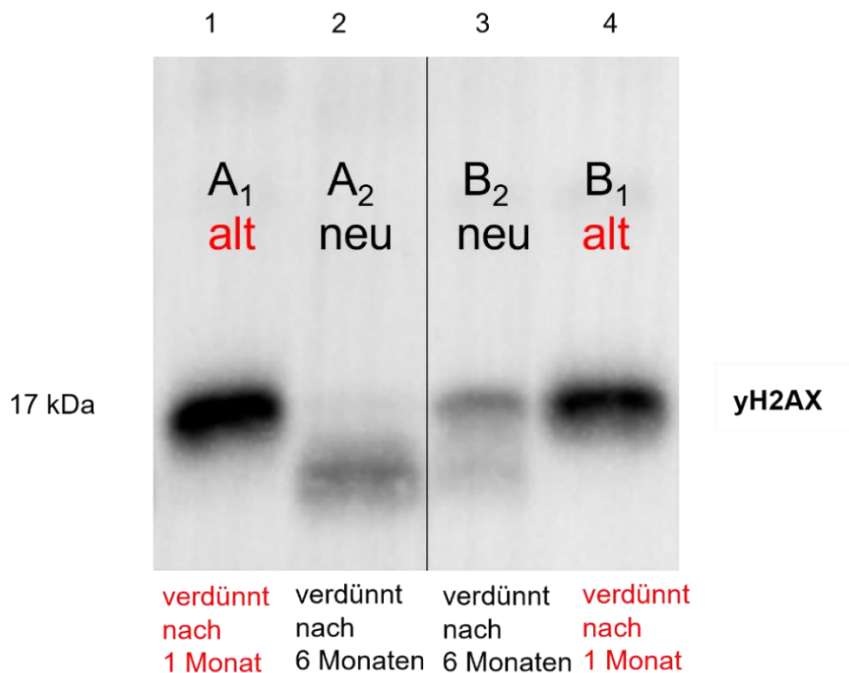
Als Ursache der Unterbanden wurde ein enzymatischer Abbau von  $\gamma\text{H2AX}$  bei längerer Lagerung der Originalproben vermutet. Aufgrund dieser Annahme wurden Proben, die lange in RIPA-Puffer lagerten, nicht zur Datenerhebung genutzt. Im Folgenden wurden RIPA-Probenverdünnungen mit Ladepuffer zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellt und die Bedeutung des Lagerungszeitraums näher untersucht, um die Lagerung der Originalproben ohne Ladepuffer der Lagerung von RIPA-Probenverdünnungen mit Ladepuffer gegenüberzustellen.

#### 4.1.3.1. RIPA-Probenverdünnungen mit Ladepuffer und Bedeutung des Lagerungszeitraums

Nach der initialen Aufnahme von Proben in RIPA-Puffer wurde auch der Verdünnungsschritt mit RIPA-Puffer und der Verdünnungsschritt mit Ladepuffer (siehe Tabelle 7) einer kritischen Prüfung unterzogen. Die nach ca. einem Monat Lagerung verdünnten RIPA-Proben (siehe 4.1.2) wurden zusammen mit den Originalproben für ca. weitere sechs Monate bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Im Folgendem sollen exemplarisch zwei Originalproben A und B und die daraus erzeugten Probenverdünnungen zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet werden. Nach dem Auftauen der Proben A und B und den alten Probeverdünnungen  $A_1$  und  $B_1$  wurde vor der SDS-PAGE eine neue Probenverdünnung  $A_2$  der Probe A und eine neue Probenverdünnung  $B_2$  der Probe B erzeugt. Die Probenverdünnungen  $A_1$  und  $B_1$  wurden nach einem Monat Lagerung verdünnt und lagerten im Anschluss für weitere sechs Monate. Die

## Ergebnisse

Probenverdünnungen A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub> wurden nach sechs Monaten Lagerung verdünnt. Miteinander verglichen werden sollten die alten Probenverdünnungen A<sub>1</sub> und B<sub>1</sub> mit den neuen Probeverdünnungen A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub>. Dafür erfolgte eine Immundetektion von  $\gamma$ H2AX zur Unterscheidung der alten Probenverdünnung A<sub>1</sub> gegenüber der neuen Probenverdünnung A<sub>2</sub> und der alten Probenverdünnung B<sub>1</sub> gegenüber der neuen Probenverdünnung B<sub>2</sub> (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17: Immundetektion alte Probeverdünnungen vs. neue Probenverdünnungen**

Ein deutliches Signal von  $\gamma$ H2AX ist bei 17 kDa jeweils in den alten Probenverdünnungen A<sub>1</sub> und B<sub>1</sub> verdünnt mit RIPA-Puffer und Ladepuffer nach einem Monat und anschließender Lagerung für sechs Monate zu erkennen (Lane 1 und 4). Für die neuen Probenverdünnungen A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub> aus den sechs Monate gelagerten unverdünnten Proben A und B zeigte sich ein Bild von Unterbanden bei ca. 15 kDa und teilweise keinem deutlichen Signal bei 17 kDa (Lane 2 und 3).

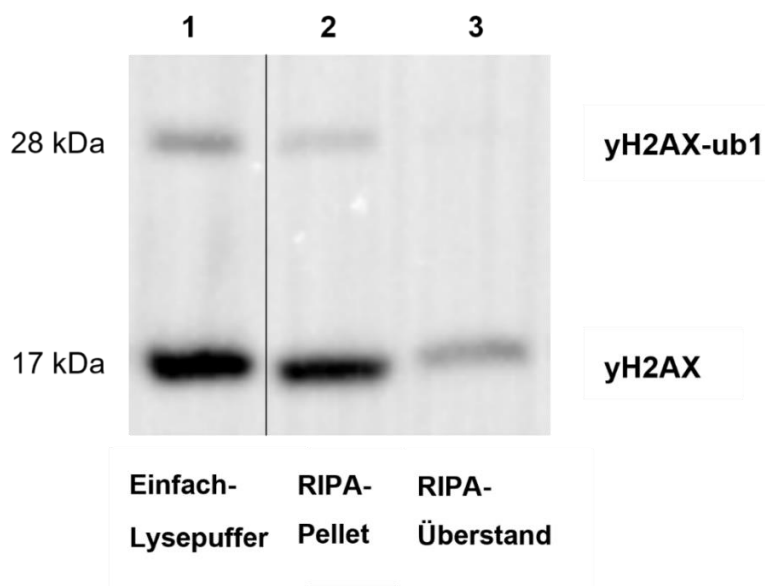
Die Verdünnung mit RIPA-Puffer und Ladepuffer zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigte, dass bei einer Verdünnung nach ca. einem Monat und Lagerung der Probenverdünnung für weitere sechs Monate  $\gamma$ H2AX in der Immundetektion weiterhin wie in (4.1.2) bei 17 kDa nachweisbar war. In den neuen Probenverdünnungen wurden Unterbanden zur  $\gamma$ H2AX Detektion bei ca. 15 kDa detektiert. Während der Lagerung war in den alten Probenverdünnungen gegenüber den Originalproben SDS zur Denaturierung der Proteine vorhanden. Als Ursache der Unterbanden in den neuen Probenverdünnungen wurden Proteinmodifikationen von  $\gamma$ H2AX bei fehlendem SDS in den Originalproben vermutet. Die Verdünnungsschritte beeinflussten den Nachweis von  $\gamma$ H2AX in der Immundetektion, ohne dass die Ursache abschließend geklärt werden konnte. Anschließend wurde daher auf den Verdünnungsschritt mit RIPA-Puffer verzichtet und der Ladepuffer unmittelbar vor SDS-PAGE

## Ergebnisse

nur dem Auftragsvolumen und nicht zur Lagerung der Probe zugefügt. Im Folgendem wurde zudem ein neues Puffersystem mit Einfach-Lysepuffer dem alten Puffersystem mit RIPA-Puffer gegenübergestellt.

### 4.1.4. Immundetektion Einfach-Lysepuffer vs. RIPA-Puffer

Infolge der Erkenntnisse zur Bedeutung des Puffersystems für die Güte der Immundetektion im Western Blot (siehe 4.1.3) sollte ein direkter Vergleich verschiedener Puffersysteme erfolgen. Dazu wurden im Rahmen der Vorversuche neue Tumorproben generiert und exemplarisch wurde ein entnommener Tumor in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte des Tumors wurde in Einfach-Lysepuffer lysiert. Die andere Hälfte des Tumors wurde in RIPA-Puffer lysiert. Diesmal wurde sowohl der Überstand als auch das Pellet der Probe in RIPA-Puffer untersucht (siehe Abbildung 18). Das RIPA-Pellet wurde hierfür erneut mit Einfach-Puffer lysiert. Beide Tumor-Lysate wurden nicht weiter verdünnt und die Zugabe von Ladepuffer erfolgte unmittelbar vor der SDS-PAGE (siehe 3.4.2.2). Im RIPA-Überstand zeigte sich dabei die geringste Detektion von  $\gamma$ H2AX. Wohingegen im erneut lysiertem RIPA-Pellet und Einfach-Lysepuffer  $\gamma$ H2AX deutlich detektiert werden konnte. Erstmals konnte im lysierten RIPA-Pellet und Einfach-Lysepuffer die monoubiquitinierte Form von  $\gamma$ H2AX ( $\gamma$ H2AX-ub1) bei ca. 28 kDa nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: Immundetektion Einfach-Lysepuffer vs. RIPA-Puffer**

*In allen abgebildeten Lanes sind Proteinproben aus demselben Tumor aufgetragen. Dieser ist in zwei Hälften geteilt worden. Lane 1 zeigt die Hälfte des Tumors, welche in Einfach-Lysepuffer aufgenommen wurde. Lane 2 und Lane 3 zeigen die andere Hälfte des Tumors, welche in RIPA-Puffer aufgenommen wurde. Das RIPA-Pellet (Lane 2) wurde zusätzlich in Einfach-Lysepuffer gelöst und danach zentrifugiert. Die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX bei 17 kDa ist am deutlichsten im Einfach-Lysepuffer (Lane 1) und im RIPA-Pellet (Lane 2). Im RIPA-Überstand war nur ein schwacher Nachweis von  $\gamma$ H2AX möglich. Das  $\gamma$ H2AX-ub1 bei 28 kDa ist im Einfach-Lysepuffer (Lane 1) am stärksten detektierbar. Auch im*

## Ergebnisse

*RIPA-Pellet (Lane 2) ist  $\gamma$ H2AX-ub1 schwach detektierbar, im RIPA-Überstand (Lane 3) ist  $\gamma$ H2AX-ub1 jedoch nicht nachweisbar.*

Die geringe Löslichkeit von  $\gamma$ H2AX in RIPA-Puffer zeigte sich nach der erneuten Lyse des RIPA-Pellets in der Immundetektion. Ein Großteil der  $\gamma$ H2AX Proteine hatte sich nicht in RIPA-Puffer gelöst. Der Einfach-Lysepuffer ermöglichte einen Nachweis von  $\gamma$ H2AX, ohne dass Teile der  $\gamma$ H2AX Proteine zusätzlich im Pellet gelöst werden mussten, und eignete sich daher als Lysepuffer besser als der RIPA-Puffer. Im weiteren Verlauf wurden aufgrund der Methodenoptimierung (siehe auch 4.1.1-4.1.3) zur Datenerhebung (siehe 4.2) alle Tumorproben zunächst ohne Lysepuffer über Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C anstatt bei -20 °C gelagert, um einem etwaigen Abbau der Proteine entgegenzuwirken. Vor Auftrag in der SDS-PAGE wurde eine definierte Menge an Probe in Einfach-Lysepuffer aufgenommen, es wurde kein Verdünnungsschritt mit RIPA-Puffer durchgeführt und der Ladepuffer wurde unmittelbar vor der SDS-PAGE hinzugefügt (siehe Tabelle 7).

## 4.2. Datenerhebung

### 4.2.1. Immundetektionen der Proben in Einfach-Lysepuffer

Mit drei unabhängigen Experimenten des CAM-Assays konnten insgesamt 56 Tumore generiert werden (siehe 4.2.2). Drei Proben wurden jedoch nach der Immundetektion nicht in die Auswertung aufgenommen (siehe 4.2.3.). Es wurde ein kurzer Zeitpunkt von 4 h und ein langer Zeitpunkt von 48 h nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP oder sterilem Aqua dest. betrachtet (siehe Tabelle 14). Zudem wurde immer je ein separates Gel mit denselben Proben für  $\gamma$ H2AX (siehe 4.2.4) und CIC-9 (siehe 4.2.5) beladen. Als Referenzprotein in den Tumor-Lysaten diente  $\beta$ -Aktin und wurde als zweites Protein auf den Membranen detektiert.

### 4.2.2. Übersicht der Probenentnahmen im CAM-Assay

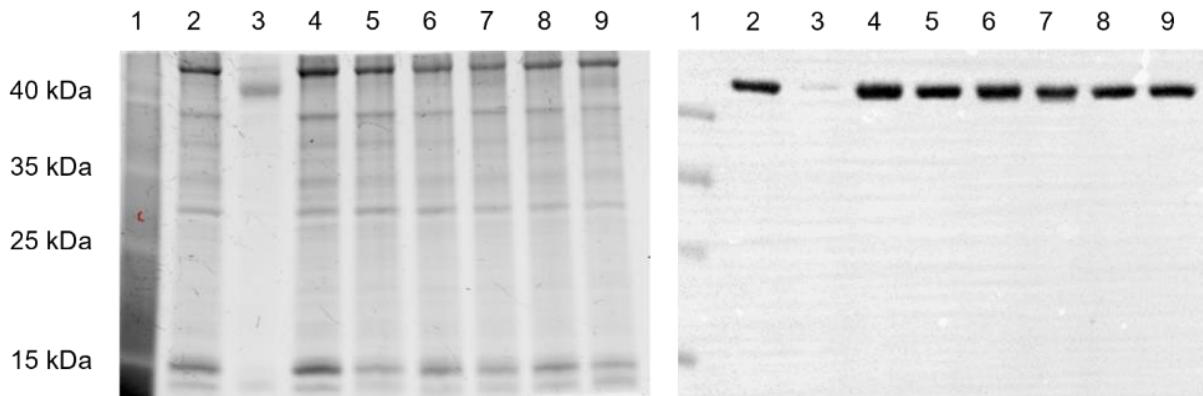
**Tabelle 14: Übersicht der Probenentnahmen im CAM-Assay**

	4 h ZnO-NP	4 h Aqua dest.	48 h ZnO-NP	48 h Aqua dest	Proben pro Entnahme
Probenentnahme 1	n = 6	n = 6	n = 4	n = 4	n = 20
Probenentnahme 2	n = 5	n = 5	n = 4	n = 3	n = 17
Probenentnahme 3	n = 5	n = 4	n = 6	n = 4	n = 19

## Ergebnisse

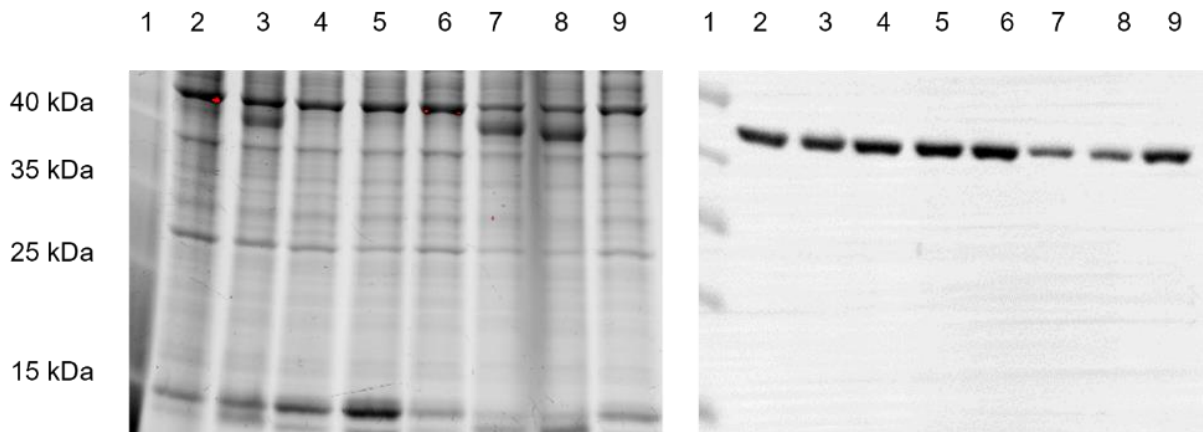
### 4.2.3. Probenausschluss

Die Proben 53, 153 und 172 wurden aufgrund des im *Stain-Free* Gel untypischen Bandenmuster für Huh-7 Zellen und dem fehlenden bis minimalen Nachweis von  $\beta$ -Aktin nicht in die Auswertung aufgenommen (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Vermutlich handelte es sich bei diesen Proben überwiegend um CAM-Gewebe.



**Abbildung 19: *Stain-Free* Gel und korrespondierende  $\beta$ -Aktin Immundetektion A**

Im linken Teil des Bildes ist das *Stain-Free* Gel erkennbar. In diesem zeigte die Probennummer 53 (Lane 3) kein für Huh-7 zelltypisches Bandenmuster und wurde nicht ausgewertet. Im rechten Teil des Bildes ist die Immundetektion von  $\beta$ -Aktin bei ca. 42 kDa dargestellt. Es zeigte sich bei der Immundetektion von  $\beta$ -Aktin keine Antikörperreaktion. Diese Konstellation spricht für die Abwesenheit von Huh-7 Zellen.



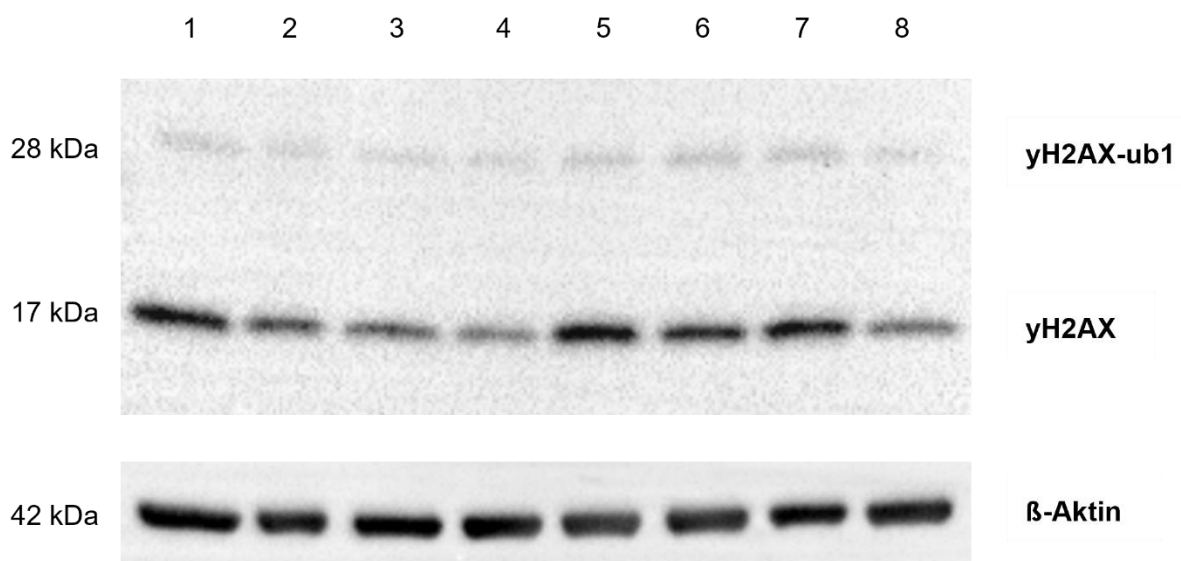
**Abbildung 20: *Stain-Free* Gel und korrespondierende  $\beta$ -Aktin Immundetektion B**

Im linken Teil des Bildes ist das *Stain-Free* Gel erkennbar. In diesem zeigten die Probennummer 153 (Lane 7) und die Probennummer 172 (Lane 8) beide ein für Huh-7 untypisches Bandenmuster und wurden nicht ausgewertet. Im rechten Teil des Bildes ist die Immundetektion von  $\beta$ -Aktin dargestellt. Es zeigte sich bei beiden Proben nur eine leichte Antikörperreaktion. Dies spricht für eine Beimengung von CAM-Gewebe in großem Umfang in beiden Tumorproben.

## Ergebnisse

### 4.2.4. Immundetektionen von $\gamma$ H2AX

Im Rahmen der DNA-Schadensantwort wird das Histon H2AX am Serin 139 phosphoryliert und so zu  $\gamma$ H2AX. Das  $\gamma$ H2AX kann als indirekter Biomarker für Schäden der DNA angesehen werden. Die Expressionsanalyse mittels Western Blot erlaubte eine Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX. Exemplarisch ist im Folgendem eine Immundetektion von  $\gamma$ H2AX und die dazu korrespondierende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin gezeigt (siehe Abbildung 21). Die beiden Immundetektionen sind als repräsentativ für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immundetektionen von  $\gamma$ H2AX und korrespondierendem  $\beta$ -Aktin anzusehen.

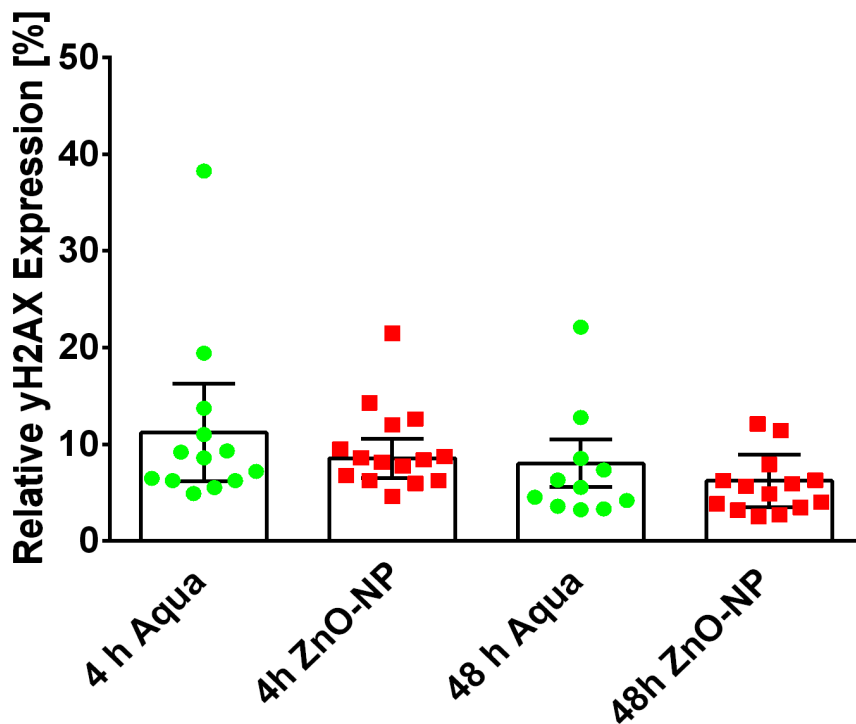


**Abbildung 21: Immundetektion  $\gamma$ H2AX und  $\beta$ -Aktin**

Dargestellt ist eine repräsentative Immundetektion von  $\gamma$ H2AX und dem dazu korrespondierenden  $\beta$ -Aktin zur Ladekontrolle. Zu sehen sind die Banden von  $\gamma$ H2AX bei 17 kDa und seiner mutmaßlich ubiquitinierten Variante  $\gamma$ H2AX-ub1 bei 28 kDa. Die in Lane 1-4 gezeigten Proteinproben entstammen Tumoren, die in ovo mit 0,3 ml einer ZnO-NP Suspension mit einer Konzentration von 900  $\mu$ g/ $\mu$ l in sterilem Aqua dest. behandelt wurden. In Lane 5-8 sind Tumore der Kontrollgruppe behandelt mit 0,3 ml sterilem Aqua dest. dargestellt. Lane 1-2 und Lane 5-6 stellen die Entnahme der Tumore nach 4 h, Lane 3-4 und 7-8 die Entnahme der Tumore nach 48 h dar.

#### 4.2.4.1. Auswertung der relativen $\gamma$ H2AX Expression

Alle 53 Tumorproben zeigten in der Immundetektion von  $\gamma$ H2AX sowohl nach dem kurzen Zeitpunkt von 4 h als auch nach langem Zeitpunkt von 48 h ein Signal (siehe 9.2.1). Sowohl Proben nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP als auch Proben nach intravaskulärer Applikation von sterilem Aqua dest. zeigten Signale in der Immundetektion. Aus den Einzelwerten der unterschiedlichen Gruppen (4 h Aqua, 4 h ZnO-NP, 48 h Aqua, 48 h ZnO-NP) wurden Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs gebildet, um die Unabhängigkeit der Durchgänge in die Auswertung mit einzubeziehen. Die Auswertung der relativen Expression von  $\gamma$ H2AX ergab dabei mittels *two-way* ANOVA und Bonferroni Korrektur keinen signifikanten Unterschied zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe (bei Probenentnahme nach 4h  $p=0,83$ , bei Probenentnahme nach 48h  $p=0,96$ ) (siehe Abbildung 22).

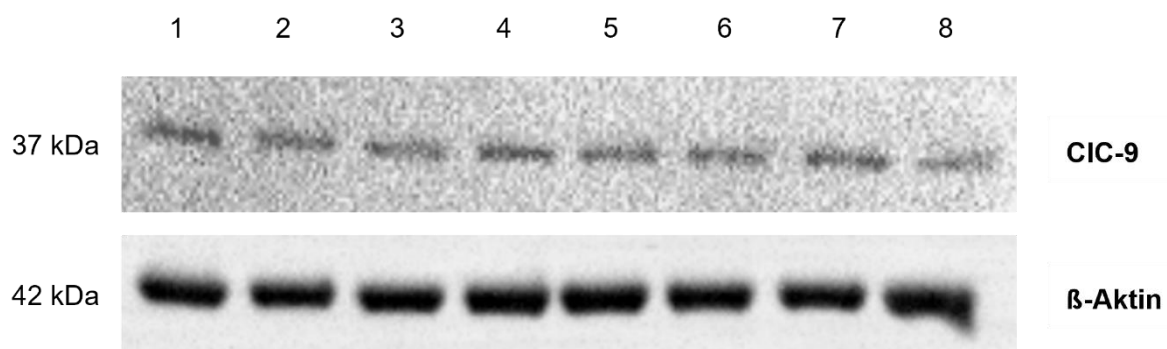


**Abbildung 22: Relative  $\gamma$ H2AX Expression**

Zu sehen ist die relative  $\gamma$ H2AX Expression in 53 Tumoren 4 h nach Applikation (links) und 48 h nach Applikation (rechts). Unterschieden werden dabei die ZnO-NP (rote Quadrate) und die Kontrollgruppe (grüne Kreise), jedes Symbol repräsentiert eine Tumorprobe. Dargestellt sind zudem Mittelwerte und Standardabweichungen der densitometrischen Analysen dreier unabhängiger Experimente ( $N \geq 3$ ). Die Proteinexpression ist in Relation zu einer Positivkontrolle (=100%) dargestellt, die auf jedem der Gele als Fixpunkt mitgelaufen ist. Zur statistischen Analyse wurde der *two-way* ANOVA mit Bonferroni Korrektur durchgeführt, um die Mittelwerte der beiden Gruppen zu beiden Zeitpunkten miteinander zu vergleichen. Die Darstellung erfolgte mittels Graph Pad Prism.

#### 4.2.5. Immundetektion von *Cleaved Caspase-9*

Im Rahmen der intrinsischen Apoptose wird die Caspase-9 u.a. an Asparagin 330 gespalten und es liegt ein langes Fragment der CIC-9 vor. Dieses wurde als indirekter Marker der Apoptose bewertet und mittels Expressionsanalyse durch den Western-Blot quantifiziert. Exemplarisch ist im Folgendem eine Immundetektion von CIC-9 und die dazu korrespondierende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin gezeigt (siehe Abbildung 23). Die beiden Immundetektionen sind als repräsentativ für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immundetektionen von CIC-9 und korrespondierendem  $\beta$ -Aktin anzusehen. Bei der Immundetektion von CIC-9 erfolgte die Darstellung immer mit einem starken Hintergrund, und die Signale der Immundetektion waren teilweise nicht stark ausgeprägt.

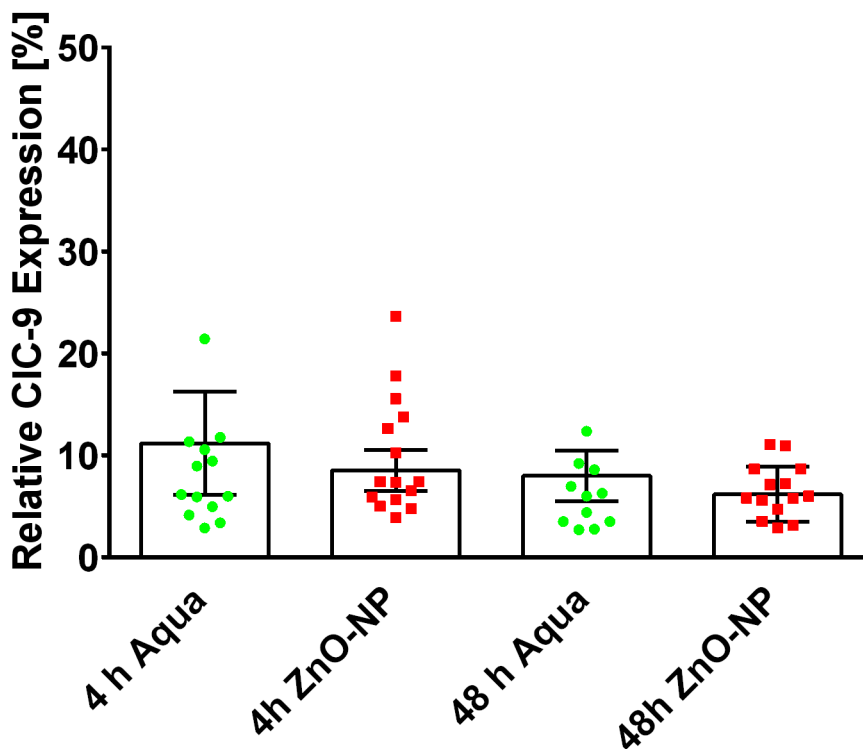


**Abbildung 23: Immundetektion *Cleaved Caspase-9* und  $\beta$ -Aktin**

Dargestellt ist eine repräsentative Immundetektion von CIC-9 und dem dazu korrespondierenden  $\beta$ -Aktin zur Ladekontrolle. Zu sehen sind die Banden von CIC-9 bei 37 kDa. Die in Lane 1-4 gezeigten Proteinproben entstammen Tumoren, die *in ovo* mit 0,3 ml einer ZnO-NP Suspension mit einer Konzentration von 900  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in sterilem Aqua dest. behandelt wurden. In Lane 5-8 sind Tumore der Kontrollgruppe behandelt mit 0,3 ml sterilem Aqua dest. dargestellt. Lane 1-2 und Lane 5-6 stellen die Entnahme der Tumore nach 4 h, Lane 3-4 und 7-8 die Entnahme der Tumore nach 48 h dar.

#### 4.2.5.1. Auswertung der relativen CIC-9 Expression

Alle 53 Tumorproben zeigten in der Immundetektion von CIC-9 sowohl nach dem kurzen Zeitpunkt von 4 h als auch nach langem Zeitpunkt von 48 h ein Signal (siehe 9.2.2). Sowohl Proben nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP als auch Proben nach intravaskulärer Applikation von sterilem Aqua dest. zeigten Signale in der Immundetektion. Aus den Einzelwerten der unterschiedlichen Gruppen (4 h Aqua, 4 h ZnO-NP, 48 h Aqua, 48 h ZnO-NP) wurden Mittelwerte der jeweiligen Durchgänge gebildet, um die Unabhängigkeit der Durchgänge in die Auswertung mit einzubeziehen. Die Auswertung der relativen Expression von CIC-9 ergab dabei mittels *two-way* ANOVA und Bonferroni Korrektur keinen signifikanten Unterschied zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe (bei Probenentnahme nach 4h  $p = 0,67$ , bei Probenentnahme nach 48h  $p > 0,99$ ) (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Relative Cleaved Caspase-9 Expression**

Zu sehen ist die relative CIC-9 Expression in 53 Tumoren 4 h nach Applikation (links) und 48 h nach Applikation (rechts). Unterschieden werden dabei die ZnO-NP (rote Quadrate) und die Kontrollgruppe (grüne Kreise), jedes Symbol repräsentiert eine Tumorprobe. Dargestellt sind zudem Mittelwerte und Standardabweichungen der densitometrischen Analysen drei unabhängiger Experimente ( $N \geq 3$ ). Die Proteinexpression ist in Relation zu einer Positivkontrolle (=100%) dargestellt, die auf jedem der Gele als Fixpunkt mitgelaufen ist. Zur statistischen Analyse wurde der *two-way* ANOVA mit Bonferroni Korrektur durchgeführt, um die Mittelwerte der beiden Gruppen zu beiden Zeitpunkten miteinander zu vergleichen. Die Darstellung erfolgte mittels Graph Pad Prism.

## **5 Diskussion**

Im Folgenden soll zunächst die Etablierung eines geeigneten Puffersystems zur Gewebelyse und Immundetektion von Histonen und Caspasen diskutiert werden (siehe 5.1). Danach erfolgt die Diskussion der Ergebnisse zur Expression von  $\gamma$ H2AX (DNA-Schadensmarker) und CIC-9 (Apoptosemarker) (siehe 5.2).

### **5.1. Etablierung eines geeigneten Puffersystems zur Gewebelyse und Immundetektion von Histonen und Caspasen**

Bei den in der Arbeit untersuchten Proben handelte es sich um Gewebeproben, welche hinsichtlich des Lysepuffers gesondert von reinen Zellkulturproben zu betrachten sind, da Gewebe neben den Zellen selbst einen weitaus höheren Anteil an Extrazellulärmatrix enthalten, der den Zellaufschluss erheblich erschweren kann. Der Lysepuffer zur Gewebelyse sollte einen höheren Anteil an Detergenzien aufweisen, um alle Proteine aus dem Gewebe extrahieren zu können. Gleichzeitig muss der Lysepuffer zur Gewebelyse auch mit dem Verfahren des Western Blots inklusive der Immundetektion kompatibel sein. RIPA-Puffer wurde bereits vielfach verwendet, um Gewebeproben zu lysieren und Immundetektionen zu ermöglichen (Zhao et al., 2015, Zhai et al., 2018, Asrafuzzaman et al., 2018, Wang et al., 2020). Zudem ist beschrieben, dass insbesondere Kernproteine eine höhere Löslichkeit in RIPA-Puffer aufweisen (Ngoka, 2008). Um das Kernprotein  $\gamma$ H2AX in den Proben detektieren zu können, wurde in den Vorversuchen daher der RIPA-Puffer zur Gewebelyse verwendet. In Bezug auf die Darstellung von Kernproteinen ist zu beachten, dass diese nur einen kleinen Anteil der Gesamtheit aller zellulären Proteine ausmachen und die Kernproteine daher in der Immundetektion schlechter darstellbar sein können.

Bei der Immundetektion von Proben in RIPA-Puffer zeigten sich bei einem Lagerungszeitraum von ca. sechs Monaten zusätzliche Banden unterhalb des zu erwartenden Molekulargewichtes von  $\gamma$ H2AX bei ca. 15 kDa (siehe Abbildung 16). Eine Überlegung zu der Entstehung dieser Unterbanden war, dass  $\gamma$ H2AX in den Gewebeproben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit der Zeit einem enzymatischen Abbau unterlag. Aufgrund der stark denaturierenden Eigenschaften gilt der RIPA-Puffer zwar im Allgemeinen als idealer Puffer, um Proteine aus Gewebeproben zu extrahieren, aber dazu ist die Präsenz von SDS vonnöten, das die Quartärstrukturen von Proteinen löst (Rehm and Letzel, 2010). In den Vorversuchen wurde zur Herstellung der Tumor-Lysate ein RIPA-Puffer verwendet, dem kein SDS beigesetzt war (siehe 2.8.1). Die Zugabe von SDS erfolgte erst mit der Zugabe des Ladepuffers (siehe 2.8.2) vor der SDS-PAGE. In Einklang mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass in Probenverdünnungen mit Ladepuffer auch nach einem langen Lagerungszeitraum der

## Diskussion

Nachweis von  $\gamma$ H2AX bei 17 kDa ohne Unterbanden möglich war (siehe 4.1.3.1 Verdünnung A<sub>1</sub> und B<sub>1</sub> in Abbildung 17). Die Überlegungen zu einem enzymatischen Abbau von  $\gamma$ H2AX bei langem Lagerungszeitraum trafen demnach wahrscheinlich nur bedingt zu. Die fehlende SDS-Denaturierung könnte bei dem Histon  $\gamma$ H2AX dazu geführt haben, dass es nicht mehr in ausreichendem Maße löslich vorlag und damit nicht nachweisbar war. In den Vorversuchen dieser Arbeit zeigte sich zudem, dass das Histon  $\gamma$ H2AX eine schlechte Löslichkeit mit der Bildung einer soliden und einer flüssigen Phase im RIPA-Puffer aufwies (siehe 4.1.4). Das Problem der Zweiphasenbildung bei der Verwendung von RIPA-Puffer zur Gewebelyse wurde 2015 auch detailliert durch Janes et al. beschrieben. Es wurden humane Darmkrebszellen (HT-29) in RIPA-Puffer lysiert und anschließend verschiedene Proteine sowohl im Pellet als auch im Überstand detektiert. Das Pellet wurde dabei erneut lysiert. Für das Histon-H3-Dimethyl-Lysin 4 (H3K4me<sub>2</sub>) gab es nahezu keinen Nachweis in der Immundetektion, wenn es in der löslichen Fraktion des RIPA-Puffers detektiert wurde. Im Pellet war der Nachweis für H3K4me<sub>2</sub> jedoch möglich. Die Caspase 8 war nur im Überstand und nicht im Pellet nachweisbar (Janes, 2015). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Histon H3K4me<sub>2</sub> eine schlechte Löslichkeit im RIPA-Puffer aufwies, wohingegen die Caspase 8 gut löslich war. In RIPA-Puffer lysierte Brusttumore zeigten eine um 60% niedrige Löslichkeit als vergleichbare Puffer, gemessen am durchschnittlichen Molekulargewicht der Proteine (Ngoka, 2008). Nach den Empfehlungen von Ngoka et al. und dem Vorgehen von Janes et al. wurde in weiteren Vorversuchen die solide Phase des RIPA-Puffers erneut lysiert (Ngoka, 2008, Janes, 2015). Im flüssigen Überstand war der Nachweis von  $\gamma$ H2AX nur geringfügig möglich, wohingegen im erneut lysiertem Pellet eine gute Darstellung von  $\gamma$ H2AX erzielt wurde. Diese Ergebnisse sprachen maßgeblich gegen die Verwendung des RIPA-Puffers, aufgrund der unzureichenden Löslichkeit von  $\gamma$ H2AX. Zudem wiesen Janes et al. darauf hin, dass das im RIPA-Puffer enthaltene Deoxycholat die Fähigkeit hat, zelluläre Enzyme zu inhibieren und somit die Aktivität der im Lysepuffer enthaltenen Phosphataseinhibitoren beeinträchtigen könnte. Da es sich bei dem hier untersuchten  $\gamma$ H2AX um ein phosphoryliertes Histon handelt, ist zu überlegen, ob das im RIPA-Puffer enthaltene Deoxycholat Einfluss auf die Stabilität und posttranslationale Modifikation des Proteins hatte und so weitere Signalstärke verloren ging. In Zusammenschau der Ergebnisse zur Verwendung von RIPA-Puffer zur Gewebelyse und Immundetektion ist anzunehmen, dass das Kernprotein  $\gamma$ H2AX einerseits in geringer Anzahl in den Proben vorlag, andererseits eine schlechte Löslichkeit in RIPA-Puffer aufwies und somit ein sehr geringer Anteil an  $\gamma$ H2AX im Überstand des RIPA-Puffer vorhanden war. Dieser geringe Anteil an  $\gamma$ H2AX war zudem über einen langen Zeitraum von sechs Monaten in RIPA-Puffer nicht stabil. Die bessere Darstellung von  $\gamma$ H2AX gelang im Einfach-Lysepuffer (siehe 4.1.4). Zudem war die Zweiphasenbildung

der Tumor-Lysate bei der Verwendung von Einfach-Lysepuffer zur Herstellung der Tumor-Lysate nur geringfügig und bei vereinzelt Proben erkennbar. Es schien sich bei den Pellets im Einfach-Lysepuffer eher um Zell-Detritus zu handeln. Die Löslichkeit für  $\gamma$ H2AX im Einfach-Lysepuffer und auch die Kompatibilität des Einfach-Lysepuffers mit dem Verfahren des Western Blots war gegeben, und ein geeignetes Puffersystem etabliert. Um bei der Verwendung von Einfach-Lysepuffer einem enzymatischen Abbau der Histone und Caspasen vorzubeugen, wurden alle weiteren Proben über Stickstoff bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ohne Lysepuffer gelagert, und die Zugabe von Einfach-Lysepuffer wurde zur Herstellung der Tumor-Lysate in den Folgetagen durchgeführt (siehe 3.3.2). Die Proben wurden zudem nicht weiter verdünnt, um möglichst wenig Einfluss auf die Stabilität der Proteine zu nehmen, und der Ladepuffer erst unmittelbar vor Auftrag in der SDS-PAGE hinzugegeben (siehe Tabelle 7).

### 5.2. Expression von $\gamma$ H2AX und CIC-9

Für den Zeitpunkt 4 h nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP/sterilem Aqua dest. zeigten sich in der vorliegenden Arbeit leicht höhere Werte in der relativen Expression von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 als für den Zeitpunkt 48 h nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP (siehe 4.2.4.1 und 4.2.5.1). Das Auftreten von DNA-Schäden und Apoptose schien demnach 4 h nach intravaskulärer Applikation stärker zu sein, als 48 h nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP bzw. sterilem Aqua dest.. Internalisierung von ZnO-NP und die Apoptose konnten bereits nach 4 h *in vitro* nachgewiesen werden und sprechen prinzipiell für die Wirkung von ZnO-NP nach einem kurzen Zeitraum (Wiesmann et al., 2019). Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe in der Expression von  $\gamma$ H2AX oder CIC-9. Das bedeutet, dass die beobachteten DNA-Schäden und die Einleitung der Apoptose nicht auf die applizierte Gabe von ZnO-NP zurückgeführt werden konnten. Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse zum Nachweis von  $\gamma$ H2AX nach ZnO-NP-Applikation (siehe 5.2.1) und zum Nachweis von Caspasen sowie von *Cleaved* Caspasen nach ZnO-NP Applikation (siehe 5.2.3) getrennt voneinander eingeordnet werden. Es gilt weiterhin zu diskutieren, welche Einflussgrößen im CAM-Assay diese Ergebnisse bedingt haben könnten, dies soll in Abschnitt 5.2.4 erfolgen.

#### 5.2.1. Nachweis von $\gamma$ H2AX nach ZnO-NP Applikation

In der Literatur konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der gewählte Untersuchungszeitpunkt nach Behandlung mit ZnO-NP eine entscheidende Rolle für den Nachweis von  $\gamma$ H2AX spielt. Bei mikroskopischer Detektion von  $\gamma$ H2AX nach ZnO-NP Applikation *in vitro* zeigten sich DNA-Schäden innerhalb von 15 min nach Behandlung (Heim et al., 2015). In anderen Untersuchungen mittels Immundetektion hingegen war das  $\gamma$ H2AX nach ZnO-NP Applikation in einem Zeitraum zwischen 12 h und 24 h gut und nach 48 h nach Behandlung nicht mehr

nachweisbar (Bai et al., 2017, Zhang et al., 2020, Cholujova et al., 2022). Es gilt zu überlegen, ob der richtige Zeitpunkt nach intravaskulärer Injektion in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde. Der kurze Zeitpunkt von 4 h könnte das Auftreten von  $\gamma$ H2AX nicht richtig abgebildet haben, da *in vitro* die Intensität der  $\gamma$ H2AX Bande bei Arakha et al. bis zu 24 h nach ZnO-NP Applikation stieg und nach 4 h eventuell noch keine ausreichenden DNA-Schäden im eingewachsenen Tumor eingetreten waren (Arakha et al., 2017). Es ist zudem nicht bekannt, wie schnell sich die ZnO-NP im CAM-Assay verteilen und wann sie auf zellulärer Ebene des Tumors wirken konnten. Die Verteilung der ZnO-NP im CAM- und Tumorgewebe könnte zu einer verzögerten Induktion von DNA-Schäden geführt haben, sodass 4 h nach ZnO-NP noch kein ausreichender Nachweis von  $\gamma$ H2AX möglich war. Buhr et al. zeigten anhand fluoreszierender Marker, dass das Zirkulieren der ZnO-NP im Blutstrom 24 h nach intravaskulärer Applikation im CAM-Assay abnahm (Buhr et al., 2021). Der lange Zeitpunkt von 48 h könnte wiederum zu spät gewählt worden sein, sodass  $\gamma$ H2AX nicht mehr darstellbar war. Die DNA-Reparaturmechanismen wären bei diesem Zeitpunkt eventuell schon abgeschlossen, und Histone würden nicht mehr phosphoryliert vorliegen. Ein signifikanter Anstieg von  $\gamma$ H2AX könnte im Zeitraum zwischen 4 h und 48 h nach intravaskulärer Applikation zu finden sein. Diese Annahme würde sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit decken.

### 5.2.2. Nachweis von $\gamma$ H2AX-ub1

Die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX zeigt sowohl die durch chemische Substanzen, mechanische Einflüsse oder ionisierende Strahlung induzierten DSB als auch die DSB, welche im Rahmen der Apoptose entstehen. Um die nicht-apoptotischen DSB zu identifizieren, bedarf es einer genaueren Betrachtung der Ubiquitinierung von  $\gamma$ H2AX. Das zusätzliche  $\gamma$ H2AX-Signal, welches in dieser Arbeit in allen Proben bei ca. 28 kDA darstellbar war, ist vermutlich die monoubiquinierte Form des  $\gamma$ H2AX (siehe Abbildung 21). Die Ligase RNF-168 ubiquitiniert Lys13/Lys15 in  $\gamma$ H2AX (Mattioli et al., 2012) und wird im Verlauf der Apoptose jedoch proteolytisch abgebaut, und die Ubiquitinierung von  $\gamma$ H2AX wird beendet. Das gleichzeitige Auftreten von  $\gamma$ H2AX und  $\gamma$ H2AX-ub1 stellt folglich einen Hinweis auf Apoptose-unabhängige DNA-Schäden dar. In der vorliegenden Arbeit wurde in der  $\gamma$ H2AX Immundetektion immer auch  $\gamma$ H2AX-ub1 nachgewiesen, dies ist folglich ein Hinweis darauf, dass Apoptose-unabhängige DNA-Schäden detektiert wurden.

### 5.2.3. Caspasen und *Cleaved* Caspasen nach ZnO-NP

Auch für den Nachweis von CIC-9 in dieser Arbeit gilt es, die gewählten Zeitpunkte der Messung von 4 h und 48 h nach intravaskulärer Applikation zu hinterfragen. Die beiden Zeitpunkte könnten das Vorhandensein von CIC-9 in dieser Arbeit nicht richtig abgebildet

haben, wenn der Zeitraum, in dem die CIC-9 hätte nachgewiesen werden können, eventuell dazwischen gelegen hat.

Die Aktivierung der Caspase-Signalwege ist stark tumorzelllinienabhängig, wie Kim et al. anhand sehr unterschiedlicher Ausprägung in verschiedenen Tumorzellen bei gleicher Behandlung zeigten (Kim et al., 2019). Die in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Positivkontrolle zeigte 4 h nach der Behandlung mit 30 µg/ml ZnO-NP eine gute Darstellung von CIC-9 in der Immundetektion (siehe 3.5). Der entsprechende Signalweg in Huh-7 Zellen kann demnach sicher durch die verwendeten Nanopartikel aktiviert werden. Es bleibt jedoch unklar, in welchem Zeitraum die Nanopartikel den Tumor *in ovo* erreichten.

In *in vitro* Versuchen zur Apoptoseinduktion durch ZnO-NP wurde die Caspase-9 bereits mehrfach verwendet, jedoch wurde dabei keine differenzierte Unterscheidung zwischen der inaktiven Pro-Caspase-9 und der aktivierten CIC-9 getroffen (Bai et al., 2017, Li et al., 2020). Anhand der Zunahme von CIC-9 gegenüber der Pro-Caspase-9 konnte *in vitro* 48 h nach Behandlung mit ZnO-NP eine Aktivierung des Caspase-Signalweg gezeigt werden. Jedoch waren die ZnO-NP stark modifiziert, was einen Vergleich erschwerte (Cholujova et al., 2022). Die gezielte Darstellung von CIC-9 ohne die Darstellung der Pro-Caspase-9 war anhand schlechter Signalstärke und viel Hintergrund vergleichbar zu den Ergebnissen dieser Arbeit (Kim et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Literatur wenig vergleichbare Daten zur selektiven Expression der CIC-9 nach ZnO-NP Applikation liefert, und somit nicht abschließend beurteilt werden kann, ob ungeeignete Messzeitpunkte gewählt wurden, keine Apoptoseinduktion in den Tumoren stattgefunden hat oder ob die Detektion von CIC-9 *in ovo* generell als Apoptosemarker ungeeignet ist. Um apoptotische Effekte von ZnO-NP in der Immundetektion nachzuweisen, könnten Bax und Bcl-2 Proteine als Alternative dienen (Du et al., 2019, George et al., 2022).

### **5.2.4. Einflussgrößen im CAM-Assay**

In Vorarbeiten der AG Brieger erfolgten Versuche zur Verwendung von ZnO-NP im CAM-Assay, in denen mittels unterschiedlicher Konzentrationen von ZnO-NP und ZnCl u.a. die mittlere letale Dosis (LD<sub>50</sub>) beider bestimmt wurde. Dabei zeigte sich eine höhere LD<sub>50</sub> und niedrigere Toxizität der ZnO-NP gegenüber ZnCl, welche der verzögerten Bioverfügbarkeit der Nanopartikel zugeordnet wurde (Buhr et al., 2021). Die Verwendung von ZnO-NP im CAM-Assay schien demnach möglich und in Zusammenschau der *in vitro* Versuche vielversprechend (Heim et al., 2015, Wiesmann et al., 2019). Die intravaskuläre Gabe von ZnO-NP erfolgte in dieser Arbeit anhand der Vorarbeiten von Buhr et al. indem eine Konzentration gewählt wurde, die keine zu hohe systemische Toxizität auslöste. Eine

## Diskussion

Apoptosen- und DNA-Schäden auslösende Anreicherung von ZnO-NP im Tumorgewebe schien anhand der Ergebnisse (siehe 4.2) nicht gegeben zu sein. Mögliche Ursachen dafür könnte das Fehlen einer hinreichend großen Anreicherung von ZnO-NP im Tumor sein, beispielsweise ausgelöst durch Ablagerungen von ZnO-NP in den Organen des Hühnerembryos (Buhr et al., 2021). Die Konzentration von zirkulierenden ZnO-NP im CAM-Assay wäre demnach deutlich reduziert und könnte die fehlenden Effekte in den eingewachsenen Tumoren erklären. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die intravaskuläre Gabe von ZnO-NP als auch von NaCl in den Nieren des Hühnerembryos zu einem Nachweis von Apoptosen führte (Buhr et al., 2021). Es ist daher zu überlegen, ob bereits die Manipulation an den Gefäßen zu DNA-Schäden und Einleitung der Apoptose in den eingewachsenen Tumoren geführt haben könnte, zumal die räumlichen Verhältnisse auf der CAM sehr eng sind und die Injektionsstelle nicht immer weit entfernt vom Tumor gewählt werden konnte. Der erfolgte Nachweis von DNA-Schäden und Apoptosen in der Immundetektion wären dann als Grundlevel der Reaktion des jeweiligen Proteins auf einen zugefügten vaskulären Schaden durch die Injektion der Substanzen einzuordnen und nicht als Nachweis einer durch ZnO-NP erreichten Toxizität.

## 6 Fazit

Die vermutete toxische Wirkung von ZnO-NP in den entnommenen Tumoren des CAM-Assays war in dieser Arbeit zu den Zeitpunkten 4 h und 48 h nach intravaskulärer Applikation anhand von  $\gamma$ H2AX und CIC-9 nicht nachweisbar. Ursächlich dafür könnten neben dem tatsächlichen Fehlen eines toxischen Effekts die Wahl nicht geeigneter Marker, ungeeignete Entnahmepunkte oder eine unzureichende Anreicherung von ZnO-NP in den Tumoren gewesen sein. Letztere könnten durch Ablagerungen von ZnO-NP in den Organen des Hühnerembryos, eine zu geringe Dosis von ZnO-NP und/oder eine verminderte Tumordurchblutung hervorgerufen worden sein.

## 7 Ausblick

In weiteren Versuchen zur Untersuchung der Wirkung von ZnO-NP auf Tumore im CAM-Assay sollte eine Messung der Zink-Konzentration im Tumor und in unterschiedlichen Geweben des Hühnerembryos Aufschluss darüber liefern, in welchen Zeiträumen sich die Nanopartikel in welchen Geweben anreichern. In dieser Arbeit wurden parallel zu den Tumorentnahmen auch Entnahmen von CAM-Gewebe und Organentnahmen durchgeführt (siehe 3.2.7 und 3.2.8). In Anschlussversuchen könnten die Zink-Konzentrationen in dem entnommenen CAM-Gewebe und den Organen gemessen werden, um Ablagerungen von ZnO-NP zu detektieren, welche möglicherweise die Anreicherung von ZnO-NP im Tumor verringerten. Mit einer Messung der Zink-Konzentrationen in Leber und Nieren der Hühnerembryonen wären zudem Aussagen über die Verstoffwechslung von ZnO-NP in einem komplexen Organismus möglich. Die ultrasonographische Analyse makroskopisch vital erscheinender Tumore nach Eckrich et al. könnte zudem ermöglichen, den variierenden Tumoreinwuchs und die Tumordurchblutung *in ovo* besser zu beurteilen und zu kontrollieren (Eckrich et al., 2020). Ein partieller Einwuchs des Tumors, die vertikale Tumortiefe und die vorhandene Tumordurchblutung könnten so vor Applikation der ZnO-NP standardisiert erfasst werden. Ziel der weiteren Untersuchungen muss es sein, den Verbleib applizierter ZnO-NP im Organismus zu verstehen, um die Bedingungen für eine gezielte Anreicherung im Tumor zu definieren.

## 8 Literaturverzeichnis

### Schriften

- ABASS, M. A., SELIM, S. A., SELIM, A. O., EL-SHAL, A. S. & GOUDA, Z. A. 2017. Effect of orally administered zinc oxide nanoparticles on albino rat thymus and spleen. *IUBMB Life*, 69, 528-539.
- AKHTAR, M. J., AHAMED, M., KUMAR, S., KHAN, M. M., AHMAD, J. & ALROKAYAN, S. A. 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine*, 7, 845-57.
- ANCONA, A., DUMONTEL, B., GARINO, N., DEMARCO, B., CHATZITHEODORIDOU, D., FAZZINI, W., ENGELKE, H. & CAUDA, V. 2018. Lipid-Coated Zinc Oxide Nanoparticles as Innovative ROS-Generators for Photodynamic Therapy in Cancer Cells. *Nanomaterials (Basel)*, 8.
- 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.
- ARAKHA, M., ROY, J., NAYAK, P. S., MALLICK, B. & JHA, S. 2017. Zinc oxide nanoparticle energy band gap reduction triggers the oxidative stress resulting into autophagy-mediated apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med*, 110, 42-53.
- ARNETH, B. 2020. Tumor Microenvironment. *Medicina*, 56, 15.
- ASRAFUZZAMAN, M., RAHMAN, M. M., MANDAL, M., MARJUQUE, M., BHOWMIK, A., ROKEYA, B., HASSAN, Z. & FARUQUE, M. O. 2018. Oyster mushroom functions as an anti-hyperglycaemic through phosphorylation of AMPK and increased expression of GLUT4 in type 2 diabetic model rats. *J Taibah Univ Med Sci*, 13, 465-471.
- 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.
- BAKY, N. A., FADDAH, L. M., AL-RASHEED, N. M., AL-RASHEED, N. M. & FATANI, A. J. 2013. Induction of inflammation, DNA damage and apoptosis in rat heart after oral exposure to zinc oxide nanoparticles and the cardioprotective role of  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin E. *Drug Res (Stuttg)*, 63, 228-36.
- BISHT, G. & RAYAMAJHI, S. 2016. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine (Rij)*, 3, 9.
- 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.
- BUHR, C. R., WIESMANN, N., TANNER, R. C., BRIEGER, J. & ECKRICH, J. 2020. The Chorioallantoic Membrane Assay in Nanotoxicological Research-An Alternative for In Vivo Experimentation. *Nanomaterials (Basel)*, 10.
- CHOLUJOVA, D., KOKLESOVA, L., LUKACOVA BUJNAKOVA, Z., DUTKOVA, E., VALUSKOVA, Z., BEBLAVA, P., MATISOVA, A., SEDLAK, J. & JAKUBIKOVA, J. 2022. In vitro and ex vivo anti-myeloma effects of nanocomposite As(4)S(4)/ZnS/Fe(3)O(4). *Sci Rep*, 12, 17961.
- CHOUDHURY, S. R., ORDAZ, J., LO, C. L., DAMAYANTI, N. P., ZHOU, F. & IRUDAYARAJ, J. 2017. From the Cover: Zinc oxide Nanoparticles-Induced Reactive Oxygen Species Promotes Multimodal Cyto- and Epigenetic Toxicity. *Toxicol Sci*, 156, 261-274.
- CLOGSTON, J. D. P., A.K. 2011. *Zeta Potential Measurement in Characterization of nanoparticles intended for drug delivery von Mc. Neil, Scott E. Kapitel 4 Seite 57-64.*, Springer.
- 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.

- DENG, X., LUAN, Q., CHEN, W., WANG, Y., WU, M., ZHANG, H. & JIAO, Z. 2009. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology*, 20, 115101.
- DU, Y., ZHANG, J., YAN, S., TAO, Z., WANG, C., HUANG, M. & ZHANG, X. 2019. PEGylated zinc oxide nanoparticles induce apoptosis in pancreatic cancer cells through reactive oxygen species. *IET Nanobiotechnology*, 13, 536-540.
- ECKRICH, J., KUGLER, P., BUHR, C. R., ERNST, B. P., MENGLER, 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.
- FANYAO, Q. & MORAIS, P. C. 2001. The pH dependence of the surface charge density in oxide-based semiconductor nanoparticles immersed in aqueous solution. *IEEE Transactions on Magnetics*, 37, 2654-2656.
- FUJIHARA, J., TONGU, M., HASHIMOTO, H., FUJITA, Y., NISHIMOTO, N., YASUDA, T. & TAKESHITA, H. 2015. Pro-inflammatory responses and oxidative stress induced by ZnO nanoparticles in vivo following intravenous injection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19, 4920-6.
- 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.
- GARCÍA-HEVIA, L., VALIENTE, R., MARTÍN-RODRÍGUEZ, R., RENERO-LECUNA, C., GONZÁLEZ, J., RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, L., AGUADO, F., VILLEGAS, J. C. & FANARRAGA, M. L. 2016. Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling, triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis. *Nanoscale*, 8, 10963-73.
- GEORGE, B. P., RAJENDRAN, N. K., HOURELD, N. N. & ABRAHAMSE, H. 2022. Rubus Capped Zinc Oxide Nanoparticles Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Molecules*, 27.
- HAN, Z., YAN, Q., GE, W., LIU, Z. G., GURUNATHAN, S., DE FELICI, M., SHEN, W. & ZHANG, X. F. 2016. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *Int J Nanomedicine*, 11, 5187-5203.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANLEY, C., LAYNE, J., PUNNOOSE, A., REDDY, K. M., COOMBS, I., COOMBS, A., FERIS, K. & WINGETT, D. 2008. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*, 19, 295103.
- HAQUE, S., NORBERT, C. C., ACHARYYA, R., MUKHERJEE, S., KATHIRVEL, M. & PATRA, C. R. 2021. Biosynthesized Silver Nanoparticles for Cancer Therapy and In Vivo Bioimaging. *Cancers (Basel)*, 13.
- 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.
- HU, C. & DU, W. 2020. Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) combined with cisplatin and gemcitabine inhibits tumor activity of NSCLC cells. *Aging (Albany NY)*, 12, 25767-25777.
- JANES, K. A. 2015. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Sci Signal*, 8, rs2.
- JANKOVIĆ, B. D., ISAKOVIĆ, K., LUKIĆ, M. L., VUJANOVIĆ, N. L., PETROVIĆ, S. & MARKOVIĆ, 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.
- 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, C. S., NGUYEN, H. D., IGNACIO, R. M., KIM, J. H., CHO, H. C., MAENG, E. H., KIM, Y. R., KIM, M. K., PARK, B. K. & KIM, S. K. 2014. Immunotoxicity of zinc oxide

- nanoparticles with different size and electrostatic charge. *Int J Nanomedicine*, 9 Suppl 2, 195-205.
- KIM, Y. J., PERUMALSAMY, H., CASTRO-ACEITUNO, V., KIM, D., MARKUS, J., LEE, S., KIM, S., LIU, Y. & YANG, D. C. 2019. Photoluminescent And Self-Assembled Hyaluronic Acid-Zinc Oxide-Ginsenoside Rh2 Nanoparticles And Their Potential Caspase-9 Apoptotic Mechanism Towards Cancer Cell Lines. *Int J Nanomedicine*, 14, 8195-8208.
- KLOUBERT, V. & RINK, L. 2015. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct*, 6, 3195-204.
- KRÓL, A., POMASTOWSKI, P., RAFIŃSKA, K., RAILEAN-PLUGARU, V. & BUSZEWSKI, B. 2017. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv Colloid Interface Sci*, 249, 37-52.
- 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.
- LI, Z., GUO, D., YIN, X., DING, S., SHEN, M., ZHANG, R., WANG, Y. & XU, R. 2020. Zinc oxide nanoparticles induce human multiple myeloma cell death via reactive oxygen species and Cyt-C/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 signaling pathway in vitro. *Biomed Pharmacother*, 122, 109712.
- LIAO, C., JIN, Y., LI, Y. & TJONG, S. C. 2020. Interactions of Zinc Oxide Nanostructures with Mammalian Cells: Cytotoxicity and Photocatalytic Toxicity. *Int J Mol Sci*, 21.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.
- MAEDA, H., WU, J., SAWA, T., MATSUMURA, Y. & HORI, K. 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, 65, 271-84.
- 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.
- MARKMAN, J. L., REKECHENETSKIY, A., HOLLER, E. & LJUBIMOVA, J. Y. 2013. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 1866-79.
- MATTIROLI, F., VISSERS, J. H., VAN DIJK, W. J., IKPA, P., CITTERIO, E., VERMEULEN, W., MARTEIJN, J. A. & SIXMA, T. K. 2012. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell*, 150, 1182-95.
- MERLOS RODRIGO, M. A., CASAR, B., MICHALKOVA, H., JIMENEZ JIMENEZ, A. M., HEGER, Z. & ADAM, V. 2021. Extending the Applicability of In Ovo and Ex Ovo Chicken Chorioallantoic Membrane Assays to Study Cytostatic Activity in Neuroblastoma Cells. *Front Oncol*, 11, 707366.
- MITREVSKA, K., MERLOS RODRIGO, M. A., CERNEI, N., MICHALKOVA, H., SPLICHAL, Z., HYNEK, D., ZITKA, O., HEGER, Z., KOPEL, P., ADAM, V. & MILOSAVLJEVIC, V. 2023. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay for the evaluation of the antitumor and antimetastatic activity of platinum-based drugs in association with the impact on the amino acid metabolism. *Mater Today Bio*, 19, 100570.
- MOHAMMAD, G., TABRIZI, M. H., ARDALAN, T., YADAMANI, S. & SAFAVI, E. 2019. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and evaluation of anti-angiogenesis, anti-inflammatory and cytotoxicity properties. *J Biosci*, 44.
- MORRIS, D. L., JR. 2014. DNA-bound metal ions: recent developments. *Biomol Concepts*, 5, 397-407.
- MU, Q., WANG, H. & ZHANG, M. 2017. Nanoparticles for imaging and treatment of metastatic breast cancer. *Expert Opin Drug Deliv*, 14, 123-136.
- 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.
- NEJDL, L., RUTTKAY-NEDECKY, B., KUDR, J., KRIZKOVA, S., SMERKOVA, K., DOSTALOVA, S., VACULOVICOVA, M., KOPEL, P., ZEHNALÉK, J., TRNKOVA, L., BABULA, P., ADAM, V. & KIZEK, R. 2014. DNA interaction with zinc(II) ions. *Int J Biol Macromol*, 64, 281-7.
- NEL, A., XIA, T., MÄDLER, L. & LI, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-7.
- NGOKA, L. C. 2008. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci*, 6, 30.
- PATI, R., DAS, I., MEHTA, R. K., SAHU, R. & SONAWANE, A. 2016. Zinc-Oxide Nanoparticles Exhibit Genotoxic, Clastogenic, Cytotoxic and Actin Depolymerization Effects by Inducing Oxidative Stress Responses in Macrophages and Adult Mice. *Toxicol Sci*, 150, 454-72.
- 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 Opin Drug Deliv*, 7, 1063-77.
- RASSOW, K. H., ROLAND NETZKER, RAINER DEUTZMANN 2012. *Duale Reihe Biochemie 3. Auflage p. 507-510.*
- REHM, H. & LETZEL, T. 2010. Das tägliche Brot. In: REHM, H. & LETZEL, T. (eds.) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- RIBATTI, D. 2014. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Experimental Cell Research*, 328, 314-324.
- 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.
- ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S. & BONNER, W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858-68.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. The principles of humane experimental technique. London: Methuen London.
- SAALLAH, S. & LENGGORO, I. W. 2018. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder and Particle Journal*, 35, 89-111.
- SANAEIMEHR, Z., JAVADI, I. & NAMVAR, F. 2018. Antiangiogenic and antiapoptotic effects of green-synthesized zinc oxide nanoparticles using Sargassum muticum algae extraction. *Cancer Nanotechnol*, 9, 3.
- SATTAR ALI, Z. 2022. Hepatic Impact of Different Concentrations of Hibiscus rosa Zinc Oxide Nanoparticles on Rats. *Arch Razi Inst*, 77, 1199-1206.
- SAYED, H. M., SAID, M. M., MORCOS, N. Y. S., EL GAWISH, M. A. & ISMAIL, A. F. M. 2021. Antitumor and Radiosensitizing Effects of Zinc Oxide-Caffeic Acid Nanoparticles against Solid Ehrlich Carcinoma in Female Mice. *Integr Cancer Ther*, 20, 15347354211021920.
- SCULLY, R. & XIE, A. 2013. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res*, 750, 5-14.
- SHARMA, H., MISHRA, P. K., TALEGAONKAR, S. & VAIDYA, B. 2015. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov Today*, 20, 1143-51.

- SHARMA, V., ANDERSON, D. & DHAWAN, A. 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17, 852-70.
- SHAWKI, M. M., EL SADIEQUE, A., ELABD, S. & MOUSTAFA, M. E. 2022. Synergetic Effect of Tumor Treating Fields and Zinc Oxide Nanoparticles on Cell Apoptosis and Genotoxicity of Three Different Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, 27.
- SIVAKUMAR, P., LEE, M., KIM, Y. S. & SHIM, M. S. 2018. Photo-triggered antibacterial and anticancer activities of zinc oxide nanoparticles. *J Mater Chem B*, 6, 4852-4871.
- THOMAS, S., GUNASANGKARAN, G., ARUMUGAM, V. A. & MUTHUKRISHNAN, S. 2022. Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles of Solanum nigrum and Its Anticancer Activity via the Induction of Apoptosis in Cervical Cancer. *Biol Trace Elem Res*, 200, 2684-2697.
- URBAŃSKA, K., PAJAŁ, B., ORZECZOWSKI, A., SOKOŁOWSKA, J., GRODZIK, M., SAWOSZ, E., SZMIDT, M. & SYSA, P. 2015. The effect of silver nanoparticles (AgNPs) on proliferation and apoptosis of in ovo cultured glioblastoma multiforme (GBM) cells. *Nanoscale Res Lett*, 10, 98.
- VIGHETTO, V., ANCONA, A., RACCA, L., LIMONGI, T., TROIA, A., CANAVESE, G. & CAUDA, V. 2019. The Synergistic Effect of Nanocrystals Combined With Ultrasound in the Generation of Reactive Oxygen Species for Biomedical Applications. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 374.
- VU, B. T., SHAHIN, S. A., CROISSANT, J., FATIEIEV, Y., MATSUMOTO, K., LE-HOANG DOAN, T., YIK, T., SIMARGI, S., CONTERAS, A., RATLIFF, L., JIMENEZ, C. M., RAEHM, L., KHASHAB, N., DURAND, J. O., GLACKIN, C. & TAMANOI, F. 2018. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Sci Rep*, 8, 8524.
- WANG, Q., ZHUANG, D., FENG, W., MA, B., QIN, L. & JIN, L. 2020. Fraxetin inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis, inflammation, and matrix degradation in chondrocytes and protects rat cartilage in vivo. *Saudi Pharm J*, 28, 1499-1506.
- WESTHEIDE, W. & RIEGER, G. 2015. IV SARCOPTERYGII, Fleischflosser. In: WESTHEIDE, W. & RIEGER, G. (eds.) *Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- WIESMANN, N. 2019. Analysis of the toxicity mechanism of zinc oxide nanoparticles aiming at their application as innovative anti-tumor agent.
- WIESMANN, N., GIERINGER, R., VIEL, M., ECKRICH, J., TREMEL, W. & BRIEGER, J. 2021. Zinc Oxide Nanoparticles Can Intervene in Radiation-Induced Senescence and Eradicate Residual Tumor Cells. *Cancers (Basel)*, 13.
- 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. *J Trace Elem Med Biol*, 51, 226-234.
- WIESMANN, N., TREMEL, W. & BRIEGER, J. 2020. Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. *J Mater Chem B*, 8, 4973-4989.
- YANG, N., QIU, F., ZHU, F. & QI, L. 2020. Therapeutic Potential of Zinc Oxide-Loaded Syringic Acid Against in vitro and in vivo Model of Lung Cancer. *Int J Nanomedicine*, 15, 8249-8260.
- 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.
- YANG, X., SHAO, H., LIU, W., GU, W., SHU, X., MO, Y., CHEN, X., ZHANG, Q. & JIANG, M. 2015. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett*, 234, 40-9.
- ZHAI, Q. Y., GE, W., WANG, J. J., SUN, X. F., MA, J. M., LIU, J. C., ZHAO, Y., FENG, Y. Z., DYCE, P. W., DE FELICI, M. & SHEN, W. 2018. Exposure to Zinc oxide nanoparticles during pregnancy induces oocyte DNA damage and affects ovarian reserve of mouse offspring. *Aging (Albany NY)*, 10, 2170-2189.

- ZHANG, T., DU, E., LIU, Y., CHENG, J., ZHANG, Z., XU, Y., QI, S. & CHEN, Y. 2020. Anticancer Effects of Zinc Oxide Nanoparticles Through Altering the Methylation Status of Histone on Bladder Cancer Cells. *Int J Nanomedicine*, 15, 1457-1468.
- ZHAO, Y., LI, L., ZHANG, P. F., SHEN, W., LIU, J., YANG, F. F., LIU, H. B. & HAO, Z. H. 2015. Differential Regulation of Gene and Protein Expression by Zinc Oxide Nanoparticles in Hen's Ovarian Granulosa Cells: Specific Roles of Nanoparticles. *PLoS One*, 10, e0140499.

### Internetquellen

- BFJ 1972. *Bundesamt für Justiz, Tierschutzgesetz § 4 und 7 [Internet]. Letzte Aktualisierung 20.12.2022. Zitiert am 10.03.2023. URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>.*
- BFR 2022. *Bundesinstitut für Risikobewertung, Zahlen zu den in 2021 in Deutschland verwendeten Versuchstieren [Internet]. Letzte Aktualisierung 21.12.2022. Zitiert am 10.03.2023. URL: [https://www.bf3r.de/de/verwendung\\_von\\_versuchstieren\\_im\\_jahr\\_2021-309160.html](https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2021-309160.html).*
- DESTATIS 2022. *Statistisches Bundesamt, Todesursachen nach Krankheitsarten 2021 [Internet] Letzte Aktualisierung 13.03.2023. Zitiert am: 13.03.2023. URL: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002#abreadcrumb>.*
- IOLITEC 2016. *IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH, Technical Data Sheet NO-0011-HP [Internet] Letzte Aktualisierung 23.03.2016. Zitiert am: 05.05.2023. URL: <https://nanomaterials.iolitec.de/sites/nanomaterials.iolitec.de/files/2019-08/TDS%20NO-0011-HP%20ZnO.pdf>.*
- WCRF 2020. *World Cancer Research Fund International, Global cancer statistics for the most common cancers in the world [Internet] Letzte Aktualisierung 23.03.2022. Zitiert am 20.03.2023. URL: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>.*
- WHO 2023. *Cancer [Internet]. Zitiert am 06.06.2023. URL: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_3](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_3).*

## 9 Anhang

### 9.1. Probenentnahmen

Entnahme von 56 Proben zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach intravaskulärer Applikation von ZnO-NP oder sterilem Aqua dest. (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15: Probenentnahme Durchgang 6-8**

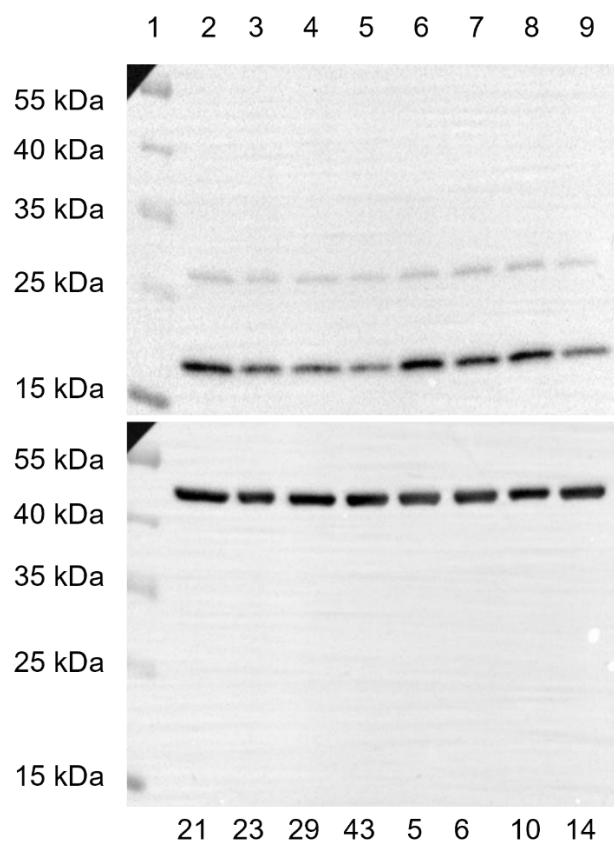
	Durchgang 6	Durchgang 7	Durchgang 8
Probe	Probennummer	Probennummer	Probennummer
4 h ZnO-NP	19	91	118
4 h ZnO-NP	21	96	119
4 h ZnO-NP	22	100	163
4 h ZnO-NP	23	53 (CAM)	171
4 h ZnO-NP	24	71	176
4 h ZnO-NP	25	x	x
48 h ZnO-NP	29	101	199
48 h ZnO-NP	34	114	203
48 h ZnO-NP	35	98	204
48 h ZnO-NP	36	41	205
4 h Aqua dest.	2	42	135
4 h Aqua dest.	3	47	140
4 h Aqua dest.	5	79	150
4 h Aqua dest.	6	81	153 (CAM)
4 h Aqua dest.	7	51	158
4 h Aqua dest.	8	x	164
48 h Aqua dest.	10	76	172 (CAM)
48 h Aqua dest.	14	90	188
48 h Aqua dest.	16	92	135
48 h Aqua dest.	17	x	140
	n = 20	n = 17	n = 19

## 9.2. Immundetektion

Mittels *wet blot* wurden 14 Membranen zur Immundetektion erzeugt. Das zuerst detektierte Protein war entweder  $\gamma$ H2AX oder CIC-9, da für diesen Nachweis separate Gele mit den gleichen Proben beladen wurden. Das korrespondierende  $\beta$ -Aktin wurde als zweites Protein auf derselben Membran detektiert. Die Membranen 1-7 zeigen die Immundetektionen von  $\gamma$ H2AX und korrespondierendem  $\beta$  Aktin (siehe 9.2.1). Die Membranen 8-14 zeigen die Immundetektionen von CIC-9 und korrespondierendem  $\beta$  Aktin (siehe 9.2.2).

### 9.2.1. Membranen 1-7 der Immundetektion von $\gamma$ H2AX und $\beta$ Aktin

#### Membran 1

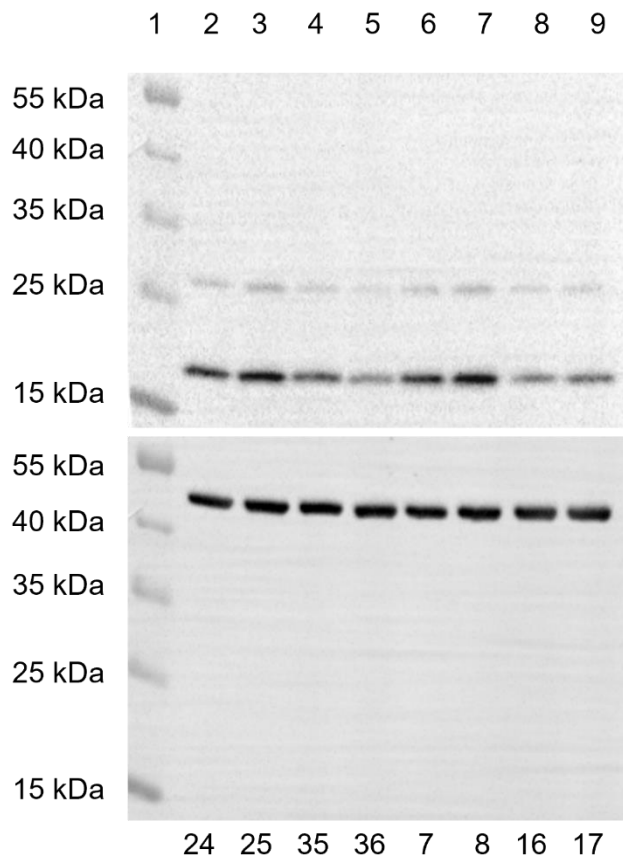


**Abbildung 25: Membran 1**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 29,2 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 6 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 2

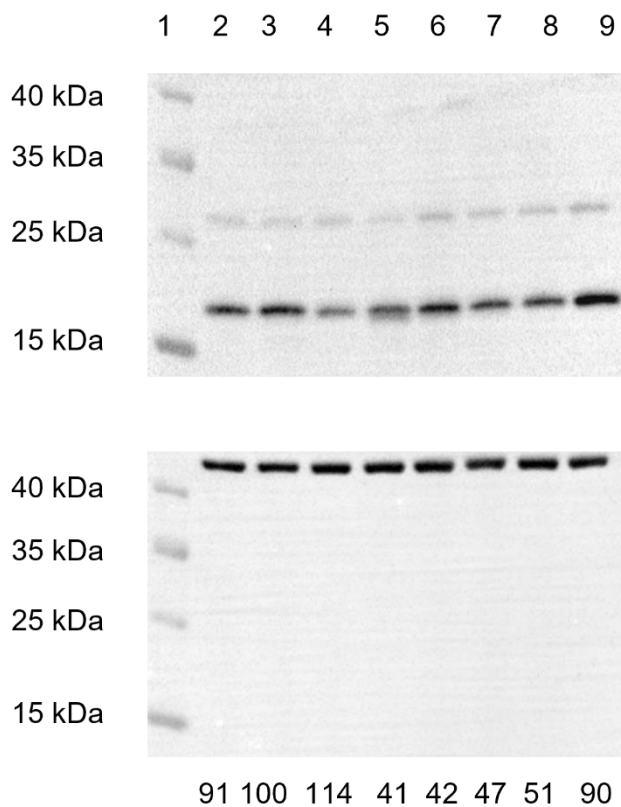


**Abbildung 26: Membran 2**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 17,1 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 6 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 3

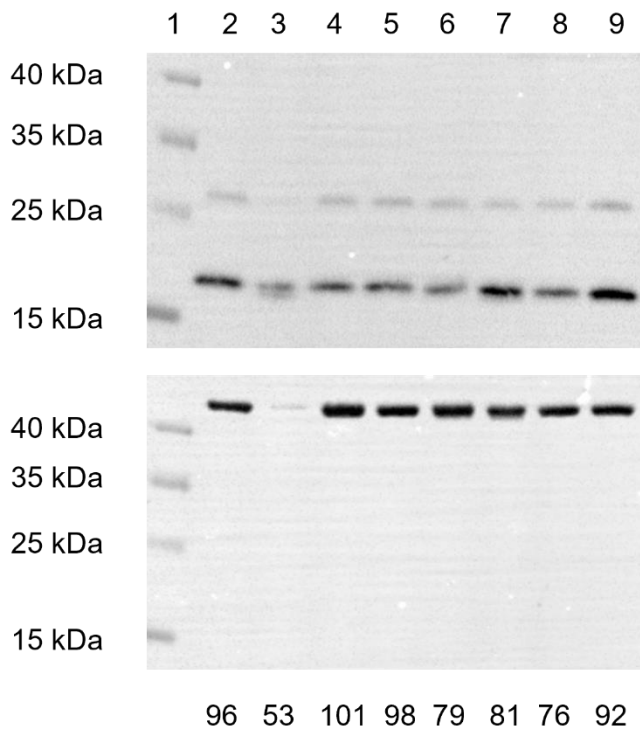


**Abbildung 27: Membran 3**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 29,2 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 7 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 4

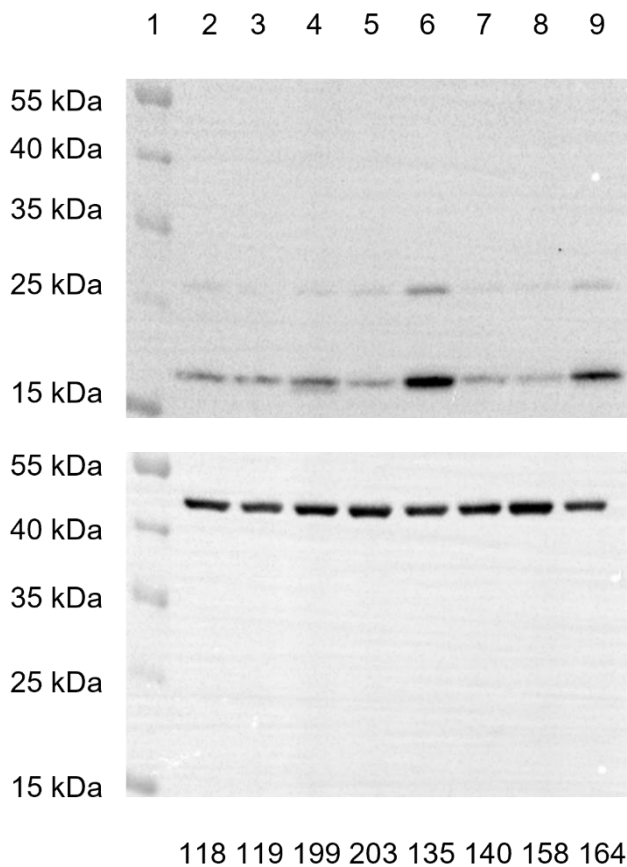


**Abbildung 28: Membran 4**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 29,2 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 7 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 5

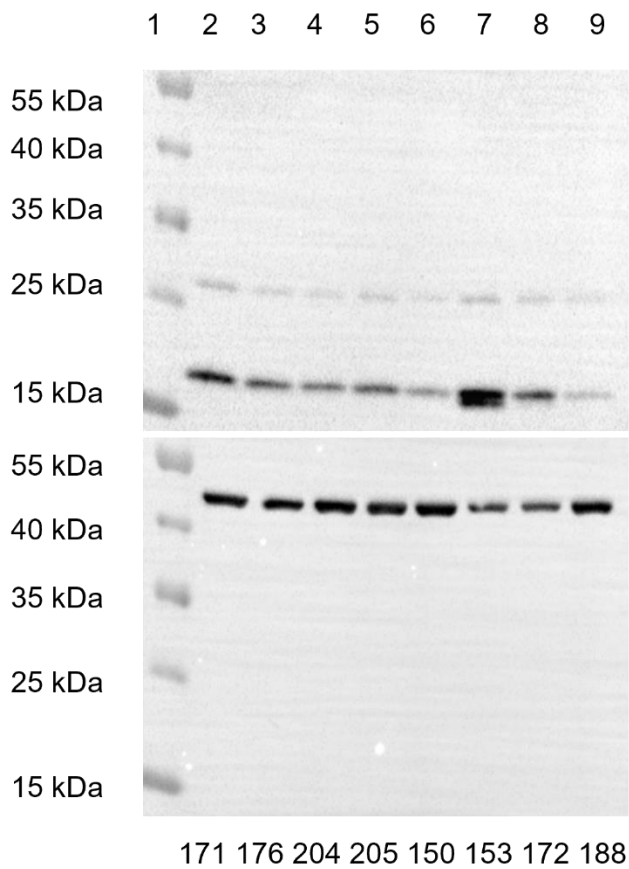


#### **Abbildung 29: Membran 5**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 17,1 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 8 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 6

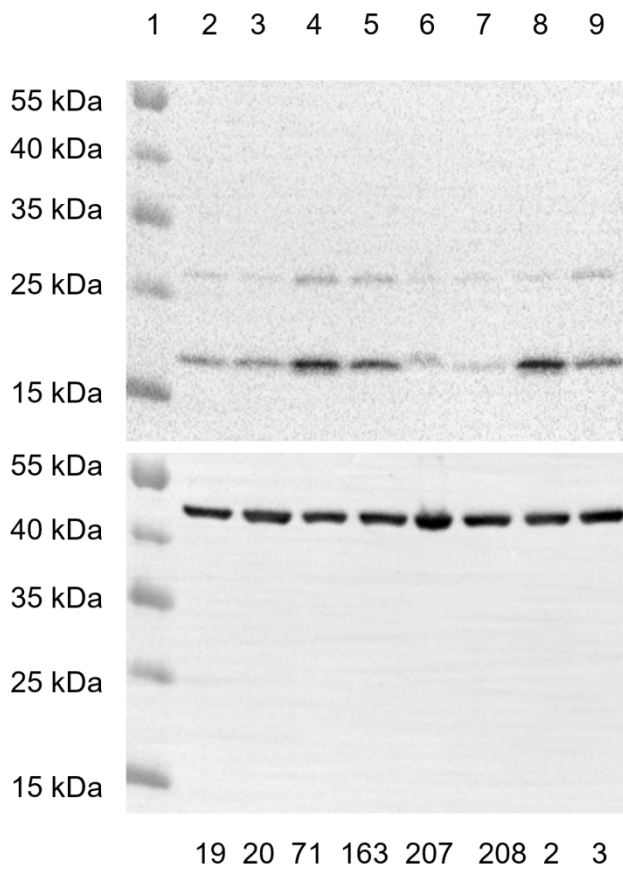


#### **Abbildung 30: Membran 6**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 17,1 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 8 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 7

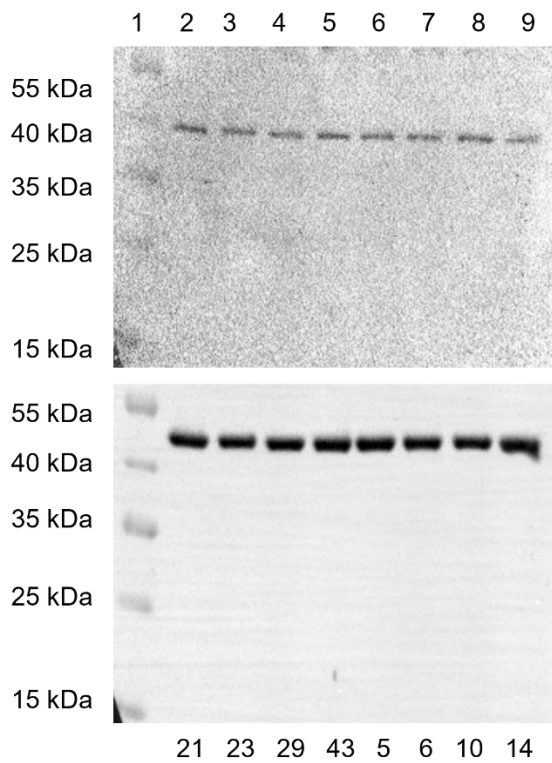


#### **Abbildung 31: Membran 7**

*Oben ist die Immundetektion von  $\gamma$ H2AX mit 17 kDa und einer Belichtung von 17,1 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgängen 6, 7 und 8 der Probeentnahmen.*

## 9.2.2. Membranen 8-14 der Immundetektion von CIC-9 und $\beta$ -Aktin

### Membran 8

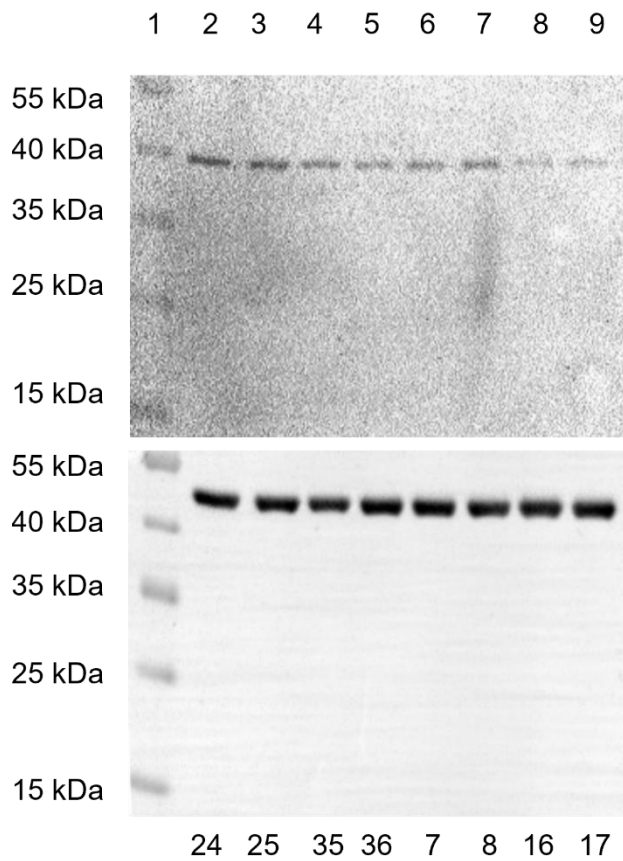


**Abbildung 32: Membran 8**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 6 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 9

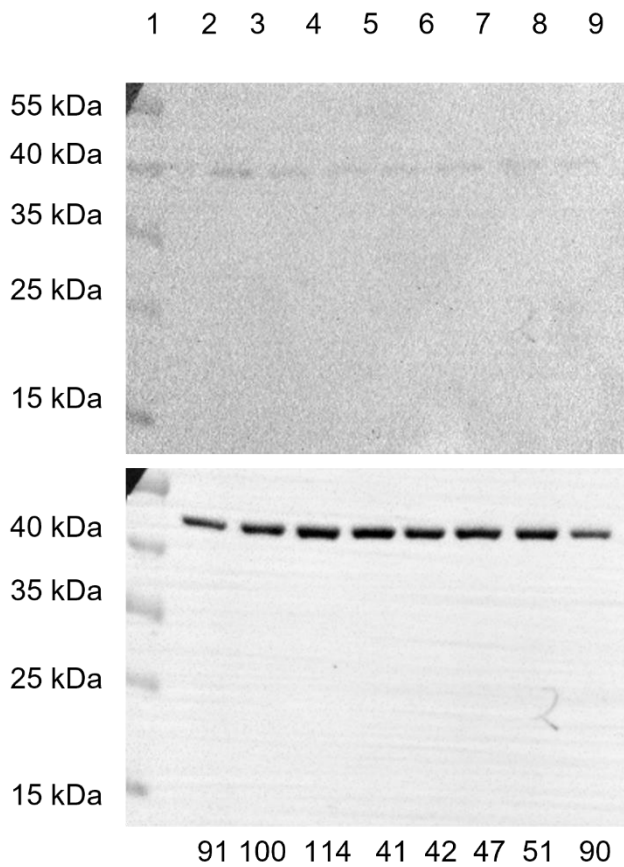


**Abbildung 33: Membran 9**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 6 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 10

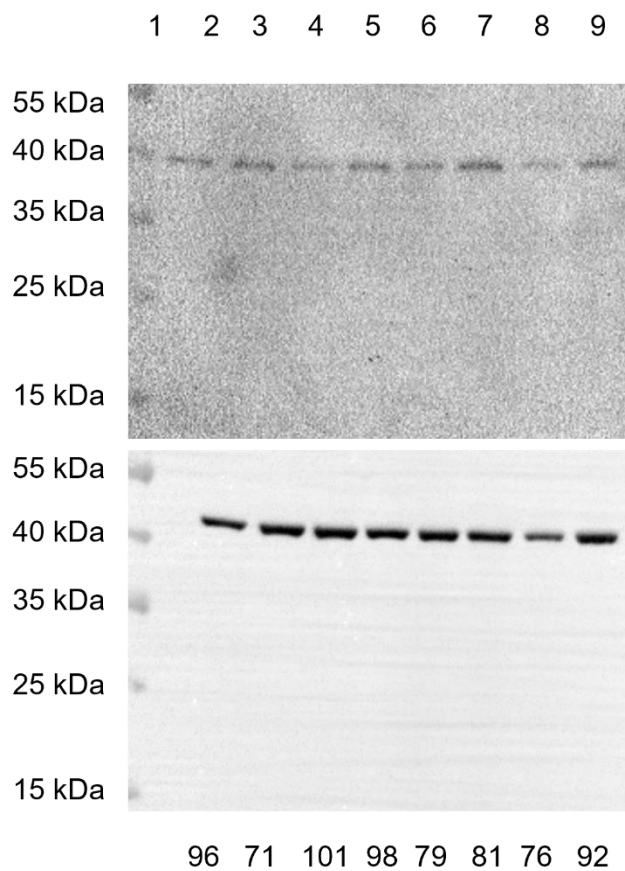


**Abbildung 34: Membran 10**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 7 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 11

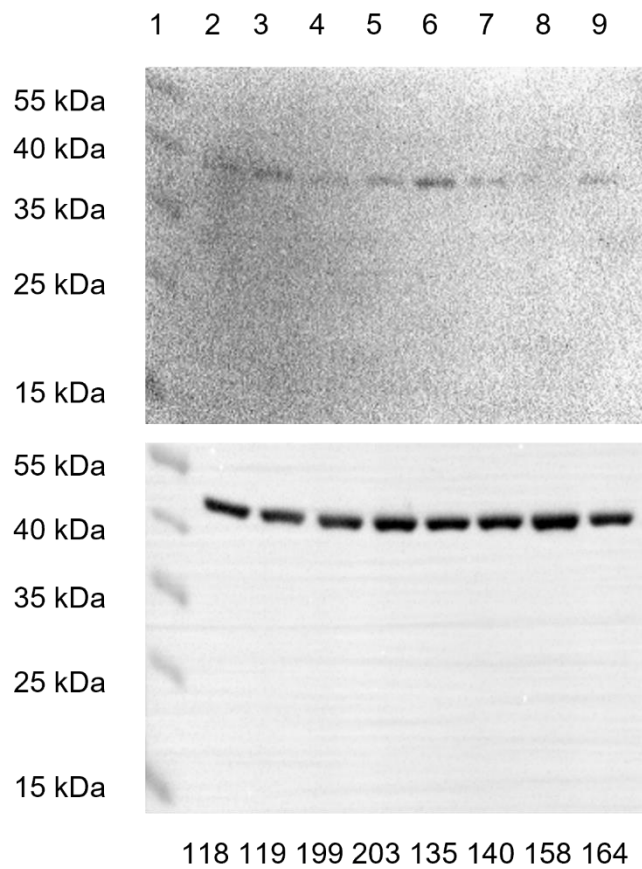


#### **Abbildung 35: Membran 11**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 7 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 12

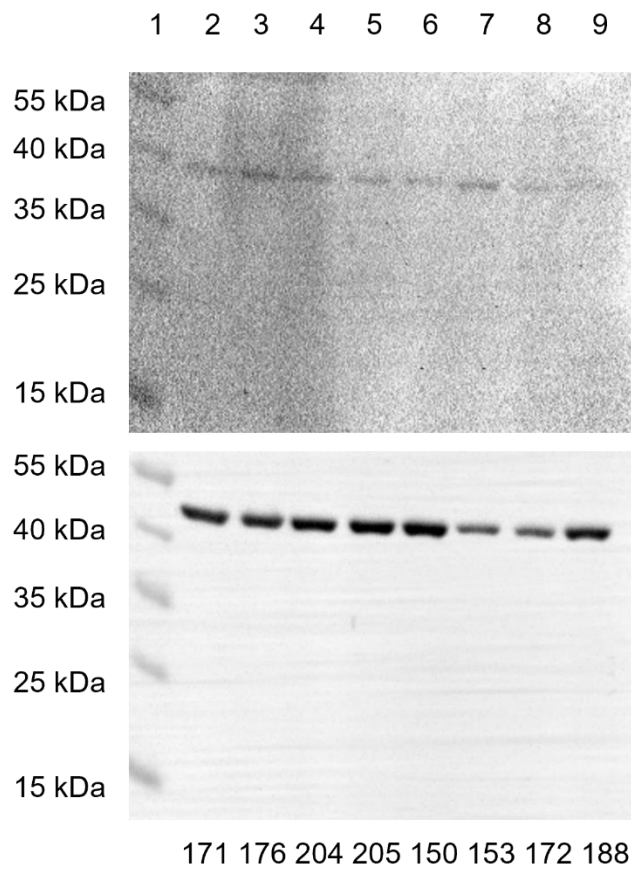


#### **Abbildung 36: Membran 12**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 8 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 13

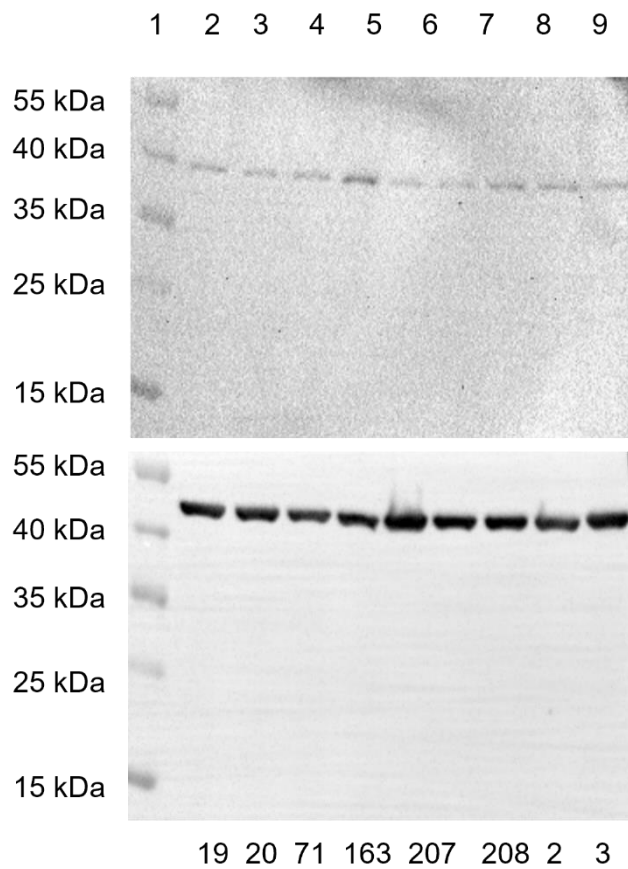


#### **Abbildung 37: Membran 13**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgang 8 der Probeentnahmen.*

## Anhang

### Membran 14



#### **Abbildung 38: Membran 14**

*Oben ist die Immundetektion von CIC-9 mit 37 kDa und einer Belichtung von 222,6 s dargestellt. Unten ist die darauffolgende Immundetektion von  $\beta$ -Aktin mit 42 kDa und einer Belichtung von 5 s gezeigt. In Lane 1 ist der Proteinmarker mit einer Proteinauftrennung zwischen 15 kDa und 55 kDa aufgetragen. Die Proben in Lane 2-9 stammen aus dem Durchgängen 6, 7 und 8 der Probeentnahmen.*

Lebenslauf

## **10 Lebenslauf**

**Ida Marie Aloe Mühl**

Geboren 30.08.1991 in Recklinghausen

### **Ärztin in Weiterbildung**

**11/2023** Pädiatrie, Christliches Kinderhospital Osnabrück

### **Studium der Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**08/2021** Aufnahme der Promotion, AG Brieger Universitätsmedizin Mainz

**05/2021** Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

**04/2020** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3,0)

**03/2017** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,5)

### **Beruf**

**2014-2015** Gesundheits- und Krankenpflegerin, Vivantes Berlin Neukölln

### **Ausbildung**

**2011-2014** Gesundheits- und Krankenpflege, St. Hildegard Münster

### **Schule**

**2001-2010** Abschluss mit dem Abitur (NC 1,7), Gymnasium Petrinum Recklinghausen