

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und  
Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der  
Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen

**Mechanismen Zinkoxid-Nanopartikel-assoziiertes Toxizität am  
Beispiel einer humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie und  
primärer humaner mesenchymaler Stammzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Helena Anne Moratin  
aus Fürth

Würzburg, Mai 2020

Referent: Prim. Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Bülent Polat

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2020

Die Promovendin ist Ärztin

*Meiner Familie gewidmet*

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Nanomaterialien</b>	<b>1</b>
1.1.1	Nanomaterialien in Industrie und Konsumprodukten	2
1.1.2	Nanomaterialien in der Medizin	3
1.2	<b>Nanopartikel</b>	<b>4</b>
1.2.1	Ursprung und Erzeugung von Nanopartikeln	4
1.2.2	Zinkoxid-Nanopartikel	5
1.3	<b>Nanotoxikologie</b>	<b>6</b>
1.3.1	Zytotoxizität	7
1.3.2	Genotoxizität	8
1.3.3	Toxizitätsmechanismen	8
1.4	<b>Apoptose und Nekrose</b>	<b>9</b>
1.5	<b>Fragestellung und Ziele der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	<b>Verwendete Zellen</b>	<b>12</b>
2.1.1	Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie	12
2.1.2	Primäre humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks	12
2.2	<b>Kultivierung der Zellen</b>	<b>13</b>
2.2.1	Kultur der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie	14
2.2.2	Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark	14
2.2.3	Kultur der mesenchymalen Stammzellen	15
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl und -vitalität	15
2.3	<b>Herstellung einer Nanopartikel-Suspension</b>	<b>16</b>
2.4	<b>Charakterisierung der Nanopartikel</b>	<b>17</b>
2.5	<b>Zytotoxizitätsbestimmung durch den MTT-Test</b>	<b>19</b>
2.5.1	Grundlagen	19
2.5.2	Fremdstoffexposition der Tumorzellen	20
2.5.3	Durchführung des Tests	20
2.5.4	Auswertung	21

<b>2.6</b>	<b>Apoptosemessung durch Durchflusszytometrie</b>	<b>22</b>
2.6.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie mit Annexin-V/Propidiumiodid-Markierung	22
2.6.2	Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung	23
2.6.3	Auswertung	24
<b>2.7</b>	<b>Zellzyklusanalyse</b>	<b>25</b>
2.7.1	Grundlagen der Zellzyklusanalyse	25
2.7.2	Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung	25
2.7.3	Auswertung	26
<b>2.8</b>	<b>Nachweis der Caspase-3 Aktivität durch quantitative RT-PCR</b>	<b>26</b>
2.8.1	Grundlagen	27
2.8.2	Isolation von RNA	29
2.8.3	Herstellung von cDNA durch reverse Transkription	31
2.8.4	Fremdstoffexposition und Durchführung	32
<b>2.9</b>	<b>Untersuchung genotoxischer Effekte durch oxidativen Stress</b>	<b>33</b>
2.9.1	Grundlagen des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assays und Modifikation mit fpg	33
2.9.2	Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen	34
2.9.3	Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung	36
2.9.4	Auswertung des fpg-modifizierten Comet Assays	38
<b>2.10</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>39</b>
2.10.1	Graphische Darstellung der Ergebnisse	39
2.10.2	Statistische Testverfahren	40
<b>2.11</b>	<b>Versuchsspezifische Labormaterialien</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellmorphologische Veränderungen durch Zinkoxid-Nanopartikel</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Nanopartikel-Charakterisierung</b>	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Reduktion der Zellvitalität</b>	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Analyse von Zellzyklusalterationen</b>	<b>53</b>
<b>3.6</b>	<b>Zeitabhängiger Anstieg der Caspase-3-Genexpression</b>	<b>55</b>

## Inhaltsverzeichnis

3.7	<b>Einfluss von oxidativem Stress auf die Induktion von DNA-Schäden</b>	<b>56</b>
3.8	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	<b>Diskussion der verwendeten Zellsysteme</b>	<b>61</b>
4.1.1	Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu	61
4.1.2	Primäre humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks	62
4.2	<b>Diskussion der <i>in vitro</i> Testverfahren</b>	<b>63</b>
4.2.1	MTT-Test	64
4.2.2	Durchflusszytometrie	65
4.2.3	Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay mit fpg-Modifikation	66
4.3	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.3.1	Zytotoxizität durch Zinkoxid-Nanopartikel	68
4.3.2	Induktion von Apoptosesignalwegen	70
4.3.3	Mechanismen Nanopartikel-assoziiierter Toxizität	72
4.3.4	Beeinflussung des Zellzyklus	73
4.3.5	Genotoxizität durch oxidativen Stress	74
4.4	<b>Ausblick</b>	<b>77</b>
4.4.1	Einsatz von Nanopartikeln als Teil moderner Tumortherapiestrategien	77
4.4.2	Nanopartikel – Hoffnungsträger oder unterschätztes Gesundheitsrisiko?	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>83</b>
6.1	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
6.2	<b>Datenübersicht</b>	<b>84</b>
6.3	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
6.4	<b>Kongressbeiträge und Publikationen</b>	<b>105</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Nanomaterialien

Aufgrund der vielseitigen Anwendungsbereiche von Nanomaterialien (NM) und ihres beträchtlichen technischen und kommerziellen Potenzials wird die Nanotechnologie als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts betrachtet. Die Menge von Produkten auf dem Markt mit Bestandteilen im Nanomaßstab erlebt derzeit einen rasanten Aufstieg. Internationalen Schätzungen zufolge wird der Weltmarkt für Nanotechnologie im Jahr 2021 einen Wert von 90,5 Milliarden US-Dollar erreichen [McWilliams, 2016]. Ihre enorme sozioökonomische Perspektive macht NM zum Ziel intensiver Forschung und rückt sie auch gleichermaßen immer mehr in den Fokus der Öffentlichkeit.

Als NM gelten laut Definition der Europäischen Union alle Materialien, bei denen mindestens die Hälfte der Bestandteile eine Größe von 1 bis 100 Nanometern (nm) hat [Amtsblatt der Europäischen Union, 2011]. Unterschieden werden Materialien mit nur einer Dimension im Nanomaßstab, wie beispielsweise Oberflächenbeschichtungen, oder mit zwei Dimensionen im Nanomaßstab, wie Nanokabel und -fasern. Hat ein Material in drei Dimensionen ein Außenmaß zwischen einem und 100 nm, so wird es als Nanopartikel (NP) bezeichnet [The Royal Society, 2004].

Die Besonderheit von NM stellt ihre Größe dar, da sie, verglichen mit Stoffen der gleichen Substanzklasse in größeren Dimensionen, für den erheblichen Unterschied ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften verantwortlich ist. Je mehr die Größe eines Teilchens abnimmt, desto mehr nimmt in Relation dessen Oberfläche zu, was zu einer vermehrten Präsentation der Atome und Moleküle und somit auch reaktiver Gruppen des Materials nach außen führt [Nel et al., 2006]. Dies resultiert in einer Verstärkung des katalytischen Verhaltens und einer ausgeprägten chemisch-biologischen Reaktivität [Athie-Garcia et al., 2018].

Abbildung 1 veranschaulicht, dass in der Größenordnung unter 100 nm der Anteil von Molekülen an der Teilchenoberfläche umgekehrt proportional zu dessen Größe ist. NM besitzen daher spezifische strukturabhängige Charakteristika chemischer, elektrischer, optischer oder magnetischer Art, die sie potenziell wertvoll für die industrielle Anwendung machen.

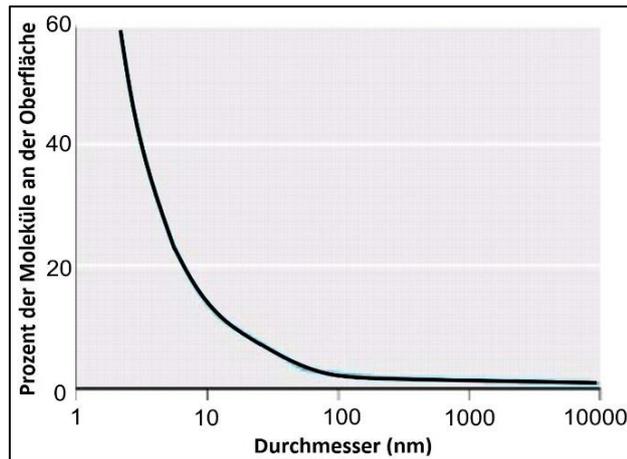


Abbildung 1: Verhältnis zwischen Durchmesser und Oberflächenmolekülen. Modifiziert nach Nel et al. [2006].

### 1.1.1 Nanomaterialien in Industrie und Konsumprodukten

Der Einsatzbereich von NM wächst beständig und erstreckt sich heute bereits über viele verschiedene Industriezweige.

In der Lebensmittelindustrie werden NM in Verpackungen verarbeitet, um die Haltbarkeit von Produkten zu verlängern. Eine Zugabe zu den Lebensmitteln selbst soll deren Textur, Geschmack oder Farbe verändern. Die Funktionalität von Textilien kann durch Einarbeitung von Nanostrukturen gesteigert werden, da sie bessere schmutz- und wasserabweisende sowie Atmungseigenschaften aufweisen [Ranjan et al., 2014]. In der Landwirtschaft ermöglicht der Zusatz von nanoskaligem Ton zu Düngemitteln eine langsamere Freisetzung von Stickstoff, sodass der Düngemittelverbrauch reduziert und die Eutrophierung von Gewässern vermieden werden kann .

Schätzungen zufolge gibt es bereits über 1800 Konsumprodukte auf dem Markt, die NM enthalten. Silber (Ag)-, Zinkoxid (ZnO)-, Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)- und Siliziumdioxid (SiO<sub>2</sub>)-NP gehören dabei zu den am häufigsten eingesetzten Substanzen [Vance et al., 2015]. Metalloxide werden aufgrund ihrer hohen UV-Absorptionsfähigkeit von der Kosmetikindustrie häufig in Sonnenschutzprodukten verarbeitet. Nanoskalige Partikel bringen hier zusätzlich den Vorteil einer guten Dispersionsfähigkeit auf der Haut bei gleichem UV-Schutz. Weiterhin werden Ag-

NP zur Prävention einer Geruchsbildung Deodorants zugesetzt [Bartlomiejczyk et al., 2013].

### 1.1.2 Nanomaterialien in der Medizin

Der Begriff „Nanomedizin“ beschreibt die Anwendung von NM für die Diagnostik, Prävention und Therapie von Erkrankungen. Sie ist zudem ein Instrument, mit dem molekulare krankheitsassoziierte Mechanismen erforscht werden. Die Größe von NM, die etwa der von Viren, DNA und Proteinen entspricht, sowie ihre hohe physikochemische Reaktivität ermöglichen die Überwindung von Grenzen, die herkömmlichen diagnostischen und therapeutischen Mitteln gesetzt sind [Hadeef, 2018]. Während viele Ansätze gegenwärtig noch Gegenstand intensiver Forschung sind, haben manche Nanotechnologien bereits Einzug in die klinische Anwendung gehalten. Beispielsweise führt die Applikation magnetischer NP im Gewebe zu Störungen des lokalen Magnetfeldes und einer Reduktion der Relaxationszeit bei Magnetresonanztomographien. Durch Anwendung von NP mit gewebespezifischen Beschichtungen als Kontrastmittel kann eine Verbesserung der bildmorphologischen Distinktion zwischen Tumor- und gesundem Gewebe erzielt werden [Sun et al., 2008]. Ein weiteres Gebiet, auf dem der Einsatz von NM innovative Forschungsthematiken liefert, ist das Tissue Engineering. NM sollen dazu beitragen, körpereigenes Gewebe zu regenerieren. So ist es beispielsweise mit Hilfe NP-beschichteter Gerüststrukturen möglich, Knochengewebe wachsen zu lassen, da diese optimale Bedingungen für Zellmigration, -differenzierung und -adhäsion bieten [Griffin et al., 2016]. Auch im Rahmen der modernen Krebstherapie erscheint die Anwendung von Nanostrukturen vielversprechend. Zum Beispiel könnten Chemotherapeutika für eine gezielte Pharmakotherapie mit Hilfe von Nano-Carrier-Systemen selektiv in Tumorzellen eingeschleust werden. Hierzu kann das Prinzip der ligandenvermittelten Aufnahme in die Zelle genutzt werden. Durch Kopplung von NP an Antikörper ist es möglich, zellspezifische Hybride zu generieren [Fratoddi et al., 2014]. Konjugate aus NP und gegen Tumorzellantigene gerichteten Antikörpern wie anti-EGFR oder -HER2/neu könnten die Detektion maligner Zellen im Gewebe erleichtern [Jain et al., 2008; Lee et al., 2007].

## 1.2 Nanopartikel

### 1.2.1 Ursprung und Erzeugung von Nanopartikeln

Die elementaren Bestandteile jeglicher Nanostrukturen sind NP. Grundsätzlich muss zwischen natürlichen und industriell erzeugten NP unterschieden werden. Die industrielle Produktion von NM reicht zurück bis in die frühen Jahre des 20. Jahrhunderts, angefangen bei der Verwendung von Industrieruß-NP für die Fertigung von Gummireifen für Automobile, um deren Abriebbeständigkeit, Haftung und Elastizität zu erhöhen [Horikoshi und Serpone, 2013]. Neben synthetisch hergestellten gibt es auch natürlich vorkommende NP in der Umwelt. Sie werden zum Beispiel bei vulkanischen Aktivitäten oder Waldbränden freigesetzt. Anthropogen erzeugte NP entstehen als Nebenprodukt bei Verbrennungsprozessen, wie bei Schweiß- und Schmelzvorgängen, bei der Polymerproduktion oder gar beim Kochen. In städtischen Gebieten stellen Dieselmotoren oder Fahrzeuge mit defekten Katalysatoren die Hauptquelle atmosphärischer NP dar, die in diesem Zusammenhang als Feinstaub bezeichnet werden [Jeevanandam et al., 2018].

Prinzipiell können zwei verschiedene Methoden zur Herstellung von NP unterschieden werden, das *Bottom-Up*- und das *Top-Down*-Verfahren. Das *Top-Down*-Verfahren basiert in der Regel auf Mahlprozessen, bei denen nanoskalige Partikel durch mechanische Zerkleinerung von größeren Ausgangsmaterialien erzeugt werden. Im Gegensatz dazu werden die Partikel beim *Bottom-Up*-Verfahren von Grund auf, also aus Atomen oder Molekülen, neu synthetisiert. Weltweit findet überwiegend das *Bottom-Up*-Verfahren Anwendung, da die Zerkleinerung auf mechanischem Weg durch Mahlen keine genaue Regulation der Partikelgröße zulässt und durch Abnutzung der Mahlkörper Verunreinigungen auftreten können [Freudenreich, 2010]. Gerade in hoch technologisierten Industriebranchen wie der Medizintechnik ist es unabdingbar, die exakte Größendistribution der verwendeten Partikel nachvollziehen zu können. Hier bietet das *Bottom-Up*-Verfahren den Vorteil, monodisperse Nanofunktionseinheiten mit speziellen, erwünschten Eigenschaften herstellen zu können.

### 1.2.2 Zinkoxid-Nanopartikel

Die Aufnahme des Spurenelementes Zink stellt aufgrund seiner enormen Bedeutung im Rahmen vieler Körperfunktionen einen essentiellen Bestandteil der menschlichen Ernährung dar. Adäquate Mengen sind vonnöten für DNA- und Proteinsynthese sowie für eine optimale Immun- und Leberfunktion, Gerinnung und olfaktorische Wahrnehmung [Lye et al., 2012]. In chemischer Verbindung mit Sauerstoff entsteht ZnO, welches als farblose, hexagonale Kristalle oder weißes Pulver mit einer molaren Masse von 81,37 g/mol vorliegt. Reines ZnO ist in Wasser unlöslich, kann jedoch in verdünnten Säuren unter Salzbildung gelöst werden. Aus materialwissenschaftlicher Sicht stellt es einen Halbleiter dar. Weltweit wird die Produktion von ZnO auf etwa  $10^5$  Tonnen pro Jahr beziffert, wobei ein Großteil davon als Aktivator für Vulkanisationsprozesse in der Gummiindustrie eingesetzt wird [Das et al., 2011]. Von der US Food and Drug Administration wird ZnO als generell unbedenklich („GRAS“ = *generally recognized as safe*) eingestuft [Rasmussen et al., 2010].

Neben Kohlenstoff und Übergangsmetallen wie Silber oder Gold zählen Metalloxide, zu denen TiO<sub>2</sub> und speziell ZnO gehören, zu den am häufigsten für die Nanomaterialproduktion verwendeten Substanzen [Bakand und Hayes, 2016]. Als Ausgangsmaterial besitzt ZnO einige besondere physikalische und chemische Eigenschaften. Eine hohe chemische- und Photostabilität sowie ein breites Absorptionsspektrum für Strahlung machen es zu einem multifunktionalen und vielseitig einsetzbaren Werkstoff. Weiterhin wird ZnO eine antimikrobielle Wirkung zugesagt, was zum einen bei der Herstellung von Nahrungsmittelverpackungen, aber auch für antiseptische Wundverbände genutzt wird [Wiesenthal et al., 2011]. Auch in der Textilindustrie werden neue Materialien auf der Basis von ZnO-Nanofasern entwickelt, die photokatalytische, antibakterielle und antioxidative Eigenschaften vereinen. Diese können beispielsweise zur Therapie und Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit chronisch-inflammatorischen Hauterkrankungen wie der Atopischen Dermatitis eingesetzt werden [Wiegand et al., 2013]. In Studien haben ZnO-NP antitumorale Eigenschaften aufgewiesen, sodass ein Einsatz als Krebstherapeutikum diskutiert wird [Mishra et al., 2017].

### 1.3 Nanotoxikologie

Seit jeher sind Menschen NP ausgesetzt, die aus natürlichen Quellen stammen. Im Rahmen der rasant ansteigenden industriellen Fertigung, des täglichen Gebrauchs und der Entsorgung von Materialien im Nanomaßstab nimmt allerdings auch die Freisetzung anthropogen erzeugter NP in die Umwelt rapide zu. Beispielsweise konnten NP im von Häuserfassaden abgeflommenen Wasser festgestellt werden, die mit NM-versetzter Wandfarbe gestrichen worden waren. Große Teile des städtischen Klärschlamm werden als Düngemittel in der Landwirtschaft weiterverwendet, sodass im Abwasser enthaltene NP im Boden und Grundwasser angereichert werden [Mahdi et al., 2018]. Weiterhin führt die Verarbeitung von NM in Kosmetikprodukten zu einer verstärkten Exposition der Menschen im alltäglichen Leben. Aus diesen Gründen sind nanotoxikologische Untersuchungen vonnöten, um eine Evaluation des Risikoprofils von NM zu ermöglichen.

Relevante Expositionsrouten des Menschen gegenüber NP sind in Anbetracht der Anwendungsgebiete vor allem der Aerodigestivtrakt und die Haut. Die inhalative Aufnahme ist vor allem bei Arbeitern in Chemie-, Kosmetik- oder farbverarbeitenden Industriebranchen vorherrschend [Osmond und McCall, 2010]. Der Partikeldurchmesser determiniert den Depositionsort. So verbleiben Partikel von 5-10 µm im Nasen-Rachenraum, von 2-3 µm in den Bronchien und von 0,1-1 µm in der Alveolarregion [Meili C. et al., 2007].

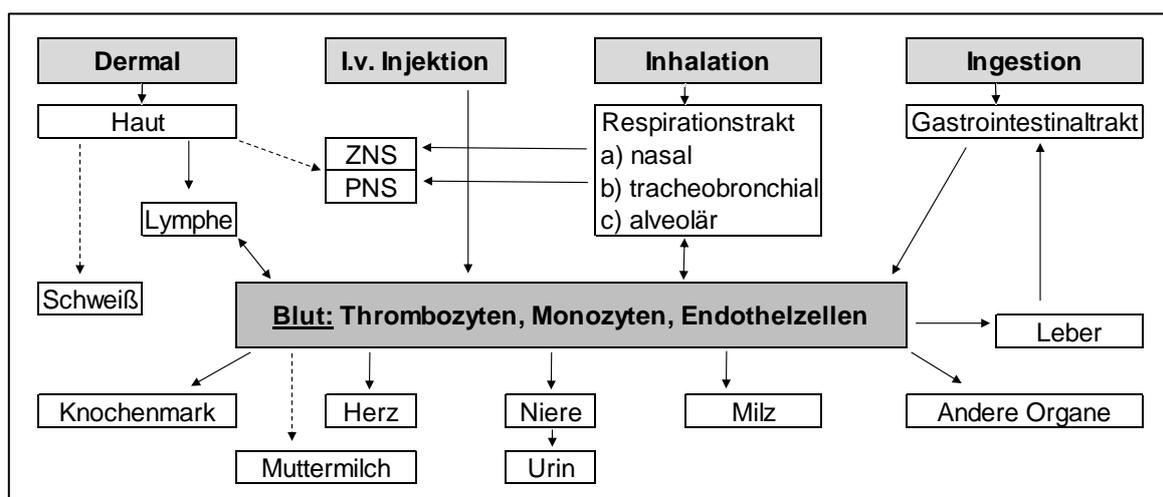


Abbildung 2: Schematische Darstellung potenzieller Eintrittspforten von NP in den menschlichen Körper sowie deren Biokinetik innerhalb des Organismus. Durchgezogene Pfeile zeigen nachgewiesene Routen, gestrichelte Pfeile mögliche Routen. Modifiziert nach Bakand und Hayes [2016].

Abbildung 2 gibt einen Überblick über potenzielle Aufnahme- und Distributionsmechanismen von NP im menschlichen Organismus.

Die Thematik NP-assoziiierter toxischer Effekte wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Eine Beurteilung realistischer NP-Expositionsdosen, der Partikelkinetik sowie deren Effekte im Organismus ist bislang vor allem anhand von experimentellen Versuchsmodellen möglich. Es gibt Hinweise, dass es nach inhalativer oder oraler Aufnahme über die Blutzirkulation zu einer Translokation und Akkumulation von NP im Körper kommen kann [Jani et al., 1994; Nemmar et al., 2002], wohingegen diese bei dermalen Applikation die oberflächlichen Schichten des Stratum corneum der Epidermis nicht zu überwinden scheinen [Kimura et al., 2012]. Über die Wirkung der Partikel im Körper selbst ist nur wenig bekannt. Daten aus klinischen Studien lassen vermuten, dass die inhalative Aufnahme von NP bei Betroffenen zu pulmonalen Inflammationsreaktionen und allergischen Lungenerkrankungen führen kann [Journeay und Goldman, 2014; Khatri et al., 2013]. Weiterhin ist ein direkter Zusammenhang zwischen Feinstaubbelastung und kardiovaskulärem Risiko belegt [Miller et al., 2007].

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es schwierig, eine generelle Aussage über das von NP ausgehende gesundheitliche Risiko zu treffen. Pathophysiologische Effekte sind prinzipiell sowohl von toxikokinetischen als auch von toxikodynamischen Faktoren abhängig, die lediglich unter *in vivo* Bedingungen zuverlässig untersucht werden können. Verteilung, Akkumulation und Ausscheidung einer Substanz sowie die daraus folgenden Effekte im Gewebe unterliegen vielen lokalen und zellspezifischen Einflussfaktoren. Weiterführende Forschung ist demnach dringend erforderlich, um das Risikopotenzial von NP abschätzen zu können.

### 1.3.1 Zytotoxizität

In vielen Studien konnte NP-induzierte Zytotoxizität *in vitro* anhand von Zelllinien [Guan et al., 2012; Wahab et al., 2014], aber auch an primären Zellen [Hackenberg et al., 2011a] beobachtet werden. Auch aus *in vivo* Untersuchungen liegen hierfür Hinweise vor [Ng et al., 2017]. NP scheinen weiterhin zellspezifische Toxizitätsprofile zu besitzen. Reddy et al. [2007] zeigten eine selektive toxische

Wirkung von ZnO-NP auf Bakterienzellen verglichen mit humanen eukaryontischen Zellen. Hanley et al. [2008] wiesen ausgeprägtere zytotoxische Effekte durch NP in malignen Zellen im Vergleich zu benignen Zellen nach. Diese Eigenschaft macht die Partikel interessant als Baustein moderner Antitumorthérapien. Da Toxizität ein wichtiger Limitationsfaktor für den Einsatz von NP als Therapeutika ist, sind umfassende Toxizitätsanalysen erforderlich.

### 1.3.2 Genotoxizität

Der Fokus nanotoxikologischer Untersuchungen liegt auf der Thematik NP-assoziiertes Zytotoxizität, die Datenlage bezüglich genotoxischer Effekte ist hingegen limitiert. Da Genomschäden zu Aktivierung maligner Zelltransformationsmechanismen führen können [Biochemie und Molekularbiochemie des Menschen, 2009], ist eine suffiziente Risikoevaluation vor dem Hintergrund einer therapeutischen sowie repetitiven, niedrig dosierten Verwendung von NP als Bestandteil von Kosmetikprodukten essentiell. Die publizierten Daten sind inkonsistent. Es wird sowohl von eindeutig evidenten [Demir et al., 2014] als auch von keinerlei feststellbaren genotoxischen Effekten in Zellen nach Exposition mit ZnO-NP berichtet [Kwon et al., 2014b]. Golbamaki et al. [2015] vermuten in ihrer Übersicht über Genotoxizität von Metalloxid-NP, dass folgende Faktoren für die Unbeständigkeit der Ergebnisse ursächlich sein können: unterschiedliche Größe, Oberflächenbeschichtung und Ladung der getesteten Partikel sowie variable Ausprägung der Agglomerationsneigung im Medium, unterschiedliche Testkonzentrationen und -systeme.

### 1.3.3 Toxizitätsmechanismen

Die molekularen Mechanismen NP-induzierter Toxizität sind nicht abschließend geklärt. Eine Vielzahl verschiedener Theorien bietet Erklärungsansätze für die zugrundeliegenden Abläufe. In der Literatur wird oxidativer Stress infolge einer überschießenden Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) und Erschöpfung antioxidativer Zellschutzmechanismen am häufigsten im Zusammenhang mit Nanotoxizität beobachtet [Kermanizadeh et al., 2015]. Infolge intrazellulär erhöhter

ROS-Konzentrationen werden verschiedene pathologische Signalwege initiiert, unter anderem Apoptosekaskaden, Zellzyklusalterationen [Kocbek et al., 2010] oder Hyperinflammation. So konnte in NP-behandelten Zellen eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und entzündungsassoziierter Gene gemessen werden [Park et al., 2010]. Jedoch wurde auch von NP-assoziiertes Toxizität berichtet, die keine direkte Folge von ROS ist [Wang et al., 2010]. In diesem Zusammenhang argumentieren Heim et al. [2015] beispielsweise, dass die schädigende Wirkung von ZnO-NP das Resultat gelöster  $Zn^{2+}$ -Ionen ist. Sie beobachteten, dass die Toxizität von ZnO-NP durch Komplexbildung von  $Zn^{2+}$  mit Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA) reduziert wurde.

## 1.4 Apoptose und Nekrose

Die Zellzahl vielzelliger Organismen wird nicht nur über die Regulation der Zellteilung gesteuert, sondern ebenso über die Beseitigung nicht mehr benötigter Zellen. Diesem Vorgang liegt ein in jeder Zelle auslösbarer kontrollierter Zelltodmechanismus zu Grunde, der als Apoptose bezeichnet wird. Dieser Prozess läuft in vielen physiologischen und pathologischen Situationen ab. So ist die Apoptose beispielsweise auch für die Differenzierung des Organismus bedeutsam, da die Separierung der Finger und Zehen eines Embryos durch apoptotischen Untergang des zunächst noch vorhandenen interdigitalen Gewebes vollzogen wird [Biochemie und Molekularbiochemie des Menschen, 2009]. Unterschieden werden muss die Apoptose von der Nekrose, der zweiten Form des Zelltodes, welche die Reaktion der Zelle auf einen extrinsischen irreversiblen Schaden ist. Mikroskopisch gibt es eindeutige Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose. Typischerweise kommt es im Rahmen der Nekrose zum Anschwellen der Zelle, Verlust der Membranintegrität und Austreten des Zellinhaltes in den Interzellularraum. In der Folge kommt es zu entzündlichen und immunologischen Reaktionen. Die Apoptose ist dagegen gekennzeichnet durch Schrumpfen der Zelle, Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen und Fragmentierung in Membranvesikel, so genannter Apoptosekörper, die anschließend von Makrophagen beseitigt werden [Kerr et al., 1972].

Es existieren zwei Wege, auf denen die Apoptose aktiviert werden kann: über extrinsische, rezeptorabhängige, oder intrinsische, mitochondrienabhängige Signaltransduktion. Beide münden in eine gemeinsame Endstrecke zellulärer Veränderungen, die von einer Klasse proteolytischer Enzyme katalysiert werden, den Caspasen. Die Aktivierung des extrinsischen Weges setzt die Bindung so genannter Todesrezeptoren voraus, zu denen beispielsweise Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie gehören [Schulze-Osthoff et al., 1998]. Dies führt letztendlich zu einer kaskadenartigen proteolytischen Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -7, die auch als Effektor-Caspasen bezeichnet werden, da sie für die morphologischen Veränderungen der Zelle nach Apoptoseinduktion verantwortlich sind. Werden innerhalb der Zelle spezifische Signale wie irreversible DNA-Schäden oder Verlust der Sauerstoffversorgung registriert, kann die Apoptose auch unabhängig von Liganden ausgelöst werden. In diesem Fall wird unter anderem Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran in das Zytoplasma freigesetzt, was somit wiederum Effektor-Caspasen aktiviert [Li et al., 1997]. Diese zerstören existenzielle zelluläre Proteine, beispielsweise Bestandteile des Zytoskeletts, Endonuklease-Inhibitoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren.

Die Apoptose wird häufig als der wichtigste Mechanismus des NP-induzierten Zelltodes betrachtet, wobei dem intrinsischen mitochondrialen Signalweg die Hauptrolle zugesprochen wird [Hsin et al., 2008]. Dem zugrunde liegt die Beobachtung, dass NP aufgrund ihrer Größe Zellmembranen überwinden und direkten Schaden an Zellorganellen verursachen können [Xia et al., 2006]. Andere Studien belegen, dass NP auch Nekrose induzieren können [Buerki-Thurnherr et al., 2013]. Welche Form des Zelltodes initiiert wird hängt, neben der Größe der Partikel [Pan et al., 2007], von vielen anderen Faktoren ab, die nicht vollständig geklärt sind. Fundierte Kenntnisse über die ablaufenden Zelltodmechanismen zu erlangen ist essenziell, um die Konsequenzen einer NP-Exposition für den Menschen besser vorhersagen zu können. Weiterhin werden auf dieser Basis Regulation und Modifikation der NP-induzierten Effekte möglich.

## 1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Im Rahmen einiger Studien wurden bereits zytotoxische Effekte von ZnO-NP nicht nur in Tumorzelllinien, sondern auch in Primärzellen wie humanen Fibroblasten oder Monozyten nachgewiesen [Feltis et al., 2012]. Wie auch bei anderen toxischen NM, wurde bei ZnO die Generierung von oxidativem Stress registriert. Ob dies jedoch der für die toxische Wirkung verantwortliche Hauptmechanismus ist, konnte bislang nicht hinreichend geklärt werden. Ebenso ist bekannt, dass ZnO-NP Apoptose induzieren, jedoch sind eine Vielzahl an möglichen Signalwegen bekannt, die hierbei eine Rolle spielen können. Da NP eine ausgeprägte toxische Wirkung auf Tumorzellen im Vergleich zu nicht-malignen Zellen aufweisen, wurden für die Untersuchungen eine Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms (PECA) sowie als Vertreter nicht-maligner Zellen primäre mesenchymale Stammzellen (MSC) ausgewählt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, toxische Effekte von ZnO-NP anhand ihrer Wirkung auf Zellen einer humanen PECA-Zelllinie zu evaluieren und potenzielle molekulare Mechanismen der Schädigung an diesem Modell zu analysieren. Weiterhin soll die Entstehung oxidativer DNA-Schäden in humanen MSC untersucht werden. Durch die Auswahl der Zielzellen ist es möglich, simultan toxische Effekte in benignen und malignen Zellen zu betrachten.

Dazu sollen folgende Fragen geprüft werden:

- Führt die Inkubation mit ZnO-NP zu einer Reduktion der Zellvitalität bei Zellen einer humanen PECA-Zelllinie?
- Falls ja, erfolgt der Untergang der PECA-Zellen über eine Aktivierung von Apoptosemechanismen und haben ZnO-NP Einfluss auf den Zellzyklus?
- Können nach Behandlung mit ZnO-NP oxidative DNA Schäden im modifizierten alkalischen Einzelzell- Mikrogelelektrophorese (Comet) Assay bei humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden?
- Sind Unterschiede der toxischen Wirkung in den verwendeten Zellen erkennbar?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Zellen

Um mögliche Unterschiede der Effekte von NP auf maligne und nicht-maligne Zellen evaluieren zu können, wurden für die in dieser Arbeit präsentierten Versuche zwei verschiedene Zelltypen verwendet. Zum einen die Tumorzelllinie FaDu, als Vertreter maligner Zellen, sowie primäre humane mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BMSC).

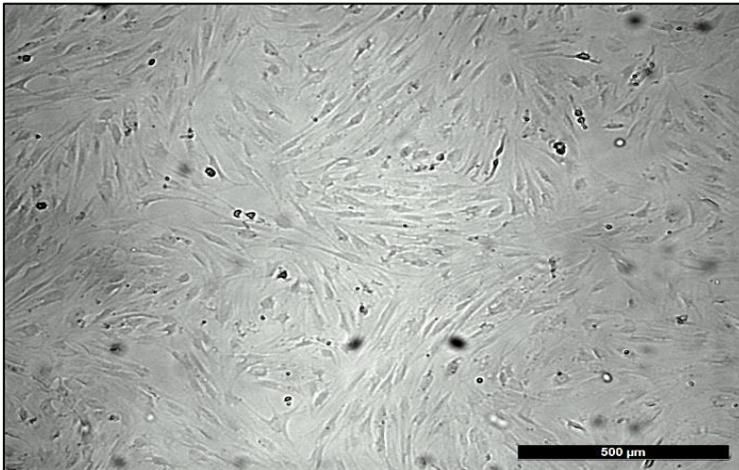
#### 2.1.1 Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie

Bei der FaDu-Zelllinie handelt es sich um eine epitheliale Zelllinie, die erstmals 1968 aus einem humanen Plattenepithelkarzinom (PECA) des Hypopharynx etabliert wurde. Die Zellen gelten als sehr stabiles Modell aus der Gruppe der Plattenepitheltumoren im Kopf-Hals-Bereich. Das Wachstumsmuster kann als adhärente Monolayer-Schicht beschrieben werden. Die durchschnittliche Verdopplungszeit der Zellen liegt bei 50 Stunden [Rangan, 1972]. Die Zellen wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC, Manassan, VA, USA) erworben (ATCC-Nr.: HTB-43). Es liegen bereits einige Studien vor, bei denen FaDu-Zellen im Zusammenhang mit NP verwendet wurden [Gehrke et al., 2017; Hackenberg et al., 2014].

#### 2.1.2 Primäre humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks

Zur Evaluation genotoxischer Schäden nach NP-Exposition wurden primäre humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (BMSC) als Zielzellen ausgewählt. Abbildung 3 veranschaulicht das Wachstumsmuster dieser Zellen in Kultur. Die BMSC dienen weiterhin als nicht-maligne Referenzgruppe, da sie auch in fortgeschrittenen Passagen noch hohe Proliferationsraten aufweisen und somit vergleichbare Grundvoraussetzungen wie die verwendeten Tumorzellen bieten. Um als MSC zu gelten, müssen Zellen bestimmte Charakteristika aufweisen. Die

Minimalkriterien für diese Definition lauten wie folgt: Die Zellen müssen unter Standardkulturbedingungen plastikadhärent sein. Weiterhin müssen sie obligatorisch die Oberflächenmarker CD73, CD105 und CD90 exprimieren, nicht jedoch HLA-DR, CD34, CD79alpha oder CD19, CD45, CD14 oder CD11b. Sie müssen die Fähigkeit besitzen, *in vitro* in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten zu differenzieren [Dominici et al., 2006]. Die Arbeit mit menschlichen Stammzellen liefert essentielle wissenschaftliche Grundlagen, speziell für die Forschungsbereiche Onkologie und Tissue Engineering. Auch in diesen Bereichen haben nanotechnologische Anwendungen bereits Einzug gefunden [Griffin et al., 2016]. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus (Direktor Univ.-Prof. Dr. M. Rudert, Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg) aus Femurköpfen von 10 Patienten nach Implantation totaler Hüftgelenksendoprothesen isoliert und in Kultur überführt. (Ethikantrag Nr. 19/06 der HNO-Klinik und Nr. 72/06 des König-Ludwig-Hauses sowie schriftliche Einwilligung der Patienten nach Aufklärung über das Versuchsvorhaben.)



*Abbildung 3:* Lichtmikroskopische Aufnahme von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks in Zellkultur. Das für diesen Zelltyp charakteristische spindelförmige Wachstumsmuster ist hierbei erkennbar.

## 2.2 Kultivierung der Zellen

Im Folgenden wird das Vorgehen bei der Zellkultur, der Passagierung und der Expansion von FaDu-Zellen erläutert. Ferner wird das Verfahren zur Gewinnung und Kultivierung von BMSC und die Bestimmungsmethode der Zellzahl und -vitalität vor der Fremdstoffexposition beschrieben.

### 2.2.1 Kultur der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie

Die FaDu-Zellen wurden in belüfteten Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) unter Zugabe von 10-12 ml Nährmedium im Brutschrank (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder GmbH, Tuttlingen, D) bei 37°C, 5 % Kohlenstoffdioxid und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde das alte durch neues Medium ersetzt, welches zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde. Das Nährmedium setzte sich aus Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI1640) (Biochrom AG, Berlin, D), 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (Linaris, Wertheim, D), 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom AG, Berlin, D), 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Biochrom AG, Berlin, D) und 1 % Natrium-Pyruvat-Lösung (Biochrom AG, Berlin, D) zusammen. Regelmäßig wurde das Zellwachstum, die Zellmorphologie und die Wachstumsdichte lichtmikroskopisch beurteilt (Lichtmikroskop Leica DM IL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D). Hatten die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht, wurden sie enzymatisch abgelöst und auf mehrere neue Kulturflaschen verteilt. Für die Passagierung wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen kurz in 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit 2 ml Trypsin 0,25 %-EDTA 1x (Life Technologies Corp. (Gibco), Carlsbad, CA, USA) für 3 Minuten im Brutschrank. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden nun 10 ml Nährmedium hinzugegeben. Die Zellsuspension konnte anschließend entweder zur weiteren Kultivierung oder zur Aussaat für die Fremdstoffexposition eingesetzt werden.

### 2.2.2 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Durch die Kollegen des wissenschaftlichen Labors des König-Ludwig-Hauses erfolgte die Extraktion von Stammzellen aus Spongiosa der entnommenen Femurköpfe. Dazu wurde die Spongiosa in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (DMEM/Ham's F12)(Life Technologies Corp. (Gibco), Carlsbad, CA, USA) bis zu einem Gesamtvolumen von 50 ml hinzugefügt. Die Röhrchen wurden nun primär kräftig mit der Hand

geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das gelöste Fett sowie das restliche Medium konnten nun als Überstand abgesaugt werden. Nach erneuter Zugabe von DMEM/Ham's F12 bis zu einer Gesamtfüllmenge von 50 ml und anschließendem manuellen Schütteln des Röhrchens, lagerten sich durch Sedimentation die Knochen- und Bindegewebsreste am Boden ab, die BMSC befanden sich im Überstand. Die aus dem Überstand gewonnene Zellsuspension wurde in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und die vorherigen Schritte mehrmals wiederholt, um ein maximales Auswaschen der Zellen aus der Spongiosa zu erreichen. Die gesammelte Zellsuspension wurde nun für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die entstandenen Zellpellets konnten dann in 10-50 ml Vollmedium DMEM/Ham's F12, versetzt mit 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und 50 µg/ml L-Ascorbat-2-Phosphat, resuspendiert werden. Ca.  $1 \times 10^9$  Zellen wurden anschließend in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Vollmedium DMEM/Ham's F12 gegeben.

### 2.2.3 Kultur der mesenchymalen Stammzellen

Die Stammzellen wurden in großen Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) mit 25 ml Expansionsmedium im Brutschrank inkubiert. Das Medium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies Corp. (Gibco), Carlsbad, CA, USA), 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung. Ein Wechsel des Expansionsmediums erfolgte zwei Mal wöchentlich. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgesaugt, ein Waschschrift mit 8 ml PBS durchgeführt und mit 4 ml Trypsin für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zunächst durch leichtes Klopfen auf den Flaschenboden, nach Zugabe von 12 ml Nährmedium auch durch Abspülen mit der Pipette, lösten sich die Zellen vom Boden ab.

### 2.2.4 Bestimmung der Zellzahl und -vitalität

Die Bestimmung der Lebendzellzahl der durch enzymatische Ablösung mit Trypsin erhaltenen Zellsuspension erfolgte durch elektronische Zellzählung mit dem

CASY® Cell Counter (Innovatis, Reutlingen, D). Die Lebend-Tot-Differenzierung des verwendeten Systems beruht auf dem Prinzip des Stromausschlussverfahrens. Über Elektroden wird elektrischer Strom in einem Cellcountergefäß (CASY-Cup, Innovatis, Reutlingen, D) angelegt, das eine Elektrolytlösung mit den suspendierten Zellen enthält. Vitale Zellen stellen elektrische Isolatoren dar, sodass sie in der Größenverteilungsanalyse mit ihrem tatsächlichen Volumen registriert werden. Bei toten Zellen ist die Zellmembran defekt und das Zytoplasma wird leitfähig. Infolgedessen werden sie nur noch mit einem Volumen detektiert, das in etwa dem des Zellkerns entspricht [Glauner, 2006].

Zur Bestimmung der beiden Parameter Zellzahl und -vitalität, wurden 10 ml CASY-Ton Lösung (Innovatis, Reutlingen, D) in ein CASY-Cup abgefüllt. Nach Hinzufügen von 100 µl der Probe erfolgte eine dreimalige Analyse eines Messvolumens von jeweils 400 µl.

## 2.3 Herstellung einer Nanopartikel-Suspension

Die verwendeten ZnO-NP wurden von der Firma mkNANO bezogen (Produktnr.: MKN-ZnO-020, Mississauga, Kanada). Laut Herstellerangaben hatten die NP einen durchschnittlichen Durchmesser von 20 nm bei einem Reinheitsgrad von 99,9 %. Bevor die Zellen für den jeweiligen Versuch mit dem Fremdstoff behandelt werden konnten, mussten die Partikel kurz zuvor in Suspension gegeben und gemäß einem spezifischen Protokoll eine Dispersion hergestellt werden.

Zunächst wurden 20 mg des ZnO-NP-Pulvers in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, D) abgewogen und in 1740 µl destilliertem Wasser suspendiert. Zur Prävention der Bildung von Partikel-Agglomeraten erfolgte nun dem Protokoll von Bihari et al. [2008] entsprechend die Sonikation mittels Ultraschallhomogenisator (Sonopuls HD 60, Bandelin, Berlin, D). Die Stammlösung wurde für 120 s bei einem Energieniveau von  $4,2 \times 10^5$  kJ/m<sup>3</sup> im kontinuierlichen Modus behandelt. Gleich im Anschluss wurde als Stabilisator 60 µl bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml hinzugefügt. Um einen physiologischen pH-Wert von 7,4 einzustellen, wurden 200 µl 10-fach konzentriertes PBS dazu pipettiert.

Die NP-Suspension musste nun möglichst zeitnah für die Exposition mit Zellkulturmedium verdünnt und in entsprechender Konzentration auf die Zellen gegeben werden.

## 2.4 Charakterisierung der Nanopartikel

Das Verhalten von NP in Zellkulturmedium ist sehr komplex und eine Interferenz der Partikel mit den Testverfahren ist denkbar. Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu ermöglichen, ist eine exakte Charakterisierung der verwendeten NP essentiell. Neben der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden in dieser Arbeit die Messung des Zetapotentials und der Agglomerationseigenschaften sowie eine Analyse der Partikelsedimentation in Zellkulturmedium durchgeführt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Dissolutionsrate durch Messung gelöster Zink-Ionen ( $Zn^{2+}$ ) für die verwendeten Testkonzentrationen.

Intrazelluläre Partikelverteilung und -morphologie in FaDu-Zellen nach NP-Exposition wurden durch die TEM beurteilt. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP behandelt. Nach Trypsinisierung und Zentrifugation wurde das Zellpellet in einer 0,1 M Lösung bestehend aus 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % Formaldehyd für 45 Minuten fixiert. Nach einer weiteren Fixationsperiode mit 2 % Osmiumtetroxid in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,2) für 2 Stunden bei 4°C wurden die Zellen über Nacht mit 0,5 % wässrigem Uranylacetat gefärbt. Die Proben wurden nun in Ethanol entwässert und in Epon 182 eingebettet. Im Anschluss an die Aufarbeitung in ultradünne Schnitte erfolgte die Analyse von Form, Größe und Aggregationseigenschaften an einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Carl Zeiss, Oberkochen, D) in der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Biozentrums der Universität Würzburg. Weiterhin wurden die Größenverteilung von NP-Aggregaten sowie das Zetapotential mittels dynamischer Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, „DLS“) im Fraunhofer-Institut für Silicatforschung ISC Würzburg ermittelt. Diese Messgrößen sind von Bedeutung für die Sedimentation der Partikel und deren zellulärer Aufnahme. Als Zetapotential wird das elektrostatische Potential

bezeichnet, das an der Abscherschicht sich bewegender Partikel in Suspension auftritt im Vergleich zur Lösungsumgebung [Clogston und Patri, 2011]. Das Zetapotential gilt als Kriterium für die elektrostatische Stabilität einer Lösung und wird bei nanotoxikologischen Untersuchungen bestimmt, um nachvollziehbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Unter Testbedingungen in wässriger Lösung ist zu beachten, dass nicht alle NP die Zellen erreichen. Die Ablagerung der Partikel ist unter anderem abhängig von der Dichte der Agglomerate. Um zeitabhängige Effekte in Korrelation zum Absetzungsverhalten der Partikel beurteilen zu können, wurde eine Sedimentationsanalyse in Zellkulturmedium durchgeführt. Hierfür wurde eine Dispersion mit 10 µg/ml ZnO-NP hergestellt und die Absorption nach Sonikation bei 490 nm mit einem TECAN Multimode-Microplate-Reader Infinite® M1000 PRO im Fraunhofer-Institut Würzburg bestimmt. Als Referenz diente reines Zellkulturmedium mit den üblichen Zusätzen. Die Messung erfolgte zu 4 Zeitpunkten (0, 4, 8, 12 Stunden) an einer Stelle 1,5 cm oberhalb des Küvettenbodens, sodass lediglich der Überstand der Probe analysiert wurde. Der prozentuale Anteil der nicht-sedimentierten Partikel wurde ermittelt, wobei die Messung zum Zeitpunkt 0 Stunden als 100 % sowie das reine Zellkulturmedium als 0 % festgelegt wurden.

Um den Einfluss im Medium gelöster Zn<sup>2+</sup>-Ionen beurteilen zu können, wurden die Ionenkonzentrationen mittels Atomabsorptionsspektrometrie im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg einmalig bestimmt. Hierfür wurde RPMI 1640 Medium mit ZnO-NP in den verwendeten Versuchskonzentrationen versetzt und nach den entsprechenden Zeiträumen für 5 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die Messung löslicher Zn<sup>2+</sup>-Ionen erfolgte daraufhin aus den Überständen der Proben. Um zu evaluieren ob die Zellvitalität durch im Medium gelöste Ionen beeinflusst wird, wurde ein exemplarischer Versuch durchgeführt. Hierfür wurden FaDu-Zellen mit dem Überstand des Mediums inkubiert, welches zuvor zwischen einer und 48 Stunden mit 20 µg/ml ZnO-NP versetzt gewesen war. Nach Ende der Exposition wurde ein [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] (MTT)-Test durchgeführt.

## 2.5 Zytotoxizitätsbestimmung durch den MTT-Test

Zum Nachweis zytotoxischer Effekte und zur Ermittlung geeigneter Fremdstoffkonzentrationen für die weiteren Versuche an FaDu-Zellen wurde der MTT-Test durchgeführt.

### 2.5.1 Grundlagen

Der MTT-Test ist ein einfacher quantitativer kolorimetrischer *in vitro* Test zur Evaluation der metabolischen Aktivität von Zellen. Er wird hauptsächlich zur Bestimmung von Zellvitalität und -proliferation eingesetzt. Der 1983 erstmals von Mosmann beschriebene Versuch beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu wasserunlöslichem blau-violett gefärbtem Formazan [Mosmann, 1983].

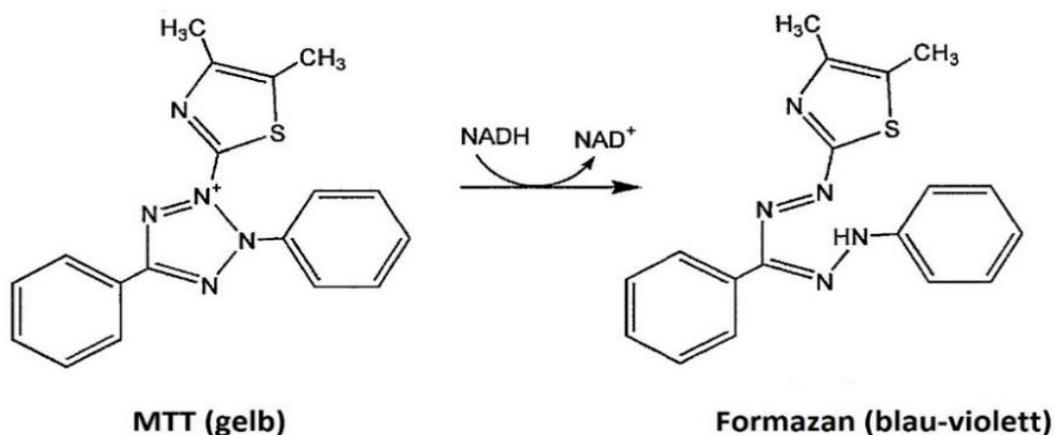


Abbildung 4: Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zu Formazan, einem Redox-Indikator. Modifiziert nach Riss et al. [2013].

Die Aufnahme und reduktive Spaltung des Stoffes erfolgt nur in lebenden Zellen. Die spektrophotometrisch erfasste Intensität der Färbung korreliert mit der metabolischen Aktivität und Vitalität der Zellen. Es wird angenommen, dass die Reduktion des Tetrazoliumsalzes hauptsächlich mithilfe der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH erfolgt. Somit ist die Umsetzung des Farbstoffs abhängig von

der Glykolyserate und der damit einhergehenden Produktion von NADH und NADPH [Berridge und Tan, 1993].

### 2.5.2 Fremdstoffexposition der Tumorzellen

Für die Fremdstoffexposition wurden zunächst Zellen in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. In jede Vertiefung wurden 100 µl Zellsuspension mit je  $1 \times 10^5$  Zellen pipettiert. Am folgenden Tag wurden die mittlerweile adhärennten Tumorzellen mit ZnO-NP für eine Dauer von 24 Stunden behandelt. Abbildung 5 veranschaulicht das Inkubationsschema. Adäquate NP-Konzentrationen waren im Rahmen von Vorversuchen aus einer umfanglicher angelegten Testung ausgewählt worden.

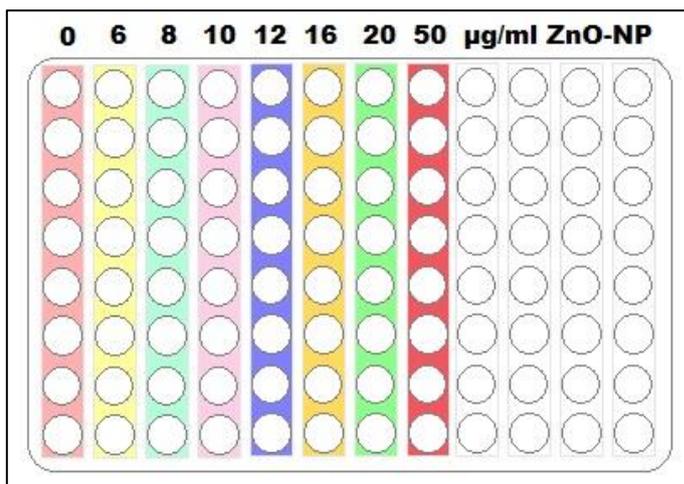


Abbildung 5:

Schema für die Inkubation der Tumorzellen mit ZnO-NP. Die Zellen der ersten Spalte dienen als Negativkontrolle. In die jeweils acht untereinander angeordneten Wells der zweiten bis achten Spalte wurde je die gleiche Dosis NP für die Dauer von 24 Stunden hinzugegeben.

### 2.5.3 Durchführung des Tests

Für den MTT-Test wurden 10 mg MTT (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in einem lichtdichten Röhrchen in 10 ml RPMI Medium ohne FCS-Zusatz gelöst. Um eine Interferenz der NP in der Versuchsdurchführung zu vermeiden, wurde nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 Stunden das Medium in jedem Well der Mikrotiterplatte durch 100 µl der MTT-Lösung ausgetauscht und die Platte vier Stunden lang im Brutschrank bei 37°C gelagert [Ahamed et al., 2011]. Am Boden der Vertiefungen hatten sich nun die blau-violetten Formazan-Kristalle gebildet, die nach dem

Absaugen des Mediums und Zugabe von 100 µl Isopropanol (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, F) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelöst wurden. Um die NP aus der Lösung zu entfernen, wurde der Inhalt der Wells mit identischen Konzentrationen in ein Eppendorfgefäß pipettiert, bei 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend in eine neue 96-Well-Platte überführt, sodass die nun abgelagerten NP im Eppendorfgefäß verblieben. Der Farbumschlag des Formazans wurde photometrisch mit einem *enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reader* (ELISA Mikroplatten Reader, ELx800, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

#### 2.5.4 Auswertung

Die Auswertung des Zytotoxizitätstests erfolgte direkt nach der photometrischen Messung mit Hilfe der Gen5 Datenanalyse Software (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D). Anhand der Messung der Farbintensität war es möglich, das Ausmaß der Zytotoxizität zu quantifizieren. Hierzu wurde die relative Zellvitalität (in %) der mit NP behandelten Proben im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet:

$$[A]_{\text{behandelt}} / [A]_{\text{unbehandelt}} \times 100$$

$[A]_{\text{behandelt}}$  stellt die Absorption der fremdstoffexponierten Probe dar und  $[A]_{\text{unbehandelt}}$  die Absorption der Negativkontrolle.

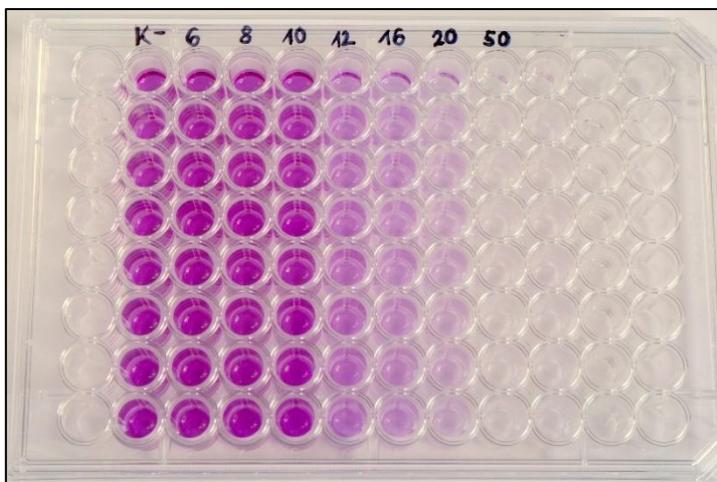


Abbildung 6:  
Mikrotiterplatte mit  
Negativkontrolle sowie sieben  
NP-behandelten Ansätzen nach  
Durchführung des MTT-Tests.  
Die Intensität der Färbung  
korreliert mit der Vitalität der  
Zellen.

## 2.6 Apoptosemessung durch Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Differenzierung und Quantifizierung von vitalen und toten Zellen nach Fremdstoffexposition. Die Fraktion der Zellen, die vital sind, kann so von früh- und spät-apoptotischen unterschieden werden.

### 2.6.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie mit Annexin-V/Propidiumiodid-Markierung

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) bezeichnet, ist eine Technik zur Analyse physikalischer und molekularer Zelleigenschaften. Sie basiert auf dem Prinzip der Erfassung von Lichtstreuung und Fluoreszenzsignalen ausgehend von Zellen, die von einem Laserstrahl angeregt werden. Es kann zwischen zwei Streulichtparametern, dem Vorwärtsstreulicht und dem Seitwärtsstreulicht unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht stellt die Lichtstreuung in engem Winkel zum Laserlicht dar und ist in etwa proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht ist abhängig von der zellulären Granularität und Binnenstruktur. Durch Markierung eines speziellen Zellmerkmals mit einem Antikörper, der mit einem Fluoreszenzmolekül gekoppelt ist, können weiterhin über die Erfassung der Fluoreszenzemission spezifische Oberflächenmarker analysiert werden [Herzenberg et al., 1976]. Die zu messende Zellsuspension wird durch Verjüngung der Messkapillare in einem Hüllstrom fokussiert, sodass die Zellen sequenziell im rechten Winkel an der Lichtquelle, einem Argon-Laserstrahl mit einem Emissionsmaximum von 488 nm, vorbeigeführt werden. Nachgeschaltete optische Detektoren erfassen die Fluoreszenzintensität sowie die Streuung des Anregungslichts.

Der Vorgang der Apoptose wird durch spezifische zellmorphologische Veränderungen charakterisiert. Unter anderem kommt es zur Kondensation des Zellkerns, Schrumpfung der Zelle und Veränderungen der Plasmamembran, wobei letztere ein sehr frühes Merkmal ist. Es kommt zur Translokation des Membran-Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin-V ist ein phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu PS [Vermees et al., 1995]. Durch die Kopplung von Annexin-V an den

Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) können mittels Durchflusszytometrie apoptotische Zellen bereits in frühen Stadien registriert werden. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen differenzieren zu können, wurde in den Versuchsaufbau ein zusätzlicher Farboxklusionstest integriert. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran ein, es werden also nur spät-apoptotische und nekrotische Zellen angefärbt [BD-Biosciences, 2011b]. Mit dieser Kombination können früh-apoptotische (Annexin-V positiv, PI negativ) von spät-apoptotischen und nekrotischen (Annexin-V positiv, PI positiv) Zellen unterschieden werden.

### 2.6.2 Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung

Für die Annexin-V/Propidiumiodid-Durchflusszytometrie wurden Tumorzellen der Zelllinie FaDu verwendet. In jedem Versuch wurden 6 Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten mit je 5 NP-Konzentrationen sowie die Messung einer Negativkontrolle aus unbehandelten Zellen durchgeführt. Es wurden sechs 6-Lochplatten mit Tumorzellen bestückt, wobei jede Vertiefung etwa  $1 \times 10^5$  Zellen beinhaltete. Die Platten wurden 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die NP-Exposition erfolgte anschließend für 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden mit den Konzentrationen 8, 10, 12, 16 und 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Für die jeweilige Messung wurde zunächst das überstehende Medium der Wells in FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, D) pipettiert. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die nach längerer Inkubationszeit und bei höheren NP-Konzentrationen schon abgelösten Zellen in der Probe erhalten blieben. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml PBS gewaschen, mit 500  $\mu\text{l}$  Trypsin für 3 Minuten vom Plattenboden abgelöst und die Reaktion mit 1 ml RPMI Medium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden zu dem entsprechenden FACS-Röhrchen hinzugefügt, das schon das Medium enthielt. Die Proben wurden nun für 5 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Das überstehende Medium wurde nach dem Zentrifugieren in ein Becherglas abgekippt und das Röhrchen an einigen Tüchern abgestreift, sodass möglichst wenig Medium zurück in das Röhrchen fließen konnte. Nach zwei Waschschr

mit PBS wurde in jedes Röhrchen 100 µl Annexin-V binding-buffer (BD Biosciences, Heidelberg, D) pipettiert, welcher zuvor in einer 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt worden war. Zum Färben erfolgte die Zugabe von je 5 µl Annexin-V-APC (BD Biosciences, Heidelberg, D) und 5 µl PI (BD Biosciences, Heidelberg, D). Nach vorsichtigem Vermischen wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und abschließend nochmals 400 µl Annexin-V binding-buffer hinzugefügt. Die Messung erfolgte im Anschluss am Durchflusszytometer BD FACSCanto (BD Biosciences, Heidelberg, D).

### 2.6.3 Auswertung

In jeder Probe wurden im Durchflusszytometer  $1 \times 10^5$  Zellen analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der FACSDiva Software (BD Biosciences, Heidelberg, D). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

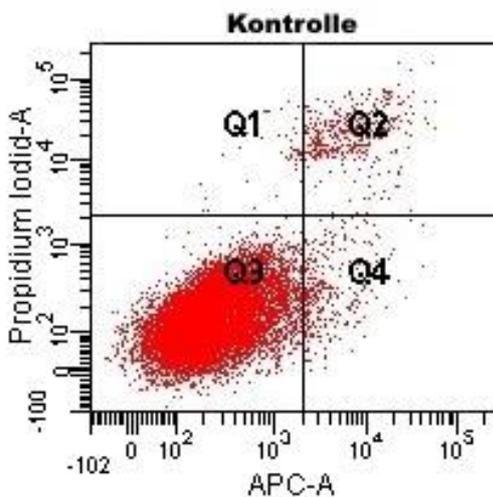


Abbildung 7:

Dotplot-Graphik der Apoptosemessung mit Annexin-V/ PI-Färbung.

Quadrant **Q3** beinhaltet die vitalen Zellen (Annexin-V neg./PI neg.);

**Q4** repräsentiert die früh-apoptotischen Zellen (Annexin-V pos./PI neg.);

Quadrant **Q2** zeigt die spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen (Annexin-V pos./PI pos.)

## 2.7 Zellzyklusanalyse

Zur Prüfung der Hypothese, ob ZnO-NP Einfluss auf den Zellzyklus haben, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen durchgeführt.

### 2.7.1 Grundlagen der Zellzyklusanalyse

Nach Anfärben der zellulären DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist es möglich, durch Messung der Fluoreszenzintensität Aussagen über den Ploidiegrad einer Zelle zu treffen. Als Farbstoff wurde in dieser Arbeit PI verwendet, welches sich als Interkalator in doppelsträngige DNA einlagert. Da sich PI unspezifisch verhält und somit auch an doppelsträngige RNA binden kann, ist es nötig, die Zellen vor der Färbung mit RNase zu behandeln [Fried et al., 1976]. Die registrierte Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional zum DNA-Gehalt der Einzelzelle. Somit kann zwischen Zellen mit diploidem Chromosomensatz ( $G_0/G_1$ -Phase), tetraploidem Chromosomensatz ( $G_2/M$ -Phase) und solchen, die sich gerade in der Phase der DNA-Replikation (S-Phase) befinden unterschieden werden [BD-Biosciences, 2011a].

### 2.7.2 Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung

In Analogie zu den Apoptose-Testansätzen wurden auch bei der Zellzyklusanalyse FaDu-Tumorzellen für 24 Stunden in 6-Lochplatten inkubiert. Pro Well wurden  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät und am Folgetag für 24 Stunden mit NP in den Konzentrationen 4, 8, 10 und 12  $\mu\text{g/ml}$  behandelt. Als Kontrollprobe wurde ein Ansatz ausschließlich mit RPMI Medium inkubiert. Die Vorbereitung der Zellen bis zum Versuchsbeginn verlief ähnlich wie bei den Apoptosemessungen. Die Zellsuspension im FACS-Röhrchen wurde für 5 Minuten bei 500 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand abgekippt.

Nach dem Dekantieren und Waschen des Überstandes wurde in jedes Röhrchen 1 ml 70%-iges Ethanol gegeben und das Pellet durch Verwirbelung mit dem Vortex gelöst. Die Proben wurden anschließend für 2 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln gelagert, bevor sie erneut für 5 Minuten bei 500 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert wurden.

Wieder wurde der Überstand abgekippt und das Pellet daraufhin in 500 µl PI/RNase Staining Buffer (BD Biosciences, Heidelberg, D) aufgenommen und vermischt. Es folgte erneut eine Inkubation von 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln und anschließend unmittelbar die Messung der Proben am Durchflusszytometer.

### 2.7.3 Auswertung

Die Auswertung der Zellzyklusanalyse wurde mit der FACSDiva Software durchgeführt. In jeder Probe wurden  $1 \times 10^5$  Zellen analysiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

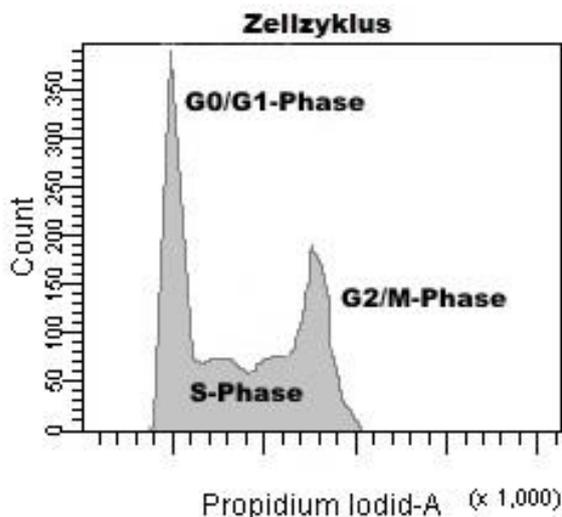


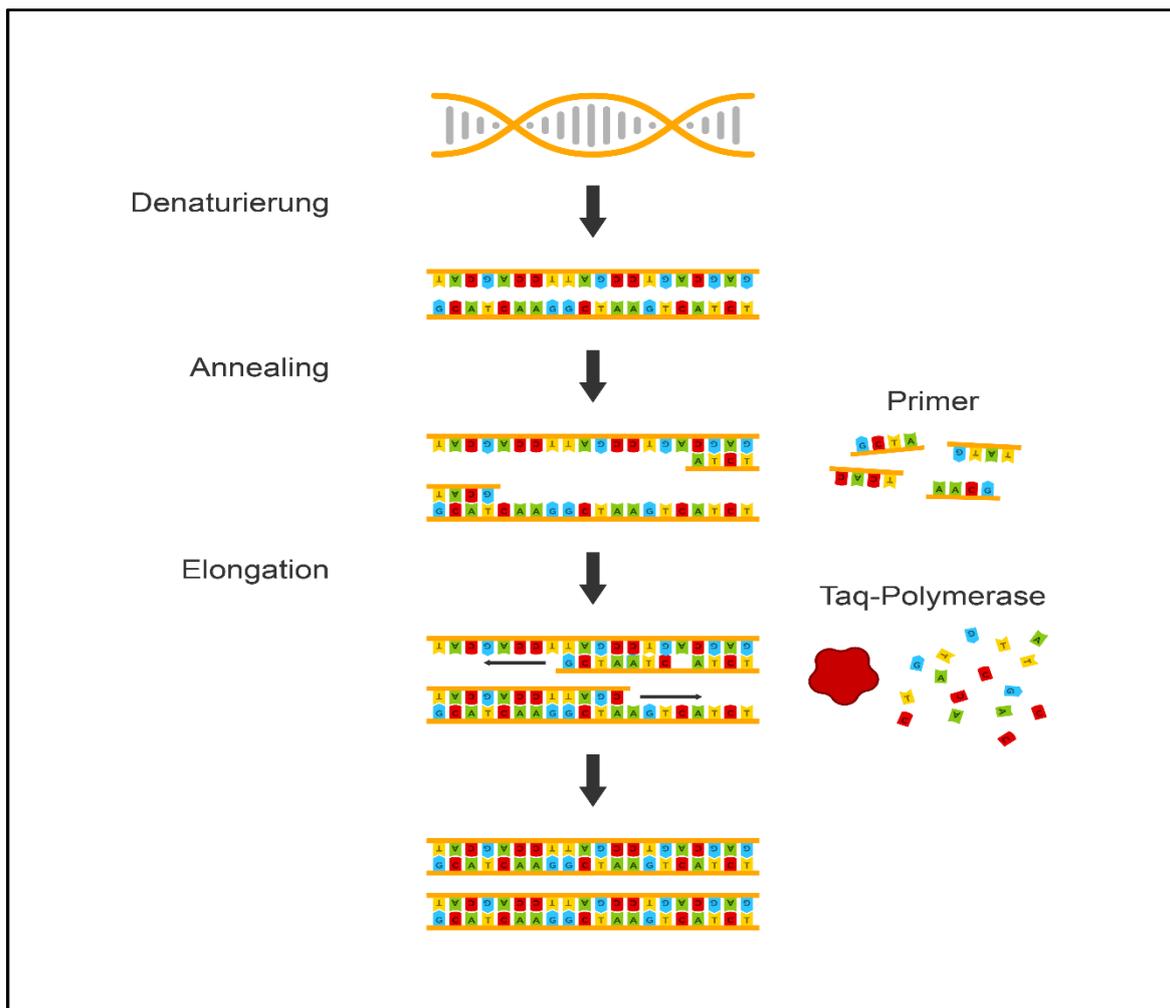
Abbildung 8:  
Histogramm einer Zellzyklusanalyse. Auf der y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Zellen aufgetragen, die x-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität. (Quelle: eigene Darstellung)

## 2.8 Nachweis der Caspase-3 Aktivität durch quantitative RT-PCR

Die Apoptose stellt einen der Hauptmechanismen des NP-vermittelten Zelltodes dar. Mithilfe der quantitativen RT-PCR ist es möglich, Veränderungen der Expression eines Zielgens im Verlauf der Inkubation mit einem Fremdstoff zu bestimmen. In diesem Fall wurde die Expression von Caspase-3 gemessen, da diese als Schlüsselenzym im Rahmen von Apoptosevorgängen exprimiert wird. Die Genexpression von Caspase-3 in FaDu-Zellen wurde nach Exposition mit ZnO-NP zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

### 2.8.1 Grundlagen

Der Begriff RT-PCR bezeichnet die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit vorheriger Generierung von cDNA aus RNA mittels reverser Transkription. Die PCR als Verfahren zur exponentiellen Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen wurde 1983 erstmals von Kary B. Mullis erörtert [Mullis, 1987]. Während einer PCR wird das natürliche Prinzip der DNA-Replikation in drei sich wiederholenden Schritten nachgeahmt. Diese sind in Abbildung 9 dargestellt.



*Abbildung 9:* Prinzip der Polymerase Kettenreaktion. Nach Trennung (Denaturierung) des DNA-Doppelstrangs erfolgt die Anlagerung (Annealing) komplementärer, genspezifischer Primer an die Einzelstränge. Bei der Elongation werden durch die Taq Polymerase die freien Stränge mit Nucleotiden komplettiert. (Quelle: eigene Darstellung)

Der erste Schritt besteht in der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 90-95°C, gefolgt von der Anlagerung zweier gegenläufiger komplementärer Oligonukleotide, so genannter Primer, an die DNA-Einzelstränge bei 55-60°C. Mit den Primern als Startmoleküle, die spezifisch für das untersuchte Gen sind, folgt nun bei einer

Temperatur von 72°C die Elongation der Zielsequenz durch eine rekombinante, hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, die Taq Polymerase genannt wird. In einem vollautomatischen Thermocycler wird dieser Zyklus bis zu 40 Mal wiederholt und die Ausgangssequenz exponentiell amplifiziert. Die ursprünglich von Mullis beschriebene Technik funktionierte auf dem Prinzip der Vervielfältigung und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid war es möglich, über die Analyse der Farbintensität und Größe der Banden, eine Aussage über die Fragmentmenge zu treffen. Bei dieser Methode war es nicht möglich die Ausgangs-DNA-Menge zu quantifizieren, sondern lediglich die Endpunkte der Versuche zu vergleichen. Um eine genauere Quantifizierung der anfänglichen DNA-Menge zu ermöglichen, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält (Template), wurde 1992 von Higuchi et al. ein neues Verfahren vorgestellt, bei dem der PCR Ethidiumbromid zugefügt wurde. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und gibt ein Fluoreszenzsignal ab, das proportional zur vorhandenen DNA-Menge ist. Somit konnte erstmals simultan DNA amplifiziert und das Produkt detektiert werden.

Für die heutige real-time PCR stehen viele verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde eine so genannte Hydrolysierungssonde (TaqMan<sup>®</sup>-Sonde) verwendet. Die TaqMan-Sonde ist ein zur cDNA komplementäres Oligonukleotid, an dessen 5'-Ende ein so genannter Reporter- und am 3'-Ende ein Quencher-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Bei Lichtanregung gibt der Reporter einen Teil seiner Energie an den in ausreichender Nähe befindlichen Quencher ab, sodass die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt wird. Bei fortschreitender Elongation kommt es durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zur Hydrolyse des Reporters, woraufhin sich dieser vom Quencher entfernt und eine proportional zu Amplifikation ansteigende Reporter-Fluoreszenz verzeichnet werden kann [Livak et al., 1995].

Zur Quantifizierung der DNA-Startmenge stehen bei der quantitativen RT-PCR prinzipiell zwei Strategien zur Verfügung. Die absolute und die relative Quantifizierung, wobei letztere in vorliegender Arbeit eingesetzt wurde. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf ein weiteres, von

sämtlichen Vorgängen unbeeinflusstes Haushaltsgen bezogen. Dies hat den Vorteil einer Reduktion der Varianz der Expressionsergebnisse, da beispielsweise unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Fehler bei der cDNA-Synthese innerhalb einer Probe sowohl das Zielgen, als auch das Haushaltsgen betreffen. Zunächst wurde dafür der so genannte  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“) bestimmt. Als  $C_T$ -Wert wird der PCR-Zyklus bezeichnet, bei dem die registrierte Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Die Berechnung der relativen Expression des zu untersuchenden Gens erfolgte dann nach der Delta-Delta-CT-Methode [Livak und Schmittgen, 2001]. Die errechnete relative Genexpression wird auch als *fold change* bezeichnet. Mit diesem Wert wird angezeigt, um wie viel kleiner oder größer die Expression des gesuchten Gens einer behandelten Probe verglichen mit der Negativkontrolle ist. Für die Berechnung der relativen Genexpression erfolgt im ersten Schritt die Normierung der Expressionsergebnisse. Der relative Genexpressionsunterschied (Ratio) zwischen behandelter Probe und Negativkontrolle, normalisiert zum Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ergibt sich aus der arithmetischen Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{behandelte Probe}) - \Delta CT (\text{Negativkontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 2.8.2 Isolation von RNA

Vor dem Schritt der eigentlichen Gen-Amplifikation, musste aus den Proben zunächst die RNA extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die RNA-Isolierung wurde mit dem Quiagen RNeasy Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Das Isolationsprinzip beruht auf dem Einsatz spezieller Puffersysteme, welche ermöglichen, dass bis zu 100  $\mu\text{g}$  RNA mit einer Länge von mindestens 200 Basenpaaren an eine Silikon-Gel-Membran binden kann. Auf diese Weise ist es möglich, vor allem mRNA, welche aus mehr als 200 Basenpaaren besteht, anzureichern. Durch Zugabe von 70%-igem Ethanol

wird die selektive Anlagerung der RNA an die Membran erleichtert, diese über mehrere Zentrifugierungsschritte weiter aufbereitet und von kleineren RNA-Molekülen, wie beispielsweise tRNA oder rRNA, gereinigt. Zur Durchführung der RNA-Isolierung wurden zunächst 600 µl RLT Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, D) zur Zell-Lyse auf jedes Pellet gegeben und dieses resuspendiert. Für mindestens 30 Minuten mussten die Proben anschließend bei 37°C im Schüttelinkubator (BIOER technology, Hangzhou, CN) inkubiert werden, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Um optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silikon-Membran zu schaffen, wurden 600 µl 70 %-iges Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) hinzugefügt und die Lösung durch langsames Auf- und Abpipettieren vermischt. 600 µl dieses Lysat-Ethanol-Gemischs wurden nun in eine RNeasy Spin-Säule (Qiagen GmbH, Hilden, D) pipettiert und für 15 Sekunden mit 13000 rpm zentrifugiert. Die RNA hatte sich nun an die Membran der Spin-Säule angelagert, sodass der Durchlauf, der sich im Sammelröhrchen befand, verworfen werden konnte. Der Vorgang des Zentrifugierens und Verwerfens des Durchflusses wurde mit 600 µl Lysat in der gleichen Säule wiederholt. Nun folgten mehrere Waschschriffe zur Reinigung der RNA, wobei der Durchfluss nach dem Zentrifugieren jedes Mal verworfen wurde. Zunächst wurden 700 µl RW1 Waschpuffer (Qiagen GmbH) auf die Säule gegeben und 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl ethanolhaltiger RPE Waschpuffer (Qiagen GmbH) hinzugefügt und ebenso für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Der letzte Waschschriff erfolgte erneut mit 500 µl RPE Puffer, wobei diesmal für 2 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert wurde. Zuletzt musste die gebundene RNA aus der Silikon-Membran der RNeasy-Säule gelöst werden. Dazu wurde die Säule aus dem Sammelröhrchen genommen, auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und 50 µl RNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Nach Zentrifugieren für eine Minute bei 13000 rpm, befand sich die isolierte RNA im Eppendorfgefäß, sodass die Säule nun verworfen werden konnte. Die extrahierte RNA wurde nun auf Eis gestellt, anschließend wurde mit dem Protokoll für die cDNA-Transkription fortgefahren.

### 2.8.3 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer spezifischen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ist es möglich, aus RNA komplementäre cDNA herzustellen. Nach Anlagerung eines Primers, einem kurzen, zur RNA komplementären DNA-Abschnitt, synthetisiert die Reverse Transkriptase einen DNA-Hybridstrang zur RNA-Matrize. Nach Anlagerung eines zweiten Primers an diesen cDNA-Einzelstrang wird mittels DNA-abhängiger DNA-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang zum schon bestehenden cDNA-Einzelstrang hergestellt.

Für die cDNA-Synthese wurde isolierte RNA, RNase- und DNase-freies Wasser (Diethylcarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O) sowie Master Mix (SuperScript® VILO Mastermix, Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA) benötigt. DEPC-H<sub>2</sub>O wurde durch Vermischen von 1 ml Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und einem Liter destilliertem Wasser über Nacht und anschließend Autoklavieren hergestellt. Der Master Mix beinhaltet unter anderem das Enzym Reverse Transkriptase, Primer und Desoxyribonukleotidtriphosphate.

Zunächst musste der RNA-Gehalt in den Proben bestimmt werden. Dazu wurden 79 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 1 µl isolierte RNA in einer UVette (Eppendorf AG, Hamburg, D) vermischt und die optische Dichte der Probe im Photometer (Eppendorf AG, Hamburg, D) bestimmt. Als Referenz dienten 80 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Als Zielwert wurden 50 ng RNA festgelegt und das entsprechende Volumen RNA mit 30 µl DEPC gemischt. In speziellen Reaktionsgefäßen (Fast Reaction Tubes, Micro Amp 8 Cap strips, Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA) wurden nun pro Ansatz der Reihe nach folgende Anteile hinzugefügt, wobei jede Probe als Duplikat angesetzt wurde: 4 µl Master Mix, die Menge verdünnter RNA, die 50 ng entsprach und die entsprechende Menge DEPC-H<sub>2</sub>O, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben in das RT-PCR-Gerät (StepOnePlus Real-Time PCR System, Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA) gegeben und das Programm für die cDNA-Synthese gestartet. Es wurden drei Zyklen bei verschiedenen Temperaturen durchlaufen. Während eines 5-minütigen Durchgangs bei 25°C erfolgte die

Denaturierung der RNA. Im zweiten Schritt wurde in 30 Minuten bei 42°C die cDNA synthetisiert und abschließend durch 5-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 85°C die Reaktion durch Enzymdenaturierung gestoppt.

#### 2.8.4 Fremdstoffexposition und Durchführung

Zur Analyse der Caspase-3 Aktivität wurden Tumorzellen der FaDu-Zelllinie verwendet. Für 24 Stunden wurden je  $1,8 \times 10^6$  Zellen in mittelgroßen Zellkulturflaschen mit 10 ml RPMI Medium ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 20 µg/ml ZnO-NP für 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst. Das zuvor abpipettierte Medium und die Zellsuspension wurden anschließend für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet konnte nun bei -80°C eingefroren oder direkt für den Versuch weiterverwendet werden. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Analyse der Caspase-3-Genexpression erfolgte unter Anwendung der TaqMan® Technologie. Die hergestellte cDNA wird dabei mit TaqMan® Gene Expression Assays, welche die genspezifischen Primer und die TaqMan-Sonde enthalten, und TaqMan® Gene Expression Master Mix (beides Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA) vermischt. Der Master Mix beinhaltet neben der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase auch Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), alle Pufferkomponenten, MgCl<sub>2</sub>, einen passiven Referenzfarbstoff (Rox®) und Uracil-DNA Glycosylase (UDG). Für die Caspase-3 Untersuchung wurden folgende TaqMan® Gene Expression Assays ausgewählt, wobei GAPDH als endogene Kontrolle diente:

*Tabelle 1: Verwendete TaqMan Assays mit Angabe der jeweiligen Assay ID und der Referenzsequenz, die in der RefSeq Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information aufgelistet ist.*

Zielgen	Referenzsequenz	Beschreibung	Assay ID
GAPDH	NM_002046.4	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Hs02758991_g1
Caspase-3	NM_004346.3	<i>apoptosis-related cysteine peptidase</i>	Hs00234387_m1

In zwei 1,5 ml Eppendorfgefäßen wurden die Ansätze für Caspase-3 und das Haushaltsgen GAPDH vorbereitet. Für jeden Ansatz mussten 10 µl Master Mix, 1 µl des entsprechenden Assays und 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O enthalten sein, wobei jede Probe als Triplikat angesetzt wurde. Von dieser Mischung wurden je 18 µl in eine Vertiefung einer 96-Well Platte (Micro Amp Fastoptical 96-Well Plate, Applied Biosystems, life technologies GmbH, Darmstadt, D) pipettiert und 2 µl cDNA hinzugefügt. Die Platte wurde nun mit einer Klebefolie abgedeckt (Sarstedt, Nümbrecht, D), für 5 Minuten bei 860 rpm zentrifugiert und anschließend in das RT-PCR Gerät gegeben. Nach Angaben des Herstellers wurden im entsprechenden Programm folgende Stadien durchlaufen: ein Schritt bei 50°C für 2 min, gefolgt von einem weiteren Schritt zur Aktivierung der Polymerase für 10 min bei 95°C und 40 Zyklen zur Amplifikation mit jeweils einem Denaturierungsschritt für 15 Sekunden bei 95°C und einem Hybridisierungs- und Elongationsschritt für 1 min bei 60°C. Der Versuch wurde insgesamt vier Mal durchgeführt.

## 2.9 Untersuchung genotoxischer Effekte durch oxidativen Stress

Genotoxizität spielt im Zusammenhang mit NP-assoziierten Zellschädigungsmechanismen eine entscheidende Rolle, da DNA-Schäden zu Mutationen und Karzinogenese führen können. Oxidativer Stress kommt hierbei als möglich Ursache von Genomschäden in Frage. Zur Prüfung, ob ZnO-NP DNA-Schäden induzieren und ob diese Folge von oxidativem Stress sind, wurde der alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay (Comet Assay) mit Zusatz des Enzyms fpg eingesetzt.

### 2.9.1 Grundlagen des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assays und Modifikation mit fpg

Der Comet Assay gilt als schnelles, zuverlässiges und vielseitig einsetzbares Instrument zur Detektion von DNA-Schäden und -Reparatur. Erstmals präsentiert wurde das Konzept der Mikrogelelektrophorese 1984 von Ostling und Johanson, um Doppelstrangbrüche in der DNA zu messen [Ostling und Johanson, 1984]. Als

Weiterentwicklung der ursprünglichen Methode, die unter pH-neutralen Bedingungen durchgeführt wurde, stellten Singh et al. 1988 ein neues Protokoll vor, bei dem die Gelelektrophorese in alkalischem Milieu stattfindet. Dies ermöglichte nun auch die Evaluation von DNA-Einzelstrangbrüchen und alkalilabiler Stellen bei Einzelzellen [Singh et al., 1988]. Das Prinzip des Comet Assays beruht darauf, dass die negativ geladene DNA der einzelnen Zellen, die zuvor in Agarose gebettet und lysiert wurden, während der Elektrophorese zur Anode wandern. Fragmentierte DNA mit Strangbrüchen wandert schneller als intakte DNA. Auf diese Weise entsteht nach Anfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop das typische Bild eines Kometen mit Schweif. Je größer die Schädigung der DNA, desto weiter wandern die Fragmente bei der Elektrophorese.

Zum Nachweis speziell durch oxidativen Stress entstandener DNA-Schäden, wurden weitere Modifikationen des Comet Assays vorgestellt. Durch den Einsatz von Reparaturenendonukleasen können oxidierte Purine und Pyrimidine nachgewiesen werden [Collins et al., 1993]. Nach der Lyse werden die Zellen mit bakteriellen Enzymen inkubiert, die spezifisch für bestimmte Arten der oxidativen Schädigung sind. Während die Endonuklease III oxidierte Pyrimidine anzeigt, ist die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (fpg) spezifisch für 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoGua), einem Purin. Das in dieser Arbeit verwendete fpg-Enzym ist ein Basenexzisionsreparaturenzym, das Strangbrüche am Ort der DNA-Schädigung anzeigt, in diesem Fall an der oxidierten Base 8-oxoGua [Boiteux et al., 1990]. Nach der anschließenden Gelelektrophorese kann über den Vergleich der enzymbehandelten Proben mit lediglich pufferinkubierten Proben das Vorhandensein oxidierter Basen erkannt werden [Collins et al., 1996].

### 2.9.2 Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen

24 Stunden vor Beginn der Versuchsdurchführung wurde ein Elektrophoresepuffer hergestellt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Mindestens eine Stunde vor Beginn der Durchführung des Comet Assays wurde eine Lyselösung angesetzt und ebenfalls kühl gelagert.

Für den Elektrophoresepuffer wurden 120 ml 5 M Natronlauge (NaOH), 10 ml EDTA-Stammlösung (0,2 M) und 1870 ml Aqua bidest. gemischt und bei 4°C

gekühlt. Für die 5 M NaOH-Lösung wurden 200 g Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen (Merck, Schwalbach, D) in 900 ml Aqua bidest. gelöst. Anschließend wurde mit Aqua bidest. zu einer Gesamtmenge von 1 l aufgefüllt. Die 0,2 M EDTA-Stammlösung wurde durch Zugabe von 14,89 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in 180 ml Aqua bidest. hergestellt. Mit NaOH-Plätzchen wurde die Lösung nun auf einen pH-Wert von 10,0 eingestellt. Mit Aqua bidest. wurde anschließend auf eine Gesamtmenge von 200 ml aufgefüllt. Nach Autoklavieren der Lösung konnte diese nun lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die Lyselösung für eine Küvette setzte sich zusammen aus 66,75 ml Lysepuffer, 7,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 0,75 ml Triton X-100 (beides Sigma-Aldrich). Für den Lysepuffer wurde ein Gemisch aus 74,4 g EDTA, 2,4 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) (Merck), 292,8 g NaCl und 67 ml einer 30 %igen N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz-Lösung (Serva, Heidelberg, D) in 1800 ml Aqua bidest. gegeben. Durch Zugabe 5 M NaOH-Lösung wurde ein pH-Wert von 10,0 eingestellt und Aqua bidest. bis zu einer Gesamtmenge von 2 l zugegeben.

Zur Herstellung des TRIS-Neutralisationspuffers wurden 97 g TRIS (Merck) in 1950 ml Aqua bidest. gegeben und durch Titration einer 10 M HCl-Lösung (Merck) ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Nach Auffüllen der Lösung auf 2 l mit Aqua bidest. konnte der TRIS-Puffer autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert werden. Die fpg-Modifikation des Comet Assays erforderte die Herstellung einiger Pufferlösungen. Zunächst musste ein 10-fach Enzympuffer angesetzt werden. Für 100 ml des Puffers wurden 9,5 g 400 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure (HEPES) (Sigma-Aldrich), 7,5 g 1 M Kaliumchlorid (KCl) (Merck) und 186 mg 5 mM EDTA abgewogen und anschließend mit Kaliumhydroxid (KOH) (Merck) ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Die Lösung konnte bei -20°C gelagert werden. Für einen 1-fach Enzympuffer mit 1:10 Verdünnung wurden 9 ml Aqua bidest. zu 1 ml des 10-fach Enzympuffers zugegeben. Um 5 ml des Enzym-BSA-Puffers zu erhalten, wurden 100 µl NEBuffer 1 (mit BSA) (New England Biolabs, Frankfurt, D) mit 4,9 ml des 1-fach Enzympuffers vermischt. Zum Erhalt einer 1:3000 Verdünnung der fpg-Lösung wurde 1 µl fpg (New England Biolabs) zu 3 ml Enzym-BSA-Puffer hinzugegeben.

Als Färbemittel diente GelRed®. 10 µl GelRed®-Stammlösung (Biotium, Fremont, Kalifornien, USA) wurde in 990 µl Aqua bidest. gegeben und anschließend mit 3 ml 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan (DABCO) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemischt. Der Farbstoff wurde bei 4°C lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

### 2.9.3 Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen zur Genotoxizität wurden primäre humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (BMSC) verwendet. Diese wurden am Tag vor der Exposition in 6-Lochplatten mit  $2 \times 10^5$  Zellen in 3 ml DMEM Medium pro Vertiefung angesetzt, um eine ausreichende Adhärenz zu gewährleisten. Die ZnO-NP wurden in den Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml für 24 Stunden hinzugegeben. Als Negativreferenz diente ein ausschließlich mit Medium behandelter Ansatz, für die Positivkontrolle wurden die Zellen eine Stunde mit 300 µM Methylmethansulfonat (MMS) inkubiert. Für die MMS-Lösung wurde zunächst eine 100 mM Stammlösung angesetzt aus 991,6 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und 8,4 µl MMS (Sigma-Aldrich, Steinheim, D). Von dieser Lösung wurden 300 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 700 µl DMSO hinzugefügt. Nun wurden zu den 3 ml Medium des Wells 30 µl der MMS-Lösung zugegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde aus allen Wells das Medium abgesaugt und zum Waschen 1 ml PBS hinzugefügt. Das PBS wurde nach kurzem Schwenken der Platte erneut abgesaugt und 500 µl Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank hatten sich die Zellen vom Boden der Platte abgelöst, woraufhin die Enzymreaktion mit 1 ml DMEM abgestoppt wurde. Nach Überführung der Zellsuspensionen in 5 Eppendorfgefäße, wurden diese für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde so viel vom überstehenden Medium abgesaugt, dass noch etwa 80 µl im Eppendorfgefäß verblieben. Die Proben wurden von nun an auf Eis gelagert, um DNA-Reparaturmechanismen oder zusätzliche Schäden zu vermeiden. Eine ausreichende Zellvitalität von mindestens 80 % wurde vor jedem Versuch mit dem Trypanblauausschlusstest sichergestellt.

Für die Versuchsdurchführung mussten zunächst Objektträger mit Agarose beschichtet werden. Dafür wurden 1,5 g Normal-Melting-Point-Agarose (1,5 %) (Roth, Karlsruhe, D) in 100 ml einfach konzentriertes PBS gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Rückstände mehr sichtbar waren. Objektträger mit doppelseitigem Mattrand (Langenbrinck, Emmendingen, D) wurden bis etwa zur Hälfte in die Agarose getaucht. Die Agarose auf der Unterseite der Objektträger wurde mit einem Tuch abgewischt und diese dann bei Raumtemperatur zum Trocknen ausgelegt.

Die anschließenden Arbeitsschritte erfolgten in lichtgeschützter Umgebung, um UV-Licht induzierte DNA-Schäden bei der späteren Auswertung ausschließen zu können. Die Proben wurden der Reihe nach mit einer Pipette resuspendiert und 30 µl der Zellsuspension mit 270 µl erwärmter Agarose vermischt. Diese wurde hergestellt indem 50 mg Low-Melting-Point-Agarose (0,5 %) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) mit 10 ml einfach konzentriertem PBS in der Mikrowelle erwärmt wurden. Je 60 µl der Agarose-Zellsuspension wurde auf vier Objektträger gegeben und die Proben mit Deckgläsern (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, D) abgedeckt. Nach 3-5 Minuten war die Agarose ausgehärtet und die Deckgläser konnten vorsichtig abgezogen werden. Gleich darauf wurden die Objektträger zwischen einer und 24 Stunden bei 4°C in lichtgeschützte Küvetten mit der frisch angesetzten Lyselösung gestellt. Im Anschluss an drei Waschschrte für je 5 Minuten mit eisgekühltem 1-fach Enzypuffer, wurden je zwei Objektträger einer Probe mit 100 µl Enzym-BSA-Puffer und zwei Objektträger mit 100 µl fpg-Lösung eingedeckt und in einer feuchten Kammer für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden danach kurz in Aqua bidest. getaucht und zur anschließenden Entspiralisierung der DNA und Elektrophorese mit der Agaroseschicht nach oben in eine Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt, D) gelegt. Kurz zuvor war die Kammer in einer Wanne runderherum mit Eis belegt worden und der vorgekühlte Elektrophoresepuffer möglichst blasenfrei eingefüllt worden. Blieben freie Plätze in der Kammer, wurden diese mit unbeschichteten Objektträgern aufgefüllt. Nach 20 Minuten im alkalischen Elektrophoresepuffer war die DNA-Entwindung abgeschlossen und die Elektrophorese konnte gestartet werden. Diese wurde für 20 Minuten bei 25 V und einer konstanten Stromstärke

von 300 mA durchgeführt, wobei die Stromstärke über das Hinzufügen oder Wegnehmen von Elektrophoresepuffer reguliert werden konnte. Anschließend wurden die Objektträger aus der Kammer genommen, kurz abgetropft und für 5 Minuten in TRIS-Neutralisationspuffer überführt. Zur Fixierung wurden die Objektträger abschließend kurz in PBS getaucht und für 10 Minuten in Küvetten mit eiskaltem Methanol gestellt. Die Objektträger konnten nach dem Trocknen für eine Woche in einer lichtundurchlässigen Box gelagert werden. Nach dem Anfärben mit 20 µl GelRed® mussten die Proben dunkel gelagert und direkt ausgewertet werden.

#### 2.9.4 Auswertung des fpg-modifizierten Comet Assays

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (DM4000B, Leica, Heerbrugg, CHE), konnektiert mit einem Computer, konnte durch die Comet 5.5 Software (Kinetic Imaging, Liverpool, UK) die fragmentierte DNA, wie in Abbildung 10 dargestellt, sichtbar gemacht werden. Während die noch intakte DNA im Kopf des Kometen bleibt, stellen sich die gewanderten DNA-Bruchstücke als Kometenschweif dar.

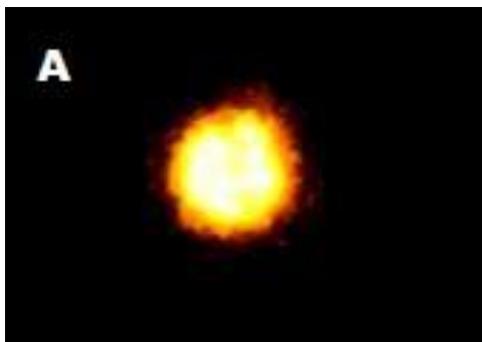
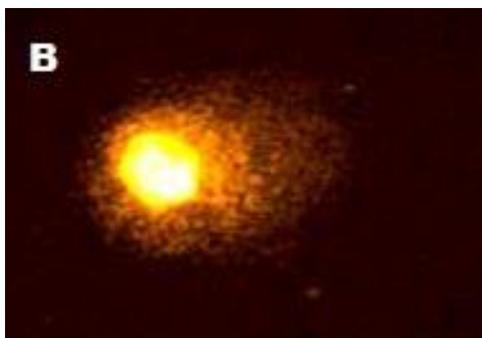


Abbildung 10:  
Darstellung der DNA-Fragmentierung im  
Fluoreszenzmikroskop

A: Gering fragmentierter Zellkern



B: Höhergradige Schädigung der DNA. Die  
Fragmente wandern während der Elektrophorese  
zur Anode und bilden den charakteristischen  
Schweif.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Parameter *Tail DNA* (prozentualer DNA-Anteil im Schweif), *Head DNA* (DNA-Anteil im Kopf), *Tail Length* (Schweiflänge) und *Olive Tail Moment* (OTM) erfasst.

Der OTM wird aus dem Produkt der Schweiflänge und dem Anteil der DNA im Schweif an der Gesamt-DNA berechnet [Olive und Banath, 1993]:

$$\text{Olive Tail Moment} = \text{Tail Length} \times \frac{\text{Tail DNA}}{\text{Tail DNA} + \text{Head DNA}}$$

Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewertet, sodass pro untersuchter Konzentration jeweils 100 Zellen mit und 100 Zellen ohne fpg-Behandlung erfasst wurden. Von den relevanten Parametern wurden die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt.

## 2.10 Statistische Analyse

### 2.10.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse des fpg-modifizierten Comet Assay und des MTT-Tests erfolgte in sogenannten Boxplots, die durch das Programm GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt wurden. Ein Boxplot dient der schnellen Vermittlung eines Eindrucks über die Verteilung der Daten. Er besteht aus der Box, einem Rechteck, in dessen Bereich 50 % der Daten liegen, und sogenannten „Antennen“, die das Rechteck verlängern. Die Begrenzungen der Box werden gebildet durch das obere und das untere Quartil. Ein

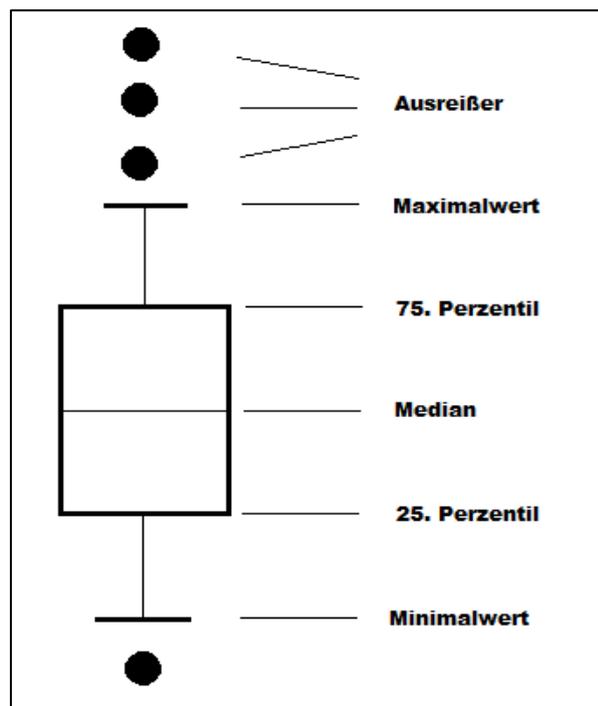


Abbildung 11: Darstellung eines Boxplots. (Quelle: eigene Darstellung)

horizontaler Strich in der Box kennzeichnet den Median, das heißt, 50 % der Werte

liegen über der Linie und 50 % darunter. Die Antennen repräsentieren den größten und den kleinsten Wert innerhalb 1,5 Standardabweichungen vom Median. Werte, die außerhalb 1,5 Standardabweichungen vom Median liegen, werden als Ausreißer bezeichnet und als Kreise dargestellt.

### 2.10.2 Statistische Testverfahren

Für die statistische Auswertung der Daten wurden mit dem Wilcoxon-Test und dem Friedman-Test zwei nicht-parametrische Testverfahren angewandt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm Stata 12 (Stata Corporation LLC, College Station, TX, USA). Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests ist es möglich, zwei abhängige Stichproben dahingehend zu analysieren, ob sie sich in ihrer zentralen Tendenz unterscheiden. So kann beispielsweise für den fpg-modifizierten Comet Assay überprüft werden, ob sich die einzelnen OTM-Werte signifikant von der Negativkontrolle unterscheiden. Um eine Alphafehler-Kumulierung zu verhindern, wurde noch eine Bonferroni-Holm-Korrektur angeschlossen. Dabei wird ein lokales  $\alpha$ -Niveau als Verhältnis von globalem  $\alpha$ -Niveau zur Anzahl der Tests berechnet. Ein p-Wert gilt dann als signifikant, wenn er kleiner ist als sein lokales  $\alpha$ -Niveau. Ist ein p-Wert größer als das lokale  $\alpha$ -Niveau, dann ist dieser und alle nachfolgenden p-Werte nicht mehr signifikant.

Im Friedman-Test können im Gegensatz zum Wilcoxon-Test mehr als zwei verbundene Stichproben auf Unterschiede in ihrer zentralen Tendenz untersucht werden. Bei diesem Rangsummentest wird ebenso die Nullhypothese überprüft, welche die Annahme ist, dass zwischen den getesteten Variablen kein signifikanter Unterschied besteht.

## 2.11 Versuchsspezifische Labormaterialien

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte.

Brutschränke	
CO <sub>2</sub> Inkubator NU5500E	NuAire Inc., Plymouth, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
BD FACSCanto flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, D
Elektrophoresenetzgerät, EV202	Consort, Turnhout, B
Elektrophoresekammern	Renner, Dannstadt, D
ELISA Mikroplatten Reader, ELx800	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED	Leica, Heerbrugg, CHE
Fluoreszenzmikroskop (Comet 5.5), DM4000B	
Heizplatte, M6	CAT/M. Zipperer GmbH, Staufen, D
Küvetten	Brand GmbH, Wertheim, D
Lichtmikroskop Leica DM IL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Membran-Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Mikrowelle	Bauknecht, Schorndorf, D
pH-Meter	Wissenschaftliche-Technische Werkstätte, Weilheim i. Obb., D
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim, D
Schüttelinkubator, Mixing Block MB-102	BIOER technology, Hangzhou, CN
StepOnePlus Real-Time PCR System	Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA
Sterile Werkbank, HERAsafe	Thermo Electron Corporation GmbH, Langenselbold, D
Transmissionselektronenmikroskop EM 900	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Ultraschall-Homogenisator, Sonopuls HD 60	Bandelin, Berlin, D
Vortex, Advanced VR Vortex Mixer ZX4	VELP Scientifica, Usmate, I
Waagen	August Sauter, Ebingen, D
Wasserbad WNB 7-45	Memmert GmbH, Schwabach, D
Zellzählgerät, CASY®	Innovatis, Reutlingen, D

Tabelle 3: Verwendete Software.

Comet 5.5	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
FACSdiva	BD Biosciences, Heidelberg, D
StepOne Software 2.3	Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA

Gen5 Datenanalyse-Software	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
Stata 12	Stata Corporation LLC, College Station, TX, USA
GraphPad Prism 6.0c	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Excel 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Cellcountergefäße, CASY-Cups	Innovatis, Reutlingen, D
Deckgläser 24 x 32 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Einmalpipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
FACS-Röhrchen, Rundbodenröhrchen aus Polystyrol 5ml	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fast Reaction Tubes, Micro Amp 8 Cap strips	Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA
Objektträger ca. 76 x 26 mm	Langenbrinck, Emmendingen, D
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim, D
Pipettenspitzen 0,510 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
QIA RNeasy spin column	Qiagen GmbH, Hilden, D
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
UVette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Multiwell 96-well Platte	Falcon Corning Corp., Corning, NY, USA
6-well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Micro Amp Fastoptical 96-Well Plate	Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien.

Aqua bidestillata	Eigenherstellung
Agarose Medium elektroendosmotisch (MEEO)	Roth, Karlsruhe, D
Agarose Type VII, low melting point (LMP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Annexin-V-APC Annexin-V-Binding-Buffer, 10 x	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Clean BD FACS Flow BD PI/RNase Staining Buffer BD Propidiumiodid Staining Solution (50µg/ml) BD Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Buffer RLT, Lyse Puffer Buffer RW1, Wasch Puffer Buffer RPE, Wasch Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, D
CASY-Ton	Innovatis, Reutlingen, D
DAPCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan)	Roth, Karlsruhe, D
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
GelRed®	Biotium, Fremont, CA, USA
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]6-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Isopropanol	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, F
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Schwalbach, D
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Schwalbach, D
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Schwalbach, D
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Merck, Schwalbach, D
Natronlauge	Merck, Schwalbach, D
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz-Lösung	Serva, Heidelberg, D
NEBuffer 1 (mit BSA)	New England Biolabs, Frankfurt, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10-fach	Roche Diagnostics, Mannheim, D
RNAse freies Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Salzsäure 10M	Merck, Schwalbach, D
SuperScript® VILO Mastermix Taq Man Gene Expression Master Mix	Life Technologies Corp. (Applied Biosystems), Carlsbad, CA, USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck, Schwalbach, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tabelle 6: Verwendete Nährmedien, Zusätze und Enzyme.

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)	Biochrom AG, Berlin, D
Dulbecco's Modified Eagle minimal essential Medium (DMEM)	Life Technologies Corp. (Gibco), Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung (1000 Units/1000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, D
Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung	Biochrom AG, Berlin, D
Natrium-Pyruvat-Lösung (100mM)	Biochrom AG, Berlin, D
FCS (Fetales Kälberserum)	Linaris, Wertheim, D
Trypsin 0,25 %-EDTA 1x	Life Technologies Corp. (Gibco), Carlsbad, CA, USA
Fpg	New England Biolabs, Frankfurt, D

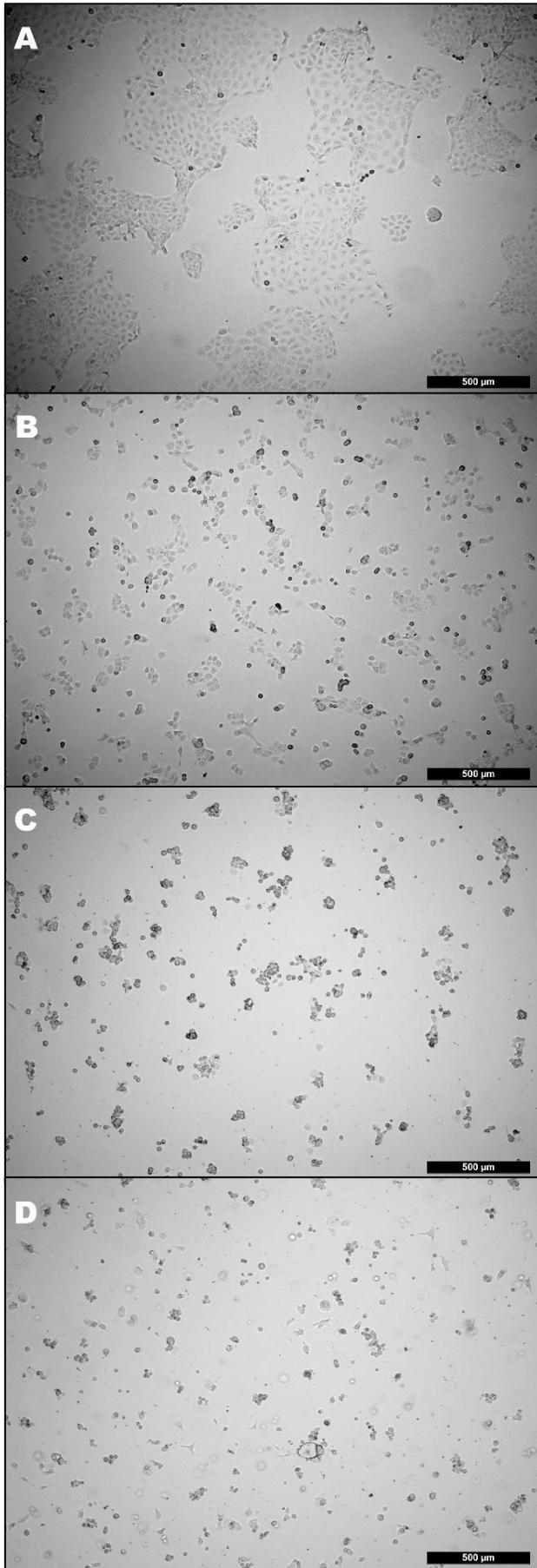
### 3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt der Arbeit werden die ermittelten Ergebnisse sowie deren statistische Auswertung präsentiert. Es wurden Zytotoxizitätsanalysen durch MTT-Test sowie quantitative und qualitative Versuche zu Apoptosemechanismen durch Annexin-V/Propidiumiodid FACS und PCR der Caspase-3-Genexpression in FaDu-Zellen durchgeführt. Weiterhin wurde der Einfluss von ZnO-NP auf den Zellzyklus untersucht. Zur Ermittlung genotoxischer Effekte in BMSC wurden der fpg-modifizierte Comet Assay verwendet. Die erhobenen Messwerte liegen im Anhang in tabellarischer Form im Abschnitt *6.2 Datenübersicht* vor.

#### 3.1 Zellmorphologische Veränderungen durch Zinkoxid-Nanopartikel

Im Rahmen der Analyse der Caspase-3 Aktivität wurden Zellen der FaDu-Zelllinie mit 20 µg/ml ZnO-NP für mehrere verschiedene Inkubationszeiträume behandelt. Bei den regelmäßigen lichtmikroskopischen Kontrollen während der Versuchsdurchführung fielen bereits nach einstündiger Inkubation erste morphologische Veränderungen der Zellen auf. Abbildung 12 veranschaulicht diese Veränderungen im Verlauf der Zeit.

In Bild A ist das adhärente Wachstumsmuster von FaDu-Zellen in Kultur ohne Einfluss von Fremdstoffen erkennbar. Bild B bis D zeigt die Morphologie der Zellen bei zunehmender Inkubationszeit mit 20 µg/ml ZnO-NP. Auf Bild B, das nach einer Stunde Inkubation aufgenommen wurde, wirken bereits einige Zellen in ihrer Größe reduziert und weisen eine kugelige Form auf. Zum Teil hatten diese sich vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und bildeten gruppierte Anhäufungen im Medium. Mit Zunahme der Zeit stieg die Anzahl abgelöster und kugelliger Zellen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme von Bild D wiesen nur noch sehr wenige Zellen Adhärenz zum Flaschenboden auf.

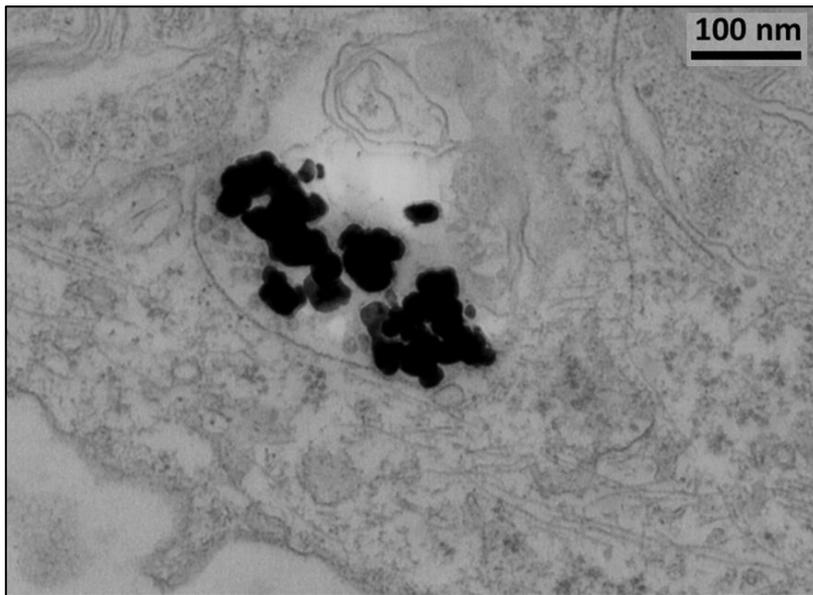


*Abbildung 12:*  
Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen von FaDu-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Exposition mit 20 µg/ml ZnO-NP. Erkennbar ist die Zunahme abgelöster, rundlich geformter Zellen mit steigender Expositionsdauer.

- A:** Unbehandelte Kontrolle
- B:** Nach einer Stunde,
- C:** Nach 6 Stunden,
- D:** Nach 24 Stunden Behandlung mit 20 µg/ml ZnO-NP.

### 3.2 Nanopartikel-Charakterisierung

Physikalische Eigenschaften der verwendeten NP wie Morphologie und Größe sowie deren Aufnahme und Verteilung in Zellen wurde durch die TEM analysiert. Die Partikel lagen in sphäroider Form vor und wiesen entsprechend der Herstellerangaben eine Größe von 20-30 nm auf. NP-Aggregate konnten intrazellulär und zum Teil innerhalb von Zellorganellen detektiert werden. Dies wird in Abbildung 13 veranschaulicht.



*Abbildung 13:* TEM-Dokumentation der intrazellulären Verteilung von ZnO-NP in einer FaDu-Zelle nach Exposition mit 2 µg/ml über 24 Stunden. Die Partikel waren im Zytoplasma, in Vesikeln (hier sichtbar) und teilweise in Zellorganellen nachweisbar.

Der mittlere Durchmesser der Partikelaggregate in Kulturmedium betrug 67,06 nm, das Zetapotential wurde mit -11,2 mV gemessen. Der Polydispersitätsindex (PDI) der Aggregate lag bei 0,136.

Die Analyse der Partikel-Sedimentation ergab, dass der Anteil nicht-sedimentierter NP nach 4 Stunden bei 82 % lag im Vergleich zum Ausgangspunkt (0 Stunden/100 %). Nach 8 Stunden lag der Wert bei 73 % und nach 12 Stunden bei 70 %.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis aus einem exemplarischen Versuch zur Evaluation des Einflusses im Medium gelöster  $Zn^{2+}$ -Ionen auf die Zellvitalität. Es konnte festgestellt werden, dass es im Vergleich zur Negativkontrolle nicht zum Absinken der Zahl vitaler Zellen kam. FaDu-Zellen wurden für eine Stunde mit den Mediumüberständen inkubiert, welche vorher zwischen einer und 48 Stunden mit  $20 \mu\text{g/ml}$  ZnO-NP versetzt gewesen waren.

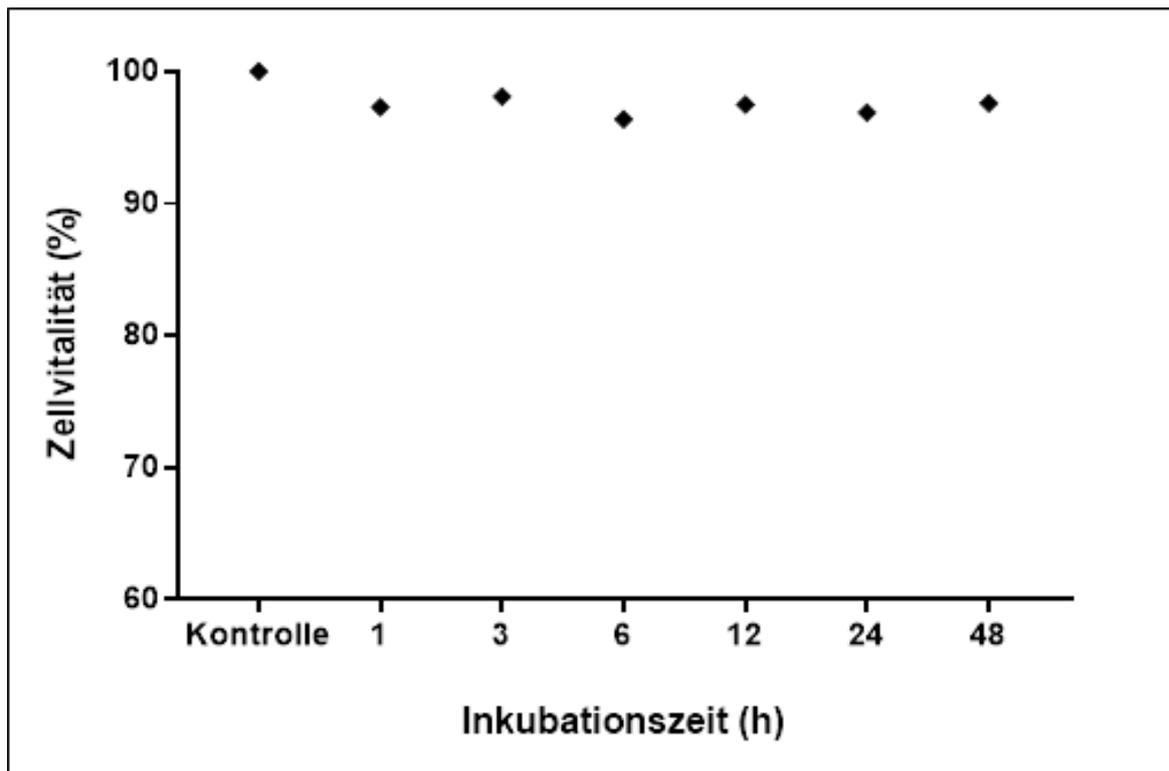


Abbildung 14: Zellvitalitätsmessung durch MTT-Test nach Exposition von FaDu-Zellen mit dem Mediumüberstand, welchem für die Dauer zwischen einer und 48 Stunden  $20 \mu\text{g/ml}$  ZnO-NP zugefügt worden war. Das Diagramm stellt die Resultate einer einzelnen Messung dar und zeigt, dass die Zellvitalität durch Inkubation mit dem Überstand nicht beeinflusst wurde.

Die dosis- und zeitabhängige Bestimmung gelöster  $Zn^{2+}$ -Ionen im Zellkulturmedium ergab, dass sich die Ionen bereits kurz nach Applikation der NP in das Medium herauslösten. Eine Probe reinen Mediums diente als Negativkontrolle. Die Ionenkonzentration lag hier bei  $0 \mu\text{mol/l}$ .

Abbildung 15 demonstriert, dass in jeder der untersuchten Gruppen die Konzentration löslicher Ionen mit zunehmender Zeit und Dosis anstieg, wobei bereits nach einer Stunde ein Großteil davon in das Medium übergetreten war.

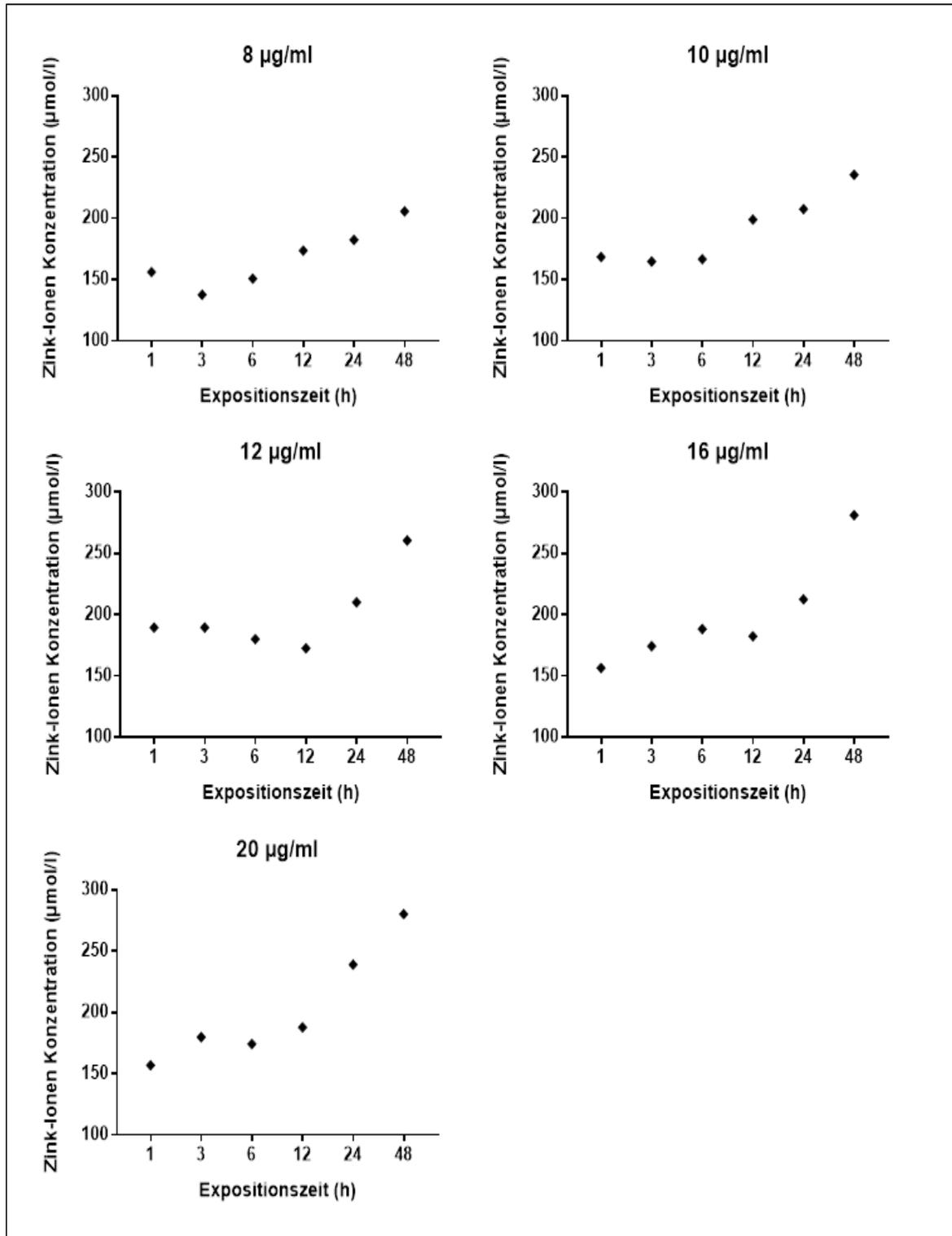


Abbildung 15: Messung gelöster Zn<sup>2+</sup>-Ionen in Überständen von RPMI 1640 Medium, welchem zuvor zwischen einer und 48 Stunden ZnO-NP in den Konzentrationen 8, 10, 12, 16 und 20 µg/ml zugefügt war.

Erkennbar ist ein von der Zeit und der NP-Dosis abhängiger Anstieg im Medium gelöster Zn<sup>2+</sup>-Ionen. Die Daten wurden bei einer Messung erhoben.

### 3.3 Reduktion der Zellvitalität

Zur Evaluation der Zellvitalität nach Inkubation mit ZnO-NP wurde der MTT-Test durchgeführt. Dieser kolorimetrische Test gibt Aufschluss über die Stoffwechselaktivität der Zellen, die wiederum mit der Vitalität korreliert. Hierbei wird die Vitalität der jeweiligen Probe in Relation zu einer unbehandelten Negativkontrolle berechnet, die dementsprechend mit 100 % angegeben wird. In aufsteigenden Konzentrationen wurden Zellen der FaDu-Zelllinie für 24 Stunden mit ZnO NP inkubiert und anschließend die Anzahl lebender Zellen untersucht.

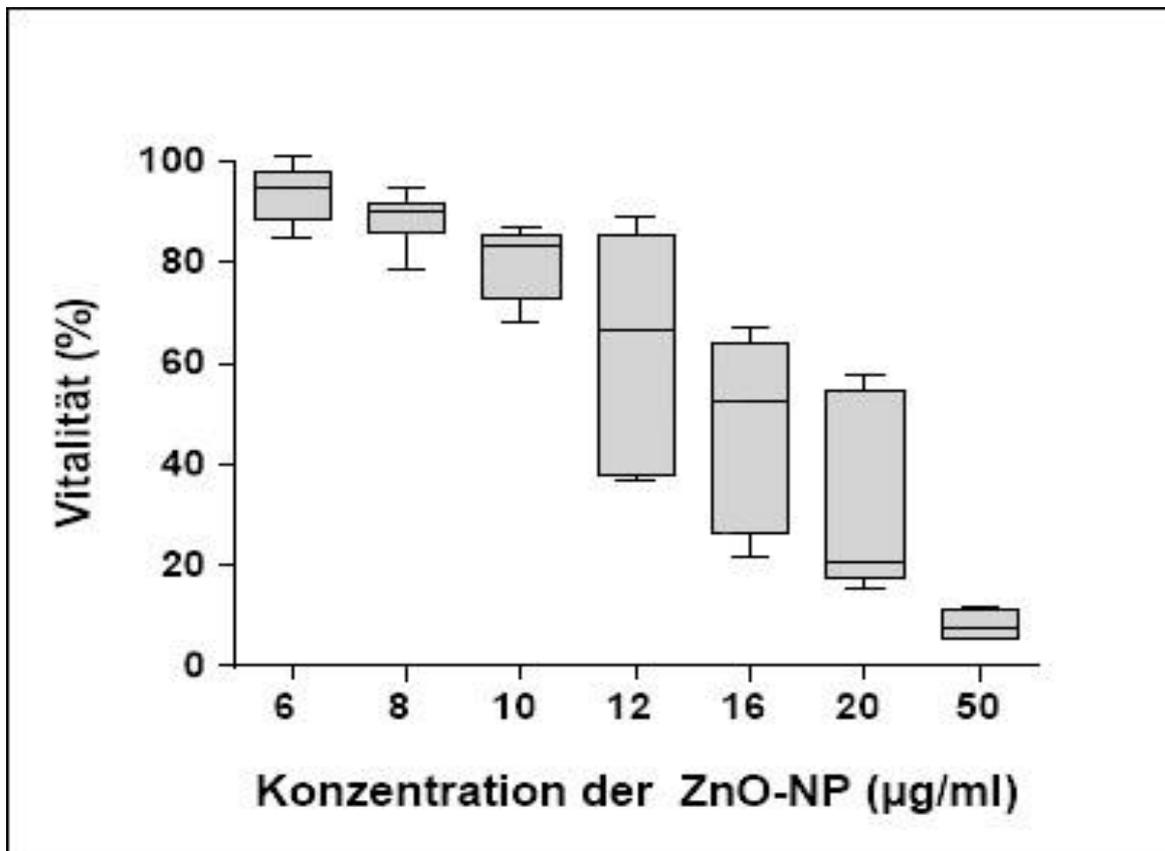


Abbildung 16: Anteil vitaler FaDu-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit ZnO-NP bezogen auf die Negativkontrolle, welche mit einer Vitalität von 100 % definiert wurde. Die getesteten NP-Konzentrationen führten zu einem Abfall der Zellvitalität (n = 24, 8 Replikate aus 3 unabhängigen Experimente).

In Abbildung 16 sind die Messwerte des MTT-Tests als Boxplot dargestellt. Es wird ersichtlich, dass alle getesteten Konzentrationen zu einer Reduktion der Zellvitalität führten. Im Friedman-Test ergab sich mit  $p = 0,00001$  eine statistisch signifikante Beeinflussung der Vitalität durch Inkubation mit ZnO-NP über 24 Stunden.

### 3.4 Quantifizierung von Apoptose nach Nanopartikel-Inkubation

Um sowohl den Einfluss von der Inkubationszeit als auch der Konzentration auf die Zahl apoptotischer Zellen beurteilen zu können, wurden FaDu-Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle mit ZnO-NP in fünf verschiedenen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde eine Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt und die Zellen im FACS analysiert. Hierbei wurden bei drei Messungen Daten erhoben, deren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte in Tabelle 7 dargestellt sind.

*Tabelle 7:* Messergebnisse der Annexin-V/Propidiumiodid FACS-Analyse. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. FaDu-Zellen wurden für 1, 3, 6, 12, 24 und 48 h mit ZnO-NP in den Konzentrationen 8, 10, 12, 16 und 20  $\mu\text{g/ml}$  behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

**V:** Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl, **A:** Apoptose, **N:** Nekrose. Angaben in [%].

ZnO-NP ( $\mu\text{g/ml}$ )	Status	Kontrolle	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
8	V:	92,8 $\pm$ 0,6	96,6 $\pm$ 3,0	91,6 $\pm$ 1,0	92,4 $\pm$ 0,7	95,3 $\pm$ 0,5	95,3 $\pm$ 0,2	95,7 $\pm$ 0,8
	A:	3,2 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,4
	N:	3,8 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3
10	V:	92,8 $\pm$ 0,6	89,0 $\pm$ 2,1	91,4 $\pm$ 1,7	91,2 $\pm$ 1,2	93,6 $\pm$ 0,8	92,0 $\pm$ 1,2	93,9 $\pm$ 0,6
	A:	3,2 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,3
	N:	3,8 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 1,0	4,2 $\pm$ 1,0	3,9 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,2
12	V:	92,8 $\pm$ 0,6	90,0 $\pm$ 0,3	94,4 $\pm$ 0,2	93,4 $\pm$ 0,4	90,6 $\pm$ 1,2	92,4 $\pm$ 0,7	86,5 $\pm$ 1,4
	A:	3,2 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,9
	N:	3,8 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,5
16	V:	92,8 $\pm$ 0,6	91,2 $\pm$ 1,2	93,0 $\pm$ 0,5	89,1 $\pm$ 0,2	80,3 $\pm$ 3,6	64,9 $\pm$ 7,9	57,4 $\pm$ 5,2
	A:	3,2 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,8	15,6 $\pm$ 2,7	28,0 $\pm$ 2,7
	N:	3,8 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,4	12,0 $\pm$ 2,7	18,0 $\pm$ 5,1	13,6 $\pm$ 2,3
20	V:	92,8 $\pm$ 0,6	91,8 $\pm$ 1,0	93,4 $\pm$ 0,7	85,7 $\pm$ 0,8	54,7 $\pm$ 2,6	17,2 $\pm$ 1,9	6,7 $\pm$ 1,0
	A:	3,2 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,6	5,8 $\pm$ 0,8	4,2 $\pm$ 0,8	29,7 $\pm$ 1,9	46,6 $\pm$ 1,1
	N:	3,8 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,4	32,2 $\pm$ 3,1	48,6 $\pm$ 0,8	47,0 $\pm$ 1,9

Unbehandelte Zellen, die als Negativkontrolle dienten, wiesen eine Vitalitätsrate von 92,8 % auf. Mit zunehmender Inkubationszeit konnte ein Anstieg sowohl apoptotischer als auch nekrotischer Zellen registriert werden. Während die Inkubation mit 16  $\mu\text{g/ml}$  für 3 Stunden kaum Auswirkung zeigte, führte eine Verlängerung der Expositionszeit zu raschem Absinken der Vitalität auf 89,1 %

nach 6 Stunden, 80,3 % nach 12 Stunden, 64,9 % nach 24 Stunden und 57,4 % nach 48 Stunden. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde der Friedman-Test durchgeführt. Dabei wurde getestet, ob einerseits innerhalb der Gruppen, die für die gleiche Zeit, und andererseits innerhalb der Gruppen, die mit der gleichen Konzentration mit NP behandelt wurden, eine signifikante Änderung der vitalen Zellen auftrat. Damit lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die Verlängerung der Inkubationszeit bei gleicher Konzentration oder der Anstieg der Testkonzentration bei gleicher Expositionsdauer eine signifikante Auswirkung innerhalb der untersuchten Gruppe hat. Der Friedman-Test zeigte, dass sich die Vitalität innerhalb der Gruppen signifikant änderte, die je mit 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml und 20 µg/ml ZnO-NP behandelt worden waren. Ob die Verlängerung der Inkubationszeit für die jeweilige Konzentrationsgruppe ein signifikantes Ergebnis erbrachte, ist in Tabelle 8 dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass in der Gruppe, die mit 8 µg/ml behandelt worden war, die Vitalität größer war als in der Kontrollgruppe. Tabelle 9 veranschaulicht die p-Werte der Friedman-Tests, die für die Gruppen mit gleichen Inkubationszeiträumen durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich, dass ab 12 Stunden eine Steigerung der NP-Konzentration die Zellvitalität signifikant beeinflusste.

*Tabelle 8:* Ergebnisse des Friedman-Tests mit Angabe der p-Werte, des  $\alpha$ -Niveaus und der Signifikanz. Der Test erfolgte anhand der prozentualen Anteile vitaler Zellen innerhalb der Gruppen, die mit der gleichen NP-Konzentration behandelt worden waren.

	<b><math>\alpha</math>-Niveau</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanz</b>
Kontrolle	0,05	1	Nein
8 µg/ml	0,05	0,0143	Ja
10 µg/ml	0,05	0,1818	Nein
12 µg/ml	0,05	0,0211	Ja
16 µg/ml	0,05	0,0116	Ja
20 µg/ml	0,05	0,0083	Ja

Mit sinkender Zahl vitaler Zellen stieg die Rate der detektierten apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Inkubation mit 20 µg/ml über 12 Stunden induzierte hauptsächlich Nekrose, während die Behandlung mit 16 µg/ml über 48 Stunden zu mehr apoptotischen Zellen führte.

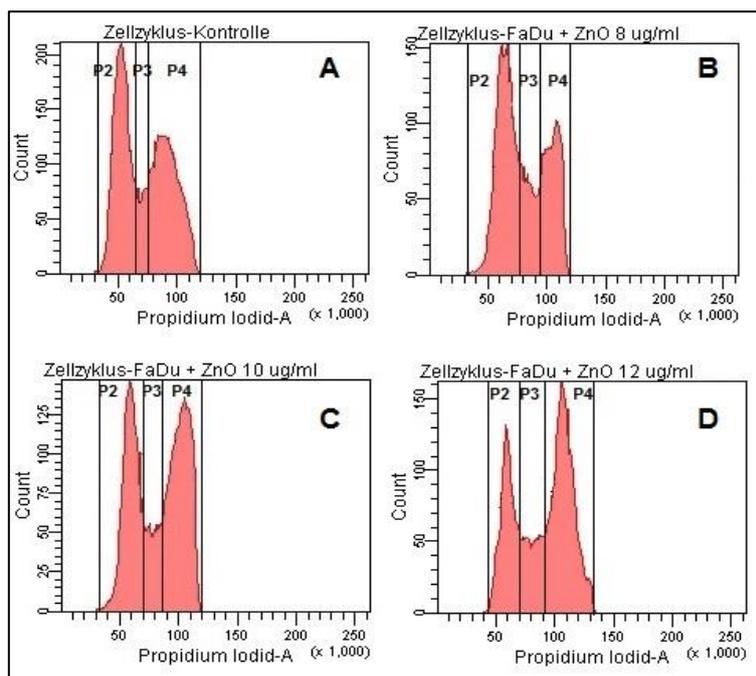
Ein klarer Zusammenhang zwischen Inkubationszeit oder -dosis und dem Auftreten von Apoptose oder Nekrose war nicht erkennbar.

*Tabelle 9:* Ergebnisse des Friedman-Tests innerhalb der Gruppen, die für die gleiche Zeit mit NP behandelt worden waren.

	$\alpha$ -Niveau	p-Wert	Signifikanz
Kontrolle	0,05	1	Nein
1 h	0,05	0,3820	Nein
3 h	0,05	0,4704	Nein
6 h	0,05	0,0688	Nein
12 h	0,05	0,0153	Ja
24 h	0,05	0,0193	Ja
48 h	0,05	0,0104	Ja

### 3.5 Analyse von Zellzyklusalterationen

Entsprechend dem in Abschnitt 2.7.2 *Fremdstoffexposition und Versuchsdurchführung* beschriebenen Protokoll wurde die Zellzyklusanalyse anhand durchflusszytometrischer Messungen durchgeführt. Durch quantitative Anfärbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid ist es möglich, Rückschlüsse über den DNA-Gehalt und somit die entsprechende Phase im Zyklus der Zelle zu ziehen. Infolgedessen kann der Einfluss von ZnO-NP auf den Ablauf des Zellzyklus analysiert werden.



*Abbildung 17:* Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der Zellzyklusanalyse.

Graphik **A** zeigt die Daten der unbehandelten Probe. In **B** ist die Messung nach 24-stündiger Behandlung von FaDu-Zellen mit 8 µg/ml ZnO-NP, in **C** mit 10 µg/ml und in **D** mit 12 µg/ml dargestellt. Die quantitative Zellverteilung der einzelnen Zyklusphasen ( $P2 \triangleq G0/G1$ -Phase,  $P3 \triangleq S$ -Phase,  $P4 \triangleq G2/M$ -Phase) kann abgelesen werden.

Erkennbar ist eine Zunahme der Zellfraktion in der G2/M-Phase ab einer Konzentration von 10 µg/ml.

Abbildung 17 dient als Anschauungsbeispiel für die graphische Darstellung der Ergebnisse einer Zellzyklusanalyse.

Es zeigte sich, dass sich der prozentuale Anteil an Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen nach Behandlung mit 4  $\mu\text{g/ml}$  und 8  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP im Vergleich zur Negativkontrolle nicht ändert. Ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  war eine Abnahme des G0/G1-Anteils zugunsten der G2/M-Phase zu beobachten. Die Zellfraktion, die sich in der S-Phase befand, blieb weiterhin konstant. Die Anteile der Zellzyklusphasen mit und ohne Inkubation mit NP sind in Abbildung 18 veranschaulicht.

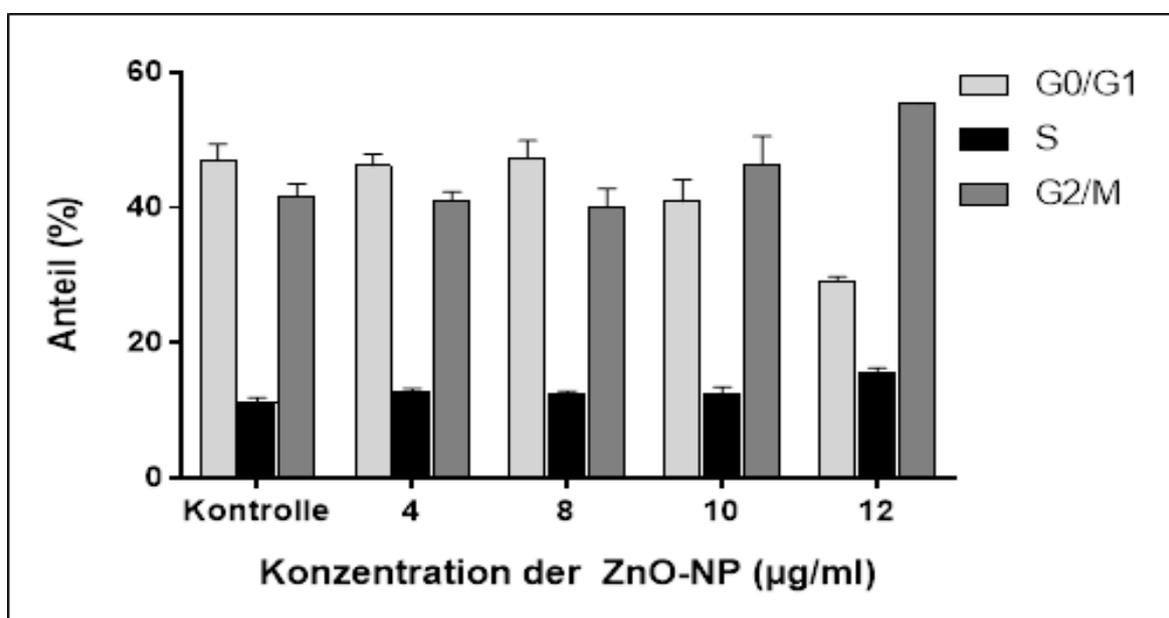


Abbildung 18: Verteilungsmuster der Zellzyklusanalyse. FaDu-Zellen wurden für 24 Stunden mit ZnO-NP in den Konzentrationen 4  $\mu\text{g/ml}$ , 8  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  und 12  $\mu\text{g/ml}$  behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardfehler des Mittelwertes. Die Inkubation mit NP bewirkte in den Zellen eine Zellzyklusinhibition mit einem Arrest in der G2/M-Phase.

Im Friedman-Test ergab sich für keine der untersuchten Zellzyklusphasen ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 10: Ergebnisse des Friedman-Tests für die einzelnen Phasen des Zellzyklus.

	$\alpha$ -Niveau	p-Wert	Signifikanz
G0/G1	0,05	0,0823	Nein
S	0,05	0,0759	Nein
G2/M	0,05	0,1046	Nein

### 3.6 Zeitabhängiger Anstieg der Caspase-3-Genexpression

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Caspase-3 dargestellt. Diese wurde durch quantitative RT-PCR untersucht. Caspase-3 gilt als eines der Effektorenzyme im Rahmen des programmierten Zelltodes. Dieser Apoptosemarker sollte bei Zellen bestimmt werden, die für verschiedene Zeitintervalle mit ZnO-NP inkubiert worden waren. Der Versuch wurde an FaDu-Zellen durchgeführt, die für 1, 3, 6, 12, 24 und 48 h mit ZnO-NP in der Konzentration 20 µg/ml behandelt worden waren. Nach mRNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR mit einem für die Caspase-3 spezifischen Primer konnte die Expression des untersuchten Gens der jeweiligen Probe in Relation zu einer unbehandelten Zellprobe berechnet werden. Dies erfolgte durch Anwendung der Delta-Delta-CT-Methode mit Hilfe des Haushaltsgens GAPDH. Die Messung wurde insgesamt vier Mal durchgeführt. Die Mittelwerte der Messungen mit deren Standardfehlern sind in Abbildung 19 veranschaulicht.

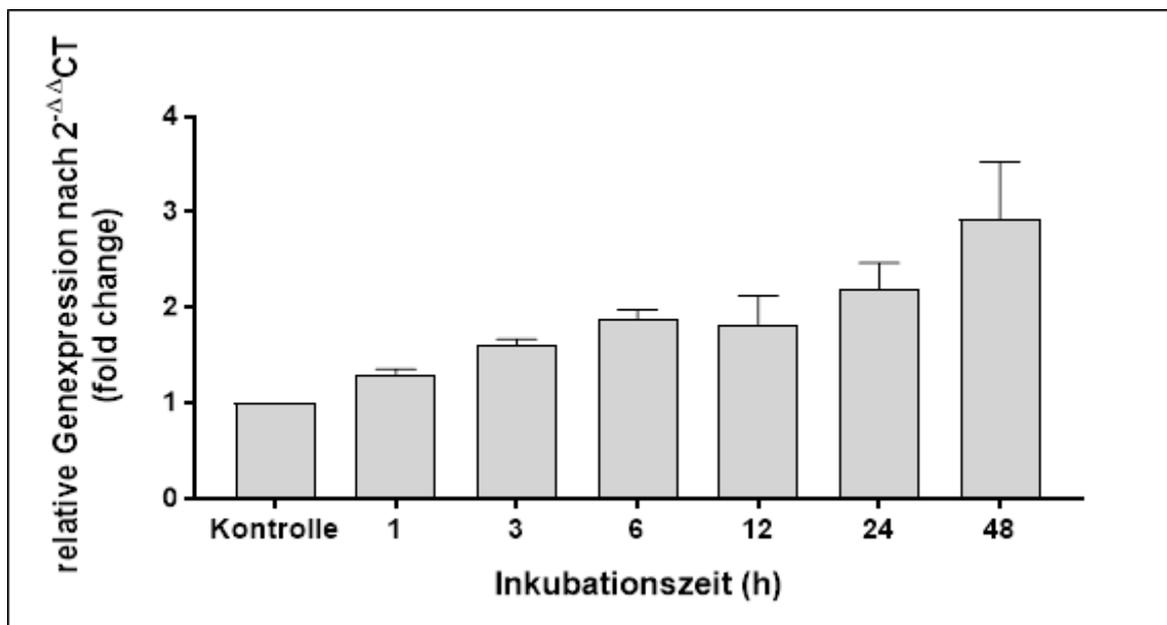


Abbildung 19: Genexpression von Caspase-3 nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode. Auf der y-Achse ist die relative Genexpression von behandelter Probe bezogen auf die Negativkontrolle und normalisiert zum Referenzgen GAPDH und auf der x-Achse die ansteigenden Inkubationszeiträume aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Messungen sowie die Standardfehler des Mittelwertes. Erkennbar ist ein Anstieg der Caspase-3-Genexpression mit zunehmender Inkubationsdauer.

Die Inkubation mit 20 µg/ml ZnO-NP führte zeitabhängig zu einer zunehmenden Expression des Caspase-3 Enzyms. Nach einer Stunde konnte ein Anstieg registriert werden. Nach 6 Stunden war die Aktivität im Mittel etwa 1,8 Mal so hoch wie bei der Negativkontrolle, nach 48 Stunden 2,9 Mal so hoch. Dies weist darauf hin, dass es mit zunehmender Inkubationszeit zu einer verstärkten Induktion der Apoptose in den behandelten Zellen gekommen ist. Der Friedman-Test ergab mit  $p = 0,0154$  eine zeitabhängige signifikante Zunahme der Caspase-3-Aktivität.

### 3.7 Einfluss von oxidativem Stress auf die Induktion von DNA-Schäden

Zur Untersuchung genotoxischer Effekte von Noxen müssen Konzentrationen eingesetzt werden, die keine zytotoxischen Wirkungen hervorrufen. Aus diesem Grund wurde nach der NP-Exposition und vor der Durchführung jedes Comet Assays die Zellvitalität durch den Trypanblauausschlusstest überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 als Boxplot dargestellt. Lag die Zellvitalität über 80 % konnte mit dem Experiment fortgefahren werden. Für diese Versuchsreihe wurden primäre humane mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BMSC) von zehn Patienten verwendet.

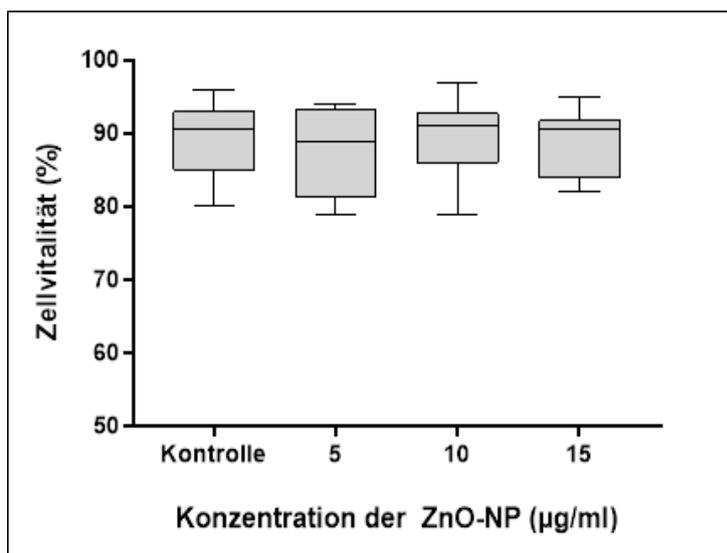
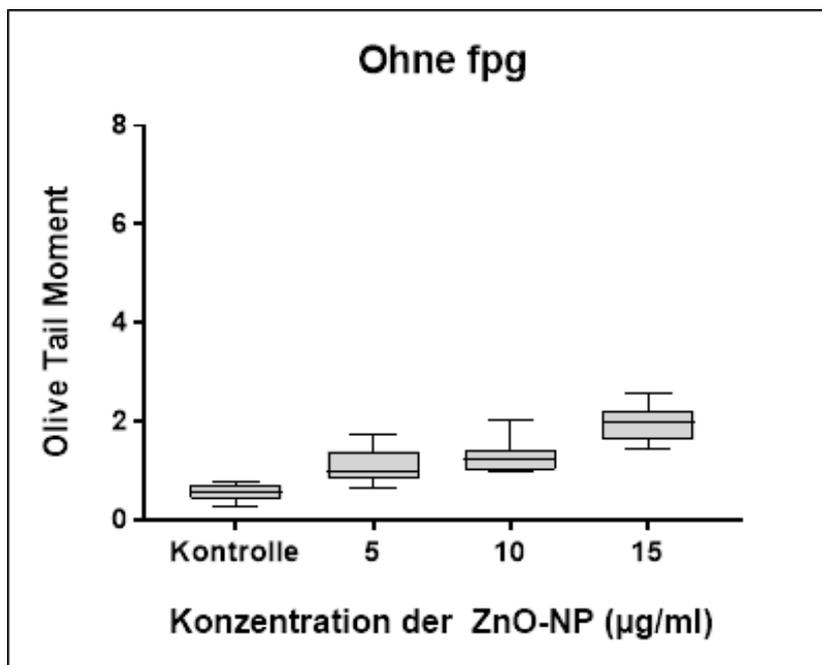


Abbildung 20:  
Zellvitalitätsbestimmung durch Trypanblauausschlusstest bei unbehandelten BMSC (Kontrolle) und nach Inkubation mit 5, 10 und 15 µg/ml ZnO-NP für 24 Stunden. Keine der getesteten Konzentrationen reduzierte die Zellvitalität auf Werte unter 80 %.

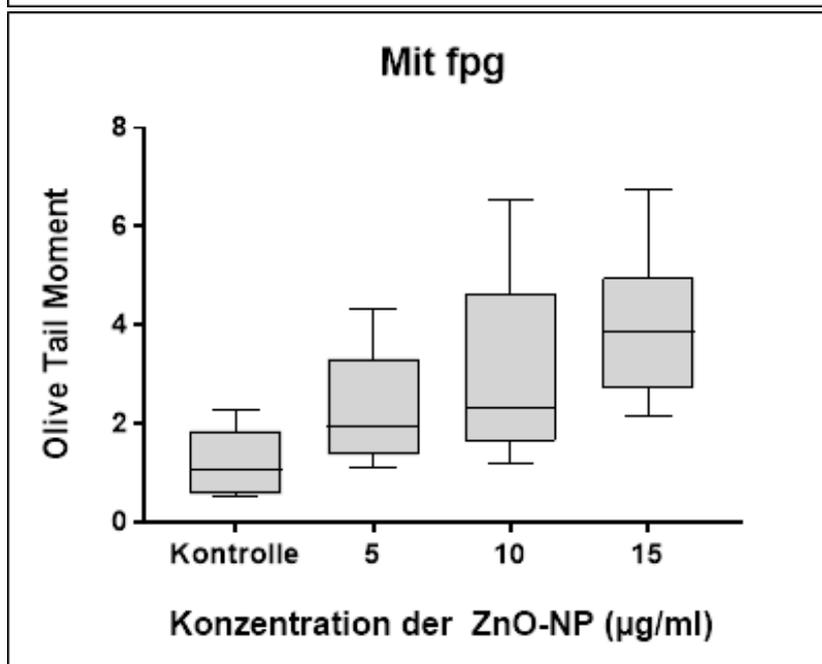
Keine der für die Genotoxizitätsanalyse verwendeten NP-Konzentrationen (5, 10, 15 µg/ml) führten zu einem Absinken der Zellvitalität von BMSC von 10 Patienten unter 80 %. Induzierte DNA-Schäden wurden im Folgenden durch den Comet

Assay erfasst. Durch den Einsatz von fpg war es weiterhin möglich, speziell oxidative DNA-Schäden zu detektieren. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für eine Stunde mit 300  $\mu\text{M}$  Methylmethansulfonat (MMS) inkubiert.

Bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Parameter *Olive Tail Moment* (OTM), *Tail DNA* (DT) und *Tail Length* (TL) bestimmt, wobei die dimensionslosen OTM-Werte für die statistische Auswertung und graphische Darstellung herangezogen wurden. Abbildung 21 zeigt hierbei die Ergebnisse ohne fpg- und Abbildung 22 die Daten aus der Messung mit fpg-Inkubation.



**Abbildung 21:** DNA-Fragmentierung in humanen BMSC nach 24-stündiger Inkubation mit 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  und 15  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP.  $n = 10$ . Die Positivkontrolle mit 300  $\mu\text{M}$  MMS wurde in der Abbildung nicht dargestellt.



**Abbildung 22:** DNA-Fragmentierung in humanen BMSC mit zusätzlicher Erfassung oxidierter Basen durch Zusatz von fpg.

Im Wilcoxon-Test konnte bereits ab 5 µg/ml ein signifikanter Anstieg des OTM-Wertes verglichen mit der Negativkontrolle nachgewiesen werden. Die OTM-Medianwerte stiegen mit zunehmender Konzentration von 0,59 (Negativkontrolle) über 1,00 (5 µg/ml) und 1,23 (10 µg/ml) auf 1,99 (15 µg/ml). Die Inkubation der BMSC mit 300 µM MMS zeigte mit  $p = 0,0002$  ebenso eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentierung.

*Tabelle 11:* Ergebnisse des Wilcoxon-Tests mit Angabe des lokalen  $\alpha$ -Niveaus nach Bonferroni-Holm-Korrektur, p-Wert und Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der OTM-Medianwerte der Nanopartikel-behandelten Zellen gegen die Negativkontrolle.

Ohne fpg	Lokales $\alpha$ -Niveau	p-Wert	Signifikanz
5 µg/ml ZnO-NP vs. Kontrolle	0,05	0,0005	Ja
10 µg/ml ZnO-NP vs. Kontrolle	0,0125	0,0002	Ja
15 µg/ml ZnO-NP vs. Kontrolle	0,0167	0,0002	Ja
300µM MMS vs. Kontrolle	0,0250	0,0002	Ja

Beim Vergleich der Proben, die zusätzlich mit fpg behandelt worden waren, zeigte der Wilcoxon-Test ab 10 µg/ml einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle. Auch in dieser Gruppe kam es zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der OTM-Medianwerte bis hin zu einem fast 2,5-fach so hohen Wert der 15 µg/ml Probe bezogen auf die Negativkontrolle.

*Tabelle 12:* Ergebnisse des Wilcoxon-Tests mit Angabe des lokalen  $\alpha$ -Niveaus, p-Wert und Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der OTM-Medianwerte der jeweiligen Proben mit fpg gegen die Negativkontrolle mit fpg.

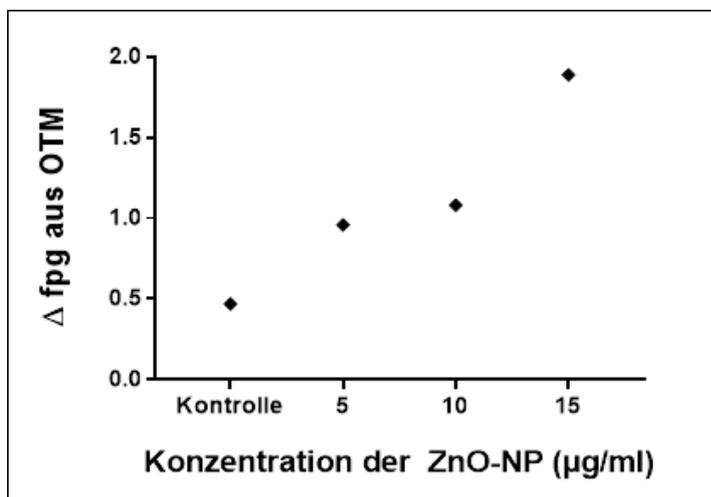
Mit fpg	Lokales $\alpha$ -Niveau	p-Wert	Signifikanz
5 µg/ml ZnO-NP vs. Kontrolle	0,05	0,0588	Nein
10 µg/ml ZnO-NP vs. Kontrolle	0,0250	0,0102	Ja
15 µg/ml ZnO-NP vs. Kontrolle	0,0125	0,0002	Ja
300µM MMS vs. Kontrolle	0,0167	0,0007	Ja

Um oxidativen Stress als Auslöser der verursachten DNA-Schäden nachweisen zu können, wurden die OTM-Werte der fpg-inkubierten Proben mit den jeweiligen Nativproben verglichen. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests sind in Tabelle 13 dargestellt. Hierbei zeigte sich bei allen Vergleichspaaren ein signifikanter Unterschied.

*Tabelle 13:* Ergebnisse des Wilcoxon-Tests mit Angabe des lokalen  $\alpha$ -Niveaus, p-Wert und Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der OTM-Medianwerte der Proben mit fpg gegen die jeweiligen Proben ohne fpg.

Ohne fpg vs. Mit fpg	Lokales $\alpha$ -Niveau	p-Wert	Signifikanz
Kontrolle ohne vs. Kontrolle mit	0,05	0,0191	Ja
5 $\mu\text{g/ml}$ ohne vs. 5 $\mu\text{g/ml}$ mit	0,0167	0,0032	Ja
10 $\mu\text{g/ml}$ ohne vs. 10 $\mu\text{g/ml}$ mit	0,0125	0,0025	Ja
15 $\mu\text{g/ml}$ ohne vs. 15 $\mu\text{g/ml}$ mit	0,0100	0,0002	Ja
300 $\mu\text{M}$ MMS ohne vs. 300 $\mu\text{M}$ MMS mit	0,0250	0,0065	Ja

DNA-Schäden, die auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, können anhand der Differenz zwischen den OTM-Werten mit und ohne fpg veranschaulicht werden:  $\Delta \text{ fpg} = \text{OTM}+\text{fpg} - \text{OTM}-\text{fpg}$ . Die Differenzen der OTM-Medianwerte, dargestellt in Abbildung 23, stiegen konzentrationsabhängig von 0,47 (Negativkontrolle+fpg - Negativkontrolle-fpg) über 0,96 (5  $\mu\text{g/ml}$ +fpg - 5  $\mu\text{g/ml}$ -fpg) und 1,08 (10  $\mu\text{g/ml}$ +fpg - 10  $\mu\text{g/ml}$ -fpg) auf 1,89 (15  $\mu\text{g/ml}$ +fpg - 15  $\mu\text{g/ml}$ -fpg). Dies weist auf eine Korrelation zwischen einem vermehrten Vorhandensein oxidativ veränderter Basen und der Zugabe von ZnO-NP in ansteigender Konzentration hin.



*Abbildung 23:* Darstellung der Differenzen der OTM-Werte mit und ohne fpg ( $\Delta \text{ fpg}$ ). Die Zunahme von  $\Delta \text{ fpg}$  ist auf das vermehrte Vorkommen oxidativ geschädigter DNA zurückzuführen.

Mit dem Friedman-Test wurde sowohl innerhalb der Gruppe ohne fpg als auch innerhalb der Gruppe mit fpg auf eine signifikante Unterscheidung der OTM-Werte getestet. Für beide ergab der Test mit  $p = 0,00001$  ohne fpg, beziehungsweise  $p = 0,0001$  mit fpg signifikante Werte.

### 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch den Einsatz multipler Testsysteme sollte ein möglichst umfassendes Toxizitätsprofil von ZnO-NP erstellt werden. Neben der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu wurden humane mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BMSC) für unterschiedliche Zeiträume und mit variierenden Konzentrationen mit NP behandelt.

Zellmorphologische Veränderungen waren in der FaDu-Zellkultur lichtmikroskopisch nach einer Stunde Inkubation mit 20 µg/ml ZnO-NP ersichtlich. Im MTT-Test führten 6 µg/ml zu einer Reduktion der Vitalität in FaDu-Zellen mit konsekutiv weiter abfallenden Vitalitätswerten bei Steigerung der NP-Konzentration. Durchflusszytometrisch wurde mit Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung eine dosis- und zeitabhängige Zunahme von apoptotischen FaDu-Zellen nach NP-Exposition festgestellt. Weiterhin konnte ein Arrest der Zellen in der G2/M-Phase beobachtet werden. In der quantitativen RT-PCR zeigten sich nach einer Stunde Exposition mit einer NP-Konzentration von 20 µg/ml erhöhte Genexpressionswerte des Apoptose-Markerenzym Caspase-3 in FaDu-Zellen. Diese stiegen analog zur Verlängerung der Expositionszeit weiter an.

Durch den fpg-modifizierten Comet Assay konnte bei allen Testkonzentrationen oxidativer Stress als wichtiger Einflussfaktor der DNA-Schädigung nachgewiesen werden. Im Wilcoxon-Test wurde ab 5 µg/ml eine statistisch signifikante DNA-Fragmentierung festgestellt. Das Ausmaß der DNA-Schädigung stieg konzentrationsabhängig.

## 4 Diskussion

Nanopartikel (NP) finden aufgrund ihrer einzigartigen physikochemischen Eigenschaften zunehmend multidisziplinäre Anwendung. Neben dem Einsatz in verschiedenen industriellen Produktionsvorgängen sind NP als Inhaltsstoff auch in immer mehr Konsumgütern vorzufinden und ihr Potenzial auf dem Gebiet der Medizin wird intensiv erforscht. Gleichermäßen wächst jedoch auch das öffentliche Bewusstsein bezüglich möglicher Auswirkungen auf Gesundheit und Umwelt.

Nanotoxikologische Fragestellungen wurden in der Vergangenheit bereits vielfach untersucht. Dennoch gibt es gerade hinsichtlich molekularbiologischer Prozesse und Einflussfaktoren auf das Toxizitätsprofil von NP noch viele offene Fragen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, weitere Erkenntnisse über die Wirkung von ZnO-NP und den damit assoziierten zellulären Mechanismen zu erlangen. Die Evaluation konzentrations- und zeitabhängiger Effekte sowie die Unterschiede der Partikelwirkung in malignen und nicht-malignen Zellen standen hierbei im Vordergrund. Dafür wurde eine toxikologische *in vitro* Studie an einer humanen Plattenepithelkarzinom (PECA)-Zelllinie sowie humanen mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (BMSC) durchgeführt.

### 4.1 Diskussion der verwendeten Zellsysteme

#### 4.1.1 Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu

NP scheinen zellspezifische Toxizitätseigenschaften zu besitzen. Speziell die tumorselektive Wirkung der NP wird aktuell intensiv erforscht. Akhtar et al. [2012] verglichen beispielsweise die Auswirkung von ZnO-NP auf drei verschiedene Malignomzelllinien sowie nicht-maligne Astrozyten und Hepatozyten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation mit einer Partikelkonzentration von 15 µg/ml nach 24 Stunden nur noch ca. 40 % der Karzinomzellen, jedoch noch annähernd 100 % der nicht-malignen Zellen vital waren. Ebenso berichteten Hanley et al. [2008], dass die Sensitivität maligner T-Zellen gegenüber den getesteten NP etwa 30 Mal höher war als die der normalen T-Zellen. Interessant ist

diese selektive Zytotoxizität von nanoskaligem ZnO vor allem im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als Therapeutikum im Rahmen einer Tumorthherapie.

Laut Angaben des Robert Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich über 17000 Menschen neu an so genannten „Kopf-Hals-Tumoren“. [Robert Koch-Institut, 2016]. Mit über 90 % stellen PECA in diesem Bereich die häufigste Tumorentität dar. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt hierbei durchschnittlich bei 51-61 % [Ferlay et al., 2013]. Wie von Svider et al. [2017] in einer Übersichtsarbeit dargestellt, hat sich, verglichen mit den Fortschritten der therapeutischen Möglichkeiten bei anderen Tumoren, in den letzten Jahrzehnten kaum eine Steigerung der Überlebensraten bei Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich erreichen lassen.

Die antiproliferative Wirkung von ZnO-NP wurde *in vitro* bereits anhand einiger verschiedener Tumorzelllinien beschrieben [Boroumand Moghaddam et al., 2017; De Berardis et al., 2010; Sharma et al., 2011a]. PECA des Kopf-Hals-Bereiches waren hingegen bislang selten Gegenstand von Untersuchungen. Daher wurde für die in dieser Arbeit präsentierten Versuche die Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu eingesetzt. Gerade für Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen könnten mit dem Einsatz von Nanotechnologie neue onkologische Therapieansätze möglich werden. Hierfür sind jedoch akkurate Untersuchungen zu potenziell gesundheitsgefährdenden Eigenschaften der Partikel unverzichtbar. Ziel vorliegender Arbeit war es daher, weiterhin einen Vergleich der Wirkung von ZnO-NP zwischen malignen und benignen Zellen anzustellen.

#### 4.1.2 Primäre humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks

Als nicht-maligne Referenzzellen wurden für diese Arbeit humane BMSC verwendet. Ein Grund für diese Wahl ist, dass die Toxizität von NP von der Proliferationsrate der Zielzellen abhängig zu sein scheint. Taccola et al. [2011] inkubierten hoch-proliferative MSC sowie differenzierte Osteozyten mit ZnO-NP. Die Partikel beeinträchtigten die Zellvitalität der MSC stärker als die der differenzierten Zellen mit niedriger Proliferationsrate. MSC weisen auch in

fortgeschrittenen Passagen noch hohe Proliferationsraten auf und ermöglichen somit einen Vergleich zu Tumorzellen. Weiterhin bieten humane BMSC im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien den Vorteil, dass sie genetisch weitgehend unverändert und somit gut geeignet für genotoxikologische Tests sind.

Die Kombination von Stammzellen und NP erbringt im Tissue Engineering innovative Ansätze. Regeneration von geschädigtem Herzmuskel- [Kharaziha et al., 2016], Knochen- [Griffin et al., 2016] oder neuronalem Gewebe [Zhang et al., 2017] erscheint so möglich. Nur vereinzelt liegen jedoch Daten zu toxischen Effekten von NP auf Stammzellen vor. Mancuso und Cao [2014] wiesen beispielsweise eine signifikante Zytotoxizität von Kupferoxid-NP in humanen BMSC nach. Silber-NP induzierten DNA-Schäden, Zellzyklusarrest sowie eine Reduktion der Zellvitalität in BMSC [He et al., 2016]. Vor dem Hintergrund der vielfältigen Einsatzbereiche sind fundierte Kenntnisse der Interaktion von NP und Stammzellen dringend erforderlich.

## 4.2 Diskussion der *in vitro* Testverfahren

Aufgrund der Heterogenität publizierter Daten ist es schwer, eine generalisierende Aussage darüber zu treffen, ob von NM ein gesundheitliches Risiko ausgeht. Physikochemische Charakteristika von NP scheinen einen großen Einfluss auf deren Toxizitätsprofil zu haben. Zu diesen Eigenschaften gehören unter anderem die Größe, Löslichkeit, Oberflächenbeschaffenheit, Ladung oder Agglomerationsneigung [Johnston et al., 2009]. Gegenwärtig gibt es keine standardisierten Protokolle für die Herstellung von NP-Dispersionen, Expositionsbedingungen und dem Einsatz von Referenzmaterialien [Kroll et al., 2011]. Auch das Fehlen präziser Richtlinien zur Charakterisierung verwendeter NP erschwert direkte Vergleiche zwischen Studien. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten erlauben daher lediglich Äußerungen zu den innerhalb der Versuchsreihe eingesetzten Partikel. Um einen möglichst breiten Überblick über die Toxizität dieser ZnO-NP zu erhalten, wurden verschiedene Testverfahren kombiniert und unterschiedliche Endpunkte betrachtet.

*In vitro* Tests bieten gegenüber *in vivo* Verfahren den Vorteil, dass sie in der Regel methodisch einfacher und ökonomischer durchzuführen sind. Die Untersuchungen erfordern meist weniger Zeit und können in vorliegender Thematik grundsätzliches Wissen zu NP-assoziierten Toxizitätsmechanismen und deren Risikobewertung liefern. Die Aussagekraft der *in vitro* erhobenen Daten ist jedoch limitiert, da die Interaktion von NP mit einzelnen Zellen in Kultur natürlich nicht vorbehaltlos auf das komplexe System eines ganzen Organismus übertragbar ist [Collins et al., 2017].

Weiterhin muss bedacht werden, dass dieselben Merkmale, die NP so interessant für industrielle Produktionen machen, eine verlässliche Risikoevaluation erschweren. Das enorme katalytische Potenzial und partikelspezifische Absorptionseigenschaften sind in der Lage, als Störfaktoren auf Messsysteme einzuwirken [Dhawan und Sharma, 2010]. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Testverfahren hinsichtlich ihrer Eignung im Rahmen nanotoxikologischer Studien diskutiert.

#### 4.2.1 MTT-Test

Der MTT-Test wurde zur Bestimmung der Zellvitalität und Evaluation zytotoxischer Effekte in FaDu-Zellen nach Inkubation mit ZnO-NP eingesetzt. Die Methode beruht auf photometrischen Messungen des durch chemische Reduktion aus Tetrazolium gebildeten, bläulich-gefärbten Stoffes Formazan. Die Farbintensität des Formazans korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und wird als indirektes Maß für die Zellvitalität herangezogen. Es wurde bereits gezeigt, dass NM Einfluss auf die im MTT-Test erhobenen Messdaten haben können. Einwandige Kohlenstoffnanoröhren und Industrieruß sind beispielsweise in der Lage, ohne Beteiligung von Zellen Tetrazolium zu Formazan zu reduzieren [Belyanskaya et al., 2007]. Denkbar wäre auch, dass die NP Ab- oder Adsorptionseigenschaften innerhalb der gleichen Wellenlänge besitzen, die für die Quantifizierung der Farbintensität verwendet wird. Dies hätte eine falsch hohe oder zu niedrige Interpretation der Vitalitätswerte zur Folge. Für ZnO-NP lagen zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit (Herbst 2018) keine solchen Daten vor. Es kann in diesem Zusammenhang jedoch auf die Studie von Holder et al. [2012] verwiesen werden. In dieser wurde gezeigt, dass Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ), ebenso ein Metalloxid wie ZnO,

erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml Formazan produzierte. Für die vorliegende Arbeit wurden außerdem einige Vorversuche durchgeführt, um Messstörungen im MTT-Test durch Partikelinterferenz ausschließen zu können. Hierfür wurde sowohl die Absorption des reinen Mediums gemessen als auch nach Zusatz von ZnO-NP. Es zeigte sich kein Unterschied der gemessenen Farbintensität zwischen einer Negativkontrolle sowie nach Zugabe der höchsten (50 µg/ml) und niedrigsten (6 µg/ml) NP-Konzentration. Gemäß dem Vorschlag von Stone et al. [2009] wurden die Proben außerdem vor der photometrischen Messung zentrifugiert und die Überstände anschließend in eine neue 96-Well-Platte überführt. Die abgelagerten NP und Zellen verblieben so im Eppendorfgesäß. Eine Beeinflussung der hier durch den MTT-Test ermittelten Vitalitätswerte erscheint in Zusammenschau demnach unwahrscheinlich. Für mehr Sicherheit sollte in zukünftigen Studien eine Kombination verschiedener Zellvitalitätstests wie beispielsweise der Neutralrot-, WST-1- oder LDH-Test angewandt werden.

#### 4.2.2 Durchflusszytometrie

Durch das Anfärben mit den Farbstoffen Annexin-V und Propidiumiodid ist eine durchflusszytometrische Differenzierung in lebende, apoptotische und nekrotische Zellen möglich. Ebenso kann der Zellzyklus mit Hilfe von Propidiumiodid im Durchflusszytometer analysiert werden. Da die Durchflusszytometrie auf der Messung von Fluoreszenzsignalen basiert, ist eine Reihe potenzieller Störfaktoren durch intrinsische Eigenschaften von NP denkbar: die Partikel könnten beispielsweise die Lichtemission blockieren, reflektieren oder gar selber fluoreszieren [Stone et al., 2009]. Adäquate Waschschriffe sind daher wichtig, um die Partikel aus der Messlösung zu entfernen. Dies ermöglicht laut Kumar et al. [2015] eine Abschwächung der Interferenzen.

Die Durchflusszytometrie gehört zu den Standardtestverfahren im Rahmen nanotoxikologischer Studien. Färbung mit Annexin-V/Propidiumiodid ist dabei eine etablierte Methode zur Detektion NP-induzierter Apoptose und Nekrose und wurde bereits zur Analyse vieler NM eingesetzt [Chakraborty et al., 2017; Govindaraju et al., 2015; Lim et al., 2008]. Die in vorliegender Arbeit erhobenen Daten können mit den Studien von Buerki-Thurnherr et al. [2013] und Xiao et al. [2016] verglichen

werden, die ebenso ZnO-NP untersuchten. Die gemessenen Raten von Apoptose und Nekrose stimmen zu großen Teilen überein. Diese Beobachtung impliziert entweder, dass die NP im angewandten Konzentrationsbereich keine entscheidende Auswirkung auf die Versuchsdurchführung haben oder, dass eine Beeinflussung auf konstante Weise stattfindet. In vorliegender Arbeit wurden mit dem MTT-Test und der FACS-Analyse zwei verschiedene Testsysteme zur Quantifizierung von Zytotoxizität eingesetzt. Beide messen jedoch unterschiedliche Endpunkte, sodass keine identischen Ergebnisse erwartet werden können.

#### 4.2.3 Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay mit fpg-Modifikation

Nach Einführung mehrerer Modifikationen der ursprünglichen Variante des Comet Assays gilt das Testverfahren heute als eines der gängigsten Werkzeuge zur Detektion verschiedener Arten von DNA-Schäden bei Einzelzellen. Dazu gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen oder *Crosslinks* der DNA mit DNA oder Proteinen [Tice et al., 2000]. Die Anwendung erstreckt sich von Genotoxizitätstests, humanem Biomonitoring und Ökogenotoxikologie bis hin zu Grundlagenforschung über DNA-Schäden und -reparatur [Collins, 2014]. Um die Sensitivität und Spezifität bei der Feststellung bestimmter DNA-Schäden zu erhöhen, besteht die Möglichkeit, eine Inkubationsphase mit läsionsspezifischen DNA-Reparaturenzymen in das Versuchsprotokoll einzufügen. Das Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (fpg) Protein ermöglicht es hierbei, speziell das oxidierte Purin 8-oxoGua zu erkennen, indem es am Ort der oxidativ veränderten Base einen DNA-Strangbruch hervorruft [Albertini et al., 2000]. Auf diese Weise kann der Einfluss von oxidativem Stress bezogen auf das Gesamtausmaß des DNA-Schadens analysiert werden.

Neben dem in dieser Arbeit angewandten Comet Assay existieren noch andere Tests zum Nachweis von Gen- und Chromosomenmutationen, Aneuploidie sowie Induktion und Reparatur von DNA-Schäden. Einem Review von Landsiedel et al. [2009] zufolge werden der Comet Assay und der Mikrokern-Test am häufigsten zur Evaluation der Genotoxizität von NM eingesetzt, seltener der Ames-Test. Der Mikrokern-Test basiert auf der mikroskopischen Detektion von Chromosomen und

Chromosomenfragmenten, die bei der Mitose nicht in den Nukleus der Tochterzelle integriert wurden. Eine Limitation dieser Methode ist jedoch, dass sie nur Aussagen über sich teilenden Zellen ermöglicht [Fenech, 1997].

Wie bereits für andere Tests mehrfach erörtert, sollten auch für Genotoxizitätsanalysen mit NP einige Aspekte bedacht werden. Diese wurden von Stone et al. [2009] in einer Übersichtsarbeit wie folgt formuliert: es ist entscheidend, vor Durchführung des Tests einen adäquaten Konzentrationsbereich festzulegen. Dieser muss unterhalb der Grenze nachweisbarer Zytotoxizität liegen, um DNA-Schäden als direkte zytotoxische Folge ausschließen zu können. Weiterhin ist die Anwendung einer Positivkontrolle wichtig. In vorliegender Arbeit wurden diese Voraussetzungen einerseits mit der Inklusion von MMS als Positivkontrolle und andererseits mit Durchführung eines Trypanblauausschlusstests vor jedem Comet Assay gewährleistet. Auch im Rahmen des Comet Assays sind potenzielle Artefakte durch NP denkbar. Während der finalen Schritte der Versuchsdurchführung könnten die NP beispielsweise in direkten Kontakt mit der DNA kommen und so artifiziellen Schaden verursachen. Partikelagglomerate könnten außerdem bei der Auswertung in direkter Umgebung von Kometenschweiften lokalisiert sein und die Messung durch Eigenfluoreszenz beeinflussen. Magdolenova et al. [2012] testeten in diesem Zusammenhang verschiedene NM hinsichtlich ihres Interferenzpotenzials. Sie gaben an, dass weder in der ursprünglichen noch in der fpg-modifizierten Variante des Comet Assays Auswirkungen auf die Resultate registriert wurden.

Aufgrund all der genannten potenziellen Störfaktoren folgern Huk et al. [2015], dass es sinnvoll wäre, verschiedene Testsysteme mit unterschiedlichen Mechanismen und Endpunkten wie DNA-Strangbrüche, Basenalterationen oder Chromosomenaberrationen zu kombinieren.

## 4.3 Diskussion der Ergebnisse

### 4.3.1 Zytotoxizität durch Zinkoxid-Nanopartikel

Zytotoxische Effekte von ZnO-NP in FaDu-Tumorzellen wurden in vorliegender Arbeit durch den MTT-Test analysiert. Eine Reduktion der Zellvitalität gegenüber der unbehandelten Kontrolle war nach 24-stündiger Exposition bereits bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 6 µg/ml erkennbar. Die Vitalitätswerte sanken konsekutiv bis zu einem Minimalwert von 8 % nach Inkubation mit der höchsten Konzentration von 50 µg/ml. Eine genaue dosisabhängige Differenzierung der zytotoxischen Wirkung von ZnO-NP auf PECA des Kopf-Hals-Bereichs liegt bislang noch nicht vor. Aus diesem Grund müssen für vergleichende Betrachtungen Daten anderer humaner Malignomzelllinien herangezogen werden. In Zelllinien von Mamma- beziehungsweise Hepatozellulärem Karzinom führte die Inkubation mit 10 µg/ml ZnO-NP zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität im MTT-Test [Wahab et al., 2014]. Alarifi et al. [2013] konnten ähnliche Ergebnisse bei humanen Melanomzellen demonstrieren. Im Allgemeinen werden häufig sehr steile Dosis-Wirkungs-Kurven in einem Konzentrationsbereich zwischen 8 und 20 µg/ml beschrieben. Dies bedeutet, dass in diesem Bereich bereits kleine Veränderungen der NP-Konzentration große Effekte auf die Zellvitalität zur Folge haben. Eine exakte Gegenüberstellung von Dosis und Wirkung von NP zwischen Studien erscheint daher nicht sinnvoll. In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich mit der Publikation von Lin et al. [2009] interessant. Die in vorliegender Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen verglichen mit den von Lin et al. präsentierten Daten eine stärkere zytotoxische Wirkung bei niedrigeren NP-Konzentrationen vermuten. Nach Behandlung mit 8 µg/ml ZnO-NP waren noch 94 % der bei Lin und Kollegen verwendeten A549 Zellen vital, hingegen nur 88 % der FaDu-Zellen. Bei 12 µg/ml sind die Ergebnisse mit 65 % Vitalität (A549) und 63 % (FaDu) jedoch wiederum sehr ähnlich.

Wie bereits erwähnt, ist das Ausmaß der Folgen einer Inkubation mit NP von vielen Faktoren abhängig. Neben NP-spezifische Charakteristika ist dies auch die generelle Suszeptibilität der untersuchten Zellen. In vorliegender Arbeit wurden neben FaDu-Tumorzellen auch BMSC untersucht. Anhand der Stammzellen sollte

jedoch hauptsächlich die genotoxische Wirkung von ZnO-NP getestet werden. Daher kann lediglich der im Rahmen des Comet Assays durchgeführte Trypanblauausschlusstest einen Anhaltspunkt für die Zytotoxizität der Partikel auf BMSC liefern. Dieser zeigte, dass die ZnO-NP bis zu der Maximalkonzentration von 15 µg/l keinen membrandestruierenden toxischen Effekt auf BMSC hatten. Für mehr Aussagekraft wäre es hier sinnvoll, den gleichen Test für beide untersuchten Zellarten durchzuführen. In der Literatur können einige Belege für die Zytotoxizität von NP auf benigne Zellen vorgefunden werden. Guan et al. [2012] demonstrierten zum Beispiel, dass sowohl humane Hepatozyten als auch embryonale Nierenzellen nach Inkubation mit ZnO-NP eine reduzierte Vitalität aufwiesen, wobei hier mit 50-100 µg/ml weitaus höhere Konzentrationen als in vorliegender Arbeit zum Einsatz kamen. Deng et al. [2009] zeigten, dass ZnO-NP auch neurotoxische Wirkungen entwickeln können. Andere Autoren treffen wiederum gegenteilige Aussagen. So konnten Ghosh et al. [2016] keinerlei Abfall der Zellvitalität bei humanen Lymphozyten bis zu 40 µg/ml registrieren. Hong et al. [2013] bezeichnen ZnO-NP bis 100 µg/ml als nicht-toxisch.

Die Unbeständigkeit der Ergebnisse könnte damit erklärt werden, dass sowohl die verwendeten Partikel in ihrer Größe, Ladung und Oberflächenbeschaffenheit als auch die Kulturbedingungen bei den *in vitro* Tests variieren. Beispielsweise kann die Zusammensetzung des Kulturmediums oder das Dispersionsprotokoll den Partikel-Agglomerationsstatus beeinflussen und somit die Sedimentation, den zellulären Kontakt sowie die Reaktivität der NP verändern [Roszak et al., 2016]. So entwickelten ZnO-NP mit einem Durchmesser von 26 nm stärkere zytotoxische Effekte gegenüber humanen Kolonkarzinomzellen als Partikel mit 90 nm [Kang et al., 2013]. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die Wirkung der Partikel von zelltypspezifischen Abwehrmechanismen sowie deren Proliferationsrate abhängig ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Studie vorgestellten Daten lediglich Hinweise dafür liefern können, dass die verwendeten ZnO-NP zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Es ist nur schwer abschätzbar, welchen NP-Konzentrationen der Mensch im Rahmen eines normalen Konsumverhaltes tatsächlich ausgesetzt ist. Hierbei sollte jedoch vor allem bedacht werden, dass

Arbeiter im Rahmen von industriellen Fertigungsprozessen womöglich über lange Zeiträume hinweg größeren Mengen von NP ausgesetzt sind. Die wiederholten Darstellungen von zytotoxischen Effekten *in vitro* geben Anlass dazu, den zunehmenden Einsatz von NP kritisch zu hinterfragen. Bislang gibt es nur wenige Daten aus *in vivo* Studien, jedoch konnten auch hier bereits Belege dafür gefunden werden, dass die Partikel bedenkliche Effekte auf verschiedene Organe wie Leber, Lunge, Niere, Milz und Pankreas haben könnten [Hong et al., 2013].

#### 4.3.2 Induktion von Apoptosesignalwegen

Zellschädigende Effekte nach Exposition gegenüber ZnO-NP konnten, wie oben gezeigt, bereits anhand verschiedener Modelle demonstriert werden. Bei der Bewertung des zytotoxischen Potenzials von NM ist es wichtig, nicht nur zwischen toten und lebendigen Zellen zu differenzieren, sondern auch die zugrundeliegenden molekulargenetischen Mechanismen zu beleuchten. Generell können zwei verschiedene Formen des Zelltodes unterschieden werden: die Apoptose und die Nekrose. Im Zusammenhang mit NP-induziertem Zelluntergang wird der Apoptose häufig eine Hauptrolle zugesprochen. Unter anderem konnte bei humanen dermalen Fibroblasten [Meyer et al., 2011] und Astrozyten [Wang et al., 2014] die Apoptose als vorherrschende Form des Zelltodes nach NP-Inkubation ausgemacht werden. In Makrophagen, die mit ZnO-NP behandelt wurden, konnten apoptosespezifische morphologische Veränderungen registriert werden. Dazu gehören Kernkondensation, DNA-Fragmentierung und die Bildung von Apoptosekörpern [Wilhelmi et al., 2013].

Auch in vorliegender Studie zeigten die durchflusszytometrischen Messungen nach Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung eine von Inkubationszeit und Dosis der NP abhängige Zunahme apoptotischer Zellen. Während die Behandlung für eine und drei Stunden konzentrationsübergreifend noch keine messbaren Effekte hervorrief, stiegen nach sechs Stunden Inkubation mit höheren NP-Dosen (16 und 20 µg/ml) die Raten sowohl von Apoptose als auch von Nekrose. Buerki-Thurnherr et al. [2013] beschrieben eine signifikante Zunahme von Zelltodraten bei Jurkat A, welche Zellen einer humanen T-Lymphozyten-Zelllinie sind, nach Exposition mit 50 µg/ml ZnO-NP für fünf Stunden und mit 10 µg/ml für 15 Stunden. Sie geben an,

dass kürzere Exposition hauptsächlich Apoptose und längere NP-Behandlung größtenteils Nekrose hervorruft. Die in vorliegender Studie präsentierten Daten weisen auf keine direkte Korrelation zwischen Inkubationszeit und der Induktion eines spezifischen Zelltodmechanismus hin. Apoptose und Nekrose scheinen eher auch in frühen Stufen der Zytotoxizität eine gleichwertige Rolle zu spielen. Pan et al. [2007] testeten Gold-NP zwischen 0,8 und 15 nm auf ihre zellulären Effekte hin. Hierbei zeigte sich, dass Partikel von 1,4 nm Nekrose hervorriefen, während 1,2 nm Partikel hauptsächlich Apoptose induzierten. Die Heterogenität der Zelltodmechanismen könnte durch unterschiedliche zelluläre Reaktionen bei individuellen Expositionsdosen aufgrund einer inhomogenen Lösung des ZnO zu erklären sein. Auch die Überlegung, dass die NP-Exposition in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus stattgefunden haben kann, stellt einen Erklärungsansatz hierfür dar [Wilhelmi et al., 2013].

Der Begriff Apoptose umfasst den Ablauf einiger sich gegenseitig regulierender zellulärer Mechanismen, die alle in letzter Konsequenz zur Aktivierung von Caspasen, den Hauptmediatoren der Apoptose, führen. Die Bindung von bestimmten Liganden führt zur Auslösung der rezeptorvermittelten Apoptose. Nach Rezeptorbindung wird Caspase-8 freigesetzt, die daraufhin die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktiviert. Ist die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt oder liegen irreversible DNA-Schäden vor, wird der intrinsische Apoptoseweg aktiviert. Wie auch beim ligandenvermittelten Zelltod kommt es dann zur Aktivierung der Effektor-Caspasen, die den Zelluntergang einleiten.

Es wurde bereits gezeigt, dass es sowohl nach Behandlung mit TiO<sub>2</sub>-NP [Meena et al., 2012] als auch mit ZnO-NP zu einem Anstieg der zellulären Apoptosemarker p53, Bax und Caspase-3 kam [Akhtar et al., 2012]. Diese Beobachtung deckt sich mit den in vorliegender Arbeit präsentierten Werten der PCR. Hier kam es zu einem zeitabhängigen Anstieg der Caspase-3 Aktivität. Interessanterweise fällt beim vergleichenden Blick auf die Daten von PCR und FACS-Analyse auf, dass bereits vor der Detektion der ersten apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie ein erhöhtes Caspase-3 mRNA-Level messbar war. Alarifi et al. [2013] zeigten, dass die Caspase-3-Aktivität in humanen Malignen Melanomzellen nach Inkubation mit ZnO-NP für 24 und 48 Stunden erhöht war. Vorliegende Daten zeigen, dass die

Genexpression bereits nach einer Stunde Exposition mit 20 µg/ml ZnO-NP angestiegen war, vermehrte Apoptose konnte bei dieser Konzentration erst nach 6 Stunden in der FACS-Analyse registriert werden.

Roy et al. [2014] zeigten in einer Western Blot Analyse, dass ZnO-NP neben Caspase-3 auch die Aktivität von Caspase-8 und -9 erhöhen, sodass man eine Aktivierung sowohl des intrinsischen wie auch des extrinsischen Signalweges annehmen kann. Weiterhin konnte Autophagie, ein von der Zelle selbst eingeleiteter Abbauprozess, als Einfluss- und unterstützender Faktor der Apoptose nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen wären hier interessant, um den Einfluss von Autophagie besser zu verstehen, insbesondere, ob Autophagie als Kompensationsmechanismus gegen die Schädigung der Zelle der Apoptose entgegenwirkt oder diese unterstützt.

#### 4.3.3 Mechanismen Nanopartikel-assoziiertes Toxizität

Verschiedene Faktoren werden als apoptoseauslösende Trigger im Rahmen NP-assoziierten Toxizität diskutiert. Häufig wird der Einfluss gelöster Zink ( $Zn^{2+}$ )-Ionen beschrieben [Fukui et al., 2012]. Nach Aufnahme der NP in die Zelle kommt es rasch zu einer Dissolution der Ionen und folglich einem Anstieg der zytosolischen  $Zn^{2+}$ -Konzentration. Kao et al. [2012] geben an, dass die Zunahme der Ionenkonzentration zu mitochondrialer Dysfunktion sowie einer Caspase-Aktivierung und letztlich zur Apoptose der Zelle führt. Die erhöhte  $Zn^{2+}$ -Konzentration stört die Ionenhomöostase der Zelle, sodass es zu Unterbrechungen des Ionentransports sowie Störungen des Aminosäuremetabolismus kommen kann [Sirelkhathim et al., 2015]. Ng et al. [2017] verglichen die Wirkung von  $Zn^{2+}$ -Ionen mit der des entsprechenden NP-Anteils. Hierbei gaben sie an, dass die Ionen allein toxischer auf Zellen wirkten. Andere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen. Beispielsweise argumentieren Moos et al. [2010], dass in ihrem Versuchsaufbau ZnO-NP zwar rasch  $Zn^{2+}$ -Ionen in wässriges Medium abgaben, die resultierenden Konzentrationen jedoch zu gering waren, um toxische Effekte auszulösen. Die in vorliegender Studie präsentierten Daten wurden lediglich bei einem exemplarischen Versuch erhoben. Es zeigte sich jedoch bei allen Konzentrationen und Expositionszeiträumen die Tendenz, dass es nach Hinzufügen von ZnO-NP in

Zellkulturmedium rasch zur Dissolution von  $Zn^{2+}$ -Ionen kam. Die Ionenkonzentration stieg konsekutiv mit zunehmender NP-Dosis und Zeit. Hierbei muss bedacht werden, dass auf diese Weise lediglich extrazelluläre Fraktionen bestimmbar sind. Der Einfluss internalisierter Partikel und intrazellulär gelöster Ionen muss separat untersucht werden. Im MTT-Test konnte nach einstündiger Inkubation von FaDu-Zellen mit dem Überstand des Mediums, dem zuvor 20  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP zwischen einer und 48 Stunden zugesetzt waren, keine Auswirkung auf die Zellvitalität registriert werden.

Ein weiteres Erklärungsmodell der NP-vermittelten Toxizität liefern Huang et. al [2010]. Sie argumentieren, dass es durch die Inkubation mit ZnO-NP zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration kommt. NP scheinen sowohl Calcium-Influx von extrazellulär zu induzieren als auch die intrazelluläre Calciumhomöostase zu stören. Aufgrund der Hyperkalzämie werden verschiedene enzymatische Reaktionen initiiert, die letztlich im Zelltod resultieren. In den meisten Publikationen wird allerdings der Einfluss von oxidativem Stress als verantwortlicher Hauptmechanismus für die toxische Wirkung von ZnO-NP hervorgehoben [Xiao et al., 2016]. Die in vorliegender Studie beschriebene zeitliche Diskrepanz zwischen dem Anstieg der Caspase-3-Aktivität und dem Auftreten apoptotischer Zellen könnte womöglich auf diese Weise erklärt werden. Die Toxizität könnte durch die Induktion von oxidativem Stress bedingt sein, der erst durch die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale DNA-Schäden und letztlich Apoptose hervorruft. Es ist bekannt, dass die mitochondriale Membran eines der ersten Ziele aktivierter Caspasen ist. Eine Permeabilitätsänderung der Membran hat eine Reduktion des zellulären ATP-Levels und letztlich die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen zur Folge [Ricci et al., 2004]

#### 4.3.4 Beeinflussung des Zellzyklus

Es wurde schon berichtet, dass NP Zellwachstum und -proliferation hemmen können [Sharma et al., 2012a]. Dies wird mit einer Arretierung des Zellzyklus in verschiedenen Phasen in Zusammenhang gebracht. Liegen beispielsweise DNA-Schäden in der Zelle vor, kann das Tumorsuppressorprotein p53 das Fortschreiten des Zellzyklus inhibieren und Reparaturmechanismen oder Apoptose initiieren, um

genomische Stabilität zu gewährleisten [Farnebo et al., 2010]. Sowohl im Zusammenhang mit Silber (Ag)- [AshaRani et al., 2009] als auch mit ZnO-NP in humanen epidermalen Keratinozyten [Gao et al., 2016] wurde ein Arrest der behandelten Zellen in der G2/M-Phase beschrieben. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten überein. Der Anteil an FaDu-Zellen in der G2/M-Phase nahm mit steigender NP-Konzentration zu. Ein Arrest der Zellen am G2/M-Kontrollpunkt kann mit dem Vorhandensein von DNA-Schäden assoziiert sein. So wird vermieden, dass geschädigte Zellen in die Mitose eintreten und sich infolgedessen Neoplasien entwickeln können [Pearce und Humphrey, 2001]. Interessant hierbei ist, dass andere Publikationen von einem Arrest der Zellen nach Behandlung mit ZnO-NP in der G0/G1-Phase berichten [Ghosh et al., 2016; Pati et al., 2016]. Während Ghosh et al. Knochenmarkzellen von Mäusen untersuchten, verwendeten Pati und Kollegen eine Makrophagen-Zelllinie. Auch Gao et al. verwendeten mit humanen epidermalen Keratinozyten keine malignen Zellen, sodass dieser Unterschied nicht verantwortlich sein kann für die variablen Effekte auf den Zellzyklus. Verschiedene Zell-Generationszeiten kämen als Ursache für die Heterogenität der Resultate in Frage. Hier könnten weitere Untersuchungen sinnvoll sein, gerade hinsichtlich eines möglichen Einsatzes der NP in der Tumorthherapie. Zellen in der späten M- und G2-Phase gelten als radiosensitiver als in anderen Zellzyklusphasen. Resistenz und Sensitivität gegenüber Bestrahlung korrelieren dabei mit der Formierung von Sulfhydrylgruppen in der Zelle. Diese Gruppen fungieren als natürliche Strahlungsprotektoren und sind in der Regel in der S-Phase am stärksten ausgeprägt [Mahmoudi et al., 2011].

#### 4.3.5 Genotoxizität durch oxidativen Stress

Von vielen physikalischen und chemischen Umweltstoffen, wie ionisierender Strahlung oder UV-Licht, ist bekannt, dass sie DNA-Schäden hervorrufen können [Jackson und Bartek, 2009]. Das Hauptaugenmerk nanotoxikologischer Studien lag bislang vor allem auf zytotoxischen Aspekten, sodass vergleichsweise wenige Daten zu DNA-schädigenden Eigenschaften von NP vorliegen. Genomschäden können bereits bei sub-zytotoxischen Konzentrationen auftreten und Auslöser karzinogener Zelltransformation sein. Genotoxizitätsanalysen sind somit

unerlässlich für eine sichere Risikoevaluation. Es gibt wenige Studien, die Genotoxizität *in vivo* erfassen. Ghosh et al. [2016] detektierten DNA-Schäden in Leberzellen von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von ZnO-NP. Auch eine subakute orale Applikation von ZnO-NP in Mäusen führte zu nachweisbaren genotoxischen Effekten in Leberzellen [Sharma et al., 2012b]. Die meisten vorliegenden Daten zu mutagenen Effekte von NM basieren jedoch auf *in vitro* Studien. Beispielsweise wiesen Uzar et al. [2015] NP-induzierte DNA-Schäden in der aus Ratten etablierten epithelialen Nierenzelllinie NRK-52E nach. Senapati et al. [2015] verwendeten die Monozytenzelllinie THP-1. Im Allgemeinen werden bei der Auswahl der Untersuchungsobjekte Zelllinien oft gegenüber primären Zellen favorisiert, da eine geringere Anzahl repetitiver Experimente nötig ist, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Primäre Zellen sind jedoch weder immortalisiert noch transformiert, was entscheidende Vorteile für den Vergleich mit dem Ursprungsgewebe bringt. Eine Beispielarbeit mit primären Zellen liegt von Hackenberg et al. [2011b] vor, die DNA-Schäden in humanen Nasenschleimhautzellen nach Behandlung mit ZnO-NP feststellen konnten. Auch in primären humanen epidermalen Keratinozyten wurden schon genotoxische Effekte von ZnO-NP nachgewiesen [Sharma et al., 2011b]. In vorliegender Arbeit wurden mit humanen BMSC ebenso primäre Zellen eingesetzt.

Zur Untersuchung des DNA-schädigenden Potenzials von ZnO-NP wurde der Comet Assay durchgeführt. Bereits die Inkubation mit 5 µg/ml der Partikel führte im Wilcoxon-Test zu einem statistisch signifikanten Anstieg des OTM-Wertes in BMSC verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die Steigerung der Expositionsdosis auf 10 und 15 µg/ml hatte eine entsprechende Zunahme des registrierten DNA-Schadens zur Folge. Diese Konzentrationen lagen alle in einem Bereich, der noch keine Zytotoxizität zur Folge hatte. Die Thematik NP-induzierter Genotoxizität wird ähnlich kontrovers diskutiert wie die Zytotoxizität. Während, wie bereits erwähnt, viele Studien ebenfalls DNA-Schäden in Zellen nach Exposition mit ZnO-NP registrierten, deklarieren andere die Partikel als nicht toxisch. Kwon et al. [2014b] testeten beispielsweise vier verschiedene Partikel unterschiedlicher Größe und Ladung durch vier verschiedene genotoxikologische Testverfahren *in vitro* an einer Lungenfibroblastenzelllinie aus chinesischen Hamstern und *in vivo* an Leber- und

Magengewebe von Ratten. Sie gaben an, keine statistisch signifikanten DNA-Schäden festgestellt zu haben. Auch in diesem Zusammenhang muss auf die äußerst beschränkte Vergleichbarkeit von nanotoxikologischen Studien verwiesen werden. Es ist weder möglich noch sinnvoll, exakte Toxizitätsschwellenwerte zu ermitteln. Die vielen Belege für NP-Toxizität sollten vielmehr Anlass für weitere Untersuchungen sein. In welchen Dosen Menschen im normalen Leben NP ausgesetzt sind, ist schwer einschätzbar. Jedoch sind NP bereits jetzt als Bestandteil von Cremes, Zahnpasta oder Lebensmittelverpackungen omnipräsent. Zudem gilt der Einsatz im Rahmen von Diagnostik und Therapie in der Medizin als vielversprechend. Eine chronische Exposition mitunter auch gegenüber geringen Konzentrationen erscheint demnach sehr wahrscheinlich und sollte dringend intensiver hinsichtlich eines mutagenen Potenzials untersucht werden.

Trotz der Inkonsistenz publizierter Daten stimmt die mehrheitliche Meinung mit den in vorliegender Arbeit gezeigten Ergebnisse zur Genotoxizität überein. Hierzu gibt die Publikation von Kwon et al. [2014a] einen Überblick über relevante Studien. Generell können zwei verschiedene Formen NP-induzierter Genotoxizität unterschieden werden. Einerseits können DNA-Schäden durch direkte Interaktion von NP mit DNA auftreten, oder andererseits als indirekte Folge von oxidativem Stress in der Zelle. Als oxidativen Stress bezeichnet man einen zellulären Zustand, der durch hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = *reactive oxygen species*) gekennzeichnet ist. Unter dem Begriff ROS werden Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron zusammengefasst. Dazu gehören beispielsweise Superoxid-Anionen ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) sowie Hydroxyl- ( $\text{HO}\bullet$ ) oder Peroxyl-Radikale ( $\text{RO}_2\bullet$ ). Erhöhte intrazelluläre ROS-Level können Schäden an Lipiden, Proteinen oder der DNA in Form von Strangbrüchen, oxidativen Läsionen, Bildung von Mikrokernen oder Schwesterchromatidaustausch hervorrufen [Schins und Knaapen, 2007]. In physiologischem Zustand sind antioxidative Enzyme wie die Superoxid-Dismutase und die Katalase sowie Radikalfänger wie Glutathion für die Einhaltung eines stabilen Redox-Gleichgewichts verantwortlich [Schieber und Chandel, 2014]. ZnO-NP scheinen sowohl direkt ROS zu generieren als auch die antioxidative Enzymaktivität zu beeinträchtigen. Es entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten von Oxidantien, sodass die antioxidative Kapazität der Zellen

überschritten wird. In der Folge resultieren DNA-Schäden und Apoptose [Alarifi et al., 2013].

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass die Inkubation mit dem fpg-Enzym bei allen Proben zu einer signifikanten Zunahme der DNA-Schäden führte. Demnach war auch bei Zellen, die zuvor nicht mit NP behandelt wurden, oxidative DNA-Schädigung registrierbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Kultivierung von primären Zellen sowie die Trypsinisierung im Rahmen des Versuchs zu einem geringen Grad oxidativen Stress in diesen hervorruft. Wilhelmi et al. [2013] verwenden daher  $\Delta$ fpg, die Differenz der Messwerte mit fpg und ohne fpg, als Maß für den Einfluss von oxidativem Stress auf den DNA-Schaden.  $\Delta$ fpg der OTM-Werte stieg in vorliegender Arbeit mit zunehmender NP-Konzentration, was auf eine dosisabhängige Zunahme des oxidativen Stresses in der Zelle hinweist. Oxidative DNA-Schäden stehen in enger Beziehung zu erhöhten ROS-Leveln und gelten deshalb als einer der sensitivsten Marker für das Vorliegen von oxidativem Stress in der Zelle [Gerloff et al., 2012]. ROS induzieren vermutlich die oxidative Degradation von Lipiden, verändern das Zellmembranpotential und beeinflussen die Plasmamembranintegrität. Als Folge der Membrandysfunktion werden letzten Endes Zelltodmechanismen initiiert [Stark, 2005].

Die geschilderten Beobachtungen sind wohl mit der Annahme vereinbar, dass oxidativer Stress mitverantwortlich ist für die gezeigten genotoxischen Effekte von ZnO-NP in humanen BMSC. Eine erweiterte Untersuchung von Biomarkern wie der Lipidperoxidation, dem Glutathion Level oder der Aktivität von Superoxiddismutase und Katalase könnte neuerliche Kenntnisse über den Einfluss von oxidativem Stress im Zusammenhang NP-assoziiierter Toxizität liefern.

## 4.4 Ausblick

### 4.4.1 Einsatz von Nanopartikeln als Teil moderner Tumortherapiestrategien

Seit Beginn der 1970er Jahre hat sich die Anzahl der Neuerkrankungen an Malignomen in Deutschland beinahe verdoppelt. Dies kann unter anderem als

Folge der demografischen Alterung der Bevölkerung angesehen werden [Robert Koch-Institut, 2016]. Krebs stellt jedoch auch ein globales Problem dar, da die Erkrankung bei vielen Betroffenen trotz des Fortschritts der medizinischen Versorgung aufgrund später Diagnosen und ineffizienter Therapie fatale Verläufe nimmt. Häufig ist der Gebrauch verfügbarer Behandlungsmöglichkeiten wie Chemo-, Radio-, Hormon- oder Immuntherapie durch Resistenzen, Tumorerheterogenität oder biologische Grenzen limitiert. Große Hoffnungen werden daher in den Einsatz von Nanotechnologie zur Behandlung von Tumorerkrankungen gelegt. Mit Hilfe von NM erscheint es möglich, neue Formen zielgerichteter und effizienter Therapiestrategien mit weniger Nebenwirkungen verglichen mit herkömmlichen Methoden zu entwickeln [Ahmad et al., 2018].

Die Anwendung von NP ist in verschiedenen Bereichen der Tumordiagnostik und -therapie denkbar. Beispielsweise können sie als Biosensoren zur Diagnostik von Malignomen eingesetzt werden. Solide Tumoren sind meist aufgrund einer Überstimulation proangiogener Signale hypervaskularisiert, wobei die Gefäße keine normale Gefäßstruktur aufweisen, sondern hochpermeabel sind. NP mit einer Größe von 10-200 nm können diese Blutgefäße penetrieren und in der Tumormasse akkumulieren, was eine genaue Detektion dieser ermöglicht [Danhier et al., 2010]. Dank moderner nanotechnologischer Produktionsverfahren ist es möglich, die exakte Größe von NP zu kontrollieren. Ebenso können spezifische Oberflächenmodifikationen vorgenommen werden, um die Zellspezifität und Internalisierung von Therapeutika zu verbessern. Hierbei werden eine aktive und eine passive Form der gezielten Pharmakotherapie unterschieden. Während die aktive Form auf hochaffinen Ligand-Rezeptor-Interaktionen beruht [Fratoddi et al., 2014], wird als passive Variante die bereits erwähnte Penetration und Retention in neoplastischem Gewebe bezeichnet [Luo und Prestwich, 2002]. Peer et al. [2007] beschreiben, dass viele Tumoren die Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie beispielsweise ErbB2 in Mammakarzinomen, hochregulieren. Diese Rezeptoren können selektiv mittels anti-ErbB2 Oberflächenantikörpern detektiert werden. Durch die Kopplung mit Chemotherapeutika kann somit eine zielgerichtete Tumorthherapie mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil gewährleistet werden. Weiterhin ermöglicht es den Einsatz von photo- und

sonodynamischen Therapiemodalitäten. Halbleiter wie  $\text{TiO}_2$  und  $\text{ZnO}$  können durch UV-Licht und Ultraschallwellen angeregt werden, wodurch gezielt reaktive Sauerstoffradikale im Gewebe erzeugt und antikarzinogene Effekte ausgelöst werden können [Bogdan et al., 2017]. Photokatalytischer Zelltod konnte so beispielsweise bereits *in vitro* in PECA des Kopf-Hals-Bereichs nachgewiesen werden [Hackenberg et al., 2010].

Zink ist als Spurenelement in den Ablauf vieler biomolekularer Prozesse involviert. Steigt die intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration jedoch stark an, kommt es zum Absterben der Zelle durch Apoptose. Demgegenüber reagieren nachweislich vor allem Tumorzellen sensibel. Die Induktion von Apoptose durch Zink in malignen Zellen lässt an einen Einsatz von  $\text{ZnO}$ -Nanostrukturen als antitumoral wirksames Mittel denken [Franklin und Costello, 2009]. Wiesmann et al. [2019] beschreiben, dass die gezielte Akkumulation von  $\text{ZnO}$ -NP in einem Tumorgebiet eine therapeutische Perspektive darstellt. Es käme daraufhin zu einer Zink-Überladung mit selektiver Zellschädigung der malignen Zellen, das gesunde Gewebe bliebe unbeschädigt. Die residualen NP könnten weiterhin einfach aus dem Körper ausgeschieden werden. Die in vorliegender Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass NP-Konzentrationen, die signifikant zytotoxisch auf FaDu-Tumorzellen wirkten, keinen Abfall der Zellvitalität in BMSC auslösten. Hierbei muss jedoch relativierend erwähnt werden, dass mit dem MTT-Test und dem Trypanblauausschlusstest zwei verschiedene Toxizitätstests und Endpunkte zum Einsatz kamen. Die Unterschiede waren jedoch so auffällig, um sie als Basis für die Annahme heranzuziehen, dass  $\text{ZnO}$ -NP einen anderen Einfluss auf Tumorzellen haben als auf nicht-maligne Zellen. Die eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich genotoxischer Schäden bei sub-zytotoxischen Konzentrationen sollten dazu anregen, die Anwendung von  $\text{ZnO}$ -NP als Tumorthapeutikum letztlich doch kritisch zu hinterfragen.

#### 4.4.2 Nanopartikel – Hoffnungsträger oder unterschätztes Gesundheitsrisiko?

NM sind allgegenwärtig. Wandfarben, Sonnencremes, Zahnpasta oder Funktionskleidung sind nur wenige Beispiele für Produkte, in denen NP verarbeitet

sind. Die Entwicklung neuer Erzeugnisse mit Inhaltsstoffen im Nanomaßstab schreitet rapide voran und ermöglicht wie bereits geschildert Innovation auf vielen Gebieten. Für Verbraucher sind diese neuen Materialien oft schwer greifbar. Mediale Kampagnen zur öffentlichen Aufklärung über „nano“ werden immer häufiger initiiert. Das Bundesinstitut für Risikobewertung veröffentlichte 2013 NanoMedia, eine Analyse der Medienberichterstattung zum Thema Nanotechnologie 2008-2012. Darin wurde eine Reihe namhafter deutscher Tages- und Wochenzeitungen hinsichtlich ihrer Berichterstattung zum Thema Nanotechnologie ausgewertet. In mehr als 80 % der Artikel im angegebenen Zeitraum wurde zumindest ein Nutzen genannt, wohingegen Risiken selten thematisiert wurden [Bundesinstitut für Risikobewertung, 2013]. Richtlinien für den Verbraucherschutz schienen lange Zeit dem Tempo neuer Entwicklungen nicht folgen zu können. Erst seit dem Jahr 2013 sind NM erstmals in einer von der EU-Kommission verfassten Verordnung berücksichtigt. Laut dieser als Kosmetik-Verordnung bezeichneten Regelungen müssen Kosmetika, die NM enthalten, der EU-Kommission gemeldet werden. Zudem müssen umfassende Informationen über vorhersehbare Expositionsbedingungen, eine Schätzung der in Verkehr gebrachten Mengen sowie das toxikologische Profil und Sicherheitsdaten vorgelegt werden [Amtsblatt der Europäischen Union, 2009].

In vorliegender Arbeit wurden viele Daten präsentiert, die auf potenziell schädliche Eigenschaften von NM hinweisen. Produkte mit Bestandteilen im Nanomaßstab haben bei Verbrauchern mittlerweile Einzug in das alltägliche Leben gefunden, jedoch erscheinen eine Vielzahl an Fragen zu Gesundheits- und Umweltverträglichkeit sowie adäquaten Methoden der Risikoabschätzung unbeantwortet. Vom Bundesinstitut für Risikobewertung wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage darüber getroffen, ob von NM gesundheitliche Risiken ausgehen. Ferner gibt es keine Empfehlungen zu verantwortungsvollem Umgang mit so genannten „Nanoabfällen“, die Langzeitauswirkungen auf Natur und Umwelt sind unbekannt. Um einen zuverlässigen Verbraucherschutz zu gewährleisten, sind in Zukunft weitere intensive Forschungsaktivitäten vonnöten. Weiterhin ist ein offener Dialog wichtig, um mögliche Risiken von NM in das öffentliche Bewusstsein zu rücken.

## 5 Zusammenfassung

Nanopartikel (NP) besitzen aufgrund der im Verhältnis zum Volumen großen Oberfläche einzigartige physikochemische Charakteristika. Ihr verstärktes katalytische Verhalten und eine hohe chemische Reaktivität gelten als interessante Grundvoraussetzungen für einen multidisziplinär eingesetzten Werkstoff. NP sind in zunehmendem Maße neben industriellen Prozessen auch als Bestandteil von Konsumprodukten vorzufinden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten bereits schädliche Effekte auf humane Zellen nachgewiesen werden, sodass die nanotoxikologische Forschung einen wichtigen Stellenwert im Umwelt- und Verbraucherschutz einnimmt. Verschiedene zellbiologische Effekte von NP wurden bereits diskutiert, die Datenlage präsentiert sich bislang jedoch speziell bezüglich NP-assoziiertes Toxizität uneinheitlich. Zinkoxid (ZnO) ist aktuell eines der am häufigsten im Rahmen industrieller Produktionen eingesetzten NP. Ziel dieser Arbeit war es daher, sowohl zyto- als auch genotoxische Effekte von ZnO-NP zu analysieren und mögliche molekulare Prozesse zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf zeit- und dosisabhängige Dynamik sowie den Unterschieden in malignen und nicht-malignen Zellen gelegt werden.

Eine toxikologische Testreihe bestehend aus MTT-Test, Annexin-V/ Propidiumiodid FACS, Zellzyklusanalyse und Caspase-3-Aktivitätsmessung wurde am Modell der humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu durchgeführt. Zudem wurden humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (BMSC) von 10 Spendern auf oxidative DNA-Schäden nach Exposition gegenüber ZnO-NP untersucht. Im MTT-Test wurden zytotoxische Effekte in FaDu-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NP-Konzentrationen zwischen 6 µg/ml und 50 µg/ml evaluiert. Um eine exakte zeit- und konzentrationsabhängige Differenzierung der Induktion von Apoptose zu ermöglichen, wurden die Zellen für 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden mit NP in den Konzentrationen 8, 10, 12, 16 und 20 µg/ml behandelt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. In Analogie dazu wurde die Aktivität des Apoptose-Markerenzym Caspase-3 zeitabhängig durch quantitative RT-PCR gemessen. Um mögliche Einflüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen nachvollziehen zu können, wurde eine Zellzyklusanalyse nach 24-stündiger-

Inkubation mit 4, 8, 10 und 12 µg/ml durchgeführt. Die Messung genotoxischer Effekte erfolgte mit Hilfe des fpg-modifizierten Comet Assays an BMSC nach Behandlung mit 5, 10 und 15 µg/ml ZnO-NP über 24 Stunden.

Im MTT-Test konnte bei allen getesteten Konzentrationen eine Reduktion der Zellvitalität festgestellt werden. Evidenz für die Zytotoxizität der ZnO-NP lieferten auch zellmorphologische Veränderungen, die lichtmikroskopisch bereits nach einer Stunde Inkubationszeit sichtbar wurden. Die FACS-Analyse zeigte einen zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg apoptotischer Zellen. Erhöhte Genexpressionswerte von Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptose, waren bereits nach einstündiger Inkubation mit 20 µg/ml messbar. Weiterhin wurde die Tendenz eines Arrests der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus beobachtet. Diese Veränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Im Comet Assay wurde ab 5 µg/ml ZnO-NP im Wilcoxon-Test eine signifikante DNA-Fragmentierung bei BMSC im Vergleich zu unbehandelten Zellen registriert. Mit dem Einsatz des fpg-Enzyms wurde der Versuch weiter sensitiviert. Hierdurch konnte oxidativer Stress als Einflussfaktor auf die DNA-Schädigung nachgewiesen werden.

Die präsentierten Daten erlauben die Annahme, dass ZnO-NP in den eingesetzten Konzentrationen zytotoxische Eigenschaften aufweisen sowie das Potenzial besitzen, Apoptoseprozesse zu induzieren und Einfluss auf den Zellzyklus zu nehmen. Ebenso scheinen sie in der Lage zu sein, relevante DNA-Schäden induzieren zu können. Um eine realistischere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus zu ermöglichen, wäre in zukünftigen Projekten der Einsatz von *in vivo* Modellen erstrebenswert. Weiterhin wären auf Basis der gewonnenen Daten weitere mechanistische Untersuchungen des genotoxischen Potenzials von ZnO-NP interessant. Hierbei könnten einerseits andere Testverfahren wie der Mikrokern-Test oder der Schwesterchromatidaustausch-Test angewandt werden. Andererseits wäre die Untersuchung von Glutathion-Level oder Superoxiddismutase- und Katalaseaktivität als Biomarker von oxidativem Stress interessant.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>BMSC</b>	Humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks
<b>BSA</b>	bovines Serum Albumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>Et al.</b>	Et alii
<b>FACS</b>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i> ; Fetales Kälberserum
<b>fpg</b>	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunde
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	molar (mol/liter)
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NM</b>	Nanomaterial
<b>NP</b>	Nanopartikel
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>MMS</b>	Methylmethansulfonat
<b>OTM</b>	<i>Olive Tail Moment</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
<b>PECA</b>	Plattenepithelkarzinom
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institution</i>
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> ; Standardabweichung
<b>TD/DT</b>	<i>Tail DNA/DNA in tail</i>
<b>TL</b>	<i>Tail Length</i>
<b>V</b>	Volt
<b>vs.</b>	Versus
<b>ZnO-NP</b>	Zinkoxid-Nanopartikel

## 6.2 Datenübersicht

*Tabelle 14:* Werte der Einzelzellmikrogelelektrophorese ohne fpg-Enzym mit BMSC von 10 Patienten. Angabe von Mittelwert (Mean), Median und Standardabweichung (SD).

Patient	Kontrolle			Zinkoxid-Nanopartikel								
	OTM	DT	TL	5µg/ml			10µg/ml			15µg/ml		
				OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0.64	1.60	43.85	0.97	2.22	53.92	1.61	4.36	66.67	2.05	5.10	76.10
2	0.77	2.13	50.60	1.03	2.98	57.51	1.14	3.31	58.71	1.67	4.56	70.74
3	0.30	1.19	35.34	0.77	2.77	44.94	1.24	4.13	55.03	2.30	5.86	70.29
4	0.71	1.97	48.76	1.74	4.56	67.15	0.97	2.71	53.97	2.58	6.68	74.41
5	0.36	1.43	36.14	0.65	2.80	36.30	1.24	4.48	50.23	1.53	4.91	58.06
6	0.63	1.96	40.08	0.90	2.64	38.91	0.97	2.89	41.02	2.21	5.96	56.48
7	0.54	1.81	43.86	1.37	5.00	50.30	2.02	6.98	52.45	2.06	6.81	54.00
8	0.51	1.29	47.66	0.88	2.23	55.70	1.37	3.75	63.71	1.43	3.95	64.82
9	0.75	2.42	42.40	1.50	4.49	54.81	1.05	3.32	51.82	1.92	5.50	64.44
10	0.46	1.48	40.37	1.14	3.02	52.26	1.23	4.09	50.60	1.94	5.38	61.65
Mean	0.57	1.73	42.91	1.09	3.27	51.18	1.28	4.00	54.42	1.97	5.47	65.10
Median	0.59	1.71	43.13	1.00	2.89	53.09	1.23	3.92	53.21	1.99	5.44	64.63
SD	0.15	0.38	4.85	0.33	0.97	8.65	0.31	1.15	6.91	0.34	0.85	7.25

*Tabelle 15:* Werte der Einzelzellmikrogelelektrophorese mit fpg-Enzym mit BMSC von 10 Patienten. Angabe von Mittelwert (Mean), Median und Standardabweichung (SD).

Patient	Kontrolle			Zinkoxid-Nanopartikel								
	OTM	DT	TL	5µg/ml			10µg/ml			15µg/ml		
				OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	1.71	4.84	64.16	4.03	10.53	83.22	6.56	15.67	104.86	6.76	14.69	107.99
2	1.84	5.11	65.71	2.46	6.80	70.58	4.42	12.03	84.47	4.81	12.50	90.98
3	0.58	1.99	39.13	1.38	4.74	44.64	2.03	5.60	55.52	2.83	8.95	56.19
4	1.91	5.07	68.88	4.33	10.87	89.18	5.31	12.61	98.45	5.40	11.93	96.00
5	0.57	2.51	34.95	1.13	4.46	49.12	1.92	7.53	58.95	2.79	8.12	83.22
6	1.41	4.36	55.64	1.36	4.21	55.58	1.22	3.90	50.19	4.75	11.75	72.90
7	2.29	6.99	59.41	3.08	10.14	60.39	3.17	10.04	65.04	3.94	12.45	66.93
8	0.71	1.95	45.59	1.92	4.80	70.40	1.80	5.70	64.46	2.15	7.06	60.54
9	0.51	2.07	38.73	1.45	5.13	47.25	1.23	4.20	50.98	2.57	7.40	61.87
10	0.71	2.45	47.55	2.00	5.87	64.83	2.59	7.60	68.07	3.81	10.02	81.37
Mean	1.22	3.73	51.98	2.31	6.76	63.52	3.03	8.49	70.10	3.98	10.49	77.80
Median	1.06	3.44	51.60	1.96	5.50	62.61	2.31	7.56	64.75	3.88	10.88	77.14
SD	0.64	1.67	11.76	1.09	2.56	14.31	1.73	3.75	18.38	1.38	2.42	16.18

*Tabelle 16:* Werte der quantitativen RT-PCR. Angegeben ist der fold change.

Versuch	Kontrolle	Inkubation mit 20µg/ml Zinkoxid-Nanopartikeln					
		1h	3h	6h	12h	24h	48h
1	1.02	1.39	1.71	2.06	2.62	1.83	2.49
2	1.03	1.27	1.52	1.67	1.23	1.93	2.51
3	1.01	1.18	1.45	1.69	1.52	1.95	2.00
4	1.04	1.38	1.72	2.06	1.93	3.03	4.69
Mean	1.02	1.31	1.60	1.87	1.83	2.19	2.92
Median	1.02	1.33	1.62	1.87	1.72	1.94	2.50
SD	0.01	0.09	0.12	0.19	0.52	0.49	1.04

Tabelle 17: Werte des MTT-Test. Angegeben ist der Anteil vitaler Zellen in [%] zur Negativkontrolle.

Versuch	Kontrolle			Zinkoxid-Nanopartikel				
	0µg/ml	6µg/ml	8µg/ml	10µg/ml	12µg/ml	16µg/ml	20µg/ml	50µg/ml
1	100.00	85.05	88.02	83.14	82.61	64.03	52.07	11.13
2	100.00	87.78	90.52	84.85	84.56	63.34	53.47	11.14
3	100.00	87.78	89.62	85.55	85.45	64.33	55.00	10.86
4	100.00	90.34	91.72	83.25	86.60	66.50	55.27	11.33
5	100.00	88.64	92.79	85.87	87.35	67.04	55.83	11.36
6	100.00	90.77	93.00	87.02	89.05	65.34	57.71	11.56
7	100.00	88.02	89.29	85.30	85.39	66.80	54.92	11.10
8	100.00	89.00	90.29	84.94	88.21	26.03	56.00	11.30
9	100.00	98.70	91.40	82.21	37.22	27.67	16.96	5.65
10	100.00	100.67	94.56	85.11	38.78	27.17	18.00	5.56
11	100.00	100.22	92.17	87.07	38.04	26.74	17.61	5.43
12	100.00	99.15	91.65	84.04	37.63	26.11	16.60	5.29
13	100.00	95.54	90.47	84.56	36.89	26.58	16.79	5.28
14	100.00	96.52	90.82	85.44	37.66	26.55	17.19	5.49
15	100.00	96.18	89.15	83.78	36.98	26.31	16.84	5.37
16	100.00	95.58	90.65	83.04	37.00	47.40	15.21	5.34
17	100.00	89.80	85.14	72.02	59.65	50.53	18.11	6.83
18	100.00	94.37	79.19	68.37	64.44	52.18	19.64	7.22
19	100.00	95.10	81.15	68.58	65.07	52.42	20.02	7.24
20	100.00	85.18	82.28	68.74	65.63	57.85	20.52	7.30
21	100.00	105.04	78.34	77.17	71.66	53.90	22.37	8.08
22	100.00	97.37	83.21	70.69	67.29	56.78	20.75	7.68
23	100.00	92.47	90.15	74.97	73.81	56.36	22.25	8.11
24	100.00	98.28	87.63	72.51	69.99	21.99	21.99	8.02
Mean	100.00	93.65	88.47	80.34	63.62	46.66	30.88	8.07
Median	100.00	94.74	90.22	83.52	66.46	52.30	20.63	7.49
SD	0.00	5.27	4.41	6.49	20.19	16.74	17.20	2.41

Tabelle 18: Werte der Zellzyklusanalyse. Angegeben ist der Anteil der Zellen in [%].

Versuch	Kontrolle			Zinkoxid-Nanopartikel											
				4µg/ml			8µg/ml			10µg/ml			12µg/ml		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
1	42.5	12.2	45.3	43.9	13.7	42.4	42.9	12.4	44.7	39.7	12.2	48.1	27.7	17	55.3
2	49.9	9.9	40.2	49.5	11.8	38.7	46.8	13.1	40.1	47	14.3	38.7	29.9	14.9	55.2
3	48.8	11.5	39.7	45.2	12.6	42.2	52.1	12.3	35.6	36.1	11.3	52.6	29.6	14.8	55.6
Mean	47.1	11.2	41.7	46.2	12.7	41.1	47.3	12.6	40.1	40.9	12.6	46.5	29.1	15.6	55.4
Median	48.8	11.5	40.2	45.2	12.6	42.2	46.8	12.4	40.1	39.7	12.2	48.1	29.6	14.9	55.3
SD	3.3	1.0	2.5	2.4	0.8	1.7	3.8	0.4	3.7	4.5	1.3	5.8	1.0	1.0	0.2

Tabelle 19: Werte der Annexin-V/Propidiumiodid-FACS-Analyse. Angegeben sind die vitalen Zellen in [%].

Versuche	Kontrolle	1h						3h						6h						µg/ml ZnO NP		
		8	10	12	16	20	8	10	12	16	20	8	10	12	16	20	8	10	12		16	20
1	91.3	79.2	83.9	90.6	93.9	94.2	90.7	87.3	94.8	94.3	94.6	92.6	88.3	94.2	89.6	87.8						
2	93.1	89.7	92.6	89.3	88.9	90.8	90.2	93.2	94.6	92.7	93.9	90.8	93.4	92.4	89.1	84.8						
3	94.0	91.0	90.6	90.3	90.8	90.4	94.0	93.7	93.8	92.1	91.9	93.9	91.9	93.8	88.6	84.6						
Mean	92.8	86.6	89.0	90.1	91.2	91.8	91.6	91.4	94.4	93.0	93.5	92.4	91.2	93.5	89.1	85.7						
Median	93.1	89.7	90.6	90.3	90.8	90.8	90.7	93.2	94.6	92.7	93.9	92.6	91.9	93.8	89.1	84.8						
SD	1.1	5.3	3.7	0.6	2.1	1.7	1.7	2.9	0.4	0.9	1.1	1.3	2.1	0.8	0.4	1.5						
		<b>12h</b>						<b>24h</b>						<b>48h</b>								
Versuche		8	10	12	16	20	8	10	12	16	20	8	10	12	16	20	8	10	12	16	20	µg/ml ZnO NP
1		95.8	94.8	92.7	84.3	55.5	94.9	89.9	94.1	52.1	15.0	94.1	92.9	84.2	51.4	9.0						
2		94.0	91.7	87.7	71.4	48.9	95.4	91.4	91.2	83.8	21.9	95.6	93.5	85.5	70.1	6.4						
3		96.1	94.5	91.6	85.2	59.8	95.6	94.9	91.9	59.0	14.7	97.4	95.3	89.8	50.9	4.8						
Mean		95.3	93.7	90.7	80.3	54.7	95.3	92.1	92.4	65.0	17.2	95.7	93.9	86.5	57.5	6.7						
Median		95.8	94.5	91.6	84.3	55.5	95.4	91.4	91.9	59.0	15.0	95.6	93.5	85.5	51.4	6.4						
SD		0.9	1.4	2.1	6.3	4.5	0.3	2.1	1.2	13.6	3.3	1.3	1.0	2.4	8.9	1.7						

## 6.3 Literaturverzeichnis

- Ahamed, M., Akhtar, M.J., Siddiqui, M.A., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A.A., AlSalhi, M.S., Alrokayan, S.A.**, 2011. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* 283, 101-108.
- Ahmad, K., Rabbani, G., Baig, M.H., Lim, J.H., Khan, M.E., Lee, E.J., Ashraf, G.M., Choi, I.**, 2018. Nanoparticle-Based Drugs: A Potential Armamentarium of Effective Anti-Cancer Therapies. *Curr Drug Metab* 19 (10), 839-846.
- 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, 845-857.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Verma, A., Ahamed, M., Ahmed, M., Alhadlaq, H.A.**, 2013. Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 8, 983-993.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A.**, 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* 463, 111-172.
- Amtsblatt der Europäischen Union**, 2009. Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel.  
Im Internet verfügbar unter:  
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:de:PDF> (Stand 09/18)
- Amtsblatt der Europäischen Union**, 2011. Empfehlung der Kommission zur Definition von Nanomaterialien vom 18. Oktober 2011 (L275/38).  
Im Internet verfügbar unter:  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=EN>. (Stand 09/18)

- AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279-290.
- Athie-Garcia, M.S., Pinon-Castillo, H.A., Munoz-Castellanos, L.N., Ulloa-Ogaz, A.L., Martinez-Varela, P.I., Quintero-Ramos, A., Duran, R., Murillo-Ramirez, J.G., Orrantia-Borunda, E., 2018.** Cell wall damage and oxidative stress in *Candida albicans* ATCC10231 and *Aspergillus niger* caused by palladium nanoparticles. *Toxicol In Vitro*, 111-120.
- Bakand, S., Hayes, A., 2016.** Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *Int J Mol Sci* 17, 929.
- Bartlomiejczyk, T., Lankoff, A., Kruszewski, M., Szumiel, I., 2013.** Silver nanoparticles - allies or adversaries? *Ann Agric Environ Med* 20, 48-54.
- BD-Biosciences, 2011a.** Cell Cycle and DNA Content Analysis Using the BD Cycletest Assay on the BD FACSVerse™ System.  
Im Internet verfügbar unter:  
[https://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_Instruments\\_FACSVerse\\_CellCycle\\_DNA\\_Analysis\\_AppNote.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Instruments_FACSVerse_CellCycle_DNA_Analysis_AppNote.pdf) (Stand 09/18)
- BD-Biosciences, 2011b.** Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System.  
Im Internet verfügbar unter:  
[https://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_FACSVerse\\_Apoptosis\\_Detection\\_AppNote.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf) (Stand 09/18)
- Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A., Wick, P., 2007.** The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* 45, 2643-2648.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993.** Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482.
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A.G., Reichel, C.A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., Krombach, F., 2008.** Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol* 5, 14.

- Bogdan, J., Plawinska-Czarnak, J., Zarzynska, J., 2017.** Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review. *Nanoscale Res Lett* 12, 225.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A., Laval, J., 1990.** Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J Biol Chem* 265, 3916-3922.
- Boroumand Moghaddam, A., Moniri, M., Azizi, S., Abdul Rahim, R., Bin Ariff, A., Navaderi, M., Mohamad, R., 2017.** Eco-Friendly Formulated Zinc Oxide Nanoparticles: Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in the MCF-7 Cancer Cell Line. *Genes (Basel)* 8, 281.
- Buerki-Thurnherr, T., Xiao, L., Diener, L., Arslan, O., Hirsch, C., Maeder-Althaus, X., Grieder, K., Wampfler, B., Mathur, S., Wick, P., Krug, H.F., 2013.** In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology* 7, 402-416.
- Bundesinstitut für Risikobewertung, 2013.** NanoMedia: Analyse der Medienberichterstattung zum Thema Nanotechnologie 2008–2012, Im Internet verfügbar unter:  
<https://www.bfr.bund.de/cm/350/nanomedia-analyse-der-medienberichterstattung-zum-thema-nanotechnologie-2008-2012.pdf>.  
(Stand 09/18)
- Chakraborty, S., Castranova, V., Perez, M.K., Piedimonte, G., 2017.** Nanoparticles-induced apoptosis of human airway epithelium is mediated by proNGF/p75NTR signaling. *J Toxicol Environ Health A* 80, 53-68.
- Clogston, J.D., Patri, A.K., 2011.** Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol* 697, 63-70.
- Collins, A.R., 2014.** Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta* 1840, 794-800.

**Collins, A.R., Annangi, B., Rubio, L., Marcos, R., Dorn, M., Merker, C., Estrela-Lopis, I., Cimpan, M.R., Ibrahim, M., Cimpan, E., Ostermann, M., Sauter, A., Yamani, N.E., Shaposhnikov, S., Chevillard, S., Paget, V., Grall, R., Delic, J., de-Cerio, F.G., Suarez-Merino, B., Fessard, V., Hogeveen, K.N., Fjellsbo, L.M., Pran, E.R., Brzicova, T., Topinka, J., Silva, M.J., Leite, P.E., Ribeiro, A.R., Granjeiro, J.M., Grafstrom, R., Prina-Mello, A., Dusinska, M., 2017.** High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 9:e1413. doi: 10.1002/wnan.1413

**Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R., 1996.** Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3, 465-469.

**Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993.** Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.

**Danhier, F., Feron, O., Preat, V., 2010.** To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 148, 135-146.

**Das, A., Wang, D.Y., Leuteritz, A., Subramaniam, K., Greenwell, H.C., Wagenknecht, U., Heinrich, G., 2011.** Preparation of zinc oxide free, transparent rubber nanocomposites using a layered double hydroxide filler. *J Mater Chem* 21, 7194-7200.

**Dasgupta, N., Ranjan, S., Chakraborty, A.R., Ramalingam, C., Shanker, R., Kumar, A., 2016.** Nanoagriculture and Water Quality Management. In: Ranjan S., Dasgupta N., Lichtfouse E. (eds) *Nanoscience in Food and Agriculture 1. Sustainable Agriculture Reviews*, vol 20. Springer, Cham, 1-42.

**De Berardis, B., Civitelli, G., Condello, M., Lista, P., Pozzi, R., Arancia, G., Meschini, S., 2010.** Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 246, 116-127.

**Demir, E., Creus, A., Marcos, R., 2014.** Genotoxicity and DNA repair processes of zinc oxide nanoparticles. *J Toxicol Environ Health A* 77, 1292-1303.

- 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.
- Dhawan, A., Sharma, V., 2010.** Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal Bioanal Chem* 398, 589-605.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Farnebo, M., Bykov, V.J., Wiman, K.G., 2010.** The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 85-89.
- Feltis, B.N., SJ, O.K., Harford, A.J., Piva, T.J., Turney, T.W., Wright, P.F., 2012.** Independent cytotoxic and inflammatory responses to zinc oxide nanoparticles in human monocytes and macrophages. *Nanotoxicology* 6, 757-765.
- Fenech, M., 1997.** The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 392, 11-18.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F., 2013.** Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49, 1374-1403.
- Franklin, R.B., Costello, L.C., 2009.** The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *J Cell Biochem* 106, 750-757.
- Fratoddi, I., Venditti, I., Cametti, C., Russo, M.V., 2014.** Gold nanoparticles and gold nanoparticle-conjugates for delivery of therapeutic molecules. Progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B* 2, 4204-4220.
- Freudenreich, J., 2010.** DPMA – Erfinderaktivitäten 2010, Die Herstellung von Nanopartikeln.  
Im Internet verfügbar unter:  
[https://www.dpma.de/docs/dpma/veroeffentlichungen/1/ea\\_2010-1.pdf](https://www.dpma.de/docs/dpma/veroeffentlichungen/1/ea_2010-1.pdf).  
(Stand 11/18)

- Fried, J., Perez, A.G., Clarkson, B.D.,** 1976. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J Cell Biol* 71, 172-181.
- Fukui, H., Horie, M., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., Nishio, K., Komaba, L.K., Maru, J., Miyauhi, A., Nakamura, A., Kinugasa, S., Yoshida, Y., Hagihara, Y., Iwahashi, H.,** 2012. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem Biol Interact* 198, 29-37.
- Gao, F., Ma, N., Zhou, H., Wang, Q., Zhang, H., Wang, P., Hou, H., Wen, H., Li, L.,** 2016. Zinc oxide nanoparticles-induced epigenetic change and G2/M arrest are associated with apoptosis in human epidermal keratinocytes. *Int J Nanomedicine* 11, 3859-3874.
- Gehrke, T., Scherzad, A., Ickrath, P., Schendzielorz, P., Hagen, R., Kleinsasser, N., Hackenberg, S.,** 2017. Zinc oxide nanoparticles antagonize the effect of Cetuximab on head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Biol Ther* 18, 513-518.
- Gerloff, K., Fenoglio, I., Carella, E., Kolling, J., Albrecht, C., Boots, A.W., Forster, I., Schins, R.P.,** 2012. Distinctive toxicity of TiO<sub>2</sub> rutile/anatase mixed phase nanoparticles on Caco-2 cells. *Chem Res Toxicol* 25, 646-655.
- Ghosh, M., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Jana, A., Nag, A., Mukherjee, A.,** 2016. Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo. *Food Chem Toxicol*, 286-296.
- Glauner, B.,** 2006. Stromausschlussverfahren, Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *BIOspektrum*, 394 - 395.
- Golbamaki, N., Rasulev, B., Cassano, A., Marchese Robinson, R.L., Benfenati, E., Leszczynski, J., Cronin, M.T.,** 2015. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale* 7, 2154-2198.
- Govindaraju, K., Krishnamoorthy, K., Alsagaby, S.A., Singaravelu, G., Premanathan, M.,** 2015. Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells. *IET Nanobiotechnol* 9, 325-330.

- Griffin, M.F., Kalaskar, D.M., Seifalian, A., Butler, P.E.,** 2016. An update on the Application of Nanotechnology in Bone Tissue Engineering. *Open Orthop J* 10, 836-848.
- Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H., Liu, M.,** 2012. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 7, 602.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Gohla, A., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N.,** 2014. Nanoparticle-induced photocatalytic head and neck squamous cell carcinoma cell death is associated with autophagy. *Nanomedicine (Lond)* 9, 21-33.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N.,** 2010. Zinc oxide nanoparticles induce photocatalytic cell death in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines in vitro. *Int J Oncol* 37, 1583-1590.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N.,** 2011a. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 25, 657-663.
- Hackenberg, S., Zimmermann, F.Z., Scherzed, A., Friehs, G., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N.,** 2011b. Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. *Environ Mol Mutagen* 52, 582-589.
- Hadef, F.,** 2018. An Introduction to Nanomaterials. In: Ranjan S., Dasgupta N., Lichtfouse E. (eds), *Environmental Nanotechnology: Volume 1*. Springer International Publishing, Cham, 1-58.
- 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.
- He, W., Liu, X., Kienzle, A., Muller, W.E., Feng, Q.,** 2016. In Vitro Uptake of Silver Nanoparticles and Their Toxicity in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. *J Nanosci Nanotechnol* 16, 219-228.

- Heim, J., Felder, E., Tahir, M.N., Kaltbeitzel, A., Heinrich, U.R., Brochhausen, C., Mailander, V., Tremel, W., Brieger, J., 2015.** Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale* 7, 8931-8938.
- Herzenberg, L.A., Sweet, R.G., Herzenberg, L.A., 1976.** Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234, 108-117.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-417.
- Holder, A.L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., Koshland, C.P., 2012.** Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol* 25, 1885-1892.
- Hong, T.K., Tripathy, N., Son, H.J., Ha, K.T., Jeong, H.S., Hahn, Y.B., 2013.** A comprehensive in vitro and in vivo study of ZnO nanoparticles toxicity. *Journal of Materials Chemistry B* 1, 2985-2992.
- Horikoshi, S., Serpone, N., 2013.** Introduction to Nanoparticles, Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1-24.
- Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S., Chueh, P.J., 2008.** The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 179, 130-139.
- Huang, C.C., Aronstam, R.S., Chen, D.R., Huang, Y.W., 2010.** Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24, 45-55.
- Huk, A., Collins, A.R., El Yamani, N., Porredon, C., Azqueta, A., de Lapuente, J., Dusinska, M., 2015.** Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. *Mutagenesis* 30, 85-88.
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009.** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.

- Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A.,** 2008. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res* 41, 1578-1586.
- Jani, P.U., Mccarthy, D.E., Florence, A.T.,** 1994. Titanium-Dioxide (Rutile) Particle Uptake from the Rat Gi Tract and Translocation to Systemic Organs after Oral-Administration. *Int J Pharm* 105, 157-168.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K.,** 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol* 9, 1050-1074.
- Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V.,** 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol* 6, 33.
- Journey, W.S., Goldman, R.H.,** 2014. Occupational handling of nickel nanoparticles: a case report. *Am J Ind Med* 57, 1073-1076.
- Kang, T., Guan, R., Chen, X., Song, Y., Jiang, H., Zhao, J.,** 2013. In vitro toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells. *Nanoscale Res Lett* 8, 496.
- Kao, Y.Y., Chen, Y.C., Cheng, T.J., Chiung, Y.M., Liu, P.S.,** 2012. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicol Sci* 125, 462-472.
- Kermanizadeh, A., Chauche, C., Brown, D.M., Loft, S., Moller, P.,** 2015. The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: a review. *Environ Mol Mutagen* 56, 111-124.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.,** 1972. Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Canc* 26, 239-257.
- Kharaziha, M., Memic, A., Akbari, M., Brafman, D.A., Nikkhah, M.,** 2016. Nano-Enabled Approaches for Stem Cell-Based Cardiac Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* 5, 1533-1553.

- Khatri, M., Bello, D., Gaines, P., Martin, J., Pal, A.K., Gore, R., Woskie, S., 2013.** Nanoparticles from photocopiers induce oxidative stress and upper respiratory tract inflammation in healthy volunteers. *Nanotoxicology* 7, 1014-1027.
- Kimura, E., Kawano, Y., Todo, H., Ikarashi, Y., Sugibayashi, K., 2012.** Measurement of skin permeation/penetration of nanoparticles for their safety evaluation. *Biol Pharm Bull* 35, 1476-1486.
- Kocbek, P., Teskac, K., Kreft, M.E., Kristl, J., 2010.** Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Small* 6, 1908-1917.
- Kroll, A., Dierker, C., Rommel, C., Hahn, D., Wohlleben, W., Schulze-Isfort, C., Gobbert, C., Voetz, M., Hardinghaus, F., Schnekenburger, J., 2011.** Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol* 8, 9.
- Kumar, G., Degheidy, H., Casey, B.J., Goering, P.L., 2015.** Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food Chem Toxicol* 85, 45-51.
- Kwon, J.Y., Koedrith, P., Seo, Y.R., 2014a.** Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models in vitro and in vivo: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations. *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 2, 271-286.
- Kwon, J.Y., Lee, S.Y., Koedrith, P., Lee, J.Y., Kim, K.M., Oh, J.M., Yang, S.I., Kim, M.K., Lee, J.K., Jeong, J., Maeng, E.H., Lee, B.J., Seo, Y.R., 2014b.** Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in in vitro and in vivo tests. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 761, 1-9.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K., Oesch, F., 2009.** Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers. *Mutat Res* 681, 241-258.
- Lee, J.H., Huh, Y.M., Jun, Y.W., Seo, J.W., Jang, J.T., Song, H.T., Kim, S., Cho, E.J., Yoon, H.G., Suh, J.S., Cheon, J., 2007.** Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med* 13, 95-99.

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X.,** 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lim, Y.T., Cho, M.Y., Choi, B.S., Noh, Y.W., Chung, B.H.,** 2008. Diagnosis and therapy of macrophage cells using dextran-coated near-infrared responsive hollow-type gold nanoparticles. *Nanotechnology* 19 (37): 375105.
- Lin, W.S., Xu, Y., Huang, C.C., Ma, Y.F., Shannon, K.B., Chen, D.R., Huang, Y.W.,** 2009. Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. *J Nanoparticle Res* 11, 25-39.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K.,** 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.,** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402-408.
- Luo, Y., Prestwich, G.D.,** 2002. Cancer-Targeted Polymeric Drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2, 209-226.
- Lye, J.C., Richards, C.D., Dechen, K., Paterson, D., de Jonge, M.D., Howard, D.L., Warr, C.G., Burke, R.,** 2012. Systematic functional characterization of putative zinc transport genes and identification of zinc toxicosis phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 215, 3254-3265.
- Magdolenova, Z., Lorenzo, Y., Collins, A., Dusinska, M.,** 2012. Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles? *J Toxicol Environ Health A* 75, 800-806.
- Mahdi, K.N.M., Peters, R., van der Ploeg, M., Ritsema, C., Geissen, V.,** 2018. Tracking the Transport of Silver Nanoparticles in Soil: a Saturated Column Experiment. *Water Air Soil Pollut* 229 (10): 334.
- Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M.A., Journey, W.S., Laurent, S.,** 2011. Effect of nanoparticles on the cell life cycle. *Chem Rev* 111, 3407-3432.

**Mancuso, L., Cao, G.,** 2014. Acute toxicity test of CuO nanoparticles using human mesenchymal stem cells. *Toxicol Mech Methods* 24, 449-454.

**McWilliams, A.,** 2016. The Maturing Nanotechnology Market: Products and Applications.

Im Internet verfügbar unter:

<https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-products-applications-report-nan031g.html> (Stand 01/19)

**Meena, R., Rani, M., Pal, R., Rajamani, P.,** 2012. Nano-TiO<sub>2</sub>-induced apoptosis by oxidative stress-mediated DNA damage and activation of p53 in human embryonic kidney cells. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 791-808.

**Meili C., Widmer M., Husmann F., Gehr P., Blank F., Riediker M., Schmid K., Stark W., L., L.,** 2007. Synthetische Nanomaterialien. Risikobeurteilung und Risikomanagement. Grundlagenbericht zum Aktionsplan. *Umwelt-Wissen* Nr. 721, 75-88.

**Meyer, K., Rajanahalli, P., Ahamed, M., Rowe, J.J., Hong, Y.,** 2011. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicol In Vitro* 25, 1721-1726.

**Miller, K.A., Siscovick, D.S., Sheppard, L., Shepherd, K., Sullivan, J.H., Anderson, G.L., Kaufman, J.D.,** 2007. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 356, 447-458.

**Mishra, P.K., Mishra, H., Ekielski, A., Talegaonkar, S., Vaidya, B.,** 2017. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discov Today* 22, 1825-1834.

**Moos, P.J., Chung, K., Woessner, D., Honegger, M., Cutler, N.S., Veranth, J.M.,** 2010. ZnO particulate matter requires cell contact for toxicity in human colon cancer cells. *Chem Res Toxicol* 23, 733-739.

**Mosmann, T.,** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

**Mullis, K.B.,** 1987. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences, US Patent No. 4683195 A.

- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N.,** 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627.
- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B.,** 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414.
- Ng, C.T., Yong, L.Q., Hande, M.P., Ong, C.N., Yu, L.E., Bay, B.H., Baeg, G.H.,** 2017. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *Int J Nanomedicine* 12, 1621-1637.
- Olive, P.L., Banath, J.P.,** 1993. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294, 275-283.
- Osmond, M.J., McCall, M.J.,** 2010. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* 4, 15-41.
- Ostling, O., Johanson, K.J.,** 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W.,** 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3, 1941-1949.
- Park, E.J., Kim, H., Kim, Y., Yi, J., Choi, K., Park, K.,** 2010. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* 275, 65-71.
- 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, 454-472.
- Pearce, A.K., Humphrey, T.C.,** 2001. Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends in Cell Biology* 11, 426-433.

- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007.** Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2, 751-760.
- Qiagen, 2012.** RNeasy Mini Handbook, Im Internet verfügbar unter: <http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf>. (Stand 09/18)
- Rangan, S.R., 1972.** A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29, 117-121.
- Ranjan, S., Dasgupta, N., Chakraborty, A.R., Melvin Samuel, S., Ramalingam, C., Shanker, R., Kumar, A., 2014.** Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. *J Nanoparticle Res* 16, 2464.
- 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, 1063-1077.
- Reddy, K.M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D.G., Hanley, C., Punnoose, A., 2007.** Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett* 90, 2139021-2139023.
- Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., Green, D.R., 2004.** Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2013.** Cell Viability Assays, in: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T.D.Y., Dahlin, J.L., Devanaryan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Hass, J.V., Inglese, J., Iversen, P.W., Kahl, S.D., Kales, S.C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Trask, O.J., Jr., Weidner, J.R., Xia, M., Xu, X. (Eds.), *Assay Guidance Manual*, Bethesda (MD), 1-23.

- Robert Koch-Institut**, 2016. Epidemiologie von Krebserkrankungen. Im Internet verfügbar unter:  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2\\_Epidemiologie.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile), S. 57-60. (Stand 09/18)
- Roszak, J., Catalan, J., Jarventaus, H., Lindberg, H.K., Suhonen, S., Vippola, M., Stepnik, M., Norppa, H.**, 2016. Effect of particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 805, 7-18.
- Roy, R., Singh, S.K., Chauhan, L.K., Das, M., Tripathi, A., Dwivedi, P.D.**, 2014. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. *Toxicol Lett* 227, 29-40.
- Schartl, M., Gessler, M., von Eckardstein, A.**, 2009. Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.
- Schieber, M., Chandel, N.S.**, 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 24, R453-R462.
- Schins, R.P., Knaapen, A.M.**, 2007. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol* 19 Suppl 1, 189-198.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E.**, 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459.
- Senapati, V.A., Kumar, A., Gupta, G.S., Pandey, A.K., Dhawan, A.**, 2015. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach. *Food Chem Toxicol* 85, 61-70.
- Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A.**, 2011a. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2). *J Biomed Nanotechnol* 7, 98-99.
- Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A.**, 2012a. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis* 17, 852-870.

- Sharma, V., Singh, P., Pandey, A.K., Dhawan, A., 2012b.** Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutat Res* 745, 84-91.
- Sharma, V., Singh, S.K., Anderson, D., Tobin, D.J., Dhawan, A., 2011b.** Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes. *J Nanosci Nanotechnol* 11, 3782-3788.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N.H.M., Ann, L.C., Bakhori, S.K.M., Hasan, H., Mohamad, D., 2015.** Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters* 7, 219-242.
- Stark, G., 2005.** Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol* 205, 1-16.
- Stone, V., Johnston, H., Schins, R.P., 2009.** Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol* 39, 613-626.
- Sun, C., Lee, J.S., Zhang, M., 2008.** Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1252-1265.
- Svider, P.F., Blasco, M.A., Raza, S.N., Shkoukani, M., Sukari, A., Yoo, G.H., Folbe, A.J., Lin, H.S., Fribley, A.M., 2017.** Head and Neck Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 156, 10-13.
- Taccola, L., Raffa, V., Riggio, C., Vittorio, O., Iorio, M.C., Vanacore, R., Pietrabissa, A., Cuschieri, A., 2011.** Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. *Int J Nanomedicine* 6, 1129-1140.
- The Royal Society, 2004.** Kapitel 3 - Science and applications in: Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.,  
Im Internet verfügbar unter:  
<http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>. (Stand 09/18)

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Uzar, N.K., Abudayyak, M., Akcay, N., Algun, G., Ozhan, G., 2015.** Zinc oxide nanoparticles induced cyto- and genotoxicity in kidney epithelial cells. *Toxicol Mech Methods* 25, 334-339.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Jr., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015.** Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6, 1769-1780.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- Wahab, R., Siddiqui, M.A., Saquib, Q., Dwivedi, S., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A.A., Shin, H.S., 2014.** ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 117, 267-276.
- Wang, J., Deng, X., Zhang, F., Chen, D., Ding, W., 2014.** ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Res Lett* 9, 117.
- Wang, L., Mercer, R.R., Rojanasakul, Y., Qiu, A., Lu, Y., Scabilloni, J.F., Wu, N., Castranova, V., 2010.** Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *J Toxicol Environ Health A* 73, 410-422.
- Wiegand, C., Hipler, U.C., Boldt, S., Strehle, J., Wollina, U., 2013.** Skin-protective effects of a zinc oxide-functionalized textile and its relevance for atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 6, 115-121.
- Wiesenthal, A., Hunter, L., Wang, S., Wickliffe, J., Wilkerson, M., 2011.** Nanoparticles: small and mighty. *Int J Dermatol* 50, 247-254.

**Wiesmann, N., Klunker, 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.

**Wilhelmi, V., Fischer, U., Weighardt, H., Schulze-Osthoff, K., Nickel, C., Stahlmecke, B., Kuhlbusch, T.A., Scherbart, A.M., Esser, C., Schins, R.P., Albrecht, C.,** 2013. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One* 8, e65704.

**Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R., Nel, A.E.,** 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 6, 1794-1807.

**Xiao, L., Liu, C., Chen, X., Yang, Z.,** 2016. Zinc oxide nanoparticles induce renal toxicity through reactive oxygen species. *Food Chem Toxicol* 90, 76-83.

**Zhang, G., Khan, A.A., Wu, H., Chen, L., Gu, Y., Gu, N.,** 2017. The Application of Nanomaterials in Stem Cell Therapy for some Neurological Diseases. *Curr Drug Targets* 19 ,279-298.

## 6.4 Kongressbeiträge und Publikationen

Kongressbeiträge:

**H. Moratin, A. Scherzad, N.H. Kleinsasser, S. Hackenberg:** Charakterisierung von Apoptoseabläufen bei ZnO-Nanopartikel-assoziiierter Toxizität in Plattenepithelkarzinomzellen.

87. Jahreshauptversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie in Düsseldorf (2016)

URL: <https://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2016/16hnod198.shtml>

doi: 10.3205/16hnod198

**H. Moratin, A. Scherzad, N. Kleinsasser, S. Hackenberg:** Analyse Zinkoxid-Nanopartikel-assoziiierter Toxizitätsmechanismen.

90. Jahreshauptversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie in Berlin (2019)

URL: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0039-1685640>

doi: 10.1055/s-0039-1685640

Publikationen:

**Moratin, H., Scherzad, A., Gehrke, T., Ickrath, P., Radeloff, K., Kleinsasser, N., Hackenberg, S.,** 2017. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles

in malignant and non-malignant cells. *Environ Mol Mutagen* 59, 247-259.

doi: 10.1002/em.22156.