

**Zyto- und Genotoxizität
von nano- und mikroskaligem Kupferoxid:
Einfluss der Bioverfügbarkeit**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

Von

Diplom-Chemikerin

Annetta Semisch

aus

Spremberg

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Korreferent: PD Dr. Carsten Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2013

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) wurden beachtet. Hiermit erkläre ich, dass außerhalb der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften keine weiteren Promotionsverfahren anhängig sind oder erfolglos beendet wurden.

Karlsruhe, 03.06.2013

Annetta Semisch

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	11
2.1	Kupfer und Kupferoxidpartikel.....	11
2.1.1	Vorkommen und Verwendung	11
2.1.2	Exposition	11
2.2	Partikelcharakterisierung und Methodenevaluierung	12
2.2.1	Partikelcharakterisierung.....	12
2.2.2	Methodenevaluierung.....	14
2.3	Bioverfügbarkeit.....	14
2.3.1	Kupferhomöostase.....	15
2.3.2	Endozytose von partikulären Substanzen	16
2.4	Toxizität	18
3	Fragestellung	21
4	Material und Methoden	22
4.1	Partikelcharakterisierung.....	22
4.1.1	Partikel	22
4.1.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	22
4.1.3	Spezifische Oberfläche (BET)	23
4.1.4	Parameter zur Messung der hydrodynamischen Größenverteilung	23
4.1.4.1	Dichte	23
4.1.4.2	Dynamische Viskosität	24
4.1.4.3	Brechungsindex.....	24
4.1.4.4	Dielektrizitätskonstante.....	25
4.1.5	Hydrodynamische Größenverteilung und Zetapotential	25
4.1.6	Kristallinität (Diffraktometrie).....	27
4.1.7	Energiedispersive Röntgenspektrometrie (EDS)	27
4.1.8	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)	27
4.1.9	Trägergas-Heißextraktion zur Ermittlung des Sauerstoffgehalts.....	28
4.1.10	pH-Wert.....	28
4.1.11	Verunreinigung mit Mikroorganismen	28
4.1.11.1	Pilzbefall und allgemeine bakterielle Kontaminationen	28
4.1.11.2	Endotoxine.....	29
4.1.12	Löslichkeit	29

4.2	Zellkultur	30
4.2.1	Zelllinien und Kultivierung	30
4.2.2	Gewinnung des Antikörpers 10H	31
4.2.3	Vorbereitung endotoxinfreier Verbrauchsmaterialien.....	32
4.2.4	Dosisangaben	32
4.2.5	Inkubation.....	33
4.2.6	Zytotoxizität	33
4.2.6.1	Reduktion von WST-8.....	34
4.2.6.2	Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit	35
4.2.7	Apoptose	35
4.2.7.1	Einfluss auf die Kernlokalisierung von AIF	35
4.2.7.2	Einfluss auf die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7	36
4.2.7.3	Einfluss auf den SubG1-Peak	37
4.2.8	Direkte und indirekte Genotoxizität.....	37
4.2.8.1	Detektion und Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen	37
4.2.8.2	Durchflusszytometrische Analyse von Mikrokernen.....	39
4.2.8.3	Detektion und Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung	40
4.2.9	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung (Bioverfügbarkeit).....	41
4.2.10	Statistik	42
5	Ergebnisse und Diskussion	43
5.1	Partikelcharakterisierung.....	43
5.1.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	43
5.1.2	Spezifische Oberfläche (BET)	44
5.1.3	Parameter zur Messung der Dynamischen Lichtstreuung.....	44
5.1.4	Hydrodynamische Größenverteilung und Zetapotential	45
5.1.5	Kristallinität.....	50
5.1.6	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDS).....	50
5.1.7	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)	52
5.1.8	Trägergas-Heißextraktion zur Ermittlung des Sauerstoffgehalts.....	53
5.1.9	pH-Wert.....	53
5.1.10	Verunreinigung mit Mikroorganismen	54
5.1.10.1	Schimmelpilz- und bakterielle Kontaminationen.....	54
5.1.10.2	Endotoxine.....	54
5.1.11	Löslichkeit	54
5.2	Zellkulturuntersuchungen	59

5.2.1	Zytotoxizität	59
5.2.1.1	Einfluss auf die zelluläre Reduktion von WST-8.....	60
5.2.1.2	Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit	62
5.2.2	Apoptose	65
5.2.2.1	Einfluss auf die Kernlokalisierung von AIF	65
5.2.2.2	Einfluss auf die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7.....	67
5.2.2.3	Einfluss auf den SubG1-Peak	68
5.2.3	Direkte und indirekte Genotoxizität.....	71
5.2.3.1	Generierung von DNA-Strangbrüchen	71
5.2.3.2	Einfluss auf die Generierung von Mikrokernen	74
5.2.3.3	Einfluss auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung.....	75
5.2.4	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung (Bioverfügbarkeit).....	79
6	Zusammenfassende Diskussion	83
7	Literaturverzeichnis	90
8	Anhang	100
8.1	Abkürzungsverzeichnis	100
8.2	Verwendete Chemikalien	102
8.3	Verwendete Antikörper	105
8.4	Lösungen und Puffer.....	106
8.5	Verwendete Verbrauchsmaterialien	107
8.6	Verwendete Geräte	109
8.7	Ergänzende Daten.....	111
8.7.1	Atomabsorptionsspektroskopie.....	111
8.7.1.1	Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.....	111
8.7.1.2	Bestimmung der Wiederfindung	111
8.7.1.3	Externe Kalibrierung	111
8.7.2	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	113
8.7.2.1	CuO NP	113
8.7.2.2	CuO MP	114
8.7.3	DLS Daten	115
8.7.3.1	Wasser.....	115
8.7.3.2	50 µg/ ml CuO NP in Wasser	115
8.7.3.3	DMEM ohne FKS.....	117
8.7.3.4	50 µg/ ml CuO NP in DMEM ohne FKS.....	117
8.7.3.5	DMEM mit 5% FKS.....	119

8.7.3.6	50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 5% FKS	120
8.7.3.7	DMEM mit 10% FKS	122
8.7.3.8	50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS.....	124
8.7.3.9	CuO MP in 10% FKS.....	126
8.7.3.10	Hydrodynamischer Radius von CuO NP nach Intensität und Volumen	127
8.7.4	Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in PBS	128
8.7.5	Zytotoxizität	129
8.7.5.1	Absorption von CuO NP, CuO MP oder CuCl ₂ in DMEM mit 10% FKS	129
8.7.5.2	Zellfreie Reduktion von WST-8 durch CuO NP, CuO MP oder CuCl ₂	130
8.7.5.3	Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit nach 4 h Inkubation in A549-Zellen	133
8.7.6	Apoptosedaten.....	135
8.7.6.1	AIF-Fluoreszenz im Zellkern und Koloniebildungsfähigkeit nach 4, 8 und 16 h...	135
8.7.6.2	Caspase	138
8.7.6.3	SubG1-Peak und Zellzahl nach 4 h, 8 h und 16 h.....	139
8.7.6.4	SubG1-Peak Methodenevaluierung	142
8.7.7	Mikrokerntest-Methodenevaluierung.....	144
8.7.7.1	Zellkulturversuche.....	144
8.7.7.2	Kontrollmessungen mit den Partikeln.....	146
9	Publikationsliste	149
10	Danksagung	155

1 ZUSAMMENFASSUNG

Nanoskalige Kupferoxidpartikel (CuO NP) werden zunehmend als Katalysatoren oder für antimikrobielle Zwecke eingesetzt. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit einer Exposition von Arbeitnehmern und der Allgemeinbevölkerung. In diesem Zusammenhang waren CuO NP im Vergleich zu anderen metallbasierten Nanopartikeln oder Mikropartikeln (CuO MP) besonders toxisch. Ein Grund dafür könnte eine zelluläre Überladung mit Kupfer sein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das toxische Potenzial von CuO NP, CuO MP und Kupfer(II)chlorid (CuCl₂) systematisch untersucht und unter Berücksichtigung von Bioverfügbarkeitsunterschieden verglichen.

Den Ausgangspunkt der Untersuchungen bildete eine ausführliche physikochemische Charakterisierung der Partikel. Sowohl CuO NP als auch CuO MP waren von identischer chemischer Zusammensetzung, hochrein, kristallin, frei von Endotoxinen, ließen den pH-Wert wässriger Lösungen unverändert und unterschieden sich um das 23-fache in der durchschnittlichen Partikelgröße und Oberfläche. In Suspension agglomerierten CuO NP in Wasser und in Zellkulturmedium in Abhängigkeit von Pufferkomponenten und Serumproteinen. Zudem lösten sich CuO NP stärker als CuO MP in wässrigen Modellflüssigkeiten.

Ferner wurde die Eignung der eingesetzten Zellkulturmethoden für Untersuchungen mit Partikeln evaluiert. Niedrige mikromolare Konzentrationen an Kupfer verhinderten die Reduktion des häufig für Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendeten Tetrazoliumsalzes 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatrium-Salz (WST-8). Daher wurde die Koloniebildungsfähigkeit zur Ermittlung der Zytotoxizität herangezogen. 24 h Behandlung mit CuO NP und CuCl₂ führten zu einer starken und konzentrationsabhängigen Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit in A549- und HeLa S3-Zellen, wohingegen CuO MP nicht-zytotoxisch waren. Im Hinblick auf den zugrunde liegenden Mechanismus des ermittelten Zelltodes induzierte allein CuO NP konzentrationsabhängig subdiploide DNA und die Translokation des „apoptosis inducing factor“ (AIF) in den Zellkern als Indikator für Apoptose. Ferner induzierte allein CuO NP konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche in HeLa S3-Zellen und erhöhte die Anzahl an Mikrokernen. Im Gegensatz dazu induzierten alle drei Kupferverbindungen DNA-Strangbrüche in HeLa S3-Zellen unter prooxidativen Bedingungen und inhibierten das Ausmaß H₂O₂-induzierter Poly(ADP-Ribosyl)ierung, die von dem Zink-bindenden Enzym Poly(ADP-Ribose)polymerase katalysiert wird.

Um zu ermitteln, ob die beobachteten Toxizitätsunterschiede mit Unterschieden in der Bioverfügbarkeit assoziiert waren, wurden die Aufnahme sowie die intrazelluläre Verteilung der Kupferverbindungen quantifiziert. Alle drei Verbindungen erhöhten den Kupfergehalt der

löslichen Fraktion des Zyto- bzw. Kernplasmas von A549-Zellen. In der zytoplasmatischen Fraktion akkumulierten etwa gleich viele Kupferionen nach Inkubation mit CuO NP oder CuCl₂. In der löslichen Kernfraktion erhöhte sich die Akkumulation von Kupferionen in der Reihenfolge CuO NP > CuO MP > CuCl₂.

Zusammengefasst belegt die vorgelegte Studie die höhere Zyto- und Genotoxizität von CuO NP im Vergleich zu CuO MP und stellt heraus, dass verschiedene Eigenschaften die Toxizität der CuO NP beeinflussen. Dabei scheint die Bioverfügbarkeit von Kupferionen im Zellkern ein relevanter Parameter zu sein.

Abstract

Nanoscale copper oxide particles (CuO NP) are increasingly applied as catalysts or for antimicrobial purposes. These applications may result in an enhanced occupational exposure. In this context, CuO NP appears to be particularly toxic, when compared to other metal-based nanomaterials or microparticles (CuO MP) and one reason may be cellular copper overload. Thus, in the present study, CuO NP, CuO MP and soluble CuCl_2 were systematically investigated and compared with regard to their toxic potential and bioavailability.

Initially, CuO NP and CuO MP were thoroughly characterized with respect to their physico-chemical properties. The data revealed that the particles left the pH unaffected, were of high purity, crystalline, free from endotoxins, and differed by the 23-fold in terms of average size and surface area. In solution CuO NP formed agglomerates in water and cell culture medium, whose size was dependent on media components and serum proteins, and released far more copper ions than CuO MP.

Furthermore, frequently applied cell culture toxicity assays were evaluated for their suitability to investigate the effects of particulate copper compounds. Here, low micromolar concentrations of copper inhibited the reduction of the tetrazolium salt WST-8 that is commonly applied for cytotoxicity evaluation. Thus, colony forming ability was applied in the present study for cytotoxicity assessment. Here, CuO NP and CuCl_2 caused a strong and dose-dependent decrease of colony forming ability after 24 h in A549 and HeLa S3 cells, whereas CuO MP were non-cytotoxic. Concerning the mechanism of cell death, subdiploid DNA as well as a translocation of the apoptosis inducing factor (AIF) into the cell nucleus were observed upon incubation with CuO NP. Furthermore, only CuO NP induced significant amounts of DNA strand breaks in HeLa S3 cells and increased the number of micronuclei, whereas all three compounds elevated the amount of H_2O_2 -induced DNA strand breaks and diminished the H_2O_2 -induced poly(ADP-ribose)ation, catalysed by the zinc-binding enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1.

Therefore, an association between the observed differences in toxicity with differences in bioavailability was investigated. All three compounds increased the copper levels in the soluble cytoplasmic and nuclear fractions of A549 cells. After incubation with CuO NP and CuCl_2 copper accumulated similarly strongly in the cytoplasmic fraction, while accumulation of CuO NP exceeded that of CuO MP and CuCl_2 in the nuclear fraction. In conclusion, the study confirmed the higher cyto- and genotoxicity of CuO NP as compared to CuO MP and points out, that multiple characteristics affect the toxicity of NP, whereas intranuclear bioavailability may be a relevant parameter.

2 EINLEITUNG

2.1 KUPFER UND KUPFEROXIDPARTIKEL

2.1.1 VORKOMMEN UND VERWENDUNG

Kupfer (Elementsymbol: Cu) ist ein hellrotes dehnbares Metall mit der Ordnungszahl 29. Im Periodensystem steht es in der I. Nebengruppe (11. Gruppe). Mit einem Anteil von 0,007% an der Erdkruste steht Kupfer an 25. Stelle der Häufigkeitsliste der Elemente (Zietz, 2007). In der Natur kommt es hauptsächlich in Form der Sulfide vor, aus denen durch Verwitterung die Oxide entstanden. Gelegentlich kommt es auch gediegen vor (Riedel, 2004).

Als wichtiges Gebrauchsmetall findet Kupfer aufgrund seiner hohen elektrischen und thermischen Leitfähigkeit sowie der guten Korrosionsbeständigkeit in der Elektroindustrie oder dem Schiffbau Verwendung. Wichtige Legierungen - wie Messing oder Bronze - enthalten Kupfer (Riedel, 2004), während lösliche Kupferverbindungen als Fungizide oder Antibewuchsanstriche eingesetzt werden (Zietz, 2007).

Synthetisierte nanoskalige Kupferoxidpartikel (CuO NP) werden als Katalysatoren (Reddy et al., 2009, Ben-Moshe et al., 2009), in Hitze-Transfer-Flüssigkeiten (Chang et al., 2011, Dey et al., 2012) oder als antimikrobieller Zusatz in Kleidung verwendet (Gabbay et al., 2006, Ren et al., 2009). Mikroskaliges Kupferoxid (CuO MP) dient als Vorstufe in der Pigmentproduktion (Shah et al., 1978).

Im Körper eines durchschnittlichen Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht befinden sich ca. 110 mg Kupfer, wodurch es nach Eisen und Zink das dritthäufigste Spurenelement im menschlichen Körper ist (Linder, 2012). Dort fungiert es als katalytischer Kofaktor in über 30 Enzymen (Rana, 2008), wie z.B. der Cytochrom c-Oxidase (COX), einem Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, der Superoxiddismutase (SOD), die an der antioxidativen Abwehr beteiligt ist, der Lysyl-Oxydase (Bindegewebssynthese) oder der Tyrosinase (Melanin-Biosynthese) (Zietz, 2007).

2.1.2 EXPOSITION

Für die allgemeine Bevölkerung erfolgt die höchste Exposition durch die Aufnahme von Nahrung und Trinkwasser über den Verdauungstrakt. Relevante Kupferquellen sind Fisch, Leber, Getreide und Nüsse (Zietz, 2007). Die Resorption im Dünndarm ist abhängig vom Angebot. Die Aufnahme von 1 mg Kupfer/ d resultiert in einer Resorptionseffizienz von über 50%, während 5 mg bis 8 mg

Kupfer/ d sie auf 20% absenken (Turnlund, 1998). Die empfohlene Tagesdosis beträgt 0,9 mg Kupfer/ d, wobei über die Nahrung ungefähr 2 mg Kupfer und über das Trinkwasser (Grenzwert: 2 mg/ l) circa 0,15 mg Kupfer pro Tag aufgenommen werden. Für Säuglinge und Kleinkinder wurde in diesem Zusammenhang ein erhöhtes Leberzirrhoserisiko durch Aufnahme von Nahrung aus kupferhaltigen Gefäßen oder erhöhte Gehalte im Trinkwasser beschrieben (Zietz, 2007).

In der Luft vorkommendes Kupfer stammt aus natürlichen und anthropogenen Quellen. Der Gehalt beträgt, abhängig von der Region, 5 ng/ m³ bis 200 ng/ m³ (Davies and Bennett, 1985) und kann durch räumliche Nähe zu kupferverarbeitenden Anlagen erhöht sein. Kupfer(II)oxid wurde in Emissionen aus der Stahlherstellung, in Flugasche sowie offenen Stahlmühlen nachgewiesen. Kupferhaltige Partikel < 1 µm wurden mit Verbrennungsprozessen oder Hochtemperaturverfahren assoziiert (ATSDR, 2004). In mehreren Studien wurden adverse Effekte bei Arbeitern beschrieben, die Kupfer- oder Kupferoxidstaub ausgesetzt waren. Von der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) wurde 2012 ein Grenzwert von 0,1 mg/ m³ für die einatembare Fraktion von Kupfer und seinen anorganischen Verbindungen angegeben (DFG, 2012).

Es gibt bisher keine epidemiologischen Daten für synthetisierte nano- oder mikroskalige Kupferoxidpartikel.

2.2 PARTIKELCHARAKTERISIERUNG UND METHODENEVALUIERUNG

2.2.1 PARTIKELCHARAKTERISIERUNG

Nanoobjekte sind definiert als Materialien, die mindestens eine Dimension (D) < 100 nm aufweisen. Dazu zählen Nanoplättchen (1D), Nanofasern (2D) und Nanopartikel (3D) (DIN27687, 2010).

Nanopartikel werden heute aus einer Vielzahl von Elementen in den unterschiedlichsten Formen und Modifikationen synthetisiert. Auch bei identischer chemischer Zusammensetzung können sowohl die physikochemischen Eigenschaften als auch das damit in Zusammenhang stehende toxische Potenzial stark voneinander abweichen (Karlsson et al., 2008, Goodman et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff „Nanotoxikologie“ etabliert (Donaldson et al., 2004, Oberdörster et al., 2005b), um die physikochemischen Eigenschaften von Nanomaterialien und deren toxisches Potential in Form von Interaktionen mit Zellen (Nel et al., 2009, Monopoli et al.,

2012) sowie die zugrundeliegenden Mechanismen der Bioverfügbarkeit und Toxizität zu verbinden (Oberdörster et al., 2005a).

Da die Toxizität von Nanomaterialien nicht auf ein Charakteristikum allein zurückgeführt werden kann, ist es nötig, möglichst viele Eigenschaften der untersuchten Materialien detailliert zu beschreiben, um die Ergebnisse toxikologischer Untersuchungen reproduzier- und vergleichbar zu machen und eine angemessene Basis für Rückschlüsse auf zugrundeliegende Eigenschaften zu schaffen.

Die Charakterisierung eines partikulären Materials ist komplex, zeit- sowie kostenintensiv und erfordert multianalytische und fächerübergreifende Kompetenzen. Charakteristika, die die Toxizität von Partikeln beeinflussen, sind u.a.: Unterschiede der Partikelgröße (Karlsson et al., 2009, Chithrani and Chan, 2007), der Form (Chithrani and Chan, 2007, Piret et al., 2012), der Oberfläche (Monteiller et al., 2007, Duffin et al., 2007), der Kristallinität (Braydich-Stolle et al., 2009) sowie der Oberflächenladung (Goodman et al., 2004, Schaeublin et al., 2011). Der wesentliche Einfluss der chemischen Zusammensetzung und der elementaren Reinheit wurde deutlich an Untersuchungen von Kohlenstoffnanoröhren (Carbon Nanotubes), deren starke Toxizität letztlich auf Verunreinigungen mit von der Synthese verbliebenen löslichen Übergangsmetallionen zurückgeführt werden konnte (Guo et al., 2007, Liu et al., 2007). Der Aspekt der Löslichkeit ist auch für metallbasierte Partikel, wie die in dieser Studie untersuchten CuO NP und CuO MP, bedeutsam, da dann statt der Partikel toxische Ionen zu den biologischen Effekten beitragen können.

Als Grundvoraussetzung vor der Durchführung von toxikologischen Experimenten gelten die Untersuchung der Partikelgröße, der Oberfläche, der Kristallinität, der Reinheit, der chemischen Zusammensetzung und möglicher bakterieller Kontaminationen der trockenen Pulver sowie die Analyse des Verhaltens in Suspension (Warheit, 2008, Schulze et al., 2008), da sich u.a. die Partikelgröße in suspendiertem Zustand oft stark verändert (Murdock et al., 2008, Jiang et al., 2009). Aus der Synthese, Verpackung oder Lagerung eingeschleppte bakterielle Kontaminationen, wie Lipopolysaccharide (Endotoxine), können an den Partikeln adherieren und die Ergebnisse, insbesondere von immunologischen Studien, beeinflussen (Vallhov et al., 2006, Shi et al., 2010, Gorbet and Sefton, 2005, Dobrovolskaia and McNeil, 2007).

Der Analyse der Veränderung und des Verhaltens während und nach der Applikation, zum Beispiel in Zellkulturversuchen, sind oft durch die komplexe Matrix Grenzen gesetzt.

2.2.2 METHODENEVALUIERUNG

Die rasch zunehmende Produktion multifunktionaler nanoskaliger Partikel für zahlreiche potenzielle Anwendungen erfordert eine begleitende toxikologische Charakterisierung, um adverse Effekte frühzeitig zu erkennen. Zellkulturbasierte Methoden finden unter definierten Bedingungen statt und können relativ einfach durchgeführt werden. Sie dienen der kostengünstigen und raschen Eingrenzung relevanter Substanzen für eine eingehendere Toxizitätstestung und reduzieren dadurch das Ausmaß umstrittener Tierversuche. Allerdings ist bei zellkulturbasierten Methoden die Limitation auf einen oder wenige Zelltypen und die fehlende Interaktion der zahlreichen Zelltypen eines Organs oder Organismus von Nachteil (Stone et al., 2009).

Im Zusammenhang mit der toxikologischen Evaluation von partikulären Substanzen werden einige für lösliche Substanzen etablierte Methoden als störungsanfällig erachtet. Zahlreiche Störungen kolorimetrischer oder fluorimetrischer Methoden durch Nanopartikel, bei denen Nanomaterialien u.a. Substrate, Farbstoffe, Antikörper oder Proteine adsorbierten und so die Resultate beeinflussten, wurden bereits beschrieben (Kroll et al., 2009, Kroll et al., 2012, Kocbach et al., 2008, Berntsen et al., 2010, Wörle-Knirsch et al., 2006, Casey et al., 2008, Stone et al., 2009). Daher ist es nötig, jede Methode bezüglich möglicher Störungen durch (Nano)partikel zu evaluieren und die Kontrollen, die Auswertung sowie die Interpretation der Daten zu optimieren. Dieser Ansatz beinhaltet auch die Mitführung von löslichen Verbindungen, wie im Falle der vorliegenden Studie z.B. CuCl_2 , um den Beitrag der Kupferionen an den beobachteten Effekten zu berücksichtigen und die Vorteile von zellkulturbasierten Methoden für toxikologische Untersuchungen an Partikeln auszuschöpfen.

2.3 BIOVERFÜGBARKEIT

Die Bioverfügbarkeit ist charakterisiert als das Verhältnis zwischen der zugeführten und der resorbierten Menge einer Substanz. Das Ausmaß der Resorption hängt wesentlich von den physikalischen und chemischen Eigenschaften wie z.B. der Löslichkeit der Substanz ab (RÖMPP, 2006).

Die Regulierung der Aufnahme von Kupferionen über die zelluläre Homöostase wird in Kapitel 2.3.1 beschrieben. In Kapitel 2.3.2 wird die Aufnahme von Partikeln über Endozytose näher erläutert.

2.3.1 KUPFERHOMÖOSTASE

Das mit der Nahrung zugeführte Kupfer wird im Dünndarm absorbiert. Die Aufnahme in die Enterocyten erfolgt vorrangig über den humanen Kupfertransporter hCTR1 (human copper transporter 1) (Wang et al., 2011). Die Freisetzung der Kupferionen aus den Enterocyten in den Körperkreislauf erfolgt mit Hilfe des Effluxtransporters ATP7A (copper-transporting ATPase 1, Menkes-Protein) und durch Exozytose. Mutationen des Gens für ATP7A führen zum sogenannten Morbus Menkes, einer Kupfermangelkrankheit, die gekennzeichnet ist durch eine lokale Kupferüberladung der Enterocyten und Kupfermangel in anderen Geweben (Menkes et al., 1962, Tümer and Møller, 2010). Im Blut binden die Kupferionen unmittelbar an Albumin, Histidin oder Transcuprein und werden in die Leber transportiert (Linder, 2012). Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase, da sie den Hauptspeicherort für Kupfer darstellt, und den Gesamtkupfergehalt des Körpers kontrolliert, indem sie die Ausscheidung von Kupfer in die Galle reguliert (Bertinato and L'Abbé, 2004). Nach dem Einbau in Coeruloplasmin verlässt Kupfer die Hepatozyten und wird mit dem Blut an die Gewebe transportiert.

Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, erfolgt die Absorption des an Transcuprein, Histidin und Albumin gebundenen Kupfers aus dem Blut in Zellen wiederum über hCTR1. Cu(II) wird dabei zu Cu(I) reduziert (Linder, 2012). Anschließend wird Cu(I) im Zytosol an Glutathion (GSH) oder Metallothioneine (MT) gebunden bzw. gespeichert. Die Chaperone transportieren Kupfer zu den verschiedenen Enzymen und Zellkompartimenten, wo sie durch Protein-Protein-Wechselwirkungen in die kupferabhängigen Enzyme eingebaut werden (Robinson 2010). Das Chaperon CCS transportiert Kupfer zur Superoxiddismutase (SOD) (Culotta et al., 1997), COX17 ist das Chaperon für die Cytochrom c-Oxidase (COX) (Glerum et al., 1996) und ATOX1 (auch HAH 1) (Klomp et al., 1997) liefert Kupfer an die ATPasen ATP7A oder ATP7B (copper-transporting ATPase 1, Wilson Protein) (Larin et al., 1999). ATP7A wird in fast allen Geweben exprimiert (Vulpe et al., 1993, Tanzi et al., 1993), während ATP7B in Hepatozyten und der Niere exprimiert wird (Bull et al., 1993, Chelly et al., 1993). Beide Proteine sind unter normalen Bedingungen vorrangig am Golgi-Apparat lokalisiert (Suzuki and Gitlin, 1999). Bei erhöhter Kupferkonzentration verlagern sie sich reversibel an die Zellmembran, um aktiv zur Exkretion beizutragen (La Fontaine and Mercer, 2007).

Da die biliäre Kupferausscheidung der Hauptmechanismus der Kupferhomöostase ist, führt eine Mutation im Gen von ATP7B zum sogenannten Morbus Wilson. Die eingeschränkte oder verhinderte Exkretion führt zu charakteristischen Kupferakkumulationen in der Leber, im Gehirn und in der Augenhornhaut. Dadurch entstehen hepatische und neurologische Beeinträchtigungen (Wilson and Lond, 1912, Ala et al., 2007).

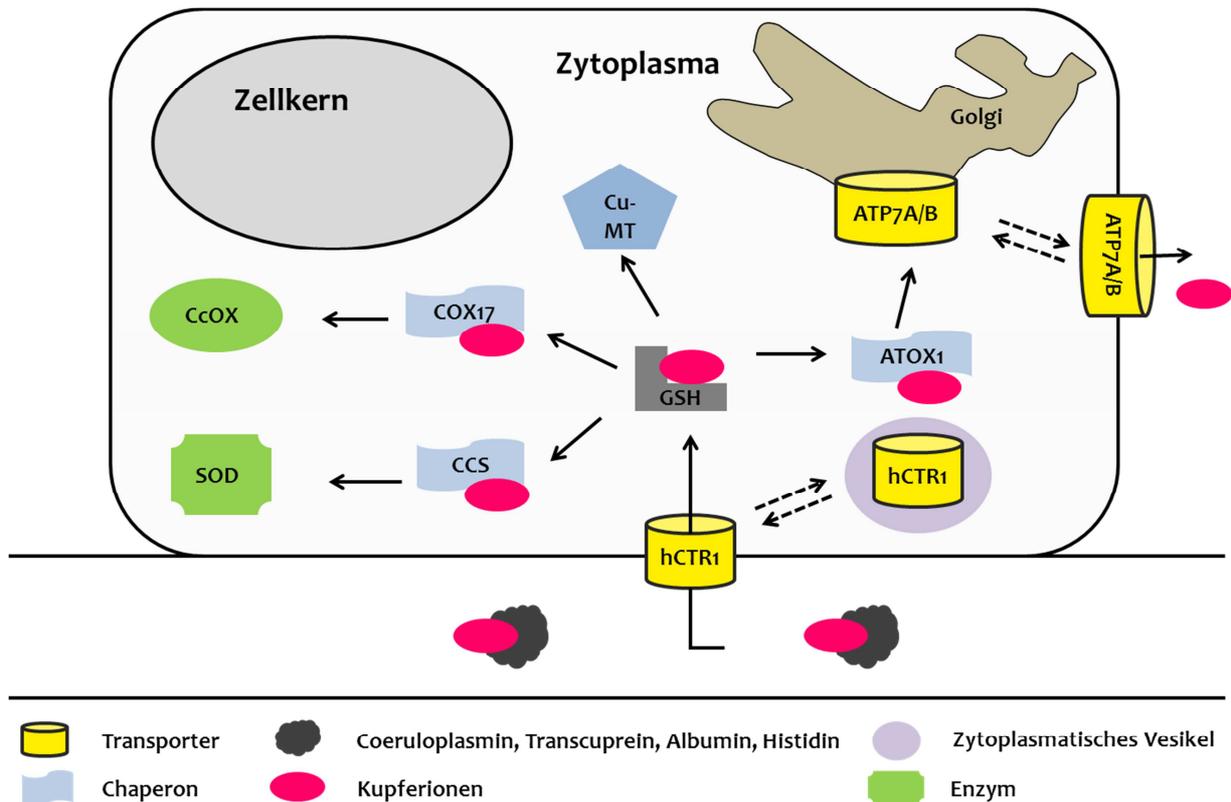


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zellulären Kupfertransportes in Säugerzellen. An der Zellmembran wird Kupfer über den Transporter hCTR1 aufgenommen. Bei hoher extrazellulärer Kupferkonzentration wird hCTR1 in zytoplasmatische Vesikel verlagert, um die Aufnahme zu reduzieren (gestrichelte Pfeile). Im Zytoplasma werden die Kupferionen an GSH oder MT gebunden oder gespeichert. Spezifische Chaperone liefern Kupfer an die entsprechenden Enzyme. CCS ist das Chaperon für die Superoxiddismutase (SOD), COX17 liefert an die Cytochrom c Oxidase (COX) und ATOX1 ist das Chaperon für ATP7A (in den meisten Geweben) und ATP7B (in Hepatozyten). Bei erhöhten intrazellulären Kupferkonzentrationen verlagern sich ATP7A oder ATP7B an die Zellmembran und tragen aktiv zur Exkretion bei (gestrichelte Pfeile) (modifiziert nach Bertinato and L'Abbé (2004)).

Im Blutplasma beträgt die Kupferkonzentration etwa 1 mg/ l (16 µM) (Linder, 2001) und in Geweben 50 µM (Prohaska, 1990). Freie Kupferionen treten praktisch nicht auf (Rae et al., 1999).

2.3.2 ENDOZYTULOSE VON PARTIKULÄREN SUBSTANZEN

Im Unterschied zu löslichen Metallionen werden Partikel über Endozytose, einem Prozess zur Internalisierung von Molekülen und Makromolekülen in Zellen, aufgenommen (Canton and Battaglia, 2012). Für Toxizitätsuntersuchungen an Partikeln ist es wichtig sowohl das Ausmaß an Endozytose bei der Aufnahme als auch das Schicksal internalisierter (Nano)partikel und dessen

intrazelluläre Folgen zu berücksichtigen, um die Ergebnisse angemessen interpretieren zu können.

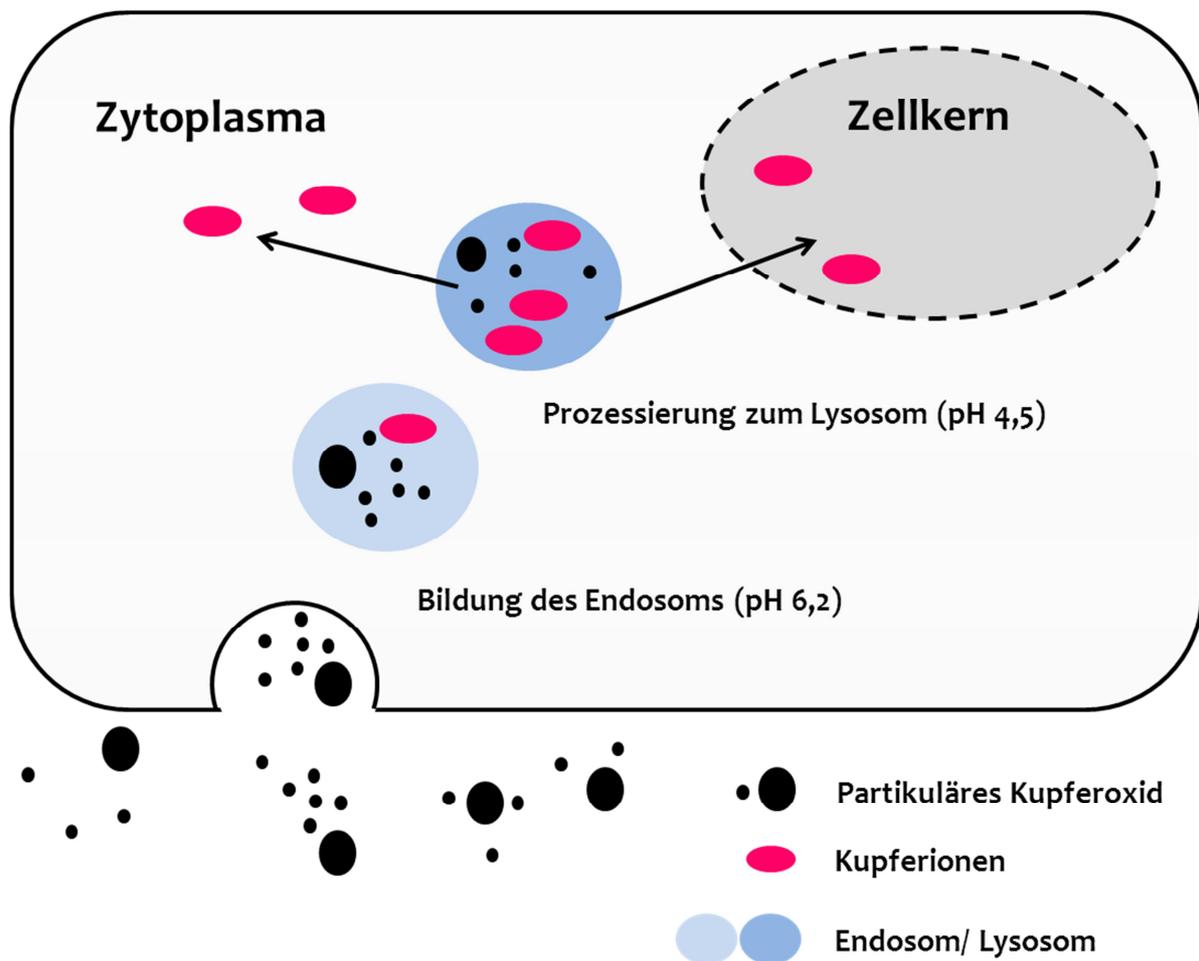


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Endozytose von Kupferoxidpartikeln. An der Zellmembran bildet sich eine Einstülpung und wird mit den enthaltenen Partikeln abgeschnürt. In dem resultierenden Vesikel (Endosom) liegt ein geringerer pH-Wert (6,2) als physiologisch (pH 7,4) vor. Durch die Prozessierung zum Lysosom sinkt der pH-Wert weiter bis auf 4,5 ab. Im Falle von metallbasierten - und unter sauren Bedingungen löslichen - Kupferoxidpartikeln können große Mengen Metallionen, u.a. in das Zytoplasma, freigesetzt werden (modifiziert nach Canton and Battaglia (2012)).

Im Allgemeinen wird nach Art der aufgenommenen Ladung kategorisiert: Über Phagozytose werden größere Partikel aufgenommen und über Pinozytose vorrangig gelöste Substanzen sowie kleinere Partikel (Makropinozytose). Phagozytose ist ein Mechanismus spezialisierter Zellen des unspezifischen Immunsystems, zu denen Neutrophile und Makrophagen zählen (Dale et al., 2008). Endozytose von kleinen Partikeln bis zu einigen Mikrometern Durchmesser und gelösten Substanzen findet praktisch in jeder eukaryotischen Zelle statt. Wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, laufen im Wesentlichen vier Schritte ab: Nach einem spezifischen Bindungsereignis an der Zelloberfläche stülpt sich die Plasmamembran ein und umschließt die Partikel. Das Endosom

genannte, beladene Vesikel trennt sich von der Plasmamembran ab und wird intrazellulär zum Zielort transportiert (Canton and Battaglia, 2012). Wenn die gebildeten Endosomen (pH 6,2) zu Lysosomen (pH 4,5) prozessiert werden (Canton and Battaglia, 2012), können im Fall von metallbasierten Partikeln, aufgrund des sauren pH-Wertes, große Mengen an Metallionen intrazellulär freigesetzt werden (Oller et al., 1997, Limbach et al., 2007).

Physikochemische Eigenschaften von Nanopartikeln, die die Endozytose beeinflussen, sind Partikelgröße, Partikelform, Oberflächenchemie, Oberflächentopologie und mechanische Eigenschaften wie z.B. die Härte der Partikel (Canton and Battaglia, 2012). Für CuO NP wurde die Aufnahme über Endozytose nachgewiesen (Wang et al., 2012).

2.4 TOXIZITÄT

Kupfer in Form löslicher Metallionen wird unter physiologischen Bedingungen homöostatisch streng reguliert (siehe Kapitel 2.3.1). Unter Überladungsbedingungen und/ oder bei genetischer Prädisposition ist Kupfer allerdings eine potenziell zytotoxische Substanz. Es kann aufgrund seiner Redoxaktivität über Fenton-artige Reaktionen die Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale katalysieren und somit zelluläre Makromoleküle - wie Proteine, DNA oder Lipide - schädigen (Linder, 2012). Ferner besitzt Kupfer eine hohe Affinität zu Thiolgruppen. Dadurch kann es entweder direkt mit Redox-sensitiven Proteindomänen oder Aminosäuren reagieren und Redox-sensitive Signalwege aktivieren und/ oder Redox-sensitive Strukturen, wie die Zink-bindenden Domänen von Enzymen zerstören (Hartwig, 2013, Schwerdtle et al., 2007).

Mehrere Studien untersuchten die Zytotoxizität von CuO NP und CuO MP. In zellkulturbasierten Experimenten wurde die deutlich ausgeprägtere Zytotoxizität einer identischen Massendosis von CuO NP gegenüber CuO MP in verschiedenen Zelllinien beschrieben (Berntsen et al., 2010, Midander et al., 2009, Karlsson et al., 2009, Wang et al., 2012). Hinweise auf Apoptose durch lösliche kupferhaltige Substanzen (Rana, 2008) wurden ebenso für CuO NP ermittelt (Hanagata et al., 2011, Perreault et al., 2012). CuO NP veränderten auch das mitochondriale Membranpotential, eine Voraussetzung zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine, wie Cytochrom c oder AIF, stärker als CuO MP. Für lösliche Kupferverbindungen wurde die Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern bereits beobachtet (Ostrakhovitch and Cherian, 2005, Kawakami et al., 2008).

Während die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch lösliches Kupfersulfat bereits bekannt ist (Schwerdtle et al., 2007), wurde im sogenannten Comet-Assay eine stärkere Induktion von DNA-Schäden durch CuO NP als durch CuO MP nachgewiesen (Karlsson et al., 2009, Wang et al., 2012,

Midander et al., 2009). Ferner erhöhte eine Inkubation mit CuO NP die Anzahl an Mikrokernen, einem Maß für chromosomale Schäden (Song et al., 2012, Perreault et al., 2012). Als Ursache für die direkte Genotoxizität wurde mehrfach eine erhöhte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch redoxaktives Kupfer diskutiert. Die Bildung von ROS nach Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ wurde sowohl in zellfreien als auch in Zellkulturexperimenten von diversen Arbeitsgruppen untersucht. In wässrigen Suspensionen von CuO-Partikeln verschiedener Größen fanden Applerot und Mitarbeiter (2012) ROS-Konzentrationen, deren Ausmaße umgekehrt proportional zur Partikelgröße waren. Je kleiner die Partikel desto größer war die beobachtete Menge an ROS.

Im zellulären System wurde der Gehalt an intrazellulären ROS mittels des DCFH-DA (2',7'-Dichlorfluorescein-diacetat)-Assays untersucht. Karlsson et al. (2008) ermittelten eine erhöhte Menge an intrazellulären ROS nach Inkubation mit CuO NP und Seiffert et al. (2011) eine zunehmende Erhöhung von ROS über einen Zeitraum von 2 h. Letztere fanden zusätzlich einen erhöhten Anteil an oxidiertem GSH (GSSG) unter den gleichen Bedingungen. Ähnliche Effekte wurden bereits früher für lösliche Kupferverbindungen beschrieben (Pourahmad and O'Brien, 2000, Hultberg et al., 1997).

Biomarker für oxidativen Stress nach Behandlung von A549-Zellen mit CuO NP wurden auch von Ahamed und Mitarbeitern (2010) untersucht. Sie ermittelten einen reduzierten Gehalt an GSH sowie erhöhte Aktivitäten von Katalase (CAT) und SOD. Zusätzlich stieg der Gehalt an Malondialdehyd (MDA), dem Endprodukt der Lipidperoxidation, an (Ahamed et al., 2010, Perreault et al., 2012).

Hydroxyl-Radikale können durch Reaktionen mit den DNA-Basen oder Zuckerresten DNA-Strangbrüche verursachen (Jomova et al., 2012). Ferner könnten Partikel über eine mechanische Wechselwirkung mit der mitotischen Spindel interagieren oder während der Mitose mit Mikrotubuli oder Kinetochoren wechselwirken (Gonzalez et al., 2008).

Ein indirekt genotoxischer Effekt durch niedrige mikromolare Konzentrationen an Kupfersulfat wurde bereits durch die Inhibierung der an der DNA-Reparatur beteiligten Poly(ADP-Ribosyl)ierung, die vorrangig von dem Zink-bindenden Protein Poly(ADP-Ribose)polymerase-1 katalysiert wird, gezeigt (Schwerdtle et al., 2007).

Die Bioverfügbarkeit von Kupfersulfat wurde bereits früher untersucht und eine konzentrationsabhängige Akkumulation in HeLa S3-Zellen beobachtet (Schwerdtle et al., 2007). Die zelluläre Aufnahme von CuO NP wurde bisher vorrangig per Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Partikel wurden in Lysosomen, Mitochondrien sowie im Zellkern beobachtet (Wang et al., 2012, Hanagata et al., 2011). Wang et al. (2012) identifizierten zudem Endozytose als Hauptweg der Aufnahme von CuO NP, indem sie

einen Endozytosehemmer verwendeten. Die Autoren detektierten zusätzlich millimolare Kupferkonzentrationen in den Zellen und Zellkernen von unbehandelten A549-Zellen sowie nach Inkubation mit CuO NP. Neben der Aufnahme und der intrazellulären Bioverfügbarkeit ist auch die extrazelluläre Bioverfügbarkeit von Bedeutung, um den Einfluss der löslichen Komponenten auf die Toxizität zu beurteilen. Bei neutralem pH-Wert in Wasser und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) wurden bisher nur geringe Gehalte an gelöstem CuO NP oder CuO MP ermittelt (Midander et al., 2009, Seiffert et al., 2011). In Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum (FKS) sowie bei saurem pH (5,5) wiesen CuO NP allerdings eine deutliche Löslichkeit auf (Studer et al., 2010, Cho et al., 2012, Midander et al., 2009, Seiffert et al., 2011, Hanagata et al., 2011).

3 FRAGESTELLUNG

Die technische Verwendung von CuO NP als Katalysator und der Einsatz in Konsumgütern mit antimikrobiellen Eigenschaften nimmt rapide zu. Daher ist eine zunehmende Exposition von Arbeitnehmern und der Allgemeinbevölkerung wahrscheinlich. CuO NP rückten in den Fokus toxikologischer Untersuchungen, da sie als Modell der stärkeren Toxizität von nano- gegenüber mikroskaligen Partikeln (CuO MP) identischer Zusammensetzung gelten. Zusätzlich zu den elementspezifischen Eigenschaften des redoxaktiven Kupfers können physikochemische Charakteristika der CuO NP oder CuO MP das toxische Potenzial beeinflussen. Im Unterschied zu löslichen Metallionen werden Partikel vorrangig über Endozytose in Zellen aufgenommen. Dadurch kann das in den Partikeln enthaltene Kupfer vielfach bioverfügbarer werden als eine homöostatisch regulierte Verbindung, wie z.B. wasserlösliches CuCl₂.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit lautet: Unterscheiden sich die Zyto- und die Genotoxizität von CuO NP, CuO MP sowie CuCl₂ und besteht ein Zusammenhang mit Unterschieden in der Bioverfügbarkeit und der intrazellulären Verteilung von Kupferionen?

Zur Aufklärung des Sachverhalts wurden CuO NP und CuO MP zunächst eingehend physikochemisch charakterisiert und die zellkulturbasierten Methoden der Toxizitätstestung bezüglich ihrer Aussagefähigkeit für Untersuchungen mit Partikeln evaluiert.

Zur Abschätzung langfristiger Folgen auf die Lebensfähigkeit wurden die Koloniebildungsfähigkeit und der Anteil an Apoptose am beobachteten Zelltod ermittelt. Um die Genotoxizität von CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ systematisch zu vergleichen, wurden vier Endpunkte evaluiert. Zuerst wurde das Potential zur Induktion von DNA-Strangbrüchen, auch unter pro-oxidativen Bedingungen, bestimmt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Induktion von Mikrokernen als Maß für chromosomale Schäden. Zuletzt wurde der Einfluss der drei Kupferverbindungen auf die in die DNA-Reparatur involvierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung ermittelt.

Um eine Basis für die Assoziation der Toxizitätsunterschiede zu Unterschieden in der Bioverfügbarkeit herzustellen, wurde die Löslichkeit der CuO NP und CuO MP in wässrigen Modellflüssigkeiten bestimmt. Anschließend wurde die intrazelluläre Verteilung von Kupferionen nach Behandlung mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ quantifiziert und verglichen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 PARTIKELCHARAKTERISIERUNG

Synthetisierte Partikel, wie CuO NP und CuO CuO MP, können sich in ihren physikochemischen Eigenschaften u.a. hinsichtlich Größe, Morphologie, Oberfläche, Kristallstruktur, Ladung, chemischer Zusammensetzung und Löslichkeit unterscheiden. Elektronenmikroskopie, Brunauer-Emmett-Teller (BET)-Analyse, Dynamische Lichtstreuung (DLS), Röntgenstrahlungsbasierte sowie nasschemische Verfahren der Elementanalyse, in Kombination mit Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) und Atomsabsorptionsspektrometrie (AAS), gaben Aufschluss über die Eigenschaften der Partikel.

4.1.1 PARTIKEL

Kupferoxidnanopartikel (CuO NP) (# 544868, Lot # MKAA0633), Kupferoxidmikropartikel (CuO MP) (# 08841, Lot #MKAA1788) und CuCl_2 (#307483) wurden von Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland) erworben. Die Partikel wurden zur Vermeidung von direktem Lichteinfall entweder in Braunglasflaschen (CuO NP) oder in Gefäßen aus High Density Polyethylen (HD-PE) (CuO MP) kühl und trocken aufbewahrt.

4.1.2 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM)

Die Partikelgröße, Form und die chemische Zusammensetzung wurden mit Hilfe der REM untersucht. Dazu fährt ein Elektronenstrahl zeilenweise über die Probenoberfläche, wobei Sekundärelektronen und Rückstreuielektronen aus der Probenoberfläche emittiert, von einem Detektor aufgefangen, verstärkt und nach elektronischer Datenverarbeitung als Bild der Probenoberfläche grafisch ausgegeben werden.

Die Partikel wurden in Wasser suspendiert, auf einen Siliziumprobenhalter, der sich auf einem Aluminiumteller befand, aufgetragen, an der Luft getrocknet und mit einer ca. 2 nM dicken Platinschicht überzogen, um die Leitfähigkeit der Probe zu erhöhen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops LEO 1530 Gemini (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) in Kombination mit energiedispersiver Röntgenspektrometrie (EDS) bei einer Beschleunigungsspannung von 10 keV.

4.1.3 SPEZIFISCHE OBERFLÄCHE (BET)

Die spezifische Oberfläche der CuO NP und CuO MP wurde durch die BET- Analyse (Brunauer et al., 1938) ermittelt. Aus der in m²/ g angegebenen spezifischen Oberfläche kann zusätzlich, unter Annahme monodisperser, sphärischer Partikel, die mittlere Partikelgröße berechnet werden.

Vor der Messung wurden die Partikelproben 6 d bei 40°C in einem Vakuumtrockenschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) vorgetrocknet und mittels Mehrpunkt-BET analysiert (Gemini 2360, Micromeritics GmbH, Aachen, Deutschland). Aus der spezifischen Oberfläche und der vom Hersteller angegebenen Dichte von CuO von 6,31 g/ cm³ wurde unter Annahme monodisperser sphärischer Partikel die mittlere Partikelgröße berechnet (Weibel et al., 2005):

$$d(BET) = \frac{6}{\rho(CuO) * A(BET)}$$

d (BET): Durchmesser der Partikel in m

ρ (CuO): Dichte von CuO (6310 kg/ m³)

A (BET): spezifische Oberfläche von CuO aus der BET Analyse in m²/ kg

4.1.4 PARAMETER ZUR MESSUNG DER HYDRODYNAMISCHEN GRÖßENVERTEILUNG

Die Kenntnis physikalischer Charakteristika des Suspensionsmittels und der Partikel ist eine Voraussetzung für die Analyse mittels DLS (siehe Kapitel 4.1.5). Daher wurden die Dichte, der Brechungsindex, die Viskosität und die Dielektrizitätskonstante von Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ohne FKS, DMEM mit 5% FKS oder DMEM mit 10% FKS ermittelt: Der Literatur wurden folgende Werte entnommen: Der Brechungsindex von CuO beträgt 2,58 (Ladelfe et al., 1972). Der Wert für die Absorption wurde nach Empfehlung von Malvern mit 0,9 für schwarze stark absorbierende CuO Partikel festgelegt.

4.1.4.1 Dichte

Die Massendichte ρ von DMEM ohne FKS und DMEM mit 5% oder 10% FKS wurde mittels der pyknometrischen Methode ermittelt. Die Dichte in g/ cm³ wurde nach Gleichung 1 berechnet:

$$\rho = \frac{m_{DMEM} - m_{Pyk,leer}}{V_{Pyk}} \quad \text{Gl. 1}$$

m_{DMEM} : Masse des mit dem Prüfmedium gefüllten Pyknometers

$m_{Pyk,leer}$: Masse des leeren Pyknometers

V_{Pyk} : Volumen des Pyknometers (50 ml)

Das leere Pyknometer wurde in einem Wasserbad für 30 min auf 20 °C äquilibriert, getrocknet und gewogen ($m_{Pyk,leer}$) (Waage: VWR 1502, Sartorius). Anschließend erfolgte die Beladung mit der jeweiligen Prüfflüssigkeit. Erneutes Temperieren, Trocknen und Wiegen ergab den Wert für m_{DMEM} .

4.1.4.2 Dynamische Viskosität

Die dynamische Viskosität η von DMEM ohne FKS sowie DMEM mit 5% oder 10% FKS wurde mittels eines Rheometers bestimmt. η ist der Quotient aus Schubspannung τ und Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ und wird in der Einheit Pa·s angegeben.

Mit Hilfe des Rheometers Physica MCR 301 (Anton Paar, Graz, Österreich) wurde die Viskosität von DMEM ohne FKS sowie DMEM mit 5% oder 10% FKS bei 20 °C ermittelt. Nach Befüllung des zylindrischen Messbechers mit der jeweiligen Flüssigkeit wurde der Messkörper eingebaut und ein vorher definiertes Programm aktiviert. Das Programm enthielt die folgenden Schritte: 33 Messungen von je 5 s Dauer bei einer Schergeschwindigkeit von $\dot{\gamma} = 0.1 \dots 100$ 1/s, zehn Messungen von 5 s Dauer bei $\dot{\gamma} = 100$ 1/s und 33 Messungen von 5 s Dauer bei $\dot{\gamma} = 100 \dots 0.1$ 1/s. Die Viskosität wurde mit der Software RHEOPLUS/32 Multi3 V 3.4 unter Verwendung der Methode Newton I berechnet.

4.1.4.3 Brechungsindex

Um Lichtstreuung experimentell beobachten zu können, ist ein Brechungsindexunterschied zwischen Partikel und Suspensionsmedium erforderlich. Brechungsindexdifferenz und Streuintensität sind zueinander proportional.

Die Brechungsindices von DMEM ohne FKS sowie DMEM mit 5% oder 10% FKS wurden mit Hilfe eines Refraktometers bei 20 °C ermittelt. Dazu wurde die Probenflüssigkeit auf das Doppelprisma

des Refraktometers appliziert, auf größtmöglichen Kontrast eingestellt und der Brechungsindex abgelesen.

4.1.4.4 Dielektrizitätskonstante

Um das Zetapotential (siehe Kapitel 4.1.5) aus der elektrophoretischen Mobilität abzuleiten, wurden Angaben zur Dielektrizitätskonstante des DMEM ohne FKS sowie DMEM mit 5% oder 10% FKS benötigt. Dazu wurde eine Sonde verwendet, die ein Signal im Bereich der Radiofrequenz bis Mikrowellenfrequenz (200 MHz bis 50 GHz) in das zu untersuchende Material emittiert. Ein Netzwerkanalysator berechnete daraus die komplexe Permittivität und gab sie als Dielektrizitätskonstante aus.

Die Dielektrizitätskonstanten von DMEM ohne FKS sowie DMEM mit 5% oder 10% FKS wurden mit Hilfe des 85070E Dielectric Probe Kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) ermittelt. Die Analyse wurde nach Kalibrierung gegen einen Kurzschluss, Luft und Wasser ausgeführt, indem die Sonde in das zu untersuchende Medium luftblasenfrei eingetaucht wurde. Die Dielektrizitätskonstante wurde als dimensionslose Zahl ausgegeben (Agilent, 2008).

4.1.5 HYDRODYNAMISCHE GRÖßENVERTEILUNG UND ZETAPOTENTIAL

Unter dem hydrodynamischen Radius versteht man den Radius eines Partikels einschließlich seiner Solvathülle in Suspensionen. Dieser lässt sich mittels DLS bestimmen. Dabei trifft kohärentes, monochromatisches Laserlicht auf die Partikel der Probe und wird an diesen gestreut. Die resultierende Interferenz führt, in Kombination mit der Brown'schen Molekularbewegung (Geschwindigkeit) der Partikel, zu Fluktuationen der detektierten Streuintensität, aus der ein Diffusionskoeffizient abgeleitet und mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung in den hydrodynamischen Radius der Partikel, umgerechnet werden kann. Zusätzlich zum hydrodynamischen Radius bzw. der Partikelgrößenverteilung wurde der Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt. Er beschreibt die Heterogenität einer Suspension und wird als dimensionslose Zahl zwischen 0 und 1 angegeben, wobei 0 eine monodisperse (alle Partikel sind gleich groß und sphärisch) und 1 eine polydisperse (sehr verschieden große und häufig unregelmäßig geformte Partikel) Partikelsuspension repräsentiert.

Das Zetapotential ist ein allgemeines Maß, um die Stabilität einer Partikelsuspension zu beurteilen. Nach der DVLO (Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek)-Theorie kann die Stabilität einer Partikelsuspension aus der Summe aller attraktiven und repulsiven Kräfte der sich mit Brown'scher Molekularbewegung bewegenden Partikel abgeschätzt werden (Derjaguin and

Landau, 1941, Verwey, 1947). Die Suspension ist stabil, wenn die repulsiven die attraktiven Kräfte überwiegen. In ionenhaltigen Lösungen bildet sich um jedes Partikel eine sogenannte elektrochemische (Helmholtz-) Doppelschicht aus, deren Schichtdicke das Ausmaß der Abstoßung oder Anziehung bestimmt. Die Ionen sind auf der Partikeloberfläche fest und mit zunehmender Entfernung davon immer loser gebunden. Das Partikel erscheint dadurch nach außen neutral. Durch Bewegung des Partikels werden die locker gebundenen Ionen abgeschert und dadurch die Neutralität aufgehoben. Das Partikel besitzt wieder ein Potential, das sogenannte Zetapotential. In Abhängigkeit vom Suspensionsmittel dient es als relative Messgröße für die Ladung des Partikels. Um das Zetapotential zu bestimmen, wird die Partikelgeschwindigkeit in einem externen elektrischen Feld (elektrophoretische Mobilität) ermittelt und mit Hilfe der Smoluchowski-Näherung in ein Zetapotential konvertiert. Zusätzlich zur elektrostatischen Abstoßung durch die elektrochemische Doppelschicht tragen auch sterisch wirksame Moleküle, wie Polymere auf der Partikeloberfläche, zur Suspensionsstabilität bei, da die Van-der-Waals-Anziehung vermindert wird.

Beträgt das Zetapotential weniger als -30 mV oder mehr als +30 mV, gilt eine Suspension als stabil, bei 0 mV als komplett instabil. Unabhängig von der mittels Zetapotential prognostizierten Stabilität einer Suspension kann es aufgrund einer großen Differenz der Dichten von Suspensionsmittel und Partikeln zur Sedimentation kommen.

Um den hydrodynamischen Radius bzw. die Partikelgrößenverteilung und das Zetapotential von CuO NP und CuO MP bei 20°C zu ermitteln, wurde der Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern (Herrenberg, Deutschland) verwendet.

1,5 ml der jeweiligen Partikelsuspension (50, 100, 150 µg/ml CuO NP) in DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS, DMEM mit 10% FKS oder hochreinem Wasser) wurden dazu in saubere Polystyrolküvetten (# 67-754, Sarstedt) überführt. Die Messbedingungen, wie Abstand des Messpunktes von der Küvettenwand, Anzahl der Messdurchläufe und Messdauer wurden vor der Messung optimiert. Die implementierte Zetasizer Nano ZS Dispersion Technology Software (DTS, Version 6.20) interpretierte die Daten.

Zetapotential-Messungen wurden in einer gefalteten Kapillarzelle (DTS 1061C, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), die zuvor mit hochreinem Wasser und Ethanol gespült wurde, ausgeführt. Zur Berechnung des Zetapotentials aus der ermittelten elektrophoretischen Mobilität wurde die Smoluchowski-Näherung für polare Solventien genutzt.

Um Wechselwirkungen auszuschließen, wurde das Gerät vor jeder Nutzung mit einem Größen- und Zetapotential-Standard überprüft. Zudem wurden die reinen Suspensionsmittel unter den gleichen Bedingungen, wie die Partikelsuspensionen auf partikuläre Verunreinigungen untersucht.

4.1.6 KRISTALLINITÄT (DIFFRAKTOMETRIE)

Ob ein Feststoff kristalline oder amorphe Struktur besitzt, kann durch Röntgendiffraktometrie ermittelt werden. Dabei wird Röntgenstrahlung am ggf. vorhandenen Kristallgitter eines Einkristalls gebeugt (Laue-Verfahren). Die in den Beugungsdiagrammen auftretenden punktmusterförmigen Reflexe entsprechen Interferenzmaxima und zeigen das Vorliegen eines kristallinen Festkörpers an.

Die Kristallinität der Partikel wurde mit Hilfe eines TECNAI G² 20 S-TWIN (FEI, Hillboro, OR, USA) bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV ermittelt. Ein Aliquot der jeweiligen Partikelsuspension in hochreinem Wasser wurde auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfernetz platziert, vorsichtig getrocknet und anschließend zur Messung appliziert. Die Laue-Diagramme wurden mit der DigitalMicrograph Software (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA) aufgenommen.

4.1.7 ENERGIEDISPERSIVE RÖNTGENSPEKTROMETRIE (EDS)

Die qualitative chemische Zusammensetzung wurde während der REM-Analyse ermittelt (REM-EDS). Das Prinzip der EDS beruht auf einer Anregung der Probe mit Elektronenstrahlen, auf die eine Emission elementspezifischer Röntgenstrahlung folgt, die detektiert wird. Im EDS-Spektrum wurde die Signalintensität gegen die Energie der Röntgenquanten aufgetragen, anhand derer die Elementzuordnung erfolgte.

Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

4.1.8 MASSENSPEKTROMETRIE MIT INDUKTIV GEKOPPELTEM PLASMA (ICP-MS)

ICP-MS ist ein Verfahren der Elementanalyse, bei dem mittels hochfrequentem Strom die Probe ionisiert und nach Beschleunigung durch ein elektrisches Feld massenspektrometrisch auf die enthaltenen Elemente hin analysiert wird.

CuO NP und CuO MP wurden in ein Mikroreagiergefäß eingewogen, mittels oxidativem Aufschluss durch 500 µl einer 1:1 Mischung (v/v) HNO₃ (69%)/ H₂O₂ (31%) (Qualität Suprapur) gelöst und durch schrittweises Heizen auf 95 °C verascht. Der verbleibende kristalline Rückstand wurde in 1 ml hochreinem Wasser aufgenommen und mittels ICP-MS der Gehalt an Kupfer und weiteren Elementen bestimmt.

4.1.9 TRÄGERGAS-HEIßEXTRAKTION ZUR ERMITTLUNG DES SAUERSTOFFGEGHALTS

Das Verfahren der Trägergas-Heißextraktion erlaubt die Bestimmung des Sauerstoffgehalts fester Proben. Dazu wird eine Probe in einer Inertgasatmosphäre in einem Tiegel aus Graphit geschmolzen. Der Sauerstoff der Probe reagiert mit dem Kohlenstoff des Tiegels zu CO oder CO₂. Dieses wird mittels Infrarotdetektion gemessen.

Die Messung der CuO NP und CuO MP Proben erfolgte mittels des Stickstoff/ Sauerstoffanalysators TC 600 (LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach, Deutschland).

4.1.10 PH-WERT

Stark sauer oder basisch reagierende Substanzen können den pH-Wert von Zellkulturmedium beeinflussen. Um dies auszuschließen, wurden die zu untersuchenden Partikel wie für die Zellkulturexperimente (siehe Kapitel 4.2.5) präpariert und der pH-Wert gemessen.

Der pH-Wert von Partikelsuspensionen aus hochreinem Wasser oder DMEM mit 10% FKS wurde unter Rühren bei Raumtemperatur mit dem pH-Meter pH 330 (SenTix® Elektrode) (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland) ermittelt.

4.1.11 VERUNREINIGUNG MIT MIKROORGANISMEN

Die Verwendung verunreinigter Partikel kann die Resultate aus Zellkulturversuchen beeinflussen. In einem ersten Ansatz wurden CuO NP und CuO MP qualitativ auf Schimmelpilz- und Bakterienbefall untersucht (Kapitel 4.1.11.1). In einem zweiten Ansatz wurde der Gehalt an Endotoxinen quantitativ ermittelt (Kapitel 4.1.11.2).

4.1.11.1 Pilzbefall und allgemeine bakterielle Kontaminationen

Die Kontamination von Zellkulturen mit Schimmelpilzen oder Bakterien kann das Wachstum der Zellen beeinflussen und somit die Ergebnisse von toxikologischen Zellkulturversuchen verfälschen. Daher wurden CuO NP und CuO MP qualitativ auf eine Kontamination untersucht.

20 mg bis 80 mg CuO NP und CuO MP wurden in DMEM mit 10% FKS ohne Penicillin-Streptomycin-Zusatz suspendiert und in Zellkulturflaschen für 14 d unter Zellkulturbedingungen inkubiert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf einen Befall mit Schimmelpilzen oder Bakterien kontrolliert. Zusätzlich wurde der pH-Wert des Mediums mit Hilfe des zugesetzten Indikators Phenolrot beobachtet. Die regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle belegte, dass CuO NP und CuO MP frei von Schimmelpilzen oder Bakterienbefall waren. Der pH-Wert blieb unverändert.

4.1.11.2 Endotoxine

Endotoxine oder Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien, die in Zellkulturexperimenten die Cytokin- und Chemokinproduktion anregen können (Vallhov et al., 2006). Der Nachweis beruht auf einer kolorimetrischen Methode, bei der Endotoxine die Aktivierung eines Proenzym im Lysat des Pfeilschwanzkrebses („Limulus amoebocyte lysate“) katalysieren. Das aktivierte Proenzym schneidet anschließend ein farbloses Substrat. Das resultierende farbige Endprodukt der Reaktion kann spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 545 nm gemessen und mit einer Standardkurve verglichen werden.

Partikelsuspensionen wurden in endotoxinfreiem Wasser hergestellt. Vor der Ermittlung des Endotoxingehalts wurden die Partikel abzentrifugiert. Zur Quantifizierung wurde das „ToxinSensor™ Endotoxin Detection System Kit“ der Firma Genscript (Piscataway, NJ, USA) unter Einsatz einer Kalibriergeraden im Bereich von 0,1-1 EU/ml verwendet und die Analyse nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.12 LÖSLICHKEIT

Um den Beitrag der löslichen und partikulären Spezies an den biologischen Effekten abzuschätzen, wurde der Kupfergehalt in den physiologisch relevanten wässrigen Flüssigkeiten DMEM ohne FKS, DMEM mit 10% FKS, künstliche alveoläre Flüssigkeit (AAF), künstliche lysosomale Flüssigkeit (ALF), PBS und hochreinem Wasser ermittelt.

10 ml einer CuO NP oder CuO MP Partikelsuspension in DMEM ohne FKS oder DMEM mit 10% FKS (50 µg/ml) wurden in Zellkulturschalen (60,1 cm²) überführt und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Suspensionen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (3000 g, 1 h, RT). 8 ml des Überstandes wurden viermal 2 ml aliquotiert und zentrifugiert (16000 g, 1 h, RT). Je 1 ml der Überstände jeden Aliquots wurde entnommen, vereinigt, gemischt und 2 ml davon wurden erneut zentrifugiert (16000 g, 1 h, RT). 1 ml des resultierenden Überstandes wurde auf einem Heizschüttler bei 95 °C eingedampft und

anschließend mit 500 µl einer 1:1 Mischung (v/v) HNO₃ (69%)/ H₂O₂ (31%) (quality suprapure) durch schrittweises Heizen von 60 auf 95 °C verascht. Der verbleibende kristalline Rückstand wurde in 1 ml hochreinem Wasser aufgenommen und der Kupfergehalt mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (GF-AAS) gemessen. Die erfolgreiche Abtrennung der Partikel von den jeweiligen Suspensionsmittelüberständen wurde mit Hilfe von DLS (siehe Kapitel 4.1.5) verifiziert.

Die Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in hochreinem Wasser, AAF, ALF oder PBS wurde in einer modifizierten Prozedur untersucht. Partikelsuspensionen (50 µg/ml) wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen für 1, 4 und 7 d bei 37 °C auf einem Inkubationschüttler (MKR 13, HLC-BioTech, Bovenden, Deutschland) bei 100 rpm geschüttelt. Zentrifugation und Veraschung wurden, wie oben angegeben, ausgeführt.

Für die AAS-Messung wurden 20 µl der Probelösung oder Verdünnung zusammen mit 5 µl Pd/ Mg-Modifizier in das Graphitrohr appliziert und mit einem für Kupfer optimierten Temperaturprogramm analysiert (Tabelle 1). Die Messwellenlänge war 324,75 nm, die Kalibriergerade wurde im Bereich von 0 µg/l bis 25 µg/l mit einer AAS Cu-Standardlösung angesetzt (siehe Kapitel 8.7.1.3)

Tabelle 1: Temperaturprogramm der AAS-Analyse von Kupfer.

	Temperatur [°C]	Ramp Time [s]	Hold Time [s]	Gasstrom Argon [ml/ min]
Trocknen 1	110	1	30	250
Trocknen 2	130	15	30	250
Pyrolyse	1200	10	20	250
Atomisierung	2000	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

4.2 ZELLKULTUR

4.2.1 ZELLINIEN UND KULTIVIERUNG

Die als Zellmodell verwendeten adhärenen Zelllinien A549 (humane Lungenadenokarzinomzelllinie) und HeLa S3 (humane Epithelkarzinomzelllinie) wuchsen in Zellkulturschalen bzw. -flaschen als Monolayer in DMEM, angereichert mit 10% FKS und 100 U/ml

Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (DMEM mit 10% FKS). Die aus Mäusen gewonnene Hybridomasuspensionszelllinie 10H zur Herstellung eines Antikörpers gegen Poly(ADP-Ribose) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Alexander Bürkle (Universität Konstanz, Deutschland) bereitgestellt. Diese Zellen benötigten spezielle Kulturbedingungen, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

Alle verwendeten Zelllinien wuchsen in Inkubatoren in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft bei 37 °C und 100% Luftfeuchtigkeit (HeraSafe, ThermoScientific, Langenselbold, Deutschland). Zellkulturexperimente erfolgten bei identischer Zelldichte (16600 Zellen/cm² Wachstumsfläche des Zellkulturgefäßes). Nach der Aussaat wuchsen die Zellen 24 h an, danach wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch das geeignete Volumen an Inkubationslösung ersetzt (0,2 ml/cm² Wachstumsfläche des Zellkulturgefäßes).

Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Morphologie und Zustand der Zellen wurden zuvor lichtmikroskopisch erfasst. Zur Passage der Zellen wurden die verwendeten Lösungen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Um die Zellen von den Zellkulturschalen abzulösen, erfolgte zweimal eine Behandlung mit 0,25% Trypsin, gefolgt von einer ca. zweiminütigen Inkubation (HeLa S₃ bzw. A549) bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden in frischem DMEM mit 10% FKS aufgenommen, gezählt und eine entsprechende Anzahl in DMEM mit 10% FKS resuspendiert. Zur Passage der 10H-Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension ohne Behandlung mit Trypsin in frisches DMEM mit 10% FKS gegeben.

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C in einem Einfriermedium aus 90% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (A549, HeLa S₃) bzw. 70% 10H-Auftaumedium (siehe Kapitel 4.2.2), 20% FKS und 10% DMSO (10H).

Alle Arbeiten erfolgten in einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Geräte und Verbrauchsmaterialien.

4.2.2 GEWINNUNG DES ANTIKÖRPERS 10H

Die Maushybridomazelllinie 10H diente der Gewinnung des gegen Poly(ADP-Ribose) gerichteten monoklonalen Antikörpers 10H (Kawamitsu et al., 1984). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. A. Bürkle (Universität Konstanz, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10H-Auftaumedium (50% (v/v) DMEM mit 10% FKS, 48% (v/v) Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Zellkulturmedium, 2% (v/v) NCTC, einfach essentielle Aminosäuren, 50 µM β-Mercaptoethanol) gegeben und regelmäßig passagiert. Stabil proliferierende Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS umgesetzt und regelmäßig passagiert.

Um den Antikörper zu gewinnen, wurden die Zellen in Hybridoma-SFM-Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) umgesetzt und durch regelmäßige, lichtmikroskopische Kontrolle die späte stationäre Wachstumsphase ermittelt. Die sich im Überstand befindenden Antikörpermoleküle wurden von den Zellüberresten durch Zentrifugation abgetrennt und bei -20 °C eingefroren. Die Reinigung erfolgte mit dem kommerziellen „Protein A Purification Kit“ (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben. Jedes Aliquot wurde mittels Immunofluoreszenz auf den Antikörpergehalt getestet und die einzusetzende optimale Verdünnung wurde bestimmt.

4.2.3 VORBEREITUNG ENDOTOXINFREIER VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die Partikelsuspensionen für alle Versuche wurden in Schnappdeckelgläsern, ausgestattet mit passendem Polytetrafluorethylen (PTFE)-ummanteltem Magnetrührkern, hergestellt. Zuvor wurden die Gläser und Rührkerne sukzessive mit sterilfiltriertem, hochreinem Wasser (18 mΩ) (Millipore, Billerica, USA) und 70% Ethanol gewaschen, um anorganische und organische Kontaminationen zu entfernen. Da bakterielle Kontaminationen substanzunabhängig biologische Effekte auslösen können, erfolgte zur Zersetzung eventuell vorhandener Lipopolysaccharide (Endotoxine) eine Heißluftsterilisation für 0,5 h bei 250 °C oder für 5 h bei 220 °C. Die Schnappdeckel wurden analog gereinigt und bis zum Gebrauch in 70% Ethanol aufbewahrt und vor der Verwendung in einer sterilen Werkbank getrocknet.

4.2.4 DOSISANGABEN

In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Inkubationsdosen in der Regel in der Einheit

Tabelle 2: Umrechnung gebräuchlicher Konzentrationsangaben der Partikeltoxikologie.

CuO [µg/ ml]	CuO [µg/ cm ²]	CuCl ₂ [µmol/ l]	CuO NP [cm ² / ml]	CuO MP [cm ² / ml]
1	0,2	13	0,1722	0,0074
5	1	63	0,8612	0,0369
10	2	126	1,723	0,0738
20	4	252	3,446	0,1476
30	6	377	5,169	0,2214
40	8	503	6,892	0,2952
50	10	630	8,615	0,3690

μg Partikel/ml Suspensionsmittel ($\mu\text{g}/\text{ml}$) angegeben. Um die Vergleichbarkeit mit anderen gebräuchlichen Dosisangaben zu erleichtern, sind in Tabelle 2 flächenbezogene Masse (μg Partikel/ cm^2 Wachstumsfläche des Zellkulturgefäßes, Spalte 2), Oberflächenkonzentration (cm^2 Partikeloberfläche/ml Suspensionsmittel, Spalte 4 und 5) und molare Konzentration (μmol Kupfer/l Suspensionsmittel, Spalte 3) gegeben.

4.2.5 INKUBATION

Zur Herstellung der Partikelsuspensionen wurden die Partikel in farblose 1,5 ml Polystyrolreaktionsgefäße (# 72.690.001 Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aliquotiert (Feinwaage BP 61 S, Sartorius, Göttingen, Deutschland).

Partikelsuspensionen mit Konzentrationen zwischen 0,5 und 10 mg/ml wurden hergestellt, indem ein Partikelaliquot komplett in ein Schnappdeckelglas mit Magnetrührkern überführt und im jeweiligen Medium suspendiert wurde. Jeder Partikelsorte und dem Kontrollmedium wurde ein eigener Satz Magnetrührkerne zugeordnet. Die Stammlösung wurde für 1 h auf einem Mehrstellenmagnetruher (Variomag® Poly, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gerührt (900 rpm, RT). Partikelsuspensionsverdünnungen im Konzentrationsbereich 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Zellkulturexperimente), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Endotoxintest) und im Bereich von 50–2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (DLS, Zetapotential) wurden hergestellt, indem festgelegte Volumina der Stammlösung in frisches Medium pipettiert und anschließend 24 h gerührt wurden (900 rpm, RT). CuCl_2 wurde in hochreinem Wasser in einer Konzentration von 400 mM gelöst und sterilfiltriert (Porenweite des Filters: 0,22 μm , Zelluloseacetat) und bei 4 °C gelagert. Geeignete Verdünnungen wurden direkt vor jeder Inkubation hergestellt. Zu Vergleichszwecken wurden gerührte Verdünnungen von CuCl_2 in gleicher Weise wie die Partikelsuspensionen hergestellt und in Kontrollexperimenten verwendet.

4.2.6 ZYTOTOXIZITÄT

Die Toxizität einer Substanz kann anhand der Zellviabilität, einem wichtigen Parameter zur Beurteilung von biologischen Effekten, abgeschätzt werden.

4.2.6.1 Reduktion von WST-8

Da die Quantifizierung der Lebensfähigkeit über die Reduktion von WST-8 auf einem kolorimetrischen Ansatz beruht, wurde zuerst die intrinsische Absorption der kupferhaltigen Verbindungen sowie von DMEM mit 10% FKS ermittelt. Die Untersuchung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz CCK-8 (Sigma Aldrich). CCK-8 enthält neben WST-8 den intermediären Elektronenakzeptor 1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat (mPMS).

100 µl DMEM mit 10% FKS bzw. 1 µg/ml bis 50 µg/ml CuO oder 13 µM bis 630 µM CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS wurden in jede Kavität einer transparenten 96-Wellplatte gegeben und für 4 h oder 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 10 µl hochreines Wasser pro Kavität zugegeben, eine weitere Stunde inkubiert und die Absorption bei 450 nm ausgelesen (Tecan Infinite pro 200M).

Anschließend wurde untersucht, ob CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ WST-8 in Abwesenheit von Zellen reduzieren können.

100 µl DMEM mit 10% FKS bzw. 1 µg/ml bis 50 µg/ml CuO oder 13 µM bis 630 µM CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS wurden in jede Kavität einer transparenten 96-Wellplatte gegeben und für 4 h oder 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 10 µl CCK-8 Reagenz (enthält WST-8) pro Kavität zugegeben, eine weitere Stunde inkubiert und die Absorption bei 450 nm ausgelesen (Tecan Infinite pro 200M).

Im Anschluss wurde die Zytotoxizität von CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ mit A549-Zellen ermittelt.

$5,5 \times 10^4$ A549-Zellen wurden in 100 µl DMEM mit 10% FKS in jede Kavität einer transparenten 96-Wellplatte ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 100 µl der entsprechenden Inkubationslösung ersetzt (0 µg/ml bis 50 µg/ml CuO bzw. 0 µM bis 630 µM CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS). Für die Ermittlung der intrinsischen Absorption der Inkubationslösungen wurden je zwei Kavitäten pro Konzentration mit den Inkubationslösungen allein versetzt. Nach 4 h bzw. 24 h wurden 10 µl CCK-8 Reagenz bzw. 10 µl hochreines Wasser in jede Kavität gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert, bevor die Absorption bei 450 nm gemessen wurde. Für die Auswertung wurde die intrinsische Absorption der Inkubationslösungen subtrahiert.

Um auszuschließen, dass die Lebensfähigkeit von A549-Zellen bereits nach 1 h Inkubation mit den kupferhaltigen Verbindungen stark absank wurden weitere Versuche wie vorstehend durchgeführt. Jedoch wurde nach der Inkubation mit CuCl₂ (1 bis 50 µM) die Inkubationslösung entfernt, die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit dem WST-Reagenz inkubiert.

4.2.6.2 Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit

Die Methode der Koloniebildungsfähigkeit basiert auf der Fähigkeit einer einzelnen Zelle, eine Kolonie zu bilden und wurde erstmals 1956 beschrieben (Puck et al., 1956). Sie erlaubt die simultane Erfassung akut toxischer Effekte anhand der Zellzahl sowie die Beurteilung von Langzeiteffekten auf die Teilungsfähigkeit nach Durchlaufen mehrerer Zellzyklen. Ein weiterer Vorteil der Koloniebildungsfähigkeit ist ihre Eignung für die Untersuchung von Nanomaterialien, da auf Farbstoffe oder Enzymreagenzien verzichtet werden kann.

1×10^6 A549-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS in Zellkulturschalen (\varnothing 87 mm) ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Sodann erfolgte die Inkubation der logarithmisch wachsenden Zellen mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ 24 h. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und elektronisch gezählt (Coulter Z2, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Zuletzt wurden Triplikate von exakt 300 Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 53 mm) mit frischem DMEM mit 10% FKS weitergesetzt. Nach sieben bis zehn Tagen konnten die gebildeten Kolonien mit Ethanol fixiert, mit Giemsalösung gefärbt und gezählt werden.

4.2.7 APOPTOSE

4.2.7.1 Einfluss auf die Kernlokalisierung von AIF

Das in der inneren mitochondrialen Membran verankerte Protein AIF kann, ausgelöst durch bestimmte apoptotische Stimuli, von der Membran gelöst und ins Zytosol freigesetzt werden. Anschließend transloziert AIF vom Zytosol in den Zellkern, wo es in großem Maßstab zur DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation beiträgt (Norberg et al., 2010). Die Translokation von AIF wurde mit Hilfe einer immunfluorimetrischen Methode untersucht. Durch Bindung an einen spezifischen Cy3-gekoppelten Antikörper kann AIF als rote Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Für die quantitative Auswertung wurde die DNA im Zellkern mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt.

$1,53 \times 10^5$ A549-Zellen wurden in 1,8 ml DMEM mit 10% FKS auf Deckgläsern (\varnothing 12 mm) in Zellkulturschalen (\varnothing 34 mm) ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Daraufhin erfolgte die Inkubation logarithmisch wachsender A549-Zellen mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ sowie 400 nM Staurosporin als Positivkontrolle für weitere 4, 8, 16 oder 24 h. Danach wurden die Schalen auf Eis gestellt, das Inkubationsmedium entfernt und die Deckgläser mit PBS (4 °C) gewaschen, bevor die Zellen fixiert wurden (3,7% Formaldehyd in PBS, 45 min, 4 °C). Nach dem Waschen mit PBS (3 ×,

4 °C) folgte die Permeabilisierung der Zellen (0,25% Triton X-100 in PBS, 25 min, 4 °C). Nach erneutem Waschen mit PBS (3 ×, 4 °C) wurden ungebundene Proteinbindungsstellen blockiert (PBS/ 5% FKS, 5 min, RT). 70 µl IgG Antikörper gegen AIF (rabbit polyclonal, Santa Cruz) (Verdünnung 1:50 in PBS/ 5% FKS) wurde auf die Deckgläser gegeben und diese in einer feuchten Kammer inkubiert (30 min, 37 °C). Abermaligem Waschen in PBS (3 ×, RT) und Behandeln mit PBS/ 5% FKS (10 min, RT) schloss sich die Behandlung der Zellen mit dem Sekundärantikörper (goat anti-rabbit Cy3-gekoppelt, Santa Cruz) (Verdünnung 1:300, in PBS/ 5% FKS, 30 min, 37 °C, im Dunklen) in der feuchten Kammer, an. Antikörperreste wurden durch Waschen mit PBS (3 ×, RT) entfernt und die Deckgläser auf Objektträgern positioniert, die mit VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) präpariert waren. Die Quantifizierung der roten Fluoreszenz des AIF im Zellkern oder den Mitochondrien wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axio Imager.M1 (Carl Zeiss AG) unter Verwendung der Software Axiovision Version 4.8 durchgeführt.

4.2.7.2 Einfluss auf die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7

Apoptose wird von Mitgliedern der „cysteine aspartic acid-specific protease“ (Caspase)-Familie koordiniert. Caspasen werden als Antwort auf diverse Zellstimuli aktiviert und bauen die Zelle durch gezielte Proteolyse von zahlreichen zellulären Proteinen ab. Zur Ermittlung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 wird ein Aminoluciferin-gebundenes Tetrapeptid mit der Sequenz DEVD (Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure) von den Effektorcaspasen geschnitten und Aminoluciferin freigelegt. Aminoluciferin wird anschließend, unter O₂-Verbrauch und Verwendung der Cofaktoren Adenosintriphosphat (ATP) und Mg²⁺, durch das Enzym Luciferase decarboxyliert. Es entsteht Luciferin. Während der Reaktion wird Lumineszenz emittiert, deren Ausmaß proportional zur Caspaseaktivität ist und gemessen werden kann.

$5,5 \times 10^4$ A549-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS in jede Kavität einer weißen 96-Wellplatte (Brand, Wertheim, Deutschland) ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Danach erfolgte die Inkubation der logarithmisch wachsenden A549-Zellen mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ sowie 400 nM Staurosporin als Postitivkontrolle 24 h. Zur Ermittlung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 wurde das Kit „Caspase Glo® 3/7“ (Promega Corporation, Madison, WI, USA) verwendet und die Analyse nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurden Blindwerte zur Ermittlung der inhärenten Lumineszenz der Partikel mitgeführt (zellfrei). Zusätzlich wurde die Wechselwirkung der Partikel mit dem Reagenz ermittelt und zur Auswertung von den eigentlichen Werten abgezogen (siehe Kapitel 5.2.2.2).

4.2.7.3 Einfluss auf den SubG1-Peak

Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt die Ermittlung des DNA-Gehaltes einer Zelle. Verwendet wird ein Fluoreszenzfarbstoff zur spezifischen Markierung der DNA, z.B. DAPI. Die angelagerte Menge an Farbstoff ist dabei dem DNA-Gehalt proportional. Die Quantifizierung erfolgt über die Ermittlung der Emission eines Fluoreszenzsignals nach Anregung des Farbstoffs. Dabei kann die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus dargestellt und mit Hilfe von Software quantifiziert werden. Zellen mit einem DNA-Gehalt kleiner dem einer Zelle in der G1-Phase, wie sie z.B. während der späten Apoptose aufgrund der Fragmentierung der DNA auftauchen, sind als sogenannter SubG1-Peak im Histogramm detektierbar.

$3,68 \times 10^5$ A549-Zellen wurden in Zellkulturschalen (\varnothing 53 mm) ausgesät, 1 d anwachsen gelassen und für 4, 8, 16 und 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ und als Positivkontrolle mit 400 nM Staurosporin inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Zellkulturmediumüberstand inklusive toter Zellen abgenommen, separat gesammelt und auf Eis gelagert. Die Zellen in der Schale wurden trypsinisiert, in PBS/5% FKS (4 °C) gesammelt, mit dem Zellkulturmediumüberstand vereinigt, zentrifugiert (448 g, 5 min, 4 °C) und das Pellet in 1 ml PBS (4 °C) resuspendiert, bevor 3 ml Ethanol (96%,-20 °C) unter Schütteln zugetropft wurden. Auf die Fixierung (über Nacht, -20 °C) folgte die durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet in 1 ml DAPI-Färbelösung (CyStainDNA, Partec, Münster, Deutschland) resuspendiert und vor der Messung für 2 h bei 4 °C und für 2 h bei RT gelagert. 10000 Zellen pro Probe wurden in Hinblick auf ihre Zellzyklusverteilung und das Auftreten eines SubG1-Peaks mit Hilfe des Durchflusszytometers PAS II (Partec) unter Zuhilfenahme der Software FloMax, analysiert.

Um Wechselwirkungen der Partikel auszuschließen, wurden Partikelsuspensionen analog zu den Versuchen mit Zellen aufgearbeitet und vermessen. Zudem wurden Partikelsuspensionen direkt mit dem gewählten Programm vermessen, um Wechselwirkungen durch eine partikelinhärente Fluoreszenz auszuschließen (siehe Anhang Kapitel 8.7.6.4).

4.2.8 DIREKTE UND INDIREKTE GENOTOXIZITÄT

4.2.8.1 Detektion und Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

Zur Ermittlung des genotoxischen Potentials einer Substanz kann u.a. die Anzahl induzierter DNA-Strangbrüche herangezogen werden. HeLa S₃-Zellen wurden mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert und mittels Alkalischer Entwindung wurde die Anzahl an DNA-Strangbrüchen

quantifiziert. Die Methode beruht auf der Entwindung der DNA bei pH 12,3 und der anschließenden Separation einzel- und doppelsträngiger DNA durch Hydroxylapatitchromatographie. Die Quantifizierung erfolgt durch einen fluoreszierenden DNA-Interkalationsfarbstoff.

Zusätzlich zu den Auswirkungen einer Inkubation mit den kupferhaltigen Substanzen allein wurde die Generierung von DNA-Strangbrüchen unter prooxidativen Bedingungen mittels einer 5 minütigen Koinkubation mit H₂O₂ untersucht.

Alle Schritte wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. $1,53 \times 10^5$ Hela S₃-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS in Zellkulturschalen (Ø 34 mm) ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Danach wurden die logarithmisch wachsenden Zellen 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, bzw. für 5 min mit 35 µM H₂O₂ koinkubiert. Hierauf wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (4 °C) gewaschen und eine alkalische Lösung (0,03 M NaOH, 0,02 M Na₂HPO₄, 0,9 M NaCl, pH 12,3) für 30 min zugegeben. Nach erfolgter Neutralisation mit 0,1 N HCl und einer Ultraschallbehandlung wurde die einzel- von der doppelsträngigen DNA durch Hydroxylapatitchromatographie bei 60 °C getrennt. Die einzelsträngige DNA wurde mittels 0,15 M Kaliumphosphatpuffer eluiert, die doppelsträngige DNA bei einer Konzentration von 0,35 M Kaliumphosphatpuffer. Der Fluoreszenzfarbstoff bis-Benzimid (Hoechst 33258) mit einer finalen Konzentration von $7,5 \times 10^{-8}$ M wurde zu jeder Probe gegeben und die Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 360 nM, Emissionswellenlänge 455 nM) mit Hilfe eines Photometers (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) ausgelesen. Aus den relativen Fluoreszenzen der einzel- und doppelsträngigen DNA kann mit folgenden Gleichungen die Anzahl der DNA-Schäden pro Zelle bzw. pro 10⁶ Basenpaare berechnet werden:

$$ds\ DNA = \frac{F(ds)}{F(ds) + 2,1 * F(es)} \quad (Gl. 2)$$

$$n(DNA - SB)_{zelle} = -\ln \frac{ds\ DNA(Probe\ mit\ H_2O_2)}{ds\ DNA(Mittelwert\ der\ Kontrolle\ ohne\ H_2O_2)} * 16666 \quad (Gl. 3)$$

$$n(DNA - SB)_{10^6Bp} = \frac{n(DNA - SB)_{zelle}}{6000} \quad (Gl. 4)$$

ds DNA:	Anteil der doppelsträngigen DNA [%]
F (ds):	relative Fluoreszenz der doppelsträngigen DNA
F (es):	relative Fluoreszenz der einzelsträngigen DNA
n (DNA-SB) _{Zelle} :	Anzahl der DNA-Strangbrüche pro Zelle [1/ Zelle]
n (DNA-SB) _{10⁶ BP} :	Anzahl der DNA-Strangbrüche pro 10 ⁶ Basenpaare [1/ 10 ⁶ Basenpaare]

Der Korrekturfaktor von 2,1 in Gleichung 2 ergibt sich aus der stärkeren Bindung des bis-Benzimidis (Hoechst 33258) an doppelsträngige DNA (Hartwig et al., 1993). Der Korrekturfaktor 16666 in Gleichung 3 errechnet sich aus dem Quotienten der Dosis in Gray und der Steigung der Kalibriergeraden und wurde mittels einer Kalibrierung mit Röntgenstrahlung ermittelt (Hartwig et al., 1996). Die errechnete Anzahl der DNA-Schäden pro Zelle kann auf 10⁶ Basenpaare bezogen angegeben werden, indem durch 6000 dividiert wird (Gleichung 4). Zum Ausschluss von Störungen wurden Partikelsuspension von 50 µg/ ml CuO NP oder CuO MP der Hydroxylapatitchromatographie unterzogen, die Eluate mit Hoechst 33258 versetzt und die Fluoreszenz detektiert.

4.2.8.2 Durchflusszytometrische Analyse von Mikrokernen

Mikrokerne entstehen u. a. durch klastogene oder aneugene Ereignisse (Fenech, 2007). Die durchflusszytometrische Analyse von Mikrokernen wurde im Jahre 2007 von Bryce und Mitarbeitern etabliert (Bryce et al., 2007). Im 1. Schritt bindet der nicht-membrangängige Farbstoff Ethidiummonoazid (EMA) kovalent an die DNA von Zellen mit beschädigter Zellmembran (nekrotisch oder apoptotisch). Die Permeabilisierung der Zellmembran intakter Zellen (intakt oder mikrokernhaltig) im 2. Schritt geht einher mit einer SYTOX Green Färbung. Apoptotische und nekrotische Zellen weisen nun eine Dopelfärbung (rot/grün) auf, während die DNA normaler und mikrokernhaltiger Zellen grün gefärbt sind. Diese Vorgehensweise erlaubt durch angepasstes Legen von Messbereichen die ausschließliche Analyse der mikrokernhaltigen Zellen.

3,1 × 10⁴ A549-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS in jede Kavität einer 24-Wellplatte ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Inkubation der logarithmisch wachsenden A549-Zellen mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂, für weitere 24 h sowie 10 J/ m² UVC (254 nm) als Positivkontrolle. Hiernach wurde die Platte für 20 min auf Eis äquilibriert, bevor das Inkubationsmedium entfernt wurde. Bei gedämpftem Licht wurden 300 µl eiskalte EMA-Färbelösung (8,5 µg/ ml EMA (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) in PBS/ 2% FKS) in jede Kavität pipettiert. Die folgende Bestrahlung (ohne Deckel, 30 min, 0 °C) mit einer Kaltlichthalogenlampe

(Abstand zu den Zellen: 15 cm) wurde von einem Waschschrift mit 1 ml eiskaltem PBS/ 2% FKS gefolgt. Die Zugabe von 500 µl Lyselösung I (58,4 mg/ 100 ml NaCl (10 M), 0,114 g/ 100 ml Natriumcitratdihydrat (0,442 mM), 30 µl/ 100 ml IGEPAL, 0,5 mg/ ml RNase (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), 0,4 µM SYTOX Green (Invitrogen)) in jede Kavität wurde gefolgt von einer Inkubation (1 h, im Dunklen, 37 °C). Hierauf wurden 500 µl Lyselösung II (8,56 g/ 100 ml Saccharose (25 mM), 1,5 g/ 100 ml Zitronensäure (7,81 mM), 0,4 µM SYTOX Green) in jede Kavität pipettiert und wiederum inkubiert (30 min, Dunkelheit, RT). SYTOX Green wurde jeweils direkt vor der Verwendung zugegeben. An dieser Stelle konnten die Platten bei Bedarf für einige Tage bei 20 °C gelagert werden. Vor der Messung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen resuspendiert, die Zellsuspension in ein Messröhrchen überführt und der durchflusszytometrischen Analyse am Partec PAS (Partec) unterzogen. 30000 Zellen pro Probe wurden analysiert unter Nutzung der Software FloMax.

Zum Ausschluss von Störungen wurden Partikelsuspensionen analog der oben beschriebenen Vorgehensweise in 24-Wellplatten behandelt und vermessen. Ebenso wurden Partikelsuspensionen in DMEM mit 10% FKS mit dem gewählten Programm am Durchflusszytometer vermessen um eine potenzielle partikelinhärente Wechselwirkung zu detektieren.

4.2.8.3 Detektion und Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen und besitzt eine wichtige Funktion in den prozessierenden Schritten der Basenexzisionsreparatur (BER) und den initialen Schritten der Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) (Krishnakumar and Kraus, 2010). Um das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in intakten HeLa-S3-Zellen zu ermitteln, wurde die Bildung von Poly(ADP-Ribose)polymeren, immunfluorimetrisch untersucht. Der hochspezifische monoklonale Antikörper gegen Poly(ADP-Ribose), 10H, wurde mit einem Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-gebundenen Sekundärantikörper gekoppelt und die Poly(ADP-Ribosyl)ierung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (siehe Kapitel 5.2.3.3).

$1,53 \times 10^5$ HeLa S3-Zellen wurden in 1,8 ml DMEM mit 10% FKS auf Deckgläsern (\varnothing 12 mm) in Zellkulturschalen (\varnothing 34 mm) ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der logarithmisch wachsenden Zellen mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ 24 h. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde durch eine 5-minütige Behandlung mit H₂O₂ (100 µM, 37 °C) induziert. Danach wurden die Deckgläschen aus den Zellkulturschalen entfernt, in PBS (4 °C) gewaschen und mit Trichloressigsäure (-20 °C, 10% (w/v), 15 min) fixiert. Daran schlossen sich drei sukzessive Waschschriffe mit 70%, 90% und 100% Ethanol (-20 °C, je 5 min) an. Die luftgetrockneten

Deckgläser wurden in PBS rehydratisiert und mit gereinigtem monoklonalem Antikörper 10H (Verdünnung 1:30 in PBS/ 5% Milchpulver, 30 min, 37 °C, Herstellung siehe 4.2.2) in einer feuchten Kammer inkubiert. Viermaliges Waschen der Deckgläser in PBS wurde gefolgt von einer Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Sekundäntikörper (Verdünnung 1:30 in PBS/ 5% Milchpulver, 30 min, 37 °C) in der feuchten Kammer. Zuletzt wurden die Deckgläser nach erneutem viermaligem Waschen in PBS auf Objektträger, präpariert mit VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories Inc.), aufgebracht und mit klarem Lack versiegelt. Die Fluoreszenzintensität wurde mithilfe des Zeiss Axio Imager.Z2, ausgestattet mit der Software ZEN 2011, evaluiert. Die Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung erfolgte über die Erfassung der kolokalisierten DAPI- und FITC-Fluoreszenz. Es wurden mindestens 50 Zellen pro Deckglas randomisiert ausgewählt und analysiert. Zur Ermittlung von Blindwerten der Kontrollen und der substanzbehandelten Zellen entfiel die Behandlung mit H₂O₂. Diese Kontrollen erlaubten die Quantifizierung der allein durch die Substanzen induzierte DNA-Strangbrüche und Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Diese Werte wurden ermittelt und dann von den Werten der mit H₂O₂ behandelten Proben abgezogen.

4.2.9 ZELLULÄRE AUFNAHME UND INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG (BIOVERFÜGBARKEIT)

Mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelte A549-Zellen wurden nach einer im Arbeitskreis etablierten Methode in die Zytosol- und Kernproteinfraktionen aufgetrennt (Schwerdtle and Hartwig, 2006). Anschließend wurde der Kupfergehalt mittels GF-AAS ermittelt.

Alle Schritte wurden auf Eis ausgeführt. 1×10^6 A549-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS in Zellkulturschalen (\varnothing 87 mm) ausgesät und für 1 d anwachsen gelassen. Daraufhin wurden die logarithmisch wachsenden A549-Zellen 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert. Hiernach wurden die Zellen trypsiniert, in eiskaltem PBS mit 5% FKS aufgenommen, zentrifugiert und vor der elektronischen Ermittlung von Zellzahl und Zellvolumen zweimal mit PBS gewaschen. 1×10^6 Zellen wurden abgenommen, zentrifugiert und mit 500 μ l Zellysepuffer (0,01 M HEPES pH 7,9, 0,01 M KCl, 0,0015 M MgCl₂, 0,3 M Saccharose, 0,0005 M Dithiothreitol (DTT), 0,0006 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,0065 mM Leupeptin) behandelt (15 min, auf Eis) bevor 25 μ l IGEPAL CA 630 (10% v/v, in Wasser) (# I3021, Fluka) zugegeben und die Mischung für 10 s gevortext wurde. Durch Zentrifugation (1500 g, 15 min, 4 °C) wurde die Proteinfraktion des Zytosols im Überstand erhalten. Das Kernpellet wurde zweimal mit Zellysepuffer gewaschen, bevor das Kernvolumen ermittelt und die Kernproteine durch Behandlung mit einem

Kernlysepuffer (0,01 M HEPES pH 7,9, 0,4 M KCl, 0,0015 M MgCl₂, 15 w% Glycerin, 0,0005 M DTT, 0,0006 M PMSF, 0,0065 mM Leupeptin) extrahiert wurden (30 min, 4 °C, Schütteln). Die abschließende Zentrifugation (10000 g, 30 min, 4 °C) ergab die Kernproteinfraktion im Überstand. Der Proteingehalt der jeweiligen Fraktion wurde mit der Methode nach Bradford ermittelt, indem ein kommerziell erworbenes Reagenz (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet wurde (Bradford 1976). Rinderserumalbumin (Merck KGaA) diente als Standard für die Erstellung der Kalibriergerade im Bereich von 0 µg/ ml bis 100 µg/ ml Protein. Das Eindampfen und Veraschen der Proben vor der ICP-MS Analyse (Gerät: ICP-MS 820 MS, Bruker Daltonics Inc., Billerica, USA) erfolgten wie in Kapitel 4.1.12 beschrieben. Die Bestimmungsgrenze betrug je nach Analyse 0,5 oder 5 µg/ l. Im Falle von Werten unterhalb der Bestimmungsgrenze wurde der halbe Wert der Bestimmungsgrenze verwendet, um Mittelwert und Standardabweichung zu berechnen. Die Wiederfindung wurde in der entsprechenden Matrix unter Verwendung von AAS-Standardelementlösungen ermittelt. Sie betrug 98% im Falle der Kernproteinfraktion und 102% im Falle der Zytosolproteinfraktion. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden regelmäßig auf ihren Kupfergehalt hin untersucht.

4.2.10 STATISTIK

Neben deskriptiver Statistik wurden die Daten mit dem Test nach Levene auf Varianz(in)homogenität analysiert. Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden durch einfaktorielle Analyse der Varianz (ANOVA) ermittelt. Im Falle der Varianzhomogenität wurde post-hoc Dunnett's T-Test, im Falle einer Varianzinhomogenität Dunnett's T3-Test verwendet. Die verwendete Software beinhaltete Valoo 2.4 (analytic-software, Leer, Deutschland), SPSS 19/20 (IBM, Armonk, USA) und Microsoft Excel 2007/2010 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

CuO NP und CuO MP wurden mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Kapitel 5.1 präsentiert. Anschließend wurden die zellkulturbasierten Methoden für die Untersuchungen mit Partikeln evaluiert, gegebenenfalls optimiert und der Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Zyto- und Genotoxizität sowie die Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung untersucht. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 5.2 dargestellt.

5.1 PARTIKELCHARAKTERISIERUNG

5.1.1 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM)

Form und Größe von Partikeln können die Bioverfügbarkeit beeinflussen, daher wurden beide Parameter am Rasterelektronenmikroskop bestimmt. Dazu wurden die Partikel in Wasser suspendiert, auf Siliziumwafer als Probenhalter aufgetragen und zur Erhöhung der Leitfähigkeit mit einer 2 nm dicken Platinschicht überzogen.

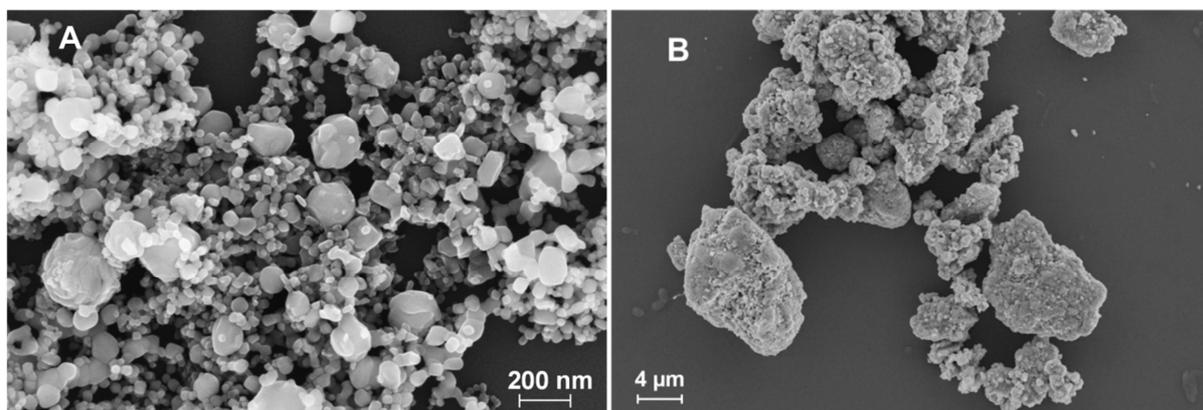


Abbildung 3: REM Aufnahmen der (A) CuO NP (Vergrößerung 150000 x) und (B) CuO MP (Vergrößerung 6500 x) bei 10 kV Beschleunigungsspannung.

CuO NP erwiesen sich als annähernd kugelförmig und mit glatter Oberfläche. Die Größenverteilung lag im Bereich von 20 nm bis etwa 200 nm (Abbildung 3 A sowie Anhang Kapitel 8.7.2.1). CuO MP waren unregelmäßig geformt und zeigten eine raue Oberfläche. Es wurden Partikelgrößen bis circa 10 µm Größe detektiert, wie auch Partikel, die der Nanodefinition (< 100 nm) nahe kamen (Abbildung 3 B sowie Anhang Kapitel 8.7.2.2).

Vom Hersteller wurde der Durchmesser der CuO NP mit $< 55 \text{ nm}$ und der der CuO MP mit $< 5 \text{ }\mu\text{m}$, ($\text{Ø} < 1,5 \text{ }\mu\text{m}$) angegeben. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten bestätigen im Wesentlichen diese Angaben. Die Erhebung einer repräsentativen Partikelgrößenverteilung unterblieb, da diese eine grafische Trennung der Partikelgrenzen voraussetzt, die in den vorliegenden Aufnahmen nicht gegeben war.

5.1.2 SPEZIFISCHE OBERFLÄCHE (BET)

Die spezifische Oberfläche wurde mit Hilfe der BET-Analyse ermittelt (Brunauer et al., 1938). Dabei adsorbiert Stickstoff bei tiefen Temperaturen (-196°C) an die vorgetrockneten Partikelproben. Bei einer anschließenden Druckverminderung desorbiert ein Teil des Gases wieder. In einem bestimmten Druckbereich ist die desorbierte Menge proportional zur Oberfläche des Probenmaterials.

Die spezifische Oberfläche von CuO NP betrug mit $17,23 \text{ m}^2/\text{g}$ das 23-fache der Oberfläche der CuO MP ($0,74 \text{ m}^2/\text{g}$). Daraus wurden unter Annahme monodisperser, sphärischer Partikel und der Dichte von CuO ($6,31 \text{ g}/\text{cm}^3$) mittlere Partikeldurchmesser von 55 nm für CuO NP bzw. $1,289 \text{ }\mu\text{m}$ für CuO MP errechnet.

Diese Werte stimmten mit den Herstellerangaben von $< 55 \text{ nm}$ (CuO NP) und $< 5 \text{ }\mu\text{m}$ ($\text{Ø} < 1,5 \text{ }\mu\text{m}$, CuO MP), wie auch den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie, gut überein.

5.1.3 PARAMETER ZUR MESSUNG DER DYNAMISCHEN LICHTSTREUUNG

Um den hydrodynamischen Radius und das Zetapotential der Partikel (siehe Kapitel 5.1.4) zu ermitteln, wurden Charakteristika des jeweiligen Suspensionsmittels wie Brechungsindex, Dielektrizitätskonstante, Dichte und Viskosität benötigt. Die Ermittlung erfolgte in der vorliegenden Arbeit erstmalig für das Zellkulturmedium DMEM ohne FKS sowie für DMEM mit 5% oder 10% FKS bei 20°C . Die Angaben für Wasser wurden einem Tabellenwerk entnommen (Haynes, 2011-2012).

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, erhöht sich die Viskosität in DMEM mit 10% FKS von $1,00 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ auf $1,15 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Der Brechungsindex und die Dichte blieben praktisch unbeeinflusst. Die Dielektrizitätskonstante nahm in DMEM ohne FKS und DMEM mit 5% oder 10% FKS im Vergleich mit $80,22$ für Wasser auf $77,59$ ab.

Die Berechnung des hydrodynamischen Radius der Partikel in einer Suspension erfolgt mit Hilfe der Stokes-Einstein-Relation, in die die Viskosität und der Brechungsindex des Suspensionsmittels

Tabelle 3: Brechungsindex, Dielektrizitätskonstante, Dichte und Viskosität von Wasser sowie DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% und DMEM mit 10% FKS bei 20 °C.

	Wasser [#]	DMEM ohne FKS	DMEM mit 5% FKS	DMEM mit 10% FKS
Brechungsindex	1,33	1,33	1,33	1,33
Dielektrizitätskonstante	80,22	77,95	78,12	77,59
Dichte [g/ cm ³]	0,99	1,00	1,01	1,00
Viskosität [mPas]	1,00	1,09	1,14	1,15

[#]: Haynes (2011-2012)

einfließen (Patty and Frisken, 2006). Die Verwendung der Viskosität von Wasser für eine Partikelsuspension mit DMEM mit 10% FKS würde bereits einen Fehler von 15% bewirken (Malvern, 2012).

Um das Zetapotential aus der elektrophoretischen Mobilität der Partikel abzuleiten, wurden Angaben zur Dielektrizitätskonstante und Viskosität des Mediums benötigt. Im vorliegenden Fall ist die Dielektrizitätskonstante von Wasser groß und der Einfluss der Additive des Zellkulturmediums darauf gering. Die Dichte des Lösungsmittels dient der Abschätzung der Agglomerations- und Sedimentationsneigung einer Suspension. Eine große Differenz zwischen der Suspensionsmittel- und der Partikeldichte begünstigt die Ausbildung einer Sedimentationsschicht. Die Dichte der Suspensionsmittel ($\rho_{LM} \approx 1 \text{ g/ cm}^3$) und die Dichte der Partikel ($\rho_{CuO} = 6,3 \text{ g/ cm}^3$) unterscheiden sich stark, daher ist eine Agglomeration oder Sedimentation wahrscheinlich.

5.1.4 HYDRODYNAMISCHE GRÖßENVERTEILUNG UND ZETAPOTENTIAL

Elektronenmikroskopische Verfahren, wie REM sowie die BET-Analyse eignen sich für die Untersuchung der Form und Größe von pulverförmigen Partikeln. Für toxikologische Untersuchungen ist der Nutzen jedoch begrenzt, da die Partikel in Zellkulturversuchen als Suspension appliziert werden.

Das Verhalten der CuO NP oder CuO MP in Suspension wurde daher mit Hilfe der DLS untersucht. Dazu wurden Partikelsuspensionen mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt. An den sich mit Brown'scher Molekularbewegung (Geschwindigkeit) bewegenden Partikeln wird das Licht gestreut, wodurch es zu Fluktuationen der Streuintensität kommt, die gemessen werden können.

Die Geschwindigkeit hängt von der Partikelgröße, der Viskosität sowie der Ionenstärke des Suspensionsmittels ab. Sie kann in einen Diffusionskoeffizienten abgeleitet werden, aus dem mit Hilfe der Stokes-Einstein-Relation der hydrodynamische Radius der Partikel berechnet wird. Nachteilig ist die eingeschränkte Eignung der Methode für heterogene (polydisperse) Suspensionen. Nach der Rayleigh-Approximation ist die Streuintensität proportional der 6. Potenz des Partikeldurchmessers. Demnach streut ein 100 nm Partikel das Licht 10^6 -fach stärker als ein 10 nm Partikel. Schon wenige große Partikel in einer Probe können das Ergebnis daher stark verfälschen.

Das Zetapotential ist ein allgemeines Maß, um die Stabilität einer Partikelsuspension zu prognostizieren. Nach der DVLO-Theorie kann die Stabilität einer Partikelsuspension aus der Summe aller attraktiven (z.B. Van-der-Waals-Kräfte, H-Brückenbindungen, kovalente Bindungen) und repulsiven (sterischen, elektrostatischen) Kräfte zwischen den Partikeln abgeschätzt werden (Derjaguin and Landau, 1941, Verwey, 1947). Eine Suspension gilt als stabil, wenn die repulsiven die attraktiven Kräfte überwiegen und das Zetapotential weniger als -30 mV oder mehr als +30 mV beträgt. Sie gilt als komplett instabil bei einem Zetapotential von 0 mV (Malvern, 2012). Unabhängig von einer anhand des Zetapotentials prognostizierten Suspensionsstabilität kann es aufgrund einer großen Dichtedifferenz von Suspensionsmittel und Partikeln zur Sedimentation kommen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden gerührte Partikelsuspensionen (24 h, 900 rpm, RT) der Konzentrationen 50, 100 und 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP untersucht. Mit Hilfe des Malvern Zetasizers NanoZS wurden der hydrodynamische Radius, der Polydispersitätsindex als Maß für die Homogenität einer Partikelsuspension und das Zetapotential von CuO NP bestimmt.

Im Gegensatz zu den CuO NP konnten CuO MP nicht zufriedenstellend untersucht werden. Die Partikel sedimentierten rasch; somit war keine adäquate Analyse möglich.

Zur Suspensionsherstellung wurden die zellkulturrelevanten Suspensionsmittel hochreines Wasser, DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS verwendet.

Wie in Tabelle 4 dargestellt, verringerte sich der hydrodynamische Radius von CuO NP in Wasser mit zunehmender Partikelkonzentration von im Mittel 488 nm (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf im Mittel 345 nm (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In DMEM ohne FKS stieg der hydrodynamische Radius von im Mittel 205 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf im Mittel 290 nm an (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Kein konzentrationsabhängiger Effekt zeigte sich in DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS mit gemessenen Werten von im Mittel 139 nm bis im Mittel 154 nm. Repräsentative Graphen der Partikelgrößenverteilung sind im Anhang (Kapitel 8.7.3) dargestellt.

Tabelle 4: Hydrodynamischer Radius von CuO NP in Wasser, DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS. Gezeigt sind Mittelwerte der Größenverteilung nach Anzahl aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zehn Bestimmungen und die Standardabweichung (SD). Die Partikelgrößenverteilung nach Intensität und Volumen sowie repräsentative Graphen können dem Anhang (siehe Kapitel 8.7.3) entnommen werden.

Hydrodynamischer Radius [nm] ± SD					
	Konzentration [µg/ ml]	Wasser	DMEM ohne FKS	DMEM mit 5% FKS	DMEM mit 10% FKS
	0	-	-		
CuO NP	50	488 ± 56	205 ± 12	148 ± 20	146 ± 6
	100	447 ± 126	250 ± 25	141 ± 19	144 ± 6
	150	345 ± 87	290 ± 65	154 ± 15	139 ± 12

Der Einfluss der Ionenstärke wurde durch einen Vergleich der Ergebnisse in Wasser und DMEM ohne FKS untersucht. Die Ionenstärke von reinem DMEM beträgt 166 mM (Toppazzini et al., 2011), während die Ionenstärke von Wasser vernachlässigbar gering ist. In DMEM ohne FKS wurden niedrigere hydrodynamische Radien als in Wasser ermittelt.

Der Einfluss eines FKS-Zusatzes wurde anhand der Ergebnisse in DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS betrachtet. Unter Zusatz von FKS konnte eine leichte Verringerung des hydrodynamischen Radius beobachtet werden.

Die Homogenität der Partikelsuspensionen wurde anhand des PDI beurteilt. Der PDI wird als dimensionslose Zahl zwischen 0 und 1 angegeben, wobei 0 eine monodisperse (alle Partikel sind gleich groß und sphärisch) und 1 eine polydisperse (die Partikel sind verschieden groß und/ oder unregelmäßig geformt) Partikelsuspension repräsentiert.

Wie in Tabelle 5 dargestellt, stieg die Homogenität der Partikelsuspension in DMEM mit 10% FKS mit zunehmender Partikelkonzentration an. Der Polydispersitätsindex sank von 0,47 auf 0,37. Kein konzentrationsabhängiger Effekt zeigte sich in Wasser, DMEM ohne FKS und DMEM mit 5% FKS.

Im Hinblick auf einen Einfluss der Ionenstärke waren die CuO NP in DMEM ohne FKS mit einem Polydispersitätsindex von rund 0,6 heterogener verteilt als in Wasser, wo ein Polydispersitätsindex von durchschnittlich 0,31 gemessen wurde.

Ein Zusatz von FKS verstärkte die Homogenität der Partikelsuspensionen in DMEM; die Polydispersitätsindexe betragen zwischen 0,31 und 0,47.

Wie Tabelle 6 zu entnehmen ist, erhöhte sich das Zetapotential in Wasser mit zunehmender Konzentration von -4,5 mV (50 µg/ ml) auf +20,9 mV (150 µg/ ml). Das Zetapotential von CuO NP in DMEM ohne bzw. mit 5% oder 10% FKS schwankte konzentrationsunabhängig um -13 mV (-11,2 mV

Tabelle 5: Polydispersitätsindex (Pdl) von CuO NP in Wasser, DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zehn Bestimmungen und die Standardabweichung (SD).

Polydispersitätsindex \pm SD					
	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Wasser	DMEM ohne FKS	DMEM mit 5% FKS	DMEM mit 10% FKS
CuO NP	50	$0,31 \pm 0,15$	$0,61 \pm 0,17$	$0,36 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,06$
	100	$0,25 \pm 0,15$	$0,58 \pm 0,22$	$0,32 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,04$
	150	$0,35 \pm 0,12$	$0,59 \pm 0,31$	$0,31 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,03$

Tabelle 6: Zetapotential von CuO NP in Wasser, DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit je drei Bestimmungen und die Standardabweichung (SD).

Zetapotential [mV] \pm SD					
	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Wasser	DMEM ohne FKS	DMEM mit 5% FKS	DMEM mit 10% FKS
CuO NP	0	-	$-15,4 \pm 5,6$	$-11,3 \pm 0,9$	$-12,4 \pm 0,6$
	50	$-4,5 \pm 1,1$	$-14,4 \pm 0,5$	$-16,1 \pm 2,9$	$-13,1 \pm 0,9$
	100	$+13,8 \pm 1,8$	$-11,2 \pm 1,6$	$-15,0 \pm 0,5$	$-13,3 \pm 0,9$
	150	$+20,9 \pm 2,9$	$-11,3 \pm 0,6$	$-14,8 \pm 0,3$	$-14,0 \pm 0,7$

bis $-16,1$ mV) und entsprach damit in etwa den Werten, die für partikelfreies DMEM ohne FKS bzw. für partikelfreies DMEM mit 5% oder 10% FKS ($-12,4$ mV bis $-15,4$ mV) ermittelt wurden.

Im Hinblick auf die Ionenstärke wurde ein stärkeres Zetapotential in partikelfreiem DMEM als in Wasser ermittelt. Die Zugabe von CuO NP zu Wasser erhöhte es, während eine Zugabe zu DMEM ohne FKS das Zetapotential praktisch unbeeinflusst ließ. Unabhängig vom FKS-Gehalt betrug das Zetapotential im Durchschnitt -13 mV ($-11,2$ mV bis $-16,2$ mV).

Neben der Suspensionsstabilität konnte anhand des Zetapotentials in Wasser auch die Ladung der Partikel beurteilt werden. Sie waren bei Konzentrationen > 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP positiv geladen. Bezüglich CuO NP zeigen die Ergebnisse deutliche Einflüsse der Suspensionsmittelzusammensetzung auf den hydrodynamischen Radius, das Zetapotential und den Polydispersitätsindex.

In Wasser, einem Medium mit vernachlässigbarer Ionenstärke, erreichte der hydrodynamische Radius von CuO NP die größten Werte (345 nm bis 488 nm). Der Vergleich mit den REM-Aufnahmen, die viele Primärpartikel ≤ 50 nm offenbarten, deutete daher auf eine Agglomeration

hin. Diese ist mangels sterischer oder elektrostatischer Abschirmung der Partikel durch Ionen oder Proteine und den dadurch vorherrschenden Einfluss attraktiver Van-der-Waals-Kräfte begünstigt (Jiang et al., 2009).

In DMEM ohne FKS lagen die CuO NP, mit Partikelgrößen zwischen 205 nm bis 290 nm, deutlich kleiner vor. Ein Grund für die geringere Größe der Agglomerate im Vergleich zu Wasser könnten die Additive des DMEM, wie Salze und Aminosäuren, sein. Diese sind in der Lage, um die Partikel herum eine repulsiv wirkende elektrochemische Doppelschicht auszubilden, welche die Teilchen voneinander trennt. Überraschenderweise zeigte eine zusätzliche sterische Abschirmung, wie sie nach Zusatz von FKS durch eine sogenannte Proteinkorona (Lynch and Dawson, 2008, Monopoli et al., 2012) postuliert wurde, praktisch keinen Effekt auf die Agglomeratgröße.

Es gibt zwei mögliche Ursachen. Erstens könnte eine Verfälschung des gemessenen hydrodynamischen Radien durch wenige große Partikel bedingt sein, da diese über eine höhere Streuintensität verfügen. Dieser Verdacht wurde durch die mit REM detektierten circa 200 nm großen Partikel erhärtet wurde. Eine zweite Ursache könnte die Löslichkeit der CuO NP sein. Nach 24 h in DMEM ohne FKS waren CuO NP zu 67% und in DMEM mit 10% FKS zu 44% gelöst (siehe Kapitel 4.1.12).

Die im Suspensionsmittel enthaltenen Komponenten beeinflussten auch das Zetapotential. Dies wurde anhand des unveränderten Zetapotentials der DMEM-Lösungen ohne bzw. mit 5% oder 10% FKS deutlich. Demgegenüber erhöhte sich das Zetapotential in Wasser von -4,5 mV auf +20 mV, was auf eine Suspensionsstabilisierung mit zunehmender Partikelkonzentration hinwies. Nichtsdestotrotz wurden alle untersuchten Partikelsuspensionen als instabil eingestuft, da in keinem Fall ein Zetapotential von < -30 mV oder $> +30$ mV ermittelt wurde.

Neben der Suspensionsstabilität konnte anhand des Zetapotentials auch die Ladung der Partikel beurteilt werden. In Zellkulturexperimenten waren kationische Partikel stärker zytotoxisch als anionische Partikel. Als Ursache wurde die starke elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran diskutiert (Goodman et al., 2004). Ist das Zetapotential einer Partikelprobe in Wasser bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes positiv, so sind die Partikel positiv geladen (Roebben et al., 2011). Von Chang et al. (2005) wurde der isoelektrische Punkt nadelförmiger CuO NP bei pH 10 ermittelt. Da die CuO NP in der vorliegenden Studie bei pH 7 ein positives Potenzial aufwiesen, handelt es sich um kationische Partikel.

Im Gegensatz zu den CuO NP konnten CuO MP nicht zufriedenstellend untersucht werden. Die Partikel sedimentierten rasch; somit war keine adäquate Analyse möglich. Der Polydispersitätsindex der CuO MP-Suspensionen betrug rund 0,8–1, was für eine sehr heterogene (polydisperse) Probe spricht. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der REM-Analyse bestätigte die

Heterogenität der CuO MP und somit deren mangelnde Eignung für die Ermittlung des hydrodynamischen Radius und des Zetapotentials mit dem Zetasizer Nano ZS.

5.1.5 KRISTALLINITÄT

Die Kristallinität der CuO NP und CuO MP wurde durch Röntgenbeugung (Laue-Verfahren) im TEM untersucht. Dazu wurde ein Aliquot einer wässrigen Partikelsuspension von CuO NP oder CuO MP auf ein Kupfernetz appliziert, getrocknet und Röntgenstrahlung ausgesetzt. Treten in den Beugungsaufnahmen punktmusterförmigen Reflexe auf, so entsprechen diese Interferenzmaxima und zeigen das Vorliegen eines kristallinen Festkörpers an.

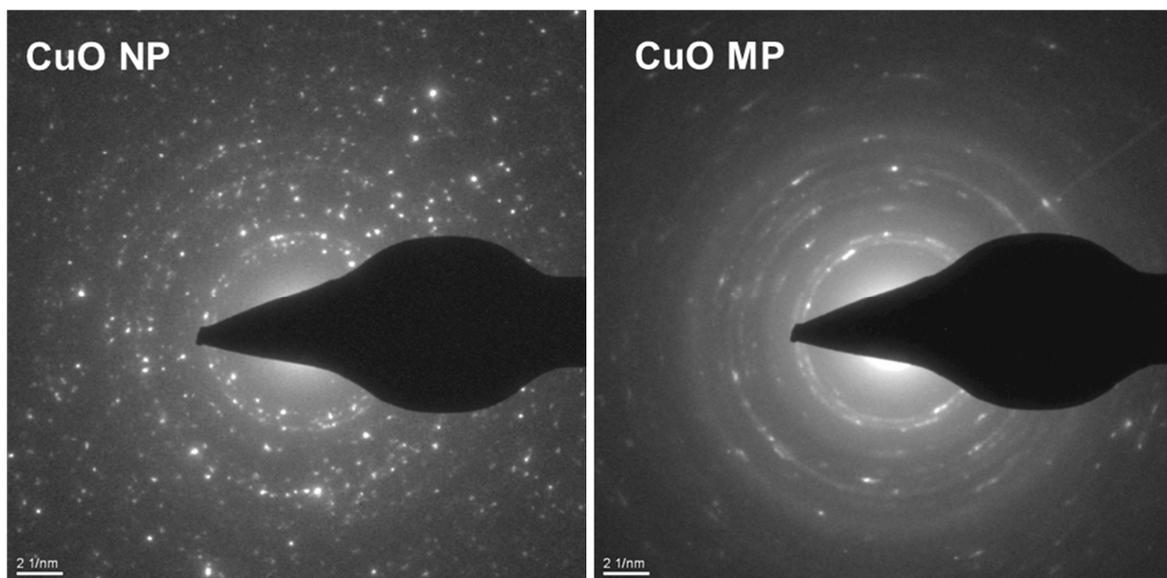


Abbildung 4: Laue-Diagramme von A) CuO NP und B) CuO MP.

Die Vielzahl der Reflexe in Abbildung 4 belegt, dass es sich sowohl bei CuO NP als auch CuO MP um kristalline Substanzen handelte.

5.1.6 ENERGIEDISPERSIVE RÖNTGENSPEKTROSKOPIE (EDS)

Die qualitative chemische Zusammensetzung von CuO NP und CuO MP wurde während der REM-Analyse mittels EDS ermittelt (REM-EDS). Das Prinzip beruht auf einer Anregung der Probe mit Elektronenstrahlen, auf die eine Emission elementspezifischer Röntgenstrahlung folgt, welche

detektiert wird. Im EDS-Spektrum wird die Signalintensität gegen die Energie der Röntgenquanten aufgetragen, anhand derer die Elementzuordnung erfolgt.

In den qualitativen EDS-Spektren der CuO NP und CuO MP (Abbildung 5) sind Signale von Cu, O, Pt, Si, Al und C sichtbar. Die Signale von Pt, Si, Al stammen aus der Probenpräparation. C ist ein geräteinhärentes Artefakt.

Die Abwesenheit von Fremdatomen spricht für eine hohe Reinheit der Partikel. Aufgrund der niedrigen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze ~0,1 Gew.%) (Cao et al., 2009) der Methode werden geringe Verunreinigungen jedoch nur teilweise detektiert. Daher wurden zur genaueren Untersuchung der chemischen Zusammensetzung und Reinheit der Partikel weitere Methoden verwendet (siehe Kapitel 5.1.7 und 5.1.8).

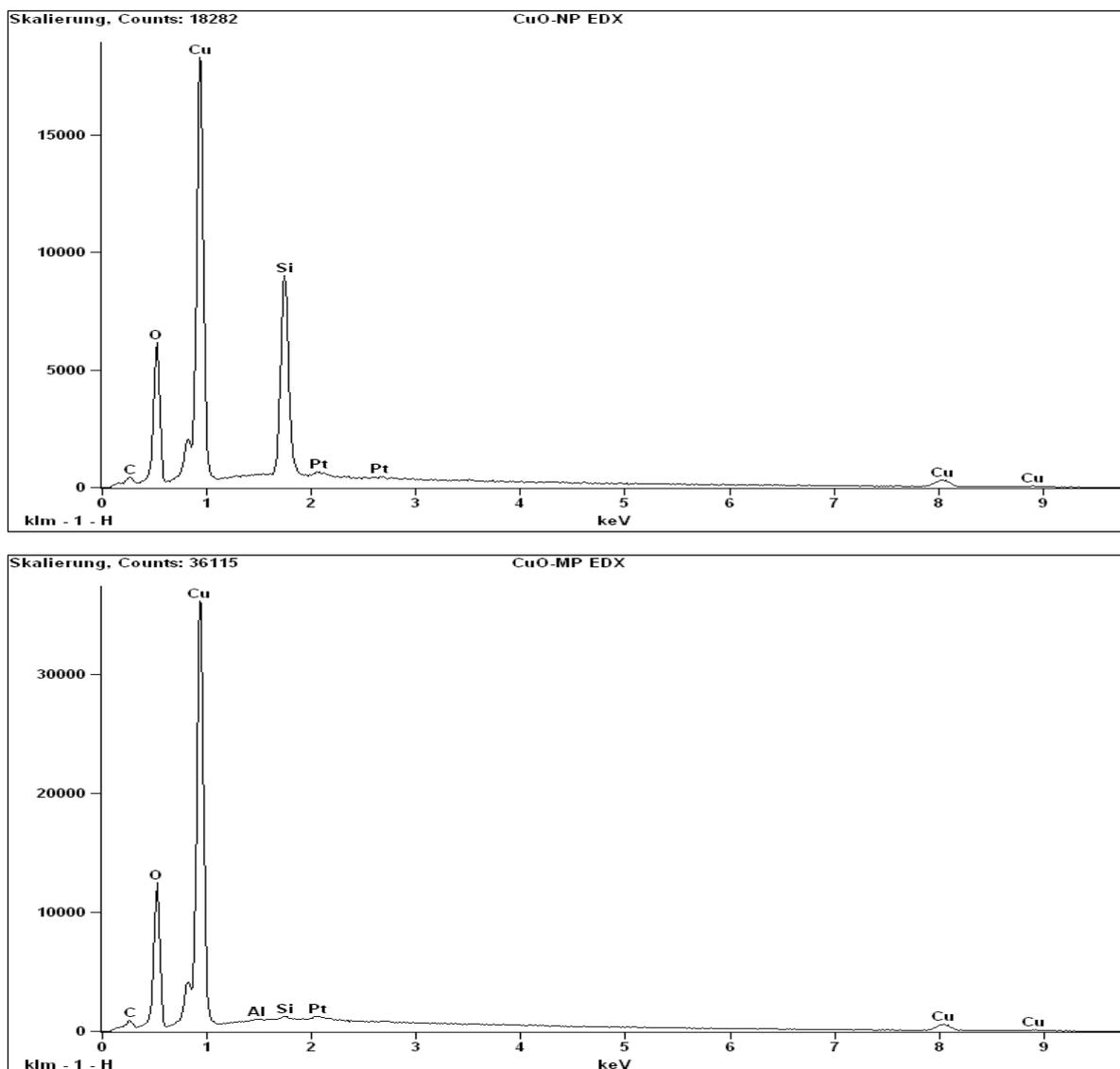


Abbildung 5: EDS-Spektren von CuO NP (oben) und CuO MP (unten). Die Peaks von Pt, Si und Al entstammen der Probenpräparation, bei C handelt es sich um ein geräteinhärentes Artefakt.

5.1.7 MASSENSPEKTROMETRIE MIT INDUKTIV GEKOPPELTEM PLASMA (ICP-MS)

ICP-MS ist ein Verfahren der Elementanalyse, bei dem mit hochfrequentem Strom die Probe ionisiert und nach Beschleunigung durch ein elektrisches Feld massenspektrometrisch auf die enthaltenen Elemente hin analysiert wird.

Die Untersuchung wässrig-saurer Lösungen der CuO NP und CuO MP ergab einen Gehalt an Fremdmetallen < 0,14 (CuO NP) bzw. < 0,11 (CuO MP) Gew.-% (Tabelle 7). Dies bestätigt die bereits mit EDS gezeigte hohe Reinheit der Partikel.

Tabelle 7: Elementanalyse der CuO NP und CuO MP mittels ICP-MS. Die Partikel wurden in konzentrierter H₂O₂/ HNO₃ gelöst und anschließend analysiert. Der Gehalt in ng/ ml bezieht sich auf den Gehalt in einer 50 µg/ ml Suspension von CuO. Abkürzung < BG: unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Element	CuO NP			CuO MP		
	[ppm]	[ng/ ml]	[µM]	[ppm]	[ng/ ml]	[µM]
Aluminium	115	4,59	0,17	83	3,32	0,12
Antimon		< BG		21	0,84	0,01
Arsen		< BG			< BG	
Barium		< BG			< BG	
Blei	201	8,03	0,04	259	10,34	0,05
Bor		< BG			< BG	
Chrom		< BG		28	1,12	0,02
Eisen	57	2,29	0,04	507	20,27	0,36
Kobalt		< BG			< BG	
Kupfer	1000000	39950	630	1000000	39950	630
Mangan	2	0,08	0,00	10	0,41	0,01
Quecksilber		< BG			< BG	
Silicium		< BG			< BG	
Titan		< BG.		1	0,05	0,00
Vanadium		< BG			< BG	
Zink	1182	47,24	0,72	386	15,41	0,24
Zinn	167	6,68	0,06	7	0,29	0,00
Gesamt	1724	68,91		1302	52,05	
Gew.-%		0,138			0,104	

5.1.8 TRÄGERGAS-HEIßEXTRAKTION ZUR ERMITTLUNG DES SAUERSTOFFGEHALTS

Um den Sauerstoffgehalt zu quantifizieren, wurden CuO NP oder CuO MP getrocknet und unter Inertgasatmosphäre in einem Graphittiegel geschmolzen. Der Sauerstoff der Probe reagierte mit dem Kohlenstoff des Tiegels zu CO oder CO₂. Die Quantifizierung erfolgte durch Infrarotdetektion.

Der ermittelte Sauerstoffgehalt von CuO NP bzw. CuO MP liegt mit $21,16 \pm 0,21\%$ bzw. $20,68 \pm 0,02\%$ leicht über dem theoretischen Gehalt von 20,11%. Der leichte Überbefund könnte durch eine Absorption von Wasser auf den Proben, die durch das Analyseverfahren miterfasst wird, erklärt werden.

Die Reinheit der CuO NP und CuO MP wurde anhand der vorliegenden Ergebnisse aus REM-EDS, ICP-MS und Trägergas-Heißextraktion zu $\geq 99,86\%$ bestimmt und übertrifft damit die Herstellerangaben von 98% für CuO MP. Beide Partikel sind somit für die anstehenden Zellkulturexperimente geeignet.

5.1.9 PH-WERT

Um zu ermitteln, ob eine Inkubation mit CuO NP und CuO MP den pH-Wert von Wasser und DMEM mit 10% FKS beeinflusst, wurden Suspensionen von 50 µg/ml CuO NP bzw. CuO MP sowie eine 630 µM Lösung von CuCl₂ mit Hilfe eines pH-Meters untersucht.

Es konnte kein Einfluss der CuO NP oder CuO MP auf den pH-Wert in hochreinem Wasser ermittelt werden, wohingegen CuCl₂ den pH-Wert um 1,5 Einheiten verringerte. Keine der Substanzen beeinflusste den pH-Wert von DMEM mit 10% FKS.

In DMEM mit 5% oder 10% FKS ist eine pH-Wert-Änderung nur durch stark basisch oder sauer reagierende Substanzen zu erwarten, da der enthaltene Carbonatpuffer Schwankungen im Bereich von pH 6,2 bis 8,6 ausgleichen kann. CuO NP und CuO MP ließen den pH-Wert von Wasser unverändert, da sie in Wasser annähernd unlöslich sind.

5.1.10 VERUNREINIGUNG MIT MIKROORGANISMEN

5.1.10.1 Schimmelpilz- und bakterielle Kontaminationen

Um die Beeinflussung der Zellkulturuntersuchungen durch eine Schimmelpilz- oder Bakterienkontamination der Partikel auszuschließen, wurden CuO NP oder CuO MP in DMEM mit 10% FKS ohne Penicillin-Streptomycin-Zusatz suspendiert und in Zellkulturflaschen für 14 Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle belegte, dass CuO NP und CuO MP frei von Schimmelpilzen oder Bakterienbefall waren. Der pH-Wert des Mediums blieb ebenso unverändert.

5.1.10.2 Endotoxine

Um eine Verunreinigung mit inflammatorisch wirksamen Bestandteilen gramnegativer Bakterien, z.B. Lipopolysacchariden (Endotoxine), auszuschließen, wurden Suspensionen von CuO NP und CuO MP mit endotoxinfreiem Wasser hergestellt, inkubiert und die Partikel vor der Analyse abzentrifugiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Kits „ToxinSensor™ Endotoxin Detection System“ nach Herstellerangaben der Firma Genscript.

Beide Substanzen erwiesen sich als frei von Endotoxinen und sind somit für die anstehenden Zellkulturversuche geeignet.

5.1.11 LÖSLICHKEIT

Zur Ermittlung der extrazellulär effektiv vorhandenen Kupferionenkonzentration wurde die Löslichkeit von CuO NP und CuO MP bestimmt. Als Suspensionsmittel wurden die zellkultur- und physiologisch relevanten Flüssigkeiten hochreines Wasser, PBS, AAF, ALF, DMEM ohne FKS und DMEM mit 10% FKS verwendet. Die Partikelsuspensionen ($c = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ CuO) wurden in Zeiträumen von 0,5 bis 168 h bei 37°C inkubiert. Die Löslichkeit in DMEM ohne FKS und DMEM mit 10% FKS wurde unter Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) bestimmt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Suspensionsmittelüberstände mehrfach zentrifugiert und die Partikelfreiheit der Überstände mit DLS geprüft. Die Löslichkeit des in den Zellkulturversuchen ebenfalls untersuchten löslichen CuCl₂ wurde mit 100% in allen Suspensionsmitteln kalkuliert.

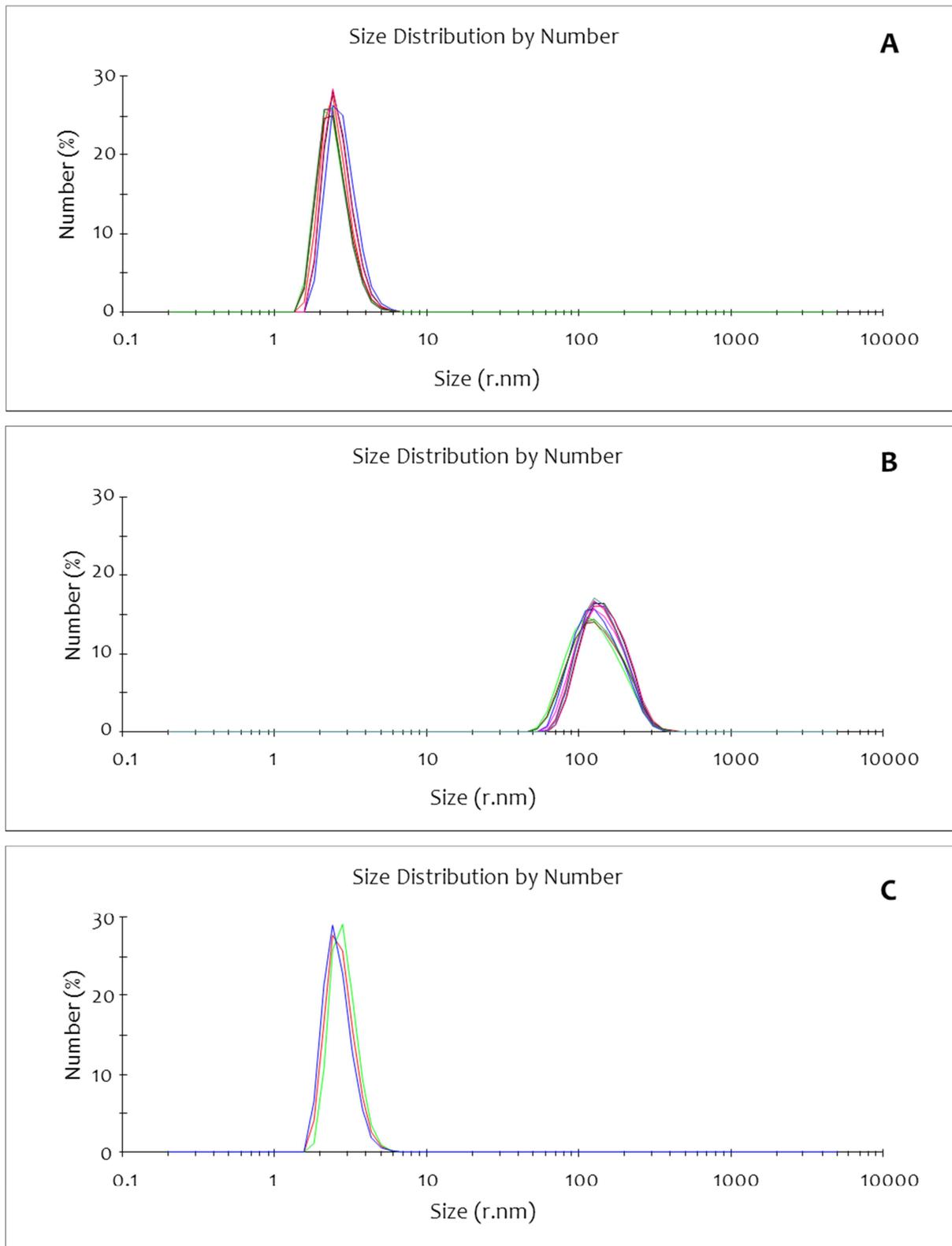


Abbildung 6: Evaluierung des hydrodynamischen Radius nach Zentrifugation. Die Partikelgrößenverteilungen von (A) DMEM mit 10% FKS, (B) 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS und (C) 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS nach Zentrifugation bei 3000 g, wurden mit DLS ermittelt. Dargestellt sind repräsentative Größenverteilungen aus mindestens drei Bestimmungen.

Wie in Abbildung 6 gezeigt, konnten die CuO NP vor der Metallgehaltsbestimmung erfolgreich von den Suspensionsmittelüberständen abgetrennt werden. In DMEM mit 10% FKS wurde mittels DLS ein Peak zwischen 1 nm und 7 nm ermittelt. Albumin ist eines der häufigsten Proteine in FKS und besitzt einen hydrodynamischen Radius von 3,3 nm bis 4,3 nm (Jachimaska et al., 2008) (Abbildung 6 A). Kontrollmessungen in DMEM ohne FKS bestätigen die Annahme, dass es sich um Bestandteile des FKS handelte (siehe Anhang Kapitel 8.7.3.3). Die Applikation einer Partikelsuspension von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS verschob den ermittelten hydrodynamischen Radius deutlich zu Werten zwischen 50 und 400 nm (Abbildung 6 B), wohingegen nach einmaliger Zentrifugation bei 3000 g wieder die ursprüngliche Partikelgrößenverteilung des DMEM mit 10% FKS beobachtet wurde (Abbildung 6 C). Da im Anschluss zwei weitere Zentrifugationsschritte erfolgten, war sichergestellt, dass nur das lösliche Kupfer bei der AAS-Messung erfasst wurde.

Die Kupfergehalte, die mit GF-AAS ermittelt wurden sind in den Abbildung 7-9 dargestellt. In den neutralen Lösungen hochreines Wasser, AAF (Abbildung 7) und PBS (siehe Anhang Kapitel 8.7.4) wurden nur geringe Mengen an Kupferionen freigesetzt. Die Löslichkeit betrug weniger als 2,4%.

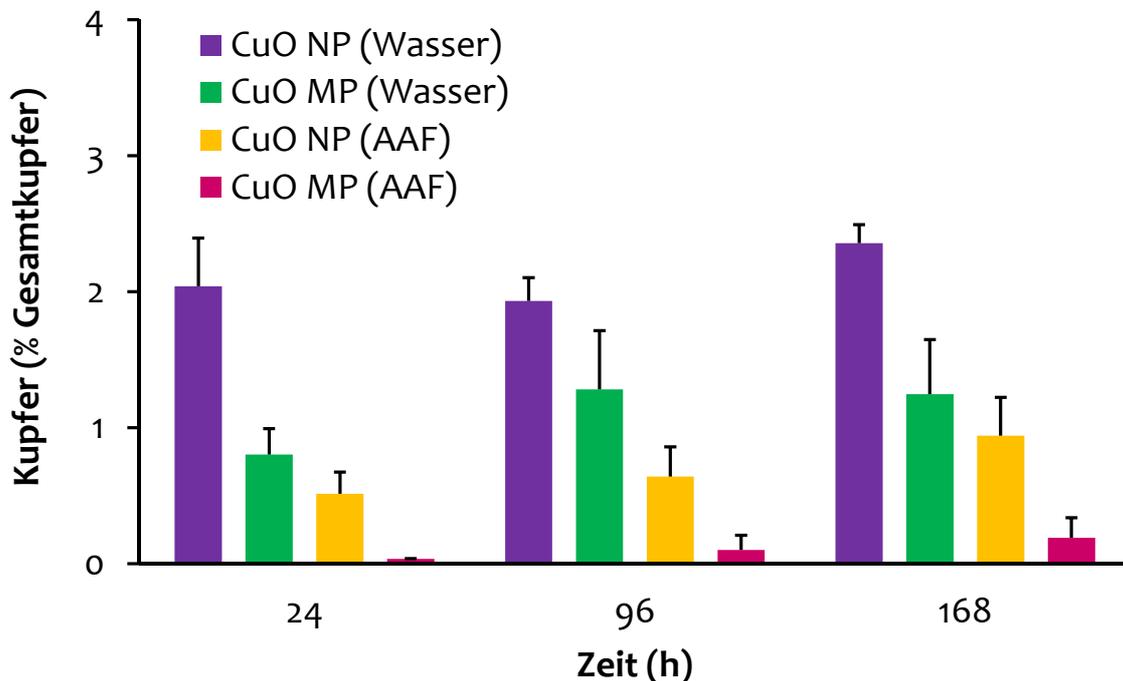


Abbildung 7: Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in hochreinem Wasser und AAF. CuO NP und CuO MP wurden in H₂O oder AAF 24, 96 oder 168 h bei 37°C bei 37°C, inkubiert, mehrfach zentrifugiert und der Kupfergehalt des Überstandes mit GF-AAS ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen + SD.

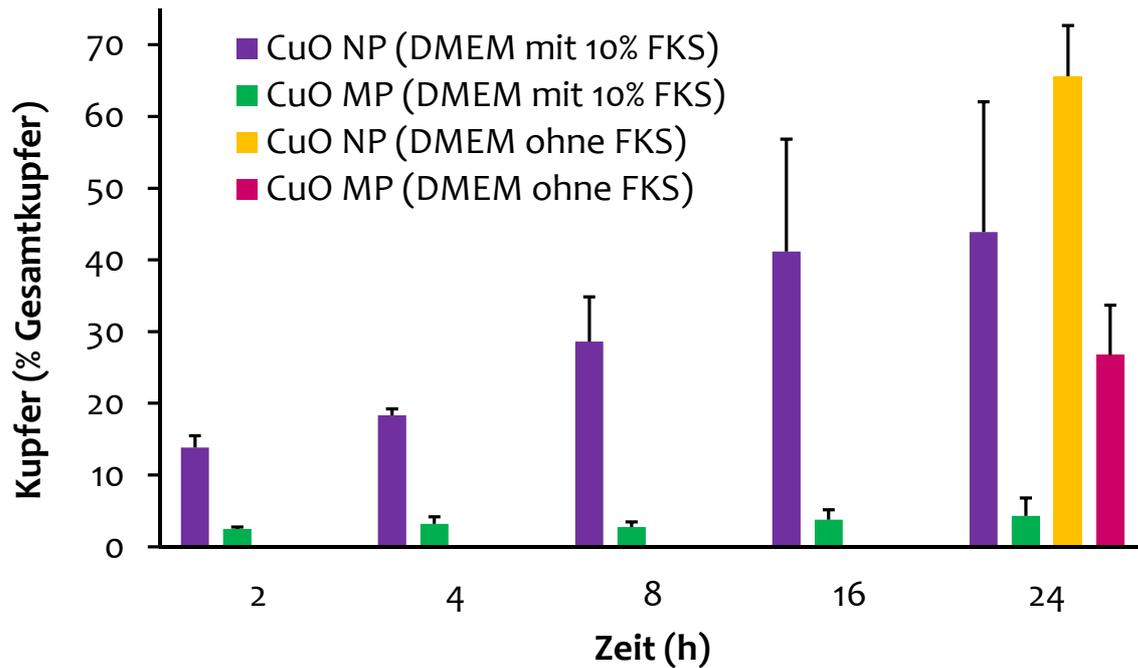


Abbildung 8: Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in DMEM ohne FKS und DMEM mit 10% FKS. CuO NP und CuO MP wurden in DMEM mit 10% FKS 2, 4, 8, 16 und 24 h und in DMEM ohne FKS 24 h unter Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert, mehrfach zentrifugiert und der Kupfergehalt des Überstandes mit GF-AAS ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen + SD.

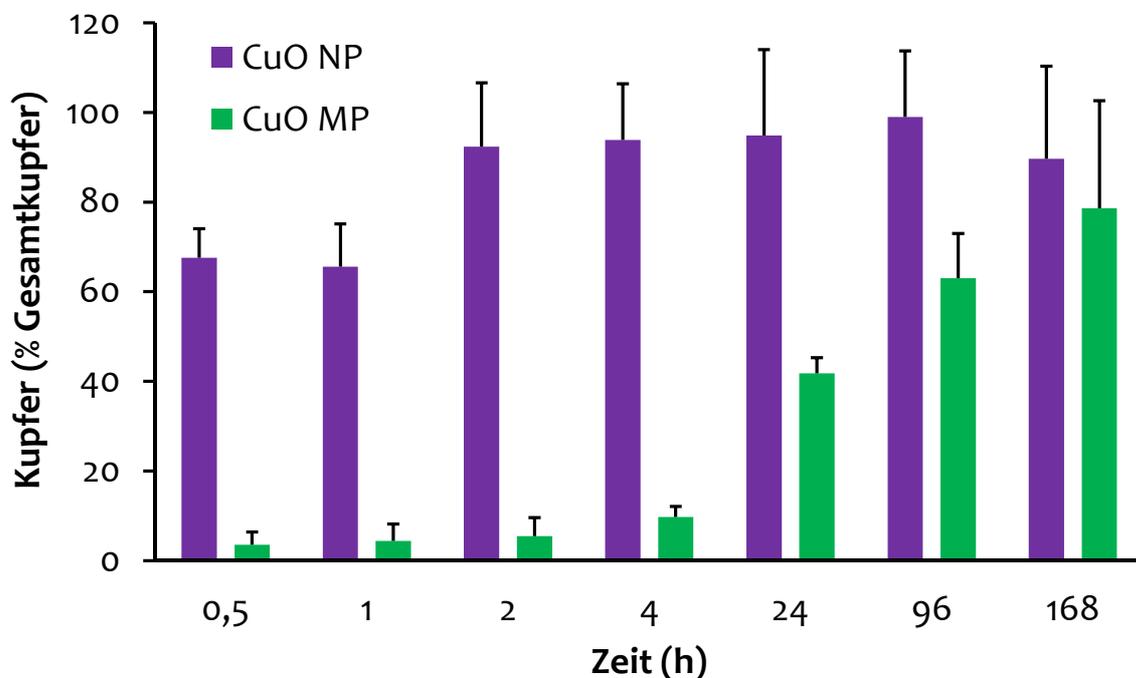


Abbildung 9: Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in ALF. CuO NP und CuO MP wurden in ALF 0,5, 1, 2, 4, 24, 96 und 168 h bei 37°C, inkubiert, mehrfach zentrifugiert und der Kupfergehalt des Überstandes mit GF-AAS ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen + SD.

Unter Zellkulturbedingungen lösten sich nach 24 h in DMEM ohne FKS 66% der CuO NP und 27% der CuO MP. In komplettem Zellkulturmedium mit Zusatz von FKS (DMEM mit 10% FKS) lösten sich CuO NP zeitabhängig. Nach 2 h waren 14% der CuO NP gelöst, nach 24 h 44%. Die Löslichkeit der CuO MP blieb über die Zeit stabil bei 4% (Abbildung 8).

Im sauren Milieu des ALF (Abbildung 9) lagen nach 30 min 68% und nach 2 h fast alle CuO NP gelöst vor. Im Gegensatz dazu hatten sich nach 2 h Inkubation lediglich 5% der CuO MP gelöst. 80% Löslichkeit zeigte sich nach 168 h (7 d).

Insgesamt belegen die Daten eine stärkere Löslichkeit von CuO NP im Vergleich zu CuO MP in allen untersuchten wässrigen Suspensionsmitteln. Die Ergebnisse zur Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in DMEM ohne FKS, in AAF sowie die zeitabhängigen Untersuchungen mit DMEM mit 10% FKS, Wasser und ALF sind neu und wurden in dieser Arbeit erstmals bestimmt.

Der Unterschied könnte mit den physikochemischen Eigenschaften der beiden Partikel zusammenhängen. Die Partikelgröße und damit auch die Oberfläche der CuO NP unterscheiden sich um das 23-fache von denen der CuO MP (siehe Kapitel 5.1.2). Infolgedessen stehen pro Masse erheblich mehr Atome an der Oberfläche von CuO NP für Reaktionen mit der Umgebung zur Verfügung, was die Reaktivität und somit die Löslichkeit erhöhen kann.

Sayes and Warheit (2009) erwähnten einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Dispersion von Partikeln in gepufferten Lösungen verglichen mit hochreinem Wasser sowie eine dadurch gesteigerte Löslichkeit. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse des geringeren hydrodynamischen Radius (siehe Kapitel 5.1.4) von CuO NP in DMEM ohne/ mit FKS weisen auf einen Zusammenhang mit der starken Löslichkeit der CuO NP in DMEM ohne bzw. mit 10% FKS hin. Die starke Agglomeration von CuO NP (siehe Kapitel 5.1.4) und die ermittelte geringe Löslichkeit in den neutralen wässrigen Lösungsmitteln H₂O, AAF und PBS deuten auf eine starke Hydrophobizität von CuO NP und CuO MP hin, die von Huang et al. (2006) für ellipsoide CuO NP nachgewiesen wurde. Im Falle des AAF könnte auch der Zusatz an Phosphatidylcholin die Löslichkeit noch herabgesetzt haben, da es aufgrund seiner Amphiphilität die positiv geladenen CuO NP (siehe Kapitel 5.1.4) gegen einen Suspensionsmittelangriff abschirmen könnte. Die geringe Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in AAF wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ermittelt. In PBS fanden Midander et al. (2009) nach 4 h bzw. 18 h Inkubation von CuO NP geringe Gehalte (< 5%) an freigesetzten Kupferionen. In Übereinstimmung mit den hier ermittelten Daten wurde in einer weiteren Studie eine bessere Löslichkeit von CuO NP in H₂O als in PBS festgestellt (Studer et al., 2010).

Im sauren Milieu des ALF (pH 4,5) zeigten sich CuO NP und CuO MP am stärksten löslich. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum bis zu 7 d untersucht. Eine Erklärung für die höhere Löslichkeit der CuO NP besteht in der erhöhten Reaktivität verglichen mit CuO MP. Eine

annähernd komplette Löslichkeit von CuO NP nach 24 h bzw. 72 h bei pH 5,5 wurde von Cho et al. (2012) bzw. Studer et al. (2010) festgestellt.

In Hinblick auf 24 h Inkubation in DMEM mit 10% FKS konnten die Daten frühere Studien bestätigen (Hanagata et al., 2011, Seiffert et al., 2011). Bezüglich CuO MP bestätigten die Daten Beobachtungen von Midander et al. (2009). Allerdings ermittelten die Autoren in derselben Studie bereits nach 4 h eine Löslichkeit von 32% der CuO NP, welche die in der vorliegenden Studie ermittelte Löslichkeit von 19% deutlich übersteigt. Diese Diskrepanz könnte mit der von Midander et al. (2009) durchgeführten Ultraschallbehandlung zusammenhängen, die die CuO NP möglicherweise reaktiver machte.

Die Löslichkeit in DMEM ohne FKS wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht. CuO NP lösten sich nach 24 h Inkubation 1,5-fach und CuO MP sogar rund sieben Mal stärker als in DMEM mit 10% FKS. Bekannt ist, dass der Zusatz von Serum oder Proteinen zum Aufbau einer sogenannten Proteinkorona um Partikel führen kann (Monopoli et al., 2012, Lynch and Dawson, 2008). Unter dieser Annahme könnten adsorbierte Proteine die Partikeloberfläche von DMEM abschirmen und die Löslichkeit in DMEM mit 10% FKS verringern.

Zusammengefasst konnte in den zeitabhängigen Untersuchungen zur Löslichkeit von CuO NP und CuO MP eine erhöhte Freisetzung von Kupferionen mit abnehmendem pH-Wert oder steigender Suspensionsmittelkomplexität beobachtet werden, die die Relevanz systematischer zeitabhängiger Löslichkeitsstudien für Toxizitätsstudien verdeutlicht. Eine bloße Abschätzung der Löslichkeit von CuO NP und CuO MP zu einzelnen Zeitpunkten hätte insbesondere im Falle des ALF und DMEM mit 10% FKS die charakteristischen Löslichkeitsunterschiede von CuO NP oder CuO MP unterschlagen.

5.2 ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN

In den Zellkulturuntersuchungen wurden die Einflüsse von CuO NP, CuO MP sowie löslichem CuCl_2 auf die Zyto- und Genotoxizität sowie die Bioverfügbarkeit und die intrazelluläre Verteilung der Kupferionen untersucht.

5.2.1 ZYTOTOXIZITÄT

Die Toxizität einer Substanz kann anhand der Zellviabilität, einem wichtigen Parameter zur Beurteilung von biologischen Effekten, abgeschätzt werden. Insbesondere für Untersuchungen

an (Nano)partikeln wird ein multianalytischer Ansatz empfohlen, um Artefakte durch Wechselwirkungen auszuschließen.

5.2.1.1 Einfluss auf die zelluläre Reduktion von WST-8

Ein häufig verwendeter Ansatz zur raschen Zytotoxizitätsbestimmung zahlreicher Proben ist die Verwendung von Tetrazoliumsalzderivaten, wie dem wasserlöslichen WST-8, das extrazellulär reduziert wird (Berridge et al., 2005). Dazu muss die mitochondriale Elektronentransportkette der Zelle intakt sein. Die Menge an gebildetem Reduktionsprodukt (Formazan) ist dabei proportional zur Anzahl lebensfähiger Zellen und kann über die Messung der Absorption bei 450 nm quantifiziert werden. Das kommerzielle Reagenz „Cell Counting Kit-8 (CCK-8)“ enthält WST-8.

Mögliche Störeinflüsse von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ mit der Absorptionswellenlänge des Formazans wurden durch die photometrische Messung von DMEM mit 10% FKS allein sowie mit steigenden Konzentrationen an CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ untersucht. Nur der Zusatz von CuO NP zu DMEM mit 10% FKS erhöhte die Absorption konzentrationsabhängig leicht von 0,16 (DMEM mit 10% FKS) auf 0,26 (50 µg/ml CuO NP). Dieser Effekt war, vermutlich aufgrund der starken Löslichkeit der CuO NP (siehe Kapitel 5.1.11), nach 24 h aufgehoben (siehe Anhang, Abbildung 47 bis 49).

Anschließend wurde untersucht, ob DMEM mit 10% FKS, CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ WST-8 bereits in Abwesenheit von Zellen reduzieren konnten. Dazu wurden entsprechende Suspensionen mit dem CCK-8 Reagenz für 1 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Keine der Kupferverbindungen reduzierte WST-8 in Abwesenheit von Zellen (siehe Anhang Kapitel 8.7.5.2, Abbildung 50 bis 52). Daher wurde die Methode zunächst, unter der Vorgabe Partikelsuspensionen ohne CCK-8 Zugabe als Blindwerte mitzuführen und in die Auswertung einzubeziehen, für die Zellkulturversuche in Betracht gezogen.

Daraufhin wurde die Viabilität von A549-Zellen nach 4 h und 24 h Inkubation mit den Kupferverbindungen ermittelt. Die Daten belegen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Lebensfähigkeit durch die drei kupferhaltigen Substanzen, beginnend bei der kleinsten Konzentration sowohl nach 4 h (Abbildung 53) als auch nach 24 h (Abbildung 54). Nach Inkubation mit CuCl₂ zeigte sich zu beiden Zeitpunkten der stärkste Effekt. Wie ein Vergleich der Abbildungen 53 und 54 zeigt, war die Zytotoxizität von CuO MP zeitabhängig nach 24 h stärker ausgeprägt, während der Effekt durch CuCl₂ und CuO NP zeitunabhängig war.

Die beobachtete Verringerung der Viabilität widersprach den Ergebnissen der zeitgleich durchgeführten Versuche zur Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit (siehe Kapitel 5.2.1.2). Es

bestand der Verdacht, dass Kupferionen in Anwesenheit von Zellen zu Artefakten mit der WST-8 Methode führten, da die beobachtete Zytotoxizität die Löslichkeit (siehe Kapitel 5.1.11) der drei Substanzen in DMEM mit 10% FKS widerspiegelte ($\text{CuCl}_2 > \text{CuO NP} > \text{CuO MP}$). Daher wurde der Einfluss von Kupferionen auf die Reduktion von WST-8 durch simultane Inkubation von A549-Zellen mit CuCl_2 und CCK-8 für 1 h untersucht. Die Daten zeigen bereits nach 1 h eine ähnlich stark ausgeprägte Zytotoxizität wie nach 4 h oder 24 h. Der Effekt startete bei $10 \mu\text{M}$ CuCl_2 (siehe Anhang, Abbildung 55).

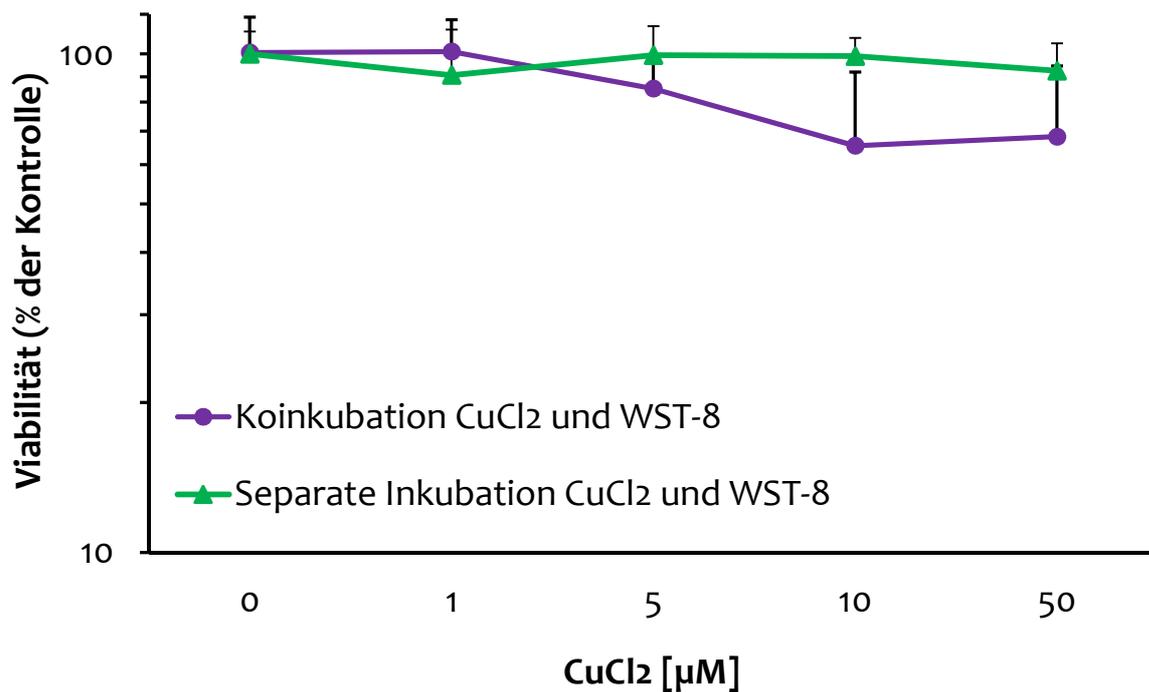


Abbildung 10: Einfluss von CuCl_2 auf die WST-8 Reduktion. A549-Zellen wurden entweder 1 h mit CuCl_2 und CCK-8 koinkubiert oder zuerst 1 h mit CuCl_2 und anschließend, nach Entfernung der Kupferlösung, 1 h mit CCK-8 inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen + SD.

Um nachzuweisen, dass CuCl_2 die Zellviabilität nach 1 h Inkubation unbeeinflusst ließ und die Zytotoxizität auf ein Artefakt zurückzuführen war, wurde die Inkubation mit der CuCl_2 -Lösung von der Inkubation mit CCK-8 separiert (Abbildung 10). Dadurch wurde der Effekt aufgehoben und zugleich nachgewiesen, dass Kupferionen zu einer Artefaktbildung mit der WST-8 Methode führen. Daher wurde die Methode von den Zytotoxizitätsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen.

5.2.1.2 Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit

Die Methode der Koloniebildungsfähigkeit basiert auf der Fähigkeit einer einzelnen Zelle, eine Kolonie zu bilden und wurde erstmals 1956 beschrieben (Puck et al., 1956). Sie erlaubt die simultane Erfassung akut toxischer Effekte anhand der Zellzahl sowie die Beurteilung von Langzeiteffekten auf die Teilungsfähigkeit nach Durchlaufen mehrerer Zellzyklen.

Im Gegensatz zu der kolorimetrischen Ermittlung der Zytotoxizität besteht ein Vorteil der Methode darin, dass auf Farbstoffe oder Enzymreagenzien verzichtet werden kann. Somit eignet sie sich besonders für die Untersuchung von Nanomaterialien.

Der Einfluss einer 24 h Inkubation mit CuO NP und CuO MP auf die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit von A549- und HeLa S3-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht.

Die Inkubation mit CuO NP oder CuCl₂ bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl. Sie war in A549-Zellen (Abbildung 11) geringer ausgeprägt als in HeLa S3-Zellen (Abbildung 12).

Ebenso zeigte sich eine stark ausgeprägte konzentrationsabhängige Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit in beiden Zelllinien (Abbildung 13 und Abbildung 14). Eine deutlich zytotoxische Wirkung mit einer Koloniezahl < 70%, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, wurde in A549-Zellen ab 5 µg/ml CuO NP bzw. 63 µM CuCl₂ und in HeLa S3-Zellen ab 20 µg/ml CuO NP bzw. 126 µM CuCl₂ beobachtet. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 50 µg/ml CuO NP nahm die Koloniezahl in beiden Zelllinien auf weniger als 10% der Kontrolle ab. Bei der höchsten untersuchten Konzentration an CuCl₂ (630 µM) sank die Koloniezahl in A549-Zellen auf 20% (A549) und in HeLa S3-Zellen auf 1% ab. CuO MP waren nicht-zytotoxisch.

Die Daten belegen eine stark ausgeprägte Zytotoxizität von CuO NP und CuCl₂ in A549 und HeLa S3-Zellen. Der deutliche Unterschied der Zytotoxizität der CuO NP im Vergleich zu einer identischen Massendosis CuO MP wurde in der Literatur wiederholt für verschiedene Zelllinien beschrieben (Karlsson et al., 2009, Berntsen et al., 2010, Midander et al., 2009). Als beeinflussende Faktoren wurden die größere Oberfläche und die daraus resultierende höhere Reaktivität der CuO NP, eine erhöhte Freisetzung reaktiver Kupferionen sowie Unterschiede in der Aufnahmerate und direkte Partikel-Zell-Kontakte diskutiert.

Bezüglich CuCl₂ widersprachen die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse denen von Karlsson et al. (2008). Während CuO NP und CuCl₂ die Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen ähnlich stark beeinträchtigen, beobachteten Karlsson et al. (2008) eine achtfach stärkere Zytotoxizität einer vergleichbaren Massendosis von CuO NP im Vergleich zu CuCl₂. Allerdings verwendeten die

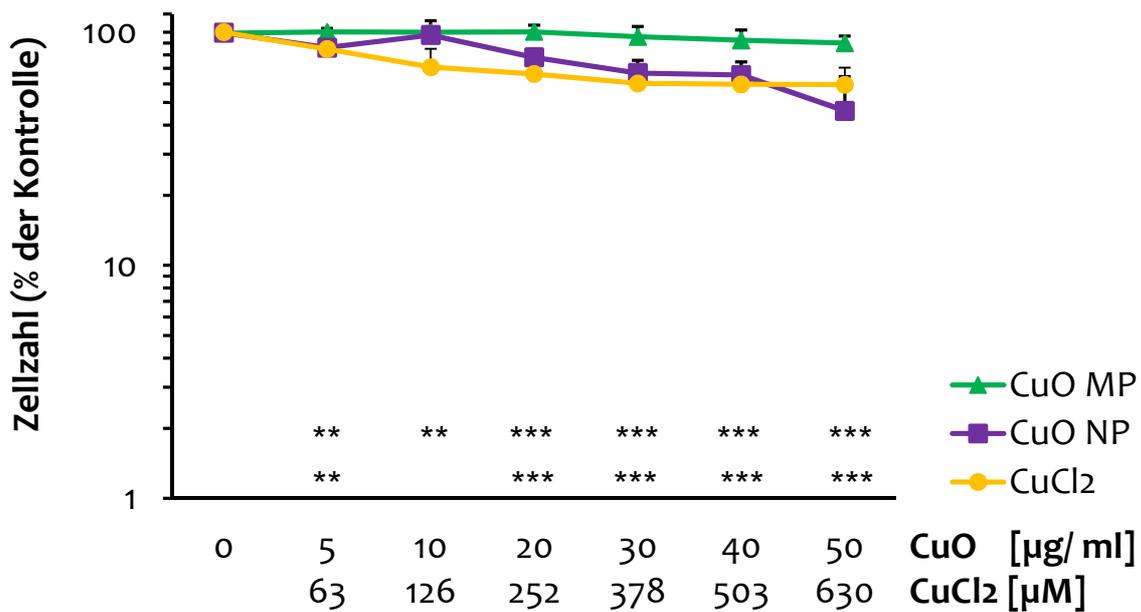


Abbildung 11: Einfluss auf die Zellzahl. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, trypsiniert und gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens neun Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (ANOVA/ Dunnett T3). 50 µg/ml CuO entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

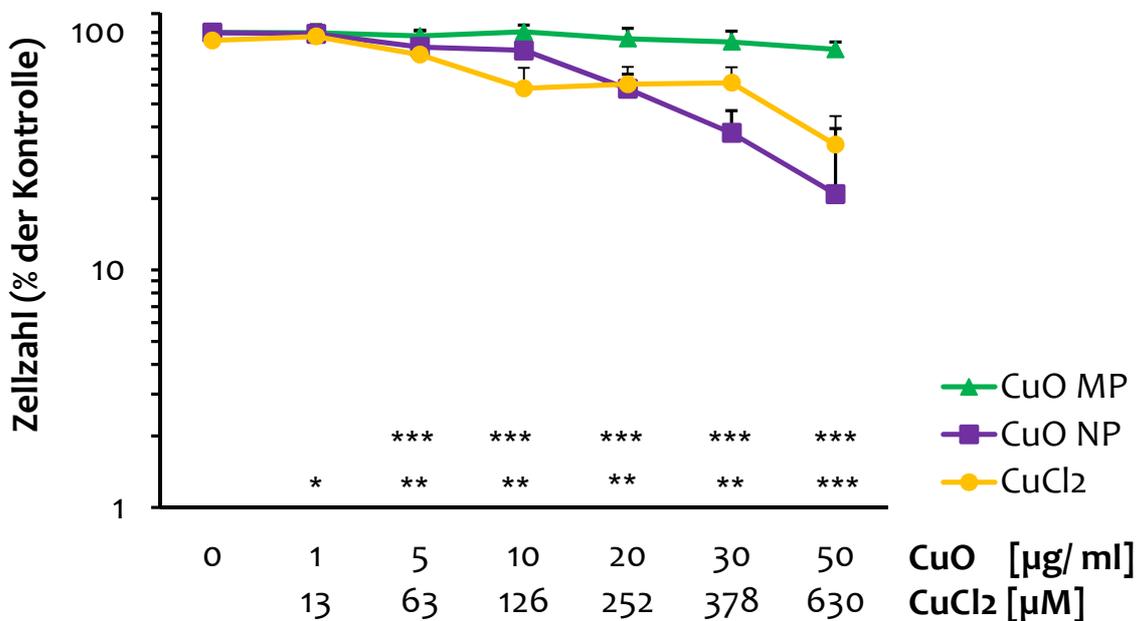


Abbildung 12: Einfluss auf die Zellzahl. HeLa S3-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, trypsiniert und gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens neun Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (ANOVA/ Dunnett T3). 50 µg/ml CuO entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

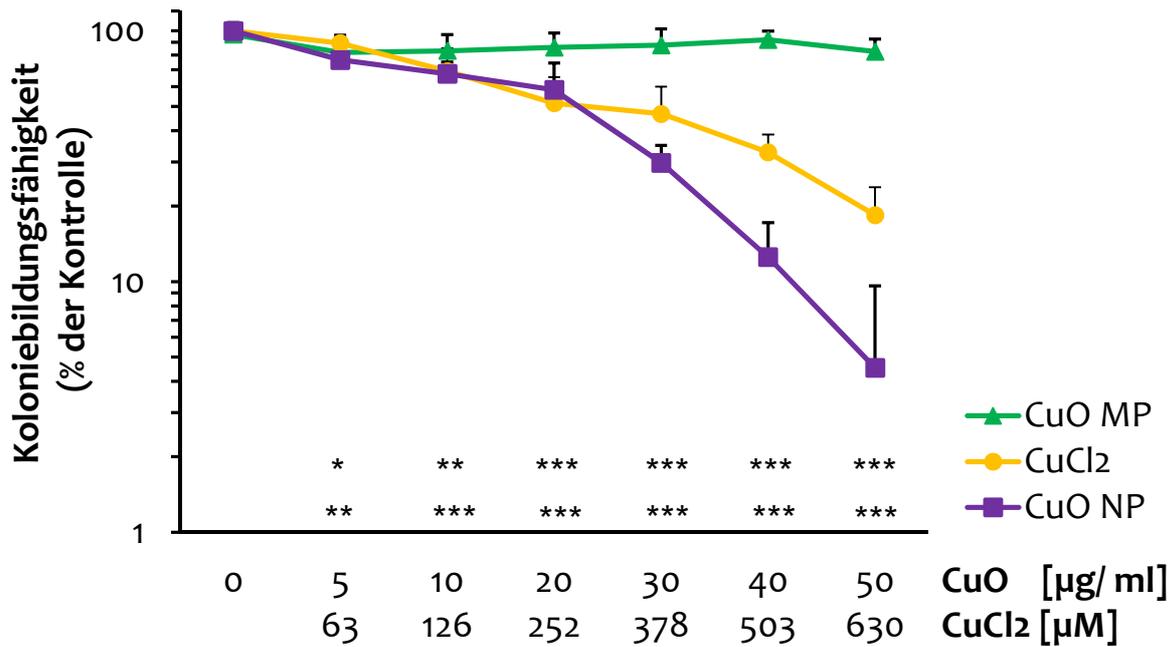


Abbildung 13: Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, trypsiniert, gezählt und erneut ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens neun Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (ANOVA/ Dunnett T3). 50 µg/ml CuO entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

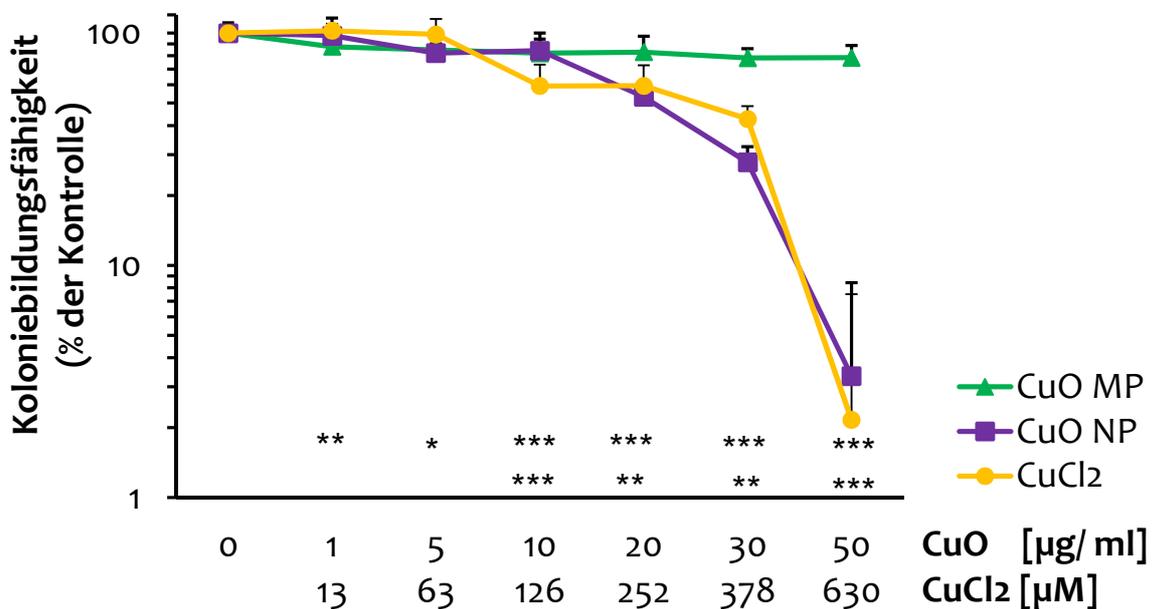


Abbildung 14: Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit. HeLa S3-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, trypsiniert, gezählt und erneut ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens neun Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (ANOVA/ Dunnett T3). 50 µg/ml CuO entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

Autoren mit dem Trypanblautest eine Methode, die bereits mit fehlerhaften Ergebnissen in Bezug auf metallbasierte Partikel in Zusammenhang gebracht wurde (Berntsen et al., 2010).

5.2.2 APOPTOSE

Um zu ermitteln, ob die beobachtete Zytotoxizität durch Apoptose bedingt ist, wurden drei Parameter in A549-Zellen untersucht. Dabei handelte es sich um die Translokation des AIF in den Zellkern (Kapitel 5.2.2.1), den Einfluss der Kupferverbindungen auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 (Kapitel 5.2.2.2) sowie die Zunahme von Zellen mit subdiploider DNA, die durchflusszytometrisch über die Zellzyklusverteilung als sogenannter SubG1-Peak detektiert wurde (Kapitel 5.2.2.3).

5.2.2.1 Einfluss auf die Kernlokalisierung von AIF

Das in der inneren mitochondrialen Membran verankerte Protein AIF kann, ausgelöst durch bestimmte apoptotische Stimuli, aus der Membran gelöst und über das Zytosol in den Zellkern transloziert werden. Dort trägt es als Endonuklease in großem Maßstab zur DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation bei (Norberg et al., 2010).

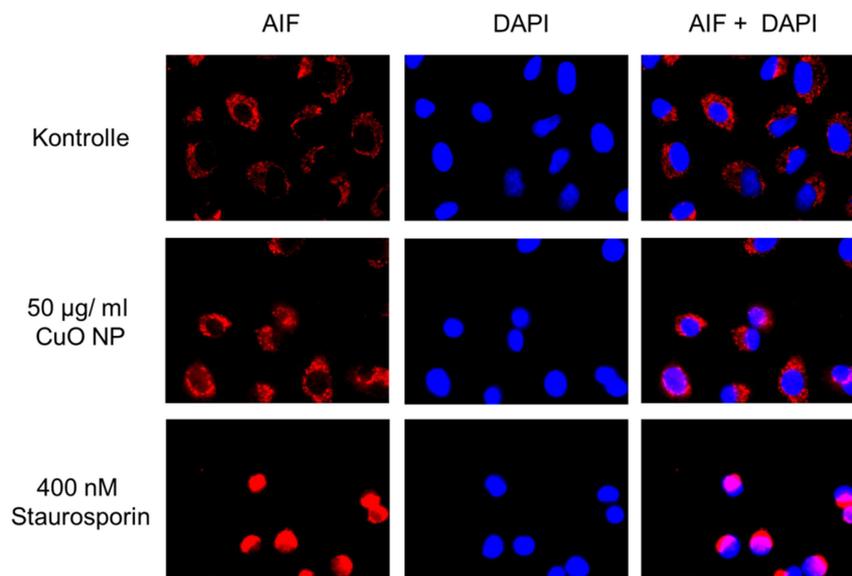


Abbildung 15: AIF-Fluoreszenz in unbehandelten Kontrollzellen (Zeile 1) sowie in Zellen die mit 50 µg/ ml CuO NP (Zeile 2) oder 400 nM Staurosporin (Zeile 3) behandelt wurden nach 24 h Inkubation.

Um die Translokation von AIF in A549-Zellen nach 4 h, 8 h, 16 h und 24 h Inkubation mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ zu ermitteln, wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper appliziert und am Fluoreszenzmikroskop detektiert (Abbildung 15).

Die Technik der Mikroskop-basierten Immunfluoreszenz bietet sich für die hier erstmals mit CuO NP und CuO MP durchgeführten Untersuchungen an, da diese selbst keine Fluoreszenz aufweisen. Eine potenzielle Absorption der Antikörper an Partikel und somit folgende Schwächung der Färbung wurde als vernachlässigbar angesehen, da vor der Applikation zahlreiche Waschschrte erfolgten, überschüssige Proteinbindungsstellen geblockt und die Antikörper im Überschuss eingesetzt wurden.

Nach 8 h, 16 h bzw. 24 h Inkubation mit CuO NP wurde ein geringer konzentrationsabhängiger Anstieg der AIF-Translokation in den Zellkern beobachtet, der bei 40 µg/ ml CuO NP in einer 1,29-, 1,33- bzw. 1,52-fachen Erhöhung, verglichen mit Kontrollzellen, resultierte. Im Vergleich dazu verursachten CuO MP und CuCl₂ zu allen untersuchten Zeitpunkten keinen Anstieg der Fluoreszenz. Die Ergebnisse nach 24 h Inkubation sind in Abbildung 16 dargestellt, die Ergebnisse

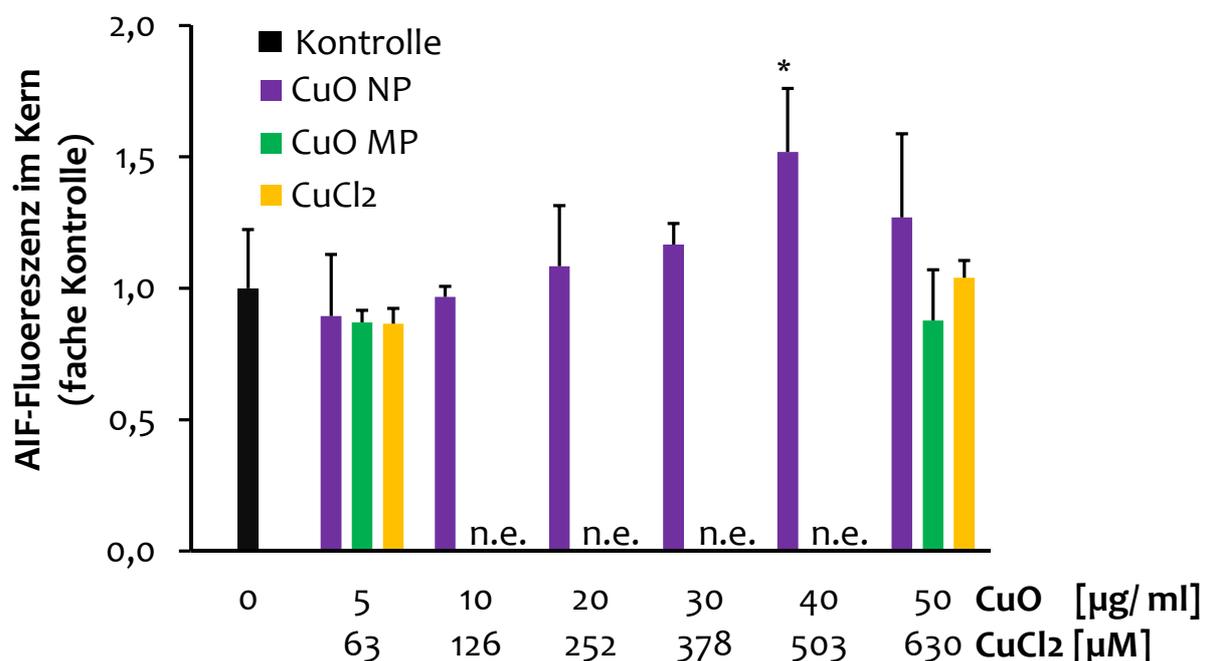


Abbildung 16: Einfluss auf die AIF-Lokalisation. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, mit einem gegen AIF gerichteten Antikörper behandelt und die AIF-Fluoreszenz im Zellkern am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte die 2,17 ± 0,16-fache AIF-Translokation im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (≥ 50 Zellen pro Experiment) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0,05 (ANOVA Dunnett T bzw. Dunnett T₃). 50 µg/ ml CuO entsprechen 10 µg/ cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e.: nicht ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungen nach 4 h, 8 h und 16 h sind im Anhang Kapitel 8.7.6.1 dargestellt.

nach 4 h, 8 h und 16 h sind im Anhang dargestellt (Kapitel 8.7.6.1). Die Positivkontrolle Staurosporin erhöhte die Fluoreszenz um das 1,64- (4 h), 2,21- (8 h), 2,33- (16 h) und 2,17-fache (24 h) der Kontrolle.

5.2.2.2 Einfluss auf die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7

Die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 führen während der Apoptose den Großteil der Proteolyse aus. Ihre Aktivierung erfolgt entweder über einen extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Signalweg oder intrinsisch nach Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien.

Um die Caspase-Aktivität nach 24 h Inkubation von A549-Zellen mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem Aminoluciferinderivat, einem Substrat der Caspasen 3 und 7, inkubiert. Nach dem Schneiden des Substrates wird Aminoluciferin, ein Substrat der Luciferase, deren Lumineszenz detektiert wird, freigesetzt.

Zunächst wurde die Eignung der Methode für die Untersuchung mit Partikeln evaluiert. Da die Partikel selbst nicht lumineszierten, wurde eine mögliche Störung durch Reaktion mit den

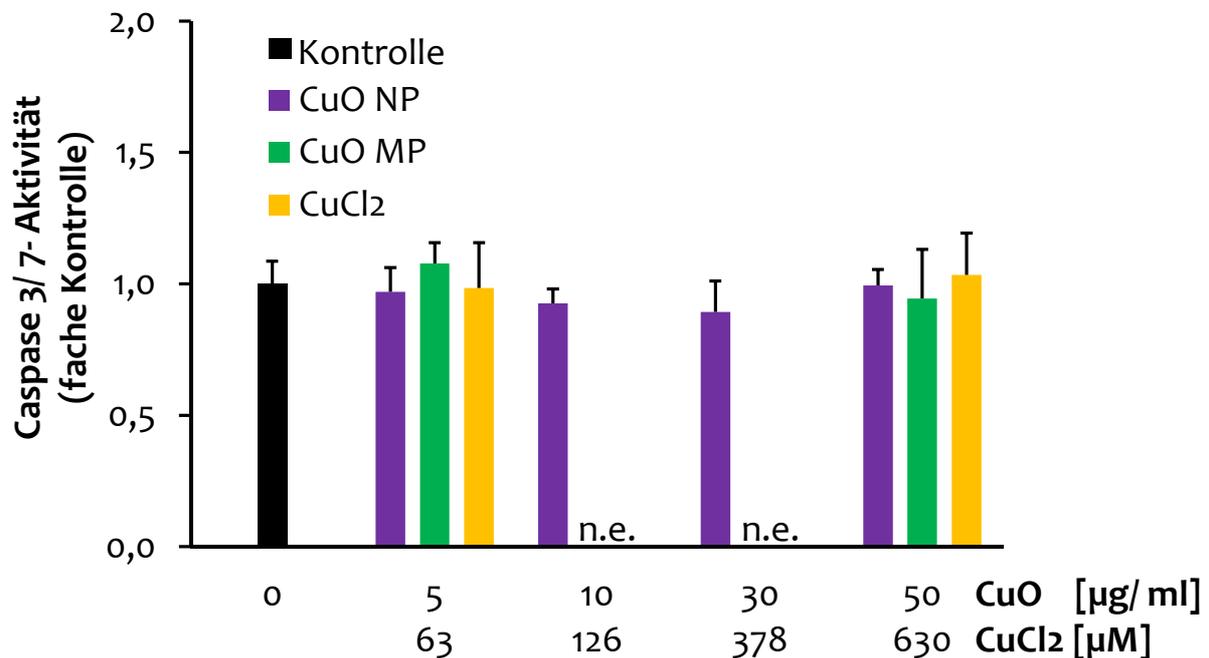


Abbildung 17: Einfluss auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ vorinkubiert und anschließend mit einem Substrat der Caspasen 3 und 7 versetzt. Die Caspase-Aktivität wurde anhand der resultierenden Lumineszenz quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden 400 nM Staurosporin verwendet, es bewirkte die $8,67 \pm 3,01$ -fache Erhöhung der Caspase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten + SD. 50 µg/ml CuO entsprechen $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CuO und $630 \mu\text{M}$ Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e.: nicht ermittelt.

Reagenzien untersucht. Dazu wurden DMEM mit 10% FKS sowie Partikelsuspensionen von CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ mit den Reagenzien versetzt und die Lumineszenz detektiert. Im Vergleich mit der Kontrolle zeigte sich mit allen drei Verbindungen eine Abnahme der Lumineszenz, die durch CuO NP mit 8,3% am stärksten ausgeprägt war (siehe Anhang Abbildung 61). Zur Vermeidung von Artefakten wurden daher Blindwerte für jede Partikel-/Metallkonzentration bei den Experimenten mitgeführt und in die Auswertung einbezogen.

Wie Abbildung 17 zu entnehmen ist, ließen 24 h Inkubation mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in A549-Zellen unbeeinflusst. Die Positivkontrolle 400 nM Staurosporin erhöhte die Aktivität auf das 8,67-fache der Kontrolle.

5.2.2.3 Einfluss auf den SubG1-Peak

Als Parameter der späten Apoptose wurde die Entstehung eines SubG1-Peaks untersucht. Die Fragmentierung der DNA ist ein Kennzeichen der späten Apoptose. Zellen mit fragmentierter DNA (SubG1-Peak) erscheinen im Histogramm, das Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen darstellt, vor dem Peak der G₁-Phase. Dieser Bereich ist in Abbildung 18 mit einer geschweiften Klammer markiert.

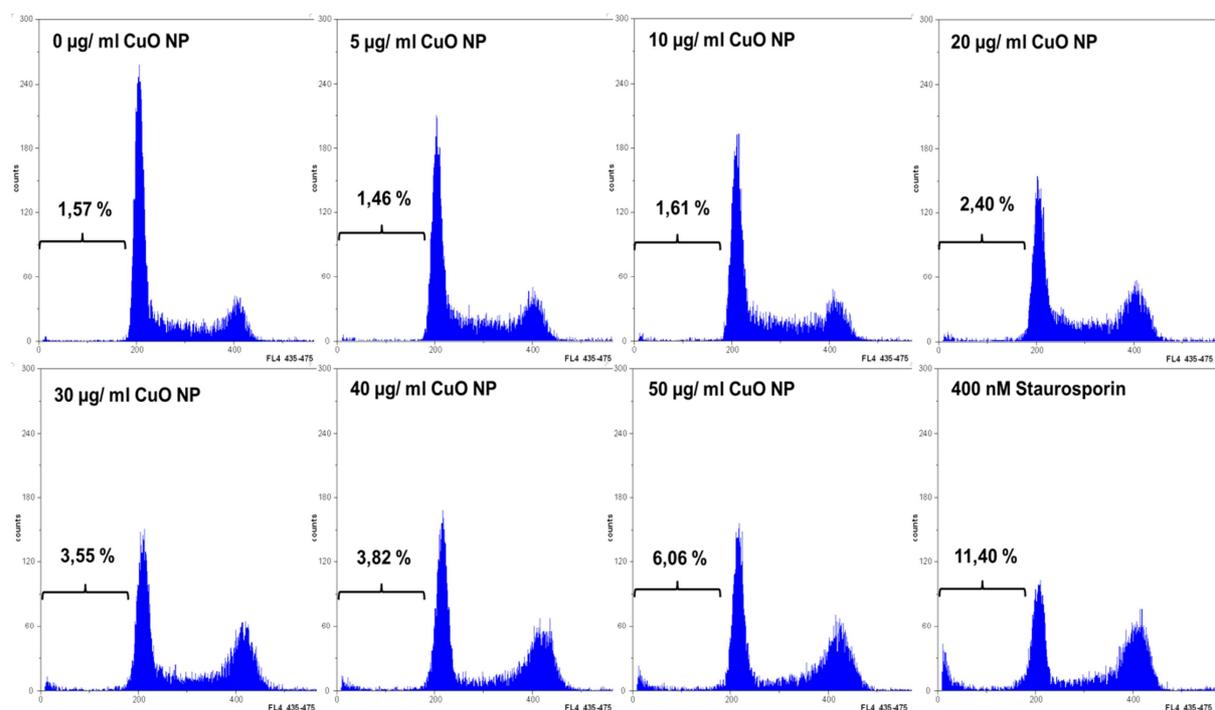


Abbildung 18: Prozentualer Anteil von A549-Zellen mit fragmentierter DNA (SubG₁-Peak) nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an CuO NP sowie 400 nM Staurosporin. Dargestellt sind repräsentative Histogramme nach 24 h Inkubation. Die geschweiften Klammer markiert den Bereich der Zellen mit fragmentierter DNA (SubG₁-Peak). Darüber ist der prozentuale Anteil von Zellen angegeben.

A549-Zellen wurden nach 4, 8, 16 oder 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ und als Positivkontrolle mit 400 nM Staurosporin inkubiert, fixiert und die DNA mit DAPI angefärbt. In Voruntersuchungen wurden Partikelsuspensionen in DMEM mit 10% FKS und unter Versuchsbedingungen behandelte Partikelsuspensionen mit dem Messprogramm analysiert. Unter diesen Bedingungen wurden praktisch keine Ereignisse im Kanal der DAPI-Fluoreszenz detektiert und die Methode für geeignet befunden (siehe Anhang Kapitel 8.7.6).

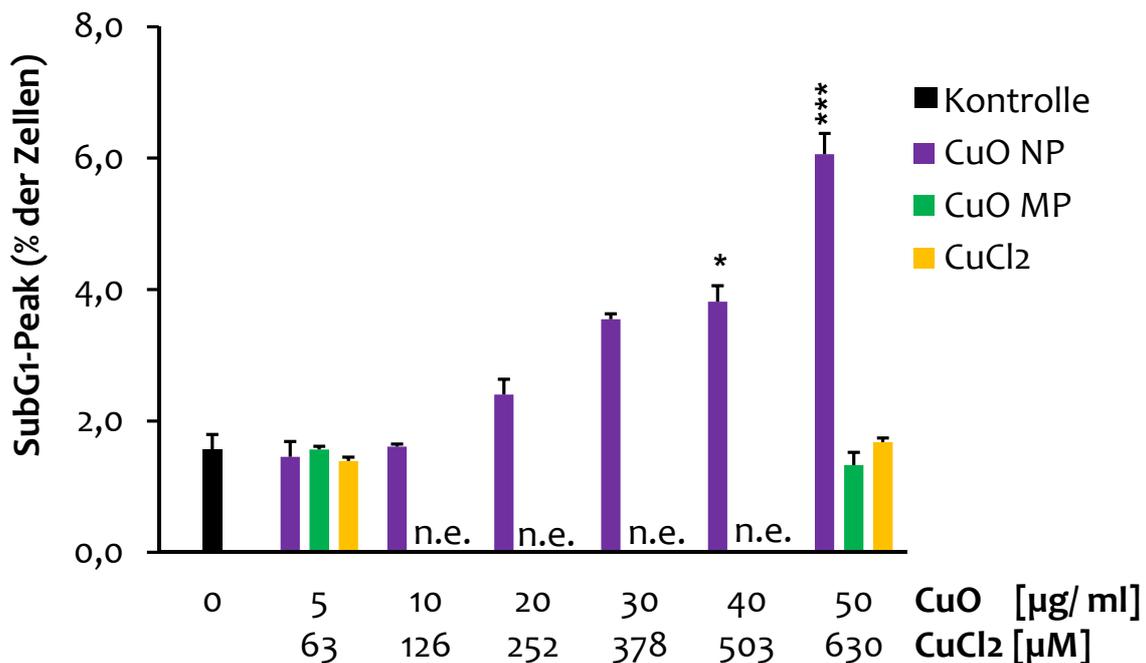


Abbildung 19 : Anteil an Zellen, die einen SubG1-Peak aufweisen. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, die DNA mit DAPI angefärbt und der Anteil Zellen mit SubG1-DNA-Gehalt am Durchflusszytometer quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte eine Zunahme des SubG1-Peaks in $11,40 \pm 2,31\%$ der Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ (ANOVA/ Dunnett T bzw. Dunnett T₃). 50 µg/ ml CuO entsprechen $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CuO und $630 \mu\text{M}$ Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Die Ergebnisse der Untersuchungen nach 4 h, 8 h und 16 h sind im Anhang Kapitel 8.7.6.3 dargestellt. Abkürzung: n.e. nicht ermittelt.

Während in Kontrollzellen und nach Inkubation von A549-Zellen mit CuO MP und CuCl₂ nach 24 h weniger als 2% der Zellen einen SubG1-Peak aufwiesen, beeinflussten CuO NP die normale Zellzyklusverteilung. Abbildung 19 gibt den konzentrationsabhängigen Anstieg an Zellen mit einem SubG1-Peak nach 24 h wieder. Die Ergebnisse nach 4 h, 8 h und 16 h sind im Anhang dargestellt (siehe Anhang Kapitel 8.7.6.3). Die Zunahme begann bei 20 µg/ ml CuO NP und resultierte in 6% bei der stark zytotoxischen Konzentration von 50 µg/ ml. 24 h Inkubation mit 400 nM Staurosporin erhöhte den Anteil der Zellen mit SubG1-DNA Gehalt auf 11%.

Apoptotische Zellen sind charakterisiert durch eine Vielzahl von morphologischen, molekularen und biochemischen Charakteristiken, z.B. Zellschrumpfen, Membranausbuchtungen (engl.: „membrane blebbing“), Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Die Detektion von mehr als einem dieser Vorgänge gilt als essentiell für die eindeutige Identifizierung apoptotischer Zellen (Rahman 2002).

In der vorliegenden Arbeit beeinflussten CuO NP die normale Zellzyklusverteilung von A549-Zellen und generierten einen messbaren Anteil (6%) an spät-apoptotischen Zellen mit subdiploider DNA. Ferner erhöhte sich nach Inkubation mit CuO NP der Anteil an AIF im Kern von A459-Zellen. CuO MP und CuCl₂ zeigten keine apoptotische Wirkung in A549-Zellen. Beide Endpunkte wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals systematisch durch den Vergleich der Effekte von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ untersucht.

Die ermittelte AIF-Translokation auf das 1,5-fache der Kontrolle durch CuO NP kann durch eine Störung oder Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials – einer Voraussetzung zur Freisetzung pro-apoptotischer Protein wie AIF aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol – verursacht sein. Die Integrität des Membranpotentials kann z.B. durch direkte Interaktion der Mitochondrien mit ungelösten Partikeln, z.B. nach endozytotischer Aufnahme auftreten. Zwei Arbeitsgruppen untersuchten eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials von A549-Zellen. Sie beobachteten eine Depolarisierung, wobei CuO NP im Vergleich zu CuO MP deutlich stärker wirkten (Wang et al., 2012, Karlsson et al., 2009). Ein möglicher Mechanismus der hier beobachteten Freisetzung von AIF durch CuO NP ist die Lipidperoxidation. In diesem Zusammenhang ermittelten Ahamed et al. (2010) und Perreault et al. (2012) nach Inkubation mit CuO NP erhöhte Mengen an Malondialdehyd (MDA), einem Endprodukt der Lipidperoxidation.

Die neuen Daten bestätigen Untersuchungen von Hanagata und Mitarbeitern (2011), die anhand einer Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung Apoptose in 9% aller mit 25 µg/ml CuO NP behandelten A549-Zellen fanden. Untersuchungen von Perreault et al. (2012), die die Fragmentierung der DNA von murinen Neuroblastomazellen durch Agarosegelelektrophorese untersuchten und eine 1,3-fache Erhöhung im Vergleich zu Kontrollzellen beobachteten.

Keine der kupferhaltigen Substanzen veränderte die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7. In Bezug auf Caspase 7 bestätigen die hier präsentierten Daten Untersuchungen von Kawakami und Mitarbeitern (2008), die keine erhöhte Genexpression von Caspase 7 nach Inkubation mit löslichem Kupfer feststellten.

Zusammengefasst gibt es deutliche Hinweise auf apoptotische Vorgänge durch CuO NP.

5.2.3 DIREKTE UND INDIREKTE GENOTOXIZITÄT

Um die Genotoxizität der drei Kupferverbindungen zu untersuchen und zu vergleichen, wurden vier Endpunkte herangezogen. Zuerst wurde das Potenzial zur DNA-Strangbruchinduktion mit Hilfe der Alkalischen Entwindung (Hartwig et al., 1996) untersucht. In einem weiteren Versuchsaufbau wurde, da das redoxaktive Kupfer Fenton-artige Reaktionen katalysieren kann, die Induktion von DNA-Strangbrüchen unter pro-oxidativen Bedingungen, d.h. einem erhöhten Gehalt an H₂O₂, untersucht (Kapitel 5.2.3.1). Drittens wurde die Induktion von Mikrokernen als Maß für chromosomale Schäden ermittelt (Kapitel 5.2.3.2). Zuletzt wurde der Einfluss der drei Verbindungen auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung untersucht, da eine Inhibition dieser Reaktion durch verhältnismäßig niedrige Konzentrationen an löslichem Kupfer bereits gezeigt wurde (Schwerdtle et al., 2007). Dies deutet auf einen indirekt genotoxischen Effekt hin, indem Enzyme, die in die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität involviert sind, inhibiert werden (Kapitel 5.2.3.3).

Um geeignete Inkubationsbedingungen für die nachfolgenden Untersuchungen zu schaffen, wurde in den folgenden Untersuchungen hauptsächlich der Konzentrationsbereich geringer bis mittlerer Zytotoxizität (bis 20 µg/ ml CuO und bis 252 µM CuCl₂) betrachtet (siehe Kapitel 5.2.1.2).

5.2.3.1 Generierung von DNA-Strangbrüchen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in HeLa S₃-Zellen nach 24 h Inkubation mit CuO NP oder CuO MP erstmals mit Hilfe der Alkalischen Entwindung quantifiziert. Die Quantifizierung sowie der hohe Probanddurchsatz in kurzer Zeit sind wesentliche Vorteile der Alkalischen Entwindung gegenüber anderen häufig verwendeten Methoden zur Ermittlung des genotoxischen Potenzials in Form von DNA-Schäden. Die Methode eignet sich besonders gut zur Untersuchung mit Partikeln, da in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass möglicherweise während der Aufarbeitung zurückgebliebene Partikel durch die Hydroxylapatitchromatographie zurückgehalten wurden und so die fluorimetrische Quantifizierung unbeeinträchtigt lassen. Dadurch war eine Wechselwirkung mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) ausgeschlossen.

Zuerst wurde die Generierung von DNA-Strangbrüchen nach 24 h Inkubation mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ in HeLa S₃-Zellen untersucht. CuO NP erhöhte die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in HeLa S₃-Zellen konzentrationsabhängig, beginnend bei der nicht-zytotoxischen Konzentration von 10 µg/ ml und resultierte in 0,8 DNA-Strangbrüche/ 10⁶ Basenpaaren bei 20 µg/ ml CuO NP. Demgegenüber wurden in unbehandelten Kontrollzellen im Mittel 0,005 DNA-Strangbrüche/10⁶

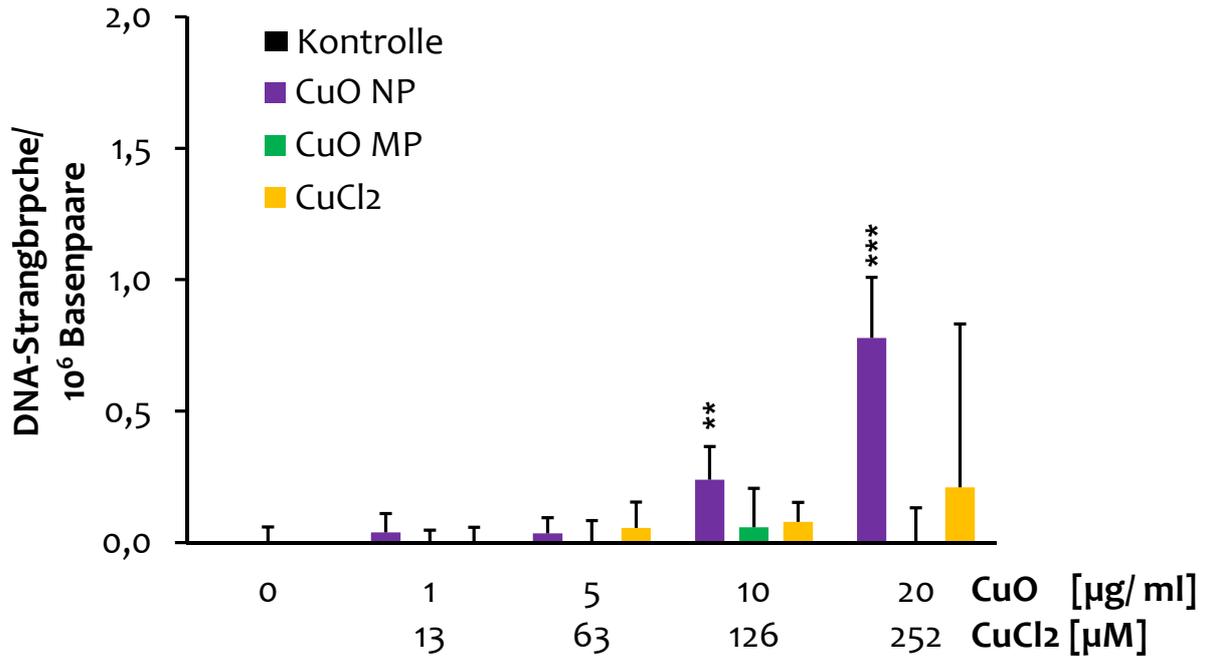


Abbildung 20: Einfluss auf die Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen. HeLa S3 Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert und die Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten + SD. Statistisch signifikant verschieden der Kontrolle: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA/ Dunnett- T3). 20 µg/ml CuO entsprechen 4 µg/cm² CuO und 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

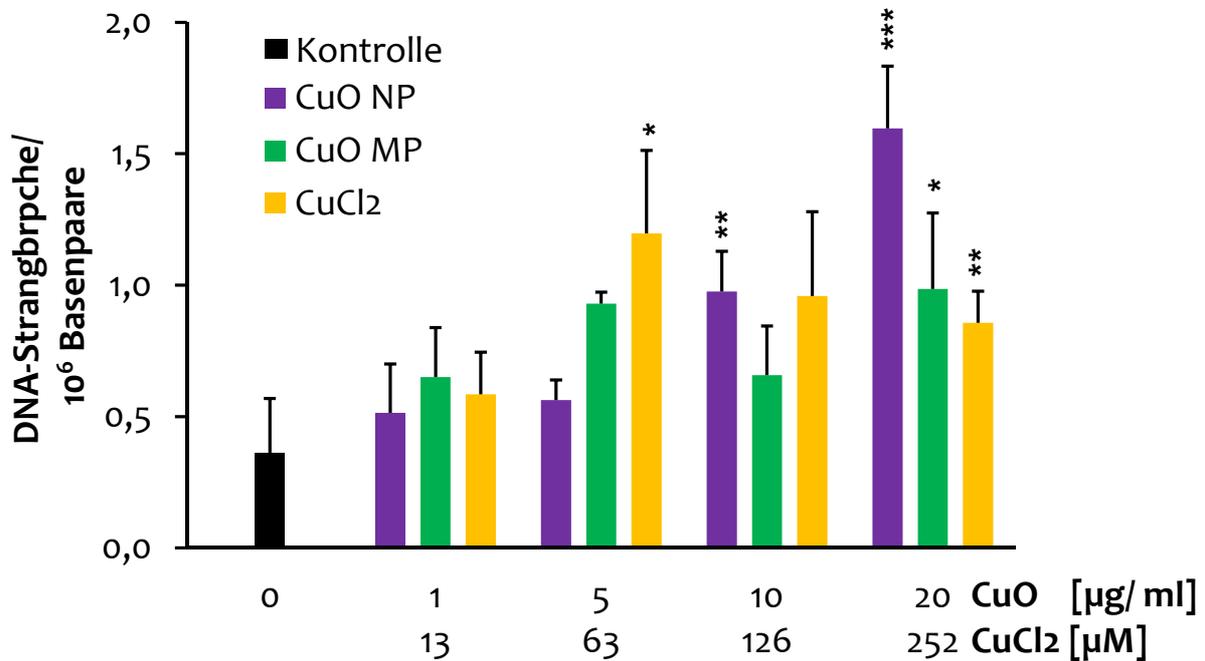


Abbildung 21: Einfluss auf die Zunahme von H₂O₂-generierten DNA-Einzelstrangbrüchen. HeLa S3 Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ vorinkubiert und im Anschluß für 5 min mit 35 µM H₂O₂ koinkubiert. Anschließend wurde die Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden der Kontrolle: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA/ Dunnett- T3). 20 µg/ml CuO entsprechen 4 µg/cm² CuO und 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Basenpaare gefunden. Keine signifikante Induktion wurde im Falle von CuO MP oder CuCl₂ beobachtet (Abbildung 20).

Anschließend wurden HeLa S3-Zellen 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ vorinkubiert und anschließend für 5 min mit 35 µM H₂O₂ coinkubiert. Jede der Verbindungen erhöhte unter diesen pro-oxidativen Bedingungen die Anzahl an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen/10⁶ Basenpaaren bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen signifikant (Abbildung 21). Nur mit H₂O₂ behandelte Zellen zeigten einen Anstieg auf 0,4 DNA-Strangbrüche/10⁶ Basenpaare. Die Zunahme war am ausgeprägtesten nach Inkubation mit CuO NP. Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen stieg konzentrationsabhängig bis auf das vierfache (20 µg/ml CuO NP: 1,6 DNA-Strangbrüche/10⁶ Basenpaare) an. Die Behandlung mit CuCl₂ erhöhte die Anzahl auf das 2,9-fache (63 µM CuCl₂: 0,8 DNA-Strangbrüche/10⁶ Basenpaare).

In der hier vorliegenden Arbeit konnten durch den systematischen Ansatz deutliche Unterschiede in der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ beobachtet werden. Ohne H₂O₂-Behandlung zeigte allein die Inkubation mit CuO NP eine signifikante Erhöhung von DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in Untersuchungen mit dem sogenannten Comet-Assay beobachtet, wo CuO NP konzentrationsabhängig mehr DNA-Schäden induzierte als CuO MP (Karlsson et al., 2008, Midander et al., 2009, Wang et al., 2012). Als Ursache wurde eine erhöhte Generierung von reaktiven ROS durch CuO NP diskutiert. Die Erhöhung der ROS-Menge durch CuO NP wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Applerot et al., 2012, Karlsson et al., 2008, Seiffert et al., 2011) und auch für Kupferionen beschrieben (Pourahmad 2000, Hultberg 1997).

Bezüglich CuCl₂ stimmt die fehlende Induktion von DNA-Strangbrüchen bei Konzentrationen bis 252 µM CuCl₂ mit einer Studie von Schwerdtle und Mitarbeitern (2007) überein. Die Autoren ermittelten zwar durch wasserlösliches Kupfersulfat induzierte DNA-Strangbrüche, allerdings erst bei Konzentration ≥ 300 µM.

In Kombination mit H₂O₂ wurden - unabhängig von der kupferhaltigen Substanz - konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche festgestellt, wobei die Behandlung mit CuO NP die Anzahl von DNA-Strangbrüchen am stärksten erhöhte. Die erhöhte Anzahl an H₂O₂-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen könnte auf eine Reaktion des H₂O₂ mit Kupferionen zurückzuführen sein. Cu(I) ist durch Fenton-ähnliche Reaktionen in der Lage Hydroxyl-Radikale zu bilden, die in der Folge durch Reaktionen mit DNA-Basen oder Zuckerresten DNA-Strangbrüche verursachen (Jomova et al., 2012).

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse ein deutliches genotoxisches Potenzial von CuO NP.

5.2.3.2 Einfluss auf die Generierung von Mikrokerneln

Um die Induktion von chromosomalen Schäden durch Inkubation mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Methode nach Bryce et al. (2007) verwendet. Der Mikrokerntest gilt als geeignete Methode, um permanente Veränderungen auf chromosomaler Ebene festzustellen. Dabei gibt die Häufigkeit induzierter Mikrokerne das Ausmaß des Chromosomenschadens wieder. Mikrokerne können aus Chromosomenbruchstücken (klastogener Effekt) oder durch eine Veränderung mitotischer Prozesse, die die Chromosomenverteilung beeinflusst (aneugener Effekt), entstehen (Kirsch-Volders et al., 2011). Eine Bildung von Mikrokerneln kann dabei aufgrund von ROS und/oder durch Anwesenheit von Partikeln nahe dem mitotischen Apparat erfolgen (Rahman et al., 2002). A549-Zellen wurden 24 h mit den kupferhaltigen Substanzen behandelt oder als Positivkontrolle mit 10 J/cm² UVC bestrahlt.

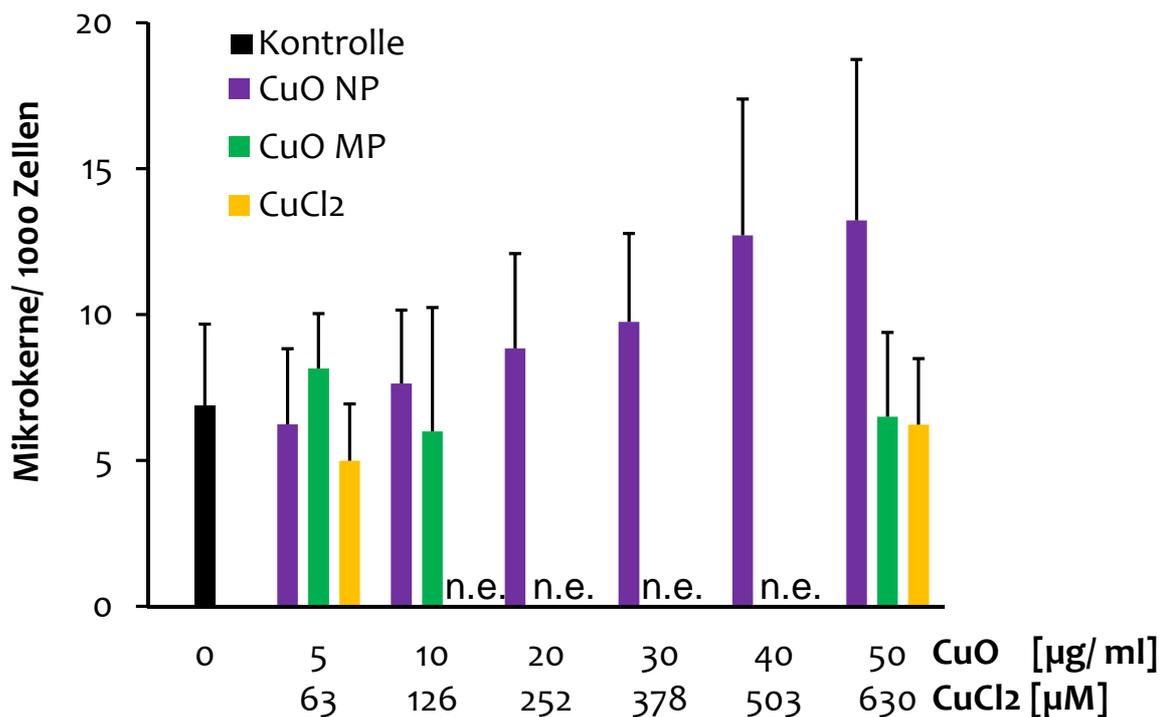


Abbildung 22: Einfluss auf die Induktion von Mikrokerneln. A549 Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ vorinkubiert. Die Anzahl an Mikrokerneln wurde mit einer durchflusszytometrischen Methode nach Bryce et al. (2007) ermittelt. Die Positivkontrolle 10 J/m² UVC generierte 105 ± 25 Mikrokerne. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen + SD. 50 µg/ml CuO entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e. nicht ermittelt.

Das Prinzip der Methode nach Bryce und Mitarbeitern (2007) beruht auf einer Doppelfärbung der DNA mit fluoreszierenden Farbstoffen. Im 1. Schritt bindet der nicht-membrangängige rote Farbstoff Ethidiummonoazid (EMA) an die DNA von Zellen mit beschädigter Zellmembran (nekrotisch oder apoptotisch). Im zweiten Schritt wird die intakte Zellmembran von unveränderten oder mikrokernhaltigen Zellen permeabilisiert und SYTOX Green zugegeben. Die DNA apoptotischer und nekrotischer Zellen weist nun eine Doppelfärbung (rot/grün) auf, während die DNA normaler und mikrokernhaltiger Zellen grün gefärbt ist. Diese Vorgehensweise erlaubte die ausschließliche Analyse der mikrokernhaltigen Zellen.

Durchflusszytometrische Analysen mit Partikeln bergen das Risiko von Artefakten. Dabei können u.a. verwendete Farbstoffe an die Partikel binden und so für den Nachweis nicht mehr zur Verfügung stehen oder Partikel an die Zellmembran adhären und so das Streuverhalten des Laserlichts beeinflussen. Daher wurde die Störung der Messung durch möglicherweise verbliebene Partikel in der Suspension untersucht, indem Partikelsuspensionen analog zu den Zellkulturversuchen aufgearbeitet oder in reiner Form vermessen wurden. Anhand der Histogramme und der angegebenen Daten konnten Artefakte für die hier durchgeführte Untersuchung ausgeschlossen werden (siehe Anhang Kapitel 8.7.7).

24 h Inkubation mit CuO NP erhöhte die Anzahl der Mikrokerne von 7/ 1000 Zellen in der Kontrolle auf 13/ 1000 Zellen nach der Inkubation mit der zytotoxischen Konzentration von 40 µg/ ml CuO NP. Inkubationen mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen an CuO NP sowie CuO MP oder CuCl₂ erhöhten die Anzahl der Mikrokerne nicht (Abbildung 22). Die Positivkontrolle 10 J/ m² UVC erhöhte die Anzahl der Mikrokerne auf 105/ 1000 Zellen.

CuO MP wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal auf ihre Fähigkeit zur Generierung von Mikrokernen untersucht. Bezüglich CuO NP weisen die Daten auf einen genotoxischen Effekt hin. Sie stützen die Ergebnisse zweier Studien, die in murinen Zellen eine konzentrationsabhängig signifikante Induktion von Mikrokernen durch CuO NP ermittelten (Song et al., 2012, Perreault et al., 2012). Als möglicher Wirkmechanismus wurde ein klastogener Effekt vermutet, der möglicherweise auf durch oxidativen Stress ausgelösten DNA-Strangbrüchen beruhte. Nanopartikel könnten aufgrund ihrer Größe ebenso während der Mitose u.a. mit Mikrotubuli oder Kinetochoren wechselwirken (Gonzalez et al., 2008).

5.2.3.3 Einfluss auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Um das Ausmaß an H₂O₂-induzierter Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu ermitteln, wurde immunologisch die Bildung von Poly(ADP-Ribose)polymeren nach Aktivierung von H₂O₂-induzierten DNA-Strangbrüchen untersucht. Zur Detektion des Enzymprodukts Poly(ADP-Ribose) wurden ein

hochspezifischer monoklonaler Antikörper 10H gegen Poly(ADP-Ribose) und ein FITC-konjugierter Sekundärantikörper verwendet.

Die immunfluorimetrische Methode zur Detektion und Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung beinhaltet die Markierung spezifischer Proteine mit Antikörpern. Hier könnte die Adsorption von Antikörpern an Partikel die Fluoreszenz verringern. Bei näherer Betrachtung der Methode konnte ein Effekt allerdings praktisch ausgeschlossen werden, da vor der Zugabe der Antikörper die Zellen vielfach gewaschen und überschüssige Proteinbindungsstellen und somit auch die Oberfläche von verbleibenden Partikeln durch Proteine aus Milchpulver oder FKS blockiert wurden. Zudem wurden die Antikörper im Überschuss zugegeben und die wenigen verbliebenen Partikel auf den Präparaten waren im Fluoreszenzmikroskop aufgrund ihrer schwarzen Farbe über den fluoreszierenden Präparaten leicht erkennbar. Solche Kerne oder Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

24 h Inkubation von HeLa S3-Zellen mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ allein zeigten keinen Einfluss auf das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Die Zellen zeigten nur ein konstant schwaches Hintergrundsignal (Daten nicht gezeigt).

Frühere Studien belegen, dass die Poly(ADP-Ribosyl)ierung innerhalb von 5 min nach der Generierung von DNA-Strangbrüchen mit 100 µM H₂O₂ ausgelöst wird (Hartwig et al., 2003). In der Folge werden die Poly(ADP-Ribose)-Polymere von der Poly(ADP-Ribose)glycohydrolase (PARG) wieder abgebaut (Althaus, 1992, Brochu et al., 1994). Die hier ermittelten Daten belegen, dass für 5 min mit 100 µM H₂O₂ behandelte Zellen eine starke Fluoreszenz aufwiesen, die eine hohe PARP-Aktivität repräsentiert (Abbildung 23).

Wie in den Abbildung 23 und 24 dargestellt, zeigte sich eine konzentrationsabhängige, signifikante Verringerung des Ausmaßes an Poly(ADP-Ribosyl)ierung nach 24 h Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ gefolgt von 5 min Inkubation mit 100 µM H₂O₂. Der Effekt begann bereits bei der kleinsten untersuchten Konzentration von 1 µg/ml CuO (13 µM CuCl₂) und betrug höchst signifikante ~ 44% Restaktivität bei der nicht-zytotoxischen Konzentration von 10 µg/ml CuO (126 µM CuCl₂) für alle Substanzen. Während mit CuO MP und CuCl₂ keine weitere Inhibierung beobachtet wurde, inhibierten 20 µg/ml CuO NP die Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf eine Restaktivität von 28%.

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eines der frühesten Ereignisse nach Induktion von DNA-Strangbrüchen. Enzyme der Familie der Poly(ADP-Ribose)polymerasen (PARP) sind fähig, bereits sehr geringe Gehalte an DNA-Strangbrüchen zu erkennen. Der Hauptteil der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wird dabei von PARP-1 katalysiert. Das Enzym verfügt über drei Zink-bindende Strukturen (Langelier et al., 2008); zwei sind für die DNA-Bindung essentiell. Die Rolle von PARP-1 ist bisher unvollständig verstanden, doch gibt es Hinweise auf einen Beitrag zur

Basenexzisionsreparatur (BER), zur Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) und zur Doppelstrangbruchreparatur (DSB) (Bouchard et al., 2003, Woodhouse and Dianov, 2008). Für CuSO_4 wurde bereits eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung gezeigt (Schwerdtle et al., 2007). Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen erstmals die Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch CuO NP und CuO MP. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung

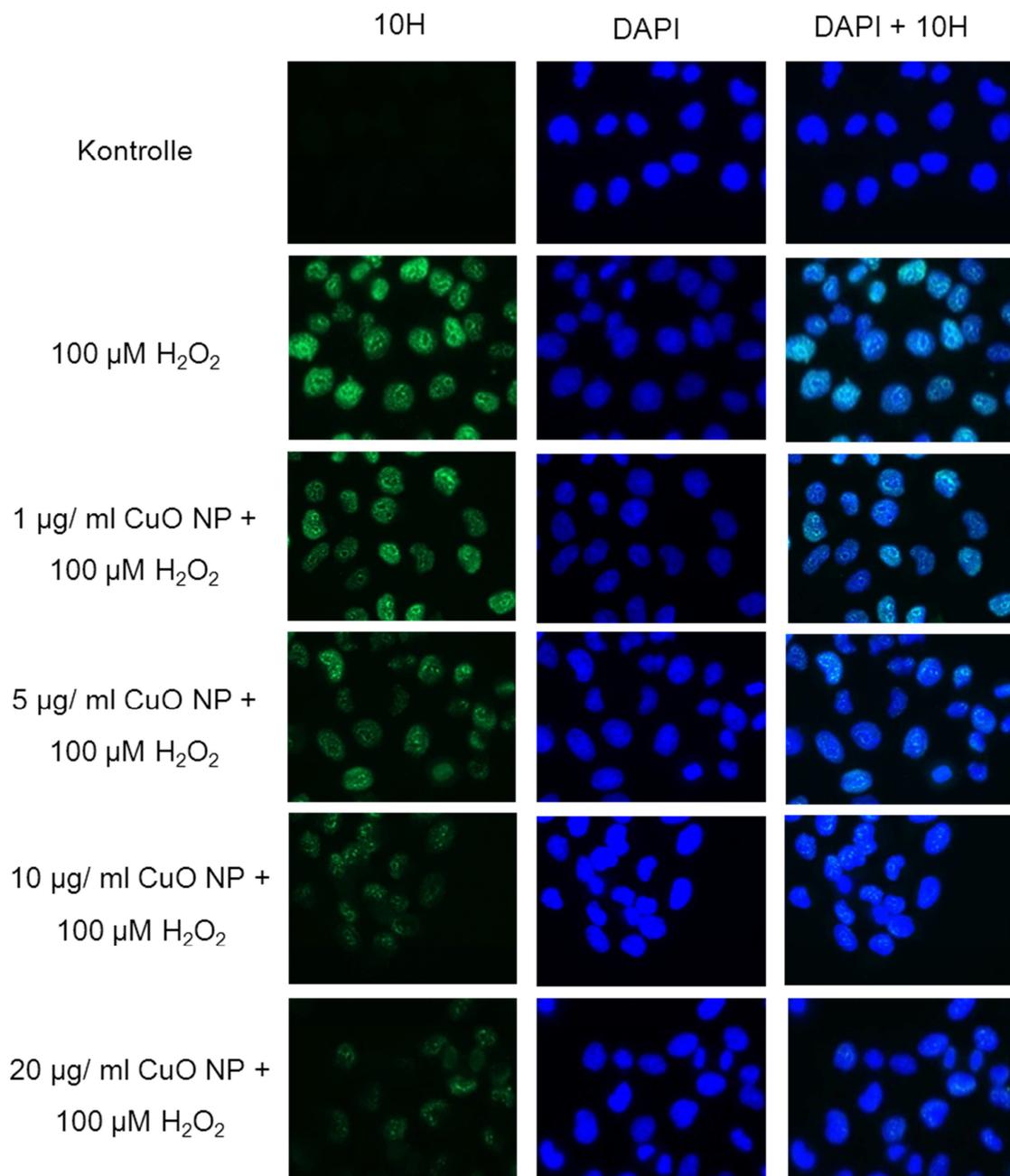


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen. HeLa-S3 Zellen wurden 24 h mit CuO NP vorinkubiert und anschließend 5 min mit 100 μM H_2O_2 koinkubiert (außer Kontrolle). Danach wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit dem gegen Poly(ADP-Ribose) gerichteten Antikörper 10H behandelt. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der DAPI- und FITC-Fluoreszenz (Einzelkanäle und Überlagerungsbilder). Die grüne Fluoreszenz des FITC-Kanals repräsentiert das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung.

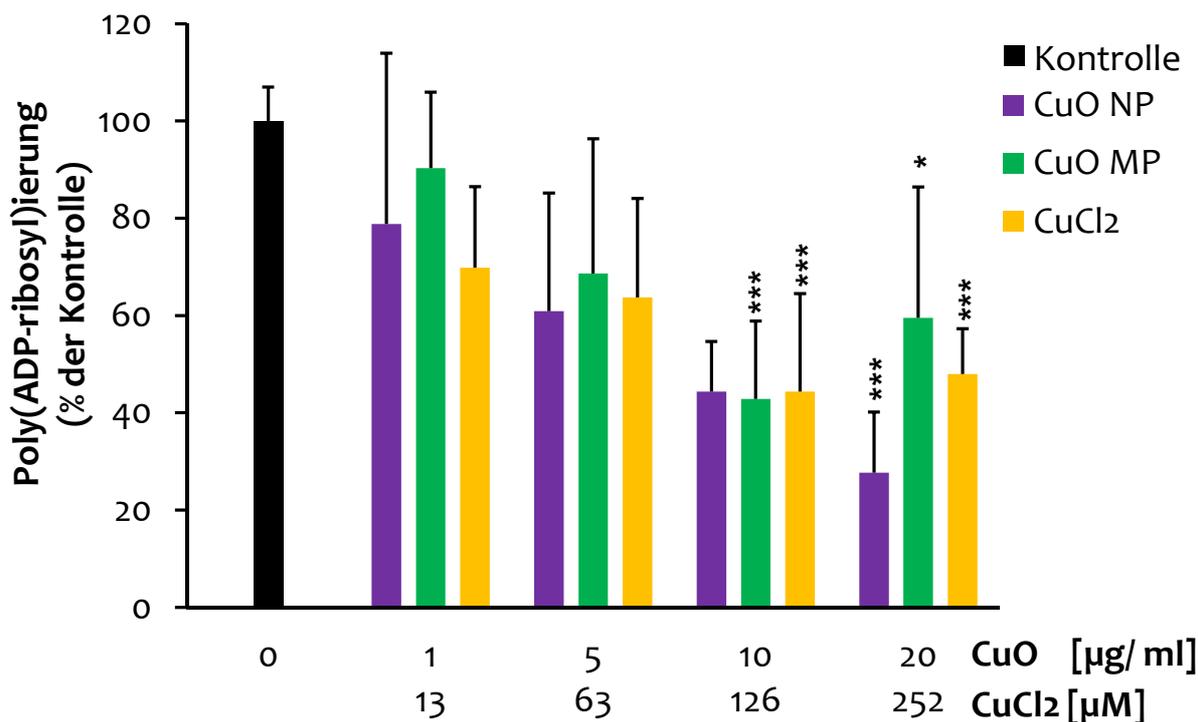


Abbildung 24: Inhibierung der H₂O₂-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung. HeLa S3 Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ vorinkubiert und anschließend für 5 min mit 100 µM H₂O₂ kokubiert. Anschließend wurden die Zellen, gewaschen, fixiert und mit dem gegen Poly(ADP-Ribose) gerichteten Antikörper 10H behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens sechs Bestimmungen (à je 50 Zellen) + 95% Konfidenzintervall (CI). Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 ANOVA/ Dunnett's T (CuO MP) bzw. Dunnett's T3 (CuO NP, CuCl₂) Test. 20 µg/ml CuO entsprechen 4 µg/cm² CuO und 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

ist im untersuchten Konzentrationsbereich nicht komplett inhibiert, jedoch wurde in der Literatur bereits diskutiert, dass auch eine teilweise Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu genomischer Instabilität beitragen könnte (Hartwig et al., 2003).

In den beiden für die DNA-Bindung essentiellen Zink-bindenden Domänen der PARP-1 wird Zink von drei thiolhaltigen Cysteinen und einem Histidinrest komplexiert (Krishnakumar and Kraus, 2010). Frühere Untersuchungen mit isolierter PARP-1 zeigten eine starke Abnahme der Enzymaktivität durch CuSO₄ (Schwerdtle et al., 2007). Als mögliche Ursache kommt eine Oxidation der Thiolgruppen der Cysteine durch das redoxaktive Kupfer in Frage. In der Folge könnte die DNA-Bindungsfähigkeit der PARP-1 verändert und somit die Poly(ADP-Ribosyl)ierung verringert werden.

Ein weiterer möglicher Grund für das verringerte Ausmaß an Poly(ADP-Ribosyl)ierung könnte eine Depletierung von NAD⁺, dem Substrat der PARP-1, durch die kupferhaltigen Substanzen sein; sie würde sich anhand einer Wachstumshemmung bemerkbar machen. Da die Poly(ADP-

Ribosyl)ierung bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentration inhibiert wurde, scheint ein verringerter Energiegehalt allerdings nicht primär beizutragen.

Ferner könnte das verringerte Ausmaß an Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch eine verminderte Anzahl an H₂O₂-induzierten DNA-Strangbrüchen verursacht sein. Dies konnte jedoch anhand der oben beschriebenen Ergebnisse (siehe Kapitel 5.2.3.1) ausgeschlossen werden, da alle Substanzen die Anzahl an H₂O₂-induzierten DNA-Strangbrüchen erhöhten.

5.2.4 ZELLULÄRE AUFNAHME UND INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG (BIOVERFÜGBARKEIT)

Ein wichtiger Aspekt, der in Zusammenhang mit den beobachteten Unterschieden der Toxizität von CuO NP im Vergleich zu CuO MP und CuCl₂ stehen könnte, ist ein potenzieller Unterschied in der Aufnahme, der intrazellulären Verteilung oder Freisetzung von Kupferionen, resultierend in einer Überladung der Zellen mit Kupfer.

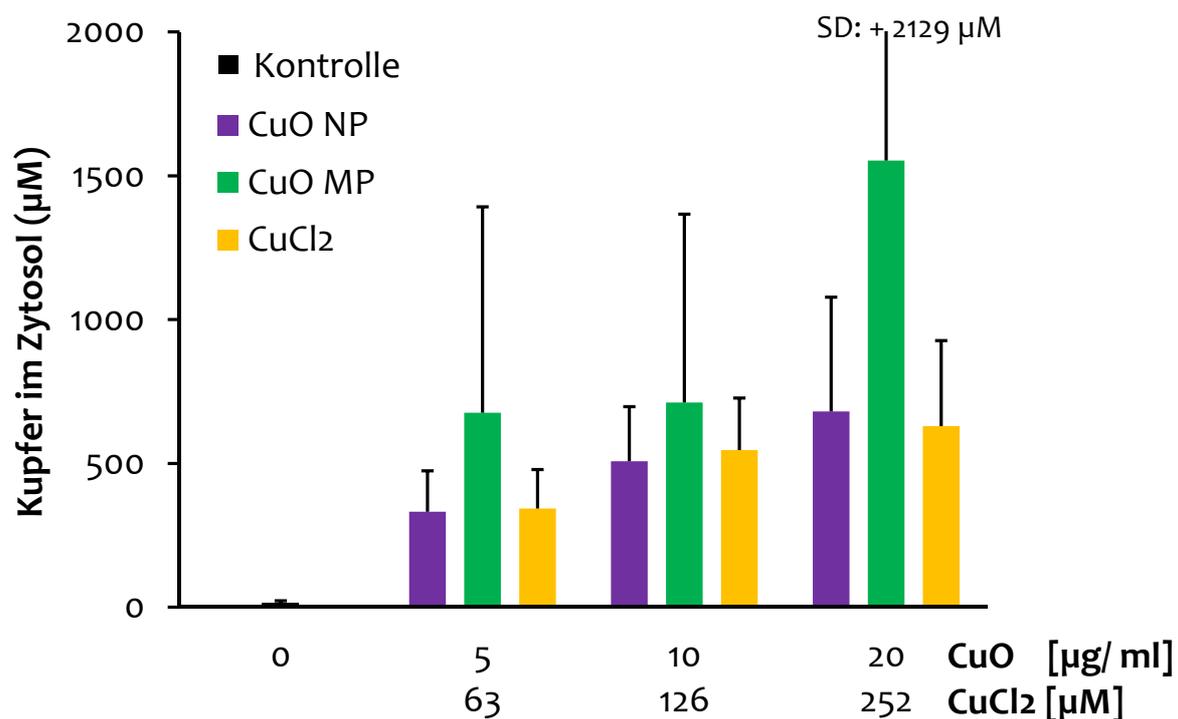


Abbildung 25: Kupfergehalt der löslichen Zytoplasmakfraktion. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert. Anschließend wurde die lösliche Zytoplasmakfraktion isoliert und der Kupfergehalt mittels ICP-MS ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten + SD. 20 µg/ml CuO entsprechen 4 µg/cm² CuO und 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

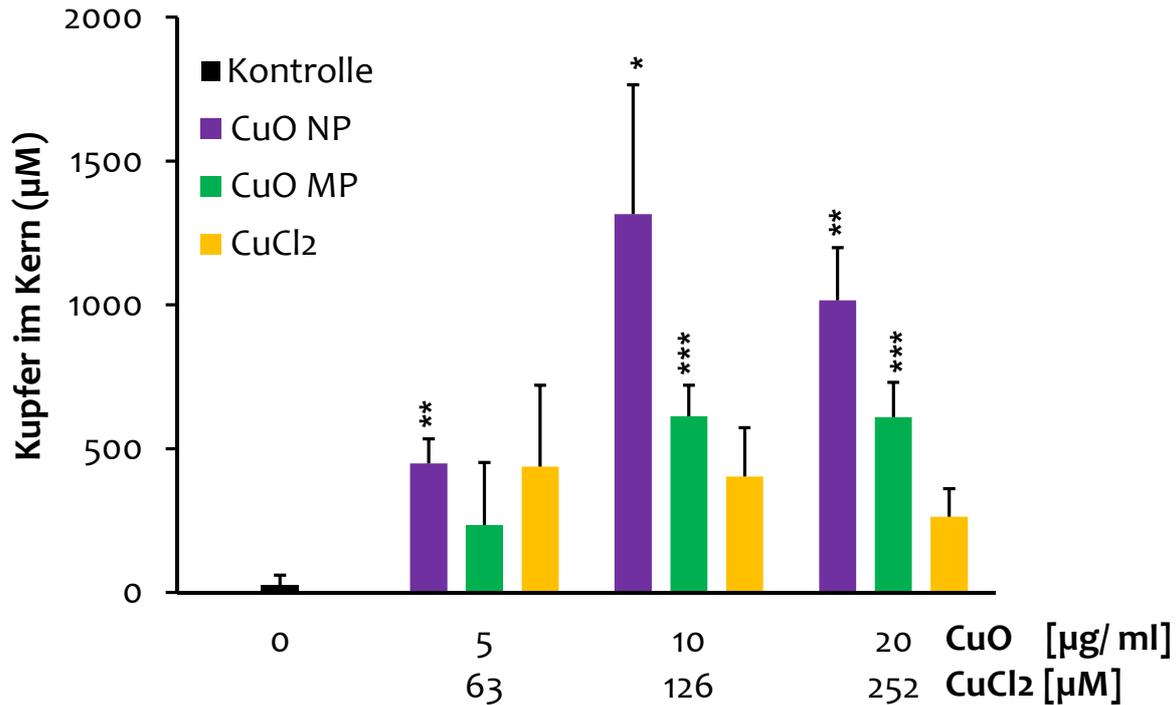


Abbildung 26: Kupfergehalt der löslichen Kernfraktion. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert. Anschließend wurde die lösliche Kernproteinfraktion isoliert und der Kupfergehalt mittels ICP-MS ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0.05, ** p < 0.01, p < 0.001 (ANOVA/ Dunnett T bzw. Dunnett T3). 20 µg/ml CuO entsprechen 4 µg/cm² CuO und 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

Da es fast unmöglich ist, durch Waschen sämtliche Partikel von extra- und/ oder intrazellulären Membranen zu entfernen, besteht die Gefahr eines Überbefundes.

Innerhalb der vorliegenden Studie wurde daher ein Ansatz gewählt, der nur das an die lösliche Fraktion des Kernplasmas oder Zytoplasmas gebundene Kupfer erfasst. Um die Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung zu ermitteln, wurden A549-Zellen 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die lösliche Fraktion des Zytoplasmas isoliert, bevor die Zellkerne lysiert und deren lösliche Fraktion isoliert wurde. Der Kupfergehalt wurde auf Basis des Zell- bzw. Kernvolumens berechnet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt.

In der löslichen Fraktion des Zytoplasmas akkumulierte Kupfer konzentrationenabhängig nach 24 h Inkubation mit CuO NP und CuCl₂. Der basale Gehalt der löslichen Fraktion des Zytoplasmas unbehandelter Kontrollzellen betrug 15 µM Kupfer. Bereits die niedrigste Konzentration von 5 µg/ml CuO NP oder 63 µM CuCl₂ erhöhte den basalen Gehalt um das 22-fache auf rund 330 µM Kupfer. Die Inkubation mit 20 µg/ml CuO NP bzw. 252 µM CuCl₂ erhöhte den Gehalt um das 45-

(680 μM) bzw. 42-fache (630 μM). Der Gehalt an Kupfer nach Inkubation mit CuO MP war aufgrund einer sehr großen Standardabweichung nicht interpretierbar (Abbildung 25).

In der löslichen Fraktion des Kerns führte die Inkubation mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP zu einer 38-fachen Erhöhung des basalen Gehalts von 27 μM auf 1015 μM . 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO MP erhöhten die Kupferionenkonzentration um das 24-fache auf rund 650 μM . CuCl_2 erhöhte den Kupfergehalt um das 15-fache bis auf rund 400 μM (Abbildung 26). In der löslichen Fraktion des Kerns überwog die Akkumulation nach Inkubation mit CuO NP die von CuO MP und CuCl_2 .

Die Daten für CuCl_2 deuten auf eine Beeinflussung durch den gezielten Im- und Export in die Zelle hin (Homöostase), da der Kupfergehalt keine Konzentrationsabhängigkeit aufweist und mit höheren extrazellulären Konzentrationen tendenziell geringer wird.

CuO NP liegt extrazellulär zu 44% gelöst vor. Daher unterliegt es ebenfalls teilweise der Kupferhomöostase. Zusätzlich wird CuO NP allerdings auch endozytiert (Wang et al., 2012). Die ungelösten Partikel werden dabei durch Endozytose aufgenommen und in den Lysosomen gelöst. Durch Anlagerung der Lysosomen an die Kernmembran gelangen die Kupferionen dann in den Zellkern (Oller et al., 1997, Limbach et al., 2007, Muñoz and Costa, 2012). Das kernnahe Vorkommen von CuO NP-haltigen Lysosomen in A549-Zellen wurde bereits per TEM beobachtet (Wang et al., 2012) Dieser Mechanismus kommt auch für CuO MP in Frage. Allerdings ist hier die Freisetzung von Kupferionen bei erniedrigtem pH-Wert, wie er in den Lysosomen vorherrscht, geringer als mit CuO NP (siehe Kapitel 4.1.12).

Zusammengefasst ergaben sich folgende Abstufungen der Kupferakkumulation in der löslichen Fraktion des Zytoplasmas: (CuO MP) > CuO NP ~ CuCl_2 , bzw. des Kernplasmas von A549-Zellen: CuO NP > CuO MP > CuCl_2 .

Die Daten zum basalen Kupfergehalt von A549-Zellen liegen in einer Größenordnung mit Daten zum Kupfergehalt des Kerns bzw. Zytoplasmas unbehandelter Maushepatozyten (Ralle et al., 2010). Sie widersprechen jedoch einer Untersuchung von Wang und Mitarbeitern (2012). Die Autoren untersuchten die Aufnahme von CuO NP und CuCl_2 in A549-Zellen mit TEM und ermittelten den Gesamtzellkupfergehalt und den Zellkernkupfergehalt mit AAS. Die daraus über das Volumen von A549-Zellen bzw. Zellkernen berechneten Konzentrationen in μM vergleichen sich wie folgt: Während die Daten der vorliegenden Arbeit für unbehandelte A549-Zellkerne eine Kupferkonzentration von 27 μM ermittelten, detektierten Wang und Mitarbeiter mit 2633 μM das circa 100-fache. Nach Inkubation mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP (12 h) ermittelten Wang und Mitarbeiter im Zellkern einen Kupfergehalt von 28522 μM , während die vorliegenden Daten nach 24 h Inkubation mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP im Mittel 1316 bzw. 1015 μM Kupfer aufwiesen. Auf die ganze Zelle bezogen, ermittelten Wang et al. nach Inkubation mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP für 12 h 11808 μM

Kupfer, das circa 20-fache des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gehaltes der löslichen Zytoplasmafraktion (507 bzw. 681 μM).

Diese starken Abweichungen können möglicherweise durch die Betrachtung der verwendeten Methoden und Zellkulturbedingungen erklärt werden. Während durch die Erfassung des Kupfergehaltes der löslichen Fraktionen des Kern- und Zytoplasmas eine Artefaktbildung durch an Zellmembranen adhärierende Partikel ausgeschlossen war, untersuchten Wang und Mitarbeiter intakte Zellen bzw. Zellkerne. Eigene Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass CuO NP und CuO MP nicht komplett von Zellen abgewaschen werden können. Daher ist es denkbar, dass durch das von Wang und Mitarbeitern verwendete Protokoll an Zellmembranen adhärierende Partikel zu den hohen Kupferwerten beitragen. Für diese Vermutung spricht auch der Vergleich der Ergebnisse mit Kupferchlorid. Wang und Mitarbeiter ermittelten nach 12 h Inkubation mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cu^{2+} rund 675 μM Kupfer in A549-Zellen. Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (63 μM) Cu^{2+} erhöhte nach 24 h den Kupfergehalt der löslichen Zytoplasmafraktion auf 630 μM . Im Falle löslichen Kupfers sind die ermittelten Konzentrationen also annähernd identisch. Ferner enthielt das von Wang et al. verwendete F12K-Medium zur Kultivierung der A549-Zellen bereits Kupfersulfat in Höhe von rund 0,002 mg/l (32 nM). Dieser geringe Zusatz erklärt allerdings nicht die in unbehandelten Kontrollkernen gefundenen hohen Kupfergehalte.

6 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Aufgrund der steigenden Produktion und dem zunehmenden Einsatz von synthetisierten Nanomaterialien steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Exposition von Arbeitnehmern sowie der Allgemeinbevölkerung. Um adverse Effekte eines solchen Eintrags frühzeitig abschätzen und rechtzeitig Schutzmaßnahmen ergreifen zu können, ist die Bewertung des toxischen Potenzials - insbesondere in Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit - von hoher Relevanz. Die Bioverfügbarkeit von nano- und mikroskaligen Kupferoxidpartikeln (CuO NP, CuO MP) wurde bisher nur qualitativ oder mit unzureichend evaluierten Methoden untersucht. Die Quantifizierung der Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung von CuO NP und CuO MP sind von großem Interesse, da die Partikel ein Beispiel für die - bei identischer Massendosis - stärkere Toxizität von nano- gegenüber mikroskaligen Partikeln darstellen.

Als Voraussetzung für die Zellkulturuntersuchungen wurden CuO NP und CuO MP ausführlich physikochemisch charakterisiert (Kapitel 5.1). Im Anschluss erfolgte die Evaluierung der verwendeten Methoden in Hinblick auf die Eignung für die Untersuchung von CuO NP und CuO MP. Die optimierten Methoden wurden anschließend zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit und intrazellulären Verteilung sowie der Zyto- und Genotoxizität appliziert (Kapitel 5.2). Als Endpunkte wurden Zytotoxizität, Apoptose, DNA-Schäden, auch auf chromosomaler Ebene, sowie die Untersuchung des Einflusses auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung, einem in die DNA-Reparatur involvierten Prozess, gewählt.

Die physikochemische Charakterisierung von Partikeln spielt eine Schlüsselrolle in der Untersuchung des toxischen Potentials von Partikeln. Sie dient als Grundlage der Interpretation von Ergebnissen aus den Zellkulturuntersuchungen und macht unterschiedliche Studien vergleichbar. Da sowohl die Synthese als auch die Lagerung die Eigenschaften von Partikeln verändern können, ist es unerlässlich, die Partikel zeitnah zu den eigenen Untersuchungen zu charakterisieren und die Herstellerangaben zu überprüfen. Die eigenen Untersuchungen belegen die hohe Reinheit sowie die elementare Zusammensetzung der kristallinen und endotoxinfreien Partikel. Die annähernd kugelförmigen CuO NP wiesen mit 20 nm bis 200 nm eine einheitlichere Größe auf als die unregelmäßig geformten CuO MP, deren Partikelgröße von 500 nm bis 10 µm reichte. Die spezifische Oberfläche der CuO NP war pro Masse 23-fach größer als die der CuO MP. Aufgrund einer eingeschränkten Aussagefähigkeit der Ergebnisse aus der Charakterisierung der pulverförmigen CuO NP und CuO MP für Zellkulturuntersuchungen, wurde das Verhalten der Partikel u.a. in wässrigen Modellflüssigkeiten und in dem Zellkulturmedium DMEM mit

verschiedenen Anteilen an FKS untersucht. Der Vergleich der elektronenmikroskopisch bestimmten Partikelgröße mit dem hydrodynamischen Radius der Partikel in Suspension erlaubte Rückschlüsse auf das Agglomerationsverhalten der Partikel in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Suspensionsmittels. Während CuO MP aufgrund rascher Sedimentation von einer adäquaten Analyse mit DLS ausgeschlossen wurden, belegen die Daten für CuO NP die Existenz von im Mittel 488 nm (hydrodynamischer Radius) großen Agglomeraten in Wasser. Deutlich kleinere Agglomerate deren hydrodynamische Radien im Mittel 146 nm bis 205 nm betrugen wurden in DMEM ohne FKS sowie nach Zusatz von 5% oder 10% FKS zu DMEM beobachtet. DMEM ohne und mit 5% oder 10% FKS als Suspensionsmittel vereinheitlichte auch das ermittelte Zetapotential - das vor allem zur Prognose der Suspensionsstabilität dient - auf Werte um die -13 mV. In Wasser stieg das Zetapotential der CuO NP konzentrationsabhängig auf bis zu +20 mV. Da keine der Suspensionen ein Zetapotential von kleiner -30 mV oder größer +30 mV aufwies, wurden sie als instabil eingestuft. Ferner veränderten weder CuO NP noch CuO MP den pH-Wert von Wasser oder Zellkulturmedium, während CuCl₂ ihn in Wasser um 1,5 Einheiten absenkte. Zusammengefasst belegen die Daten der physikochemischen Charakterisierung die Eignung der CuO NP und CuO MP für die Zellkulturversuche.

Zellkulturbasierte Methoden dienen der raschen ersten Einschätzung des toxischen Potentials einer Substanz sowie der Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen. Allerdings wurde im Zusammenhang mit Nanomaterialien bereits mehrfach über Artefakte berichtet, insbesondere bei der Verwendung von kolorimetrischen oder enzymatischen Testsystemen. Zunächst wurden daher die Testsysteme in Hinblick auf mögliche Störungen durch die kupferhaltigen Verbindungen evaluiert, wenn möglich optimiert oder für die Untersuchung verworfen. Die Ergebnisse belegen die Eignung der gewählten Testmethoden für die Untersuchung von CuO NP, CuO MP oder CuCl₂. Lediglich die häufig zur Zytotoxizitätsbestimmung verwendete Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes WST-8 wurde stark durch Kupferionen gestört. Daher wurde diese Methode verworfen und hier, erstmals für die Untersuchung von CuO NP und CuO MP, die störungsarme Methode der Koloniebildungsfähigkeit verwendet.

Die Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen sind in Tabelle 8 übersichtlich dargestellt. Die Daten belegen eine stark ausgeprägte Zytotoxizität von CuO NP und CuCl₂ in A549 und HeLa S3-Zellen, während CuO MP nicht zytotoxisch waren. Um den Mechanismus der ausgeprägten Zytotoxizität näher einzugrenzen, wurde ermittelt, ob apoptotische Zellen, die durch eine Vielzahl von morphologischen, molekularen und biochemischen Charakteristiken charakterisiert sind, detektierbar waren. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Beeinflussung der normalen Zellzyklusverteilung von A549-Zellen anhand eines messbaren Anteils spät-

apoptotischer Zellen mit subdiploider DNA (SubG1-Peak) (6%) sowie eine Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern durch CuO NP ermittelt.

Tabelle 8: Vergleich der Toxizität, Genotoxizität und Bioverfügbarkeit von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ nach 24 h Inkubation. -: kein Effekt; +: schwacher Effekt; ++: mittlerer Effekt; +++: starker Effekt. In Klammern angegeben ist die mit 100% kalkulierte Löslichkeit von CuCl₂ in den verwendeten Suspensionsmittel und der aufgrund der sehr hohen Standardabweichung nicht interpretierbare Kupfergehalt von CuO MP in der löslichen Fraktion des Zytoplasmas von A549-Zellen.

Endpunkt	CuO NP	CuO MP	CuCl ₂
Zytotoxizität (Zellzahl, Koloniebildungsfähigkeit)	+++	-	+++
SubG1-Peak	+	-	-
AIF	+	-	-
Caspase-Aktivität	-	-	-
Induktion von DNA-Strangbrüchen	+++	-	-
Verstärkung H ₂ O ₂ -induzierter DNA-Strangbrüche	+++	+++	+++
Mikrokerne	+	-	-
Hemmung der Poly(ADP-ribosyl)ierung	+++	+++	+++
Löslichkeit H ₂ O	++	+	(+++)
Löslichkeit PBS	++	+	(+++)
Löslichkeit AAF	++	+	(+++)
Löslichkeit ALF	+++	+	(+++)
Löslichkeit DMEM ohne FKS	++	+	(+++)
Löslichkeit DMEM mit 10% FKS	++	+	(+++)
Bioverfügbarkeit Zellkern	+++	++	+
Bioverfügbarkeit Zytosol	++	(+++)	++

Im Gegensatz dazu zeigten CuO MP und CuCl₂ keine apoptotischen Effekte in A549-Zellen. Die Daten zur AIF-Translokation nach Behandlung mit CuO NP stützen frühere Untersuchungen zur Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials von A549-Zellen, die durch CuO NP stärker ausgeprägt war als durch CuO MP. Die Störung des mitochondrialen Membranpotentials ist eine Voraussetzung für die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie AIF aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol. Insgesamt belegen die Ergebnisse deutlich die Induktion von Apoptose durch CuO NP und die Abwesenheit apoptotischer Effekt durch CuO MP und CuCl₂.

Um die Genotoxizität der drei Kupferverbindungen zu untersuchen und zu vergleichen, wurden vier Endpunkte herangezogen. Zuerst wurde das Potenzial zur Induktion von DNA-Strangbrüchen untersucht. In einem zweiten Ansatz wurde die Verstärkung von DNA-Strangbrüchen unter pro-oxidativen Bedingungen, d.h. erhöhten Konzentrationen an H₂O₂, untersucht. Drittens wurde die

Induktion von Mikrokernen als Maß für chromosomale Schäden ermittelt. Zuletzt wurde der Einfluss der drei Verbindungen auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung untersucht, da eine Inhibierung dieser Reaktion durch niedrige Konzentrationen an wasserlöslichem Kupfer bereits gezeigt wurde.

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CuO NP und CuO MP wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals mit Hilfe der Alkalischen Entwindung quantifiziert. Die Quantifizierung sowie die störungsfreie Eignung für die Untersuchung von partikulären Materialien sind wesentliche Vorteile der Alkalischen Entwindung. Durch den systematischen und vergleichenden Ansatz konnten deutliche Unterschiede in der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ beobachtet werden. Ohne H₂O₂-Behandlung zeigte allein CuO NP eine signifikante Induktion von DNA-Strangbrüchen in HeLa S₃-Zellen. Als Ursache kommt die bereits bekannte erhöhte Generierung von reaktiven ROS durch CuO NP in Frage. Bezüglich der ausbleibenden Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CuCl₂ bestätigen die Daten frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe; durch wasserlösliches CuSO₄ induzierte DNA-Strangbrüche wurden von den Autoren erst bei zytotoxischen Konzentrationen von $\geq 300 \mu\text{M}$ beobachtet.

Unter den pro-oxidativen Bedingungen einer Koinkubation der Kupferverbindungen mit H₂O₂ wurden - unabhängig von der kupferhaltigen Substanz - konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche festgestellt. Den stärksten Effekt zeigten wiederum CuO NP. Die erhöhte Anzahl an H₂O₂-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen wurde erstmalig quantifiziert; sie könnte auf eine Reaktion des H₂O₂ mit redoxaktiven Kupferionen zurückzuführen sein. Durch Fenton-ähnliche Reaktionen sind Kupferionen in der Lage, Hydroxyl-Radikale zu bilden und zelluläre Makromoleküle wie die DNA zu schädigen.

Permanente Veränderungen auf chromosomaler Ebene lassen sich mit Hilfe des sogenannten Mikrokerntests feststellen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine durchflusszytometrische Methode verwendet, um die Anzahl der durch CuO NP, CuO MP und CuCl₂ induzierten Mikrokerne zu ermitteln. CuO NP verdoppelten die Anzahl der Mikrokerne im Vergleich zu Kontrollzellen; dies weist auf einen genotoxischen Effekt hin, während CuO MP und CuCl₂ die Anzahl unbeeinflusst ließen. Als Wirkmechanismus kommen durch oxidativen Stress ausgelöste DNA-Strangbrüche in Frage. Ferner könnten Nanopartikel aufgrund ihrer Größe während der Mitose auch direkt mit Mikrotubuli oder dem Spindelapparat reagieren.

Ein indirekt genotoxischer Effekt der Kupferverbindungen wurde auf molekularer Ebene anhand des in die BER und SSBR involvierten Mechanismus der Poly(ADP-Ribosyl)ierung untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen belegen zum ersten Mal die konzentrationsabhängige Inhibierung der H₂O₂-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch CuO NP und CuO MP. Die Verminderung des Ausmaßes an Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch wasserlösliches CuSO₄ wurde

bereits in einer früheren Arbeit gezeigt und hier für CuCl_2 bestätigt. Der Effekt begann für alle drei Substanzen bereits bei der niedrigsten untersuchten Konzentration und wies höchste Signifikanz bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen auf, wobei die Restaktivität durch CuO NP am stärksten abgesenkt wurde. Das Enzym PARP-1 verfügt über drei Zink-bindende Domänen, von denen zwei für die Erkennung von DNA-Strangbrüchen essenziell sind. Zink wird darin u.a. von der thiolhaltigen Aminosäure Cystein komplexiert. Die Thiolgruppe bietet einen empfindlichen Angriffspunkt für die Oxidation durch redox-aktive Kupferionen. Die Störung der Zink-Komplexierung könnte daher die DNA-Bindungsfähigkeit des Enzyms PARP-1 stören, die Poly(ADP-Ribosyl)ierung hemmen und somit indirekt genotoxisch wirken. Ferner könnte eine reduzierte Anzahl an DNA-Strangbrüchen PARP-1 in geringerem Ausmaß aktivieren und hätte somit weniger Poly(ADP-ribosyl)ierung zur Folge. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da alle eingesetzten Kupferverbindungen, die Anzahl an H_2O_2 -induzierten DNA-Strangbrüchen erhöhten. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist im untersuchten Konzentrationsbereich nicht komplett inhibiert. Allerdings kann auch eine teilweise Inhibierung zur genomischen Stabilität beitragen. Zusammengefasst weisen die Daten auf ein deutliches genotoxisches Potenzial von CuO NP hin. Die Unterschiede der Zyto- und Genotoxizität von CuO NP, CuO MP und CuCl_2 könnten durch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit verursacht sein. Als relevante Parameter kommen die extra- und intrazelluläre Löslichkeit sowie die Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung von Kupferionen in Frage.

Neben den physikochemischen Eigenschaften der Partikel wie Größe, Oberfläche und elementare Zusammensetzung hängt die Löslichkeit vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Suspensionsmittels ab. In der vorliegenden Arbeit wurde die Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in wässrigen Suspensionsmitteln einfacher bis komplexer Zusammensetzung und bei neutralem oder saurem pH-Wert untersucht. In allen Suspensionsmitteln und zu jedem Zeitpunkt wurde eine stärkere Löslichkeit von CuO NP im Vergleich zu CuO MP festgestellt. Der stärkste Löslichkeitsunterschied zeigte sich bei saurem pH-Wert sowie im Zellkulturmedium DMEM. Hier verstärkte der Zusatz von FKS die Löslichkeit.

Die zelluläre Aufnahme von CuO NP wurde bereits mehrfach mit elektronenmikroskopischen Methoden beobachtet; bisher fehlte allerdings eine artefaktfreie Quantifizierung der intrazellulären Kupferionenkonzentration. Ein wichtiger Umstand, der die Gefahr eines Überbefundes birgt, ist die Verschleppung von an zellulären Membranen adhärierenden Partikeln. Daher wurde in der vorliegenden Studie ein Ansatz gewählt, der nur das an die lösliche Fraktion des Zellkerns oder Zytoplasmas gebundene Kupfer erfasst. Die Methode wurde hier erstmals mit CuO NP und CuO MP angewendet. Dazu wurden die Zellen nach der Inkubation lysiert und die lösliche Fraktion des Zytoplasmas isoliert, bevor die Zellkerne lysiert und deren lösliche Fraktion

isoliert wurde. Die Behandlung mit CuO NP und CuCl₂ führte zu einer etwa gleich starken Kupferakkumulation in der zytoplasmatischen Fraktion von A549-Zellen. In der löslichen Fraktion des Kerns überwog die Akkumulation nach Inkubation mit CuO NP die von CuO MP und CuCl₂. Die Ergebnisse für CuCl₂ im Zellkern deuten auf eine homöostatisch regulierte Aufnahme hin, da der Kupfergehalt nur eine geringe Konzentrationsabhängigkeit aufwies und mit Zunahme der extrazellulären Konzentration tendenziell abnahm. Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubation mit CuO NP ein deutlich höherer Kupfergehalt in der löslichen Zellkernfraktion ermittelt. Da CuO NP in DMEM mit 10% FKS zu 44% gelöst war, unterliegt es teilweise der für Kupferionen typischen Homöostase; allerdings wird der ungelöste Teil der CuO NP und CuO MP auch endozytiert.

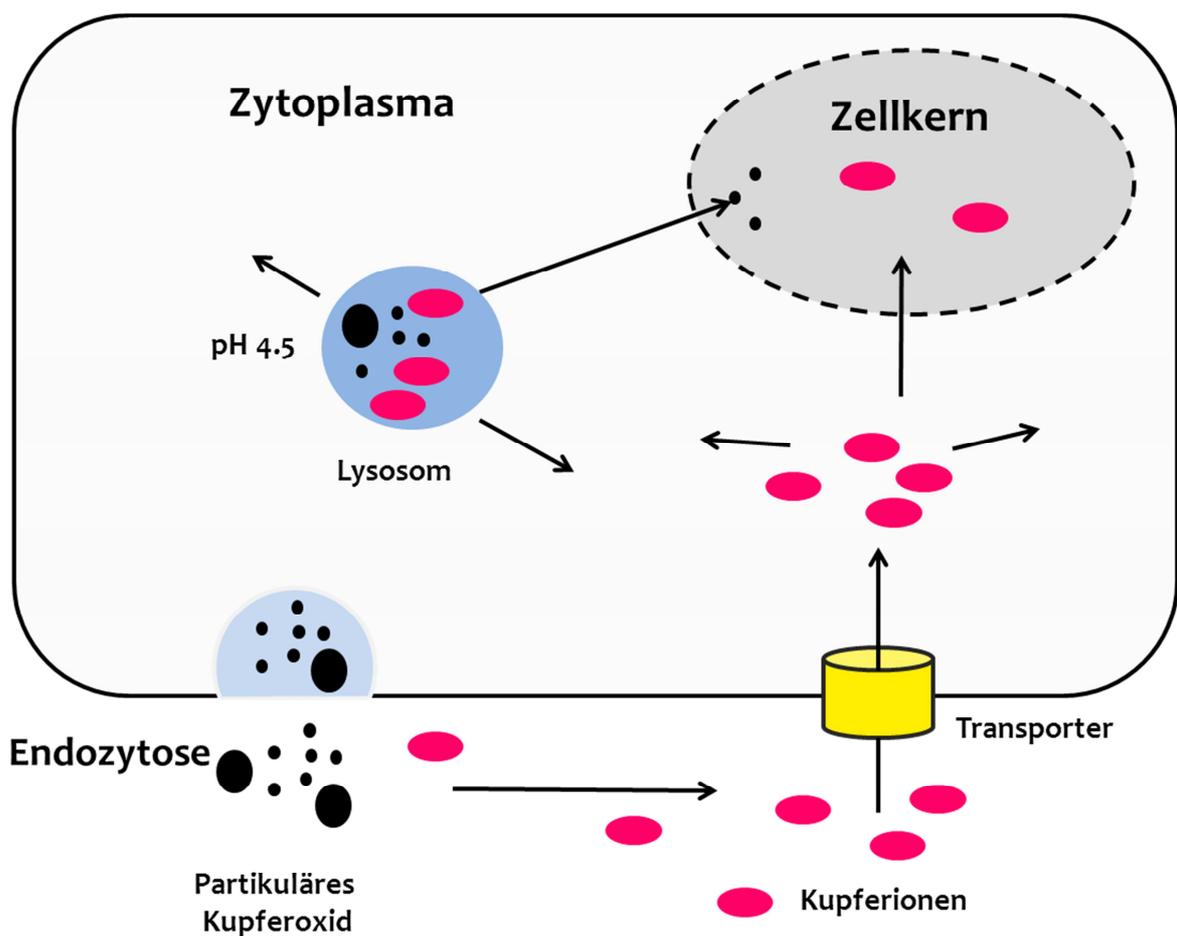


Abbildung 27: Aufnahme von löslichen Kupferionen und partikulärem Kupferoxid in eine Zelle. Extrazellulär gelöste Kupferionen werden über in der Zellmembran gelegene spezifische Transporter in die Zelle aufgenommen. Der ungelöste Anteil partikulären Kupferoxids kann endozytiert werden. Das entstehende Endosom wird durch Fusion mit Lysosomen angesäuert, wodurch sich Kupferionen aus den Partikeln lösen. Dadurch können im Zytoplasma und im Zellkern hohe Kupferionenkonzentrationen erreicht werden.

Dadurch könnten Kupferionen im sauren Milieu der Lysosomen freigesetzt werden und vermehrt in den Zellkern gelangen. Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zur zeitabhängigen Löslichkeit von CuO NP bei saurem pH-Wert, wie er in Lysosomen vorherrscht,

ergaben eine vollständige Löslichkeit innerhalb der ersten zwei Stunden. Die räumliche Nähe CuO NP-haltiger Lysosomen zum Zellkern wurde bereits mit TEM beobachtet.

Die Vorgänge sind in Abbildung 27 noch einmal schematisch dargestellt. Zusammengefasst bieten die Resultate der physikochemischen Charakterisierung wichtige Informationen, um die Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen mit anderen Studien zu vergleichen. Wie in Tabelle 8 zusammenfassend dargestellt, wurde systematisch die Zytotoxizität und die direkte und indirekte Genotoxizität von CuO NP, CuO MP sowie wasserlöslichem CuCl₂ evaluiert und verglichen. Als relevante Parameter wurden ein Einfluss der Partikelgröße, der Löslichkeit sowie der Bioverfügbarkeit und intrazellulären Verteilung von Kupferionen diskutiert. Im Hinblick auf die Zytotoxizität scheinen die intrazellulären Kupfergehalte von geringerer Bedeutung zu sein; CuO MP ist nicht-toxisch, obwohl der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion des Kernplasmas höher als der des deutlich zytotoxischen CuCl₂ ist. CuO NP war am toxischsten und die einzige Verbindung, die Apoptose induzierte. Daher ist die hohe Zytotoxizität am wahrscheinlichsten verbunden mit Partikelcharakteristika wie der großen Oberfläche, die in hohem Maße intra- und extrazelluläre Redoxreaktionen katalysieren und somit zum Zelltod führen könnte.

Bezüglich der Genotoxizität scheint der Kupfergehalt des Zellkerns relevant zu sein. Der höchste wurde im Falle des CuO NP beobachtet; CuO NP war auch die einzige Verbindung die DNA-Strangbrüche in Abwesenheit von zusätzlichen H₂O₂ sowie Mikrokerne induzierte. Ferner inhibierte CuO NP die Poly(ADP-Ribosyl)ierung am stärksten.

Zusammengefasst scheinen unterschiedliche Eigenschaften die Zyto- und Genotoxizität von CuO NP zu beeinflussen; speziell die Bioverfügbarkeit von Kupferionen im Zellkern, die die zelluläre Kupferhomöostase übersteigt, könnte die genomische Stabilität vermindern.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AGILENT 2008. Agilent 85070E Dielectric Probe Kit 200 MHz to 50 GHz Technical Overview.
- AHAMED, M., SIDDIQUI, M. A., AKHTAR, M. J., AHMAD, I., PANT, A. B. & ALHADLAQ, H. A. 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 578-583.
- ALA, A., WALKER, A. P., ASHKAN, K., DOOLEY, J. S. & SCHILSKY, M. L. 2007. Wilson's disease. *The Lancet*, 369, 397-408.
- ALTHAUS, F. R. 1992. Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *Journal of Cell Science*, 102, 663-670.
- APPLEROT, G., LELLOUCHE, J., LIPOVSKY, A., NITZAN, Y., LUBART, R., GEDANKEN, A. & BANIN, E. 2012. Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. *Small*, 8, 3326-3337.
- ATSDR 2004. Toxicological Profile for Copper (Update). *Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, Georgia*.
- BEN-MOSHE, T., DROR, I. & BERKOWITZ, B. 2009. Oxidation of organic pollutants in aqueous solutions by nanosized copper oxide catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 85, 207-211.
- BERNTSEN, P., PARK, C., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., TSUDA, A., SAGER, T., MOLINA, R., DONAGHEY, T., ALENCAR, A., KASAHARA, D., ERICSSON, T., MILLET, E., SWENSON, J., TSCHUMPERLIN, D., BUTLER, J., BRAIN, J., FREDBERG, J., GEHR, P. & ZHOU, E. 2010. Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. *J R Soc Interface*, 7, (Suppl 3): 331-40.
- BERRIDGE, M. V., HERST, P. M. & TAN, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: EL-GEWELY, M. R. (ed.) *Biotechnology Annual Review*. Elsevier.
- BERTINATO, J. & L'ABBÉ, M. R. 2004. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 316-322.
- BOUCHARD, V. J., ROULEAU, M. & POIRIER, G. G. 2003. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology*, 31, 446-454.
- BRAYDICH-STOLLE, L., SCHAEUBLIN, N., MURDOCK, R., JIANG, J., BISWAS, P., SCHLAGER, J. & HUSSAIN, S. 2009. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 1361-1374.
- BROCHU, G., DUCHAINE, C., THIBEAULT, L., LAGUEUX, J., SHAH, G. M. & POIRIER, G. G. 1994. Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1219, 342-350.

- BRUNAUER, S., EMMETT, P. H. & TELLER, E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309-319.
- BRYCE, S. M., BEMIS, J. C., AVLASEVICH, S. L. & DERTINGER, S. D. 2007. In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. *Mutation research*, 630, 78-91.
- BULL, P. C., THOMAS, G. R., ROMMENS, J. M., FORBES, J. R. & COX, D. W. 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature genetics*, 5, 327-337.
- CANTON, I. & BATTAGLIA, G. 2012. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society reviews*, 41, 2718-2739.
- CAO, B. Q., MATSUMOTO, T., MATSUMOTO, M., HIGASHIHATA, M., NAKAMURA, D. & OKADA, T. 2009. ZnO Nanowalls Grown with High-Pressure PLD and Their Applications as Field Emitters and UV Detectors. *J. Phys. Chem. C*, 113, 10975-10980.
- CASEY, A., HERZOG, E., LYNG, F. M., BYRNE, H. J., CHAMBERS, G. & DAVOREN, M. 2008. Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicology letters*, 179, 78-84.
- CHANG, H., JWO, C. S., LO, C. H., TSUNG, T. T., KAO, M. J. & LIN, H. M. 2005. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 10, 128-132.
- CHANG, M.-H., LIU, H.-S. & TAI, C. Y. 2011. Preparation of copper oxide nanoparticles and its application in nanofluid. *Powder Technology*, 207, 378-386.
- CHELLY, J., TÜMER, Z., TØNNESEN, T., PETTERSON, A., ISHIKAWA-BRUSH, Y., TOMMERUP, N., HORN, N. & MONACO, A. P. 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature genetics*, 3, 14-19.
- CHITHRANI, B. D. & CHAN, W. C. W. 2007. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Letters*, 7, 1542-1550.
- CHO, W.-S., DUFFIN, R., THIELBEER, F., BRADLEY, M., MEGSON, I. L., MACNEE, W., POLAND, C. A., TRAN, C. L. & DONALDSON, K. 2012. Zeta Potential and Solubility to Toxic Ions as Mechanisms of Lung Inflammation Caused by Metal/Metal Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126, 469-477.
- CULOTTA, V. C., KLOMP, L. W. J., STRAIN, J., CASARENO, R. L. B., KREMS, B. & GITLIN, J. D. 1997. The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 23469-23472.
- DALE, D. C., BOXER, L. & LILES, W. C. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 112, 935-945.
- DAVIES, D. J. A. & BENNETT, B. G. 1985. Exposure of man to environmental copper — An exposure commitment assessment. *Science of The Total Environment*, 46, 215-227.

- DERJAGUIN, B. & LANDAU, L. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochimica*, 14, 633-662.
- DEY, K. K., KUMAR, A., SHANKER, R., DHAWAN, A., WAN, M., YADAV, R. R. & SRIVASTAVA, A. K. 2012. Growth morphologies, phase formation, optical & biological responses of nanostructures of CuO and their application as cooling fluid in high energy density devices. *RSC Advances*, 2, 1387-1403.
- DFG 2012. MAK- und BAT-Werte-Liste 2010, Mitteilung 48. *Wiley-VCH-Verlag GmbH, Weinheim*.
- DIN27687 2010. Nanotechnologien – Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte – Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen Beuth Verlag, Berlin, Deutschland.
- DOBROVOLSKAIA, M. A. & MCNEIL, S. E. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nano*, 2, 469-478.
- DONALDSON, K., STONE, V., TRAN, C. L., KREYLING, W. & BORM, P. J. A. 2004. Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61, 727-728.
- DUFFIN, R., TRAN, L., BROWN, D., STONE, V. & DONALDSON, K. 2007. Proinflammogenic Effects of Low-Toxicity and Metal Nanoparticles In Vivo and In Vitro: Highlighting the Role of Particle Surface Area and Surface Reactivity. *Inhalation Toxicology*, 19, 849-856.
- FENECH, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protocols*, 2, 1084-1104.
- GABBAY, J., BORKOW, G., MISHAL, J., MAGEN, E., ZATCOFF, R. & SHEMER-AVNI, Y. 2006. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. *Journal of Industrial Textiles*, 35, 323-335.
- GLERUM, D. M., SHTANKO, A. & TZAGOLOFF, A. 1996. Characterization of COX17, a Yeast Gene Involved in Copper Metabolism and Assembly of Cytochrome Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 14504-14509.
- GONZALEZ, L., LISON, D. & KIRSCH-VOLDERS, M. 2008. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology*, 2, 252-273.
- GOODMAN, C. M., MCCUSKER, C. D., YILMAZ, T. & ROTELLO, V. M. 2004. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry*, 15, 897-900.
- GORBET, M. B. & SEFTON, M. V. 2005. Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials*, 26, 6811-6817.
- GUO, L., MORRIS, D. G., LIU, X., VASLET, C., HURT, R. H. & KANE, A. B. 2007. Iron Bioavailability and Redox Activity in Diverse Carbon Nanotube Samples. *Chemistry of Materials*, 19, 3472-3478.
- HANAGATA, N., ZHUANG, F., CONNOLLY, S., LI, J., OGAWA, N. & XU, M. 2011. Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. *ACS Nano*, 5, 9326-38.
- HARTWIG, A. 2013. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 63-72.

- HARTWIG, A., DALLY, H. & SCHLEPEGRELL, R. 1996. Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*, 88, 85-90.
- HARTWIG, A., KLYSZCZ-NASKO, H., SCHLEPEGRELL, R. & BEYERSMANN, D. 1993 Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis* 14 107-112
- HARTWIG, A., PELZER, A., ASMUSS, M. & BÜRKLE, A. 2003. Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. *International Journal of Cancer*, 104, 1-6.
- HAYNES, W. M. 2011-2012. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 92nd edition*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- HUANG, C.-C., HWU, J. R., SU, W.-C., SHIEH, D.-B., TZENG, Y. & YEH, C.-S. 2006. Surfactant-assisted hollowing of Cu nanoparticles involving halide-induced corrosion–oxidation processes. *Chemistry – A European Journal*, 12, 3805-3810.
- HULTBERG, B., ANDERSSON, A. & ISAKSSON, A. 1997. Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures. *Toxicology*, 117, 89-97.
- JACHIMSKA, B., WASILEWSKA, M. & ADAMCZYK, Z. 2008. Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements. *Langmuir*, 24, 6866-6872.
- JIANG, J., OBERDÖRSTER, G. & BISWAS, P. 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 77-89.
- JOMOVA, K., BAROS, S. & VALKO, M. 2012. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Metal Chemistry*, 37, 127-134.
- KARLSSON, H., GUSTAFSSON, J., CRONHOLM, P. & MÖLLER, L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*, 188, 112-118.
- KARLSSON, H. L., CRONHOLM, P., GUSTAFSSON, J. & MÖLLER, L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 1726-1732.
- KAWAKAMI, M., INAGAWA, R., HOSOKAWA, T., SAITO, T. & KURASAKI, M. 2008. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46, 2157-2164.
- KAWAMITSU, H., HOSHINO, H., OKADA, H., MIWA, M., MOMOI, H. & SUGIMURA, T. 1984. Monoclonal antibodies to poly(adenosine diphosphate ribose) recognize different structures. *Biochemistry*, 23, 3771-3777.
- KIRSCH-VOLDERS, M., PLAS, G., ELHAJOUJI, A., LUKAMOWICZ, M., GONZALEZ, L., VANDE LOOCK, K. & DECORDER, I. 2011. *The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance*,

protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, Heidelberg, Deutschland, Springer.

- KLOMP, L. W. J., LIN, S.-J., S.YUAN, D., KLAUSNER, R. D., CULOTTA, V. C. & GITLIN, J. D. 1997. Identification and Functional Expression of HAH1, a Novel Human Gene Involved in Copper Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 9221-9226.
- KOCBACH, A., TOTLANDSDAL, A. I., LÅG, M., REFSNES, M. & SCHWARZE, P. E. 2008. Differential binding of cytokines to environmentally relevant particles: A possible source for misinterpretation of in vitro results? *Toxicology letters*, 176, 131-137.
- KRISHNAKUMAR, R. & KRAUS, W. L. 2010. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell*, 39, 8-24.
- KROLL, A., PILLUKAT, M., HAHN, D. & SCHNEKENBURGER, J. 2012. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of Toxicology*, 86, 1123-1136.
- KROLL, A., PILLUKAT, M. H., HAHN, D. & SCHNEKENBURGER, J. 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 370-377.
- LA FONTAINE, S. & MERCER, J. F. B. 2007. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463, 149-167.
- LADELFE, P. C., CZANDERNA, A. W. & BIEGEN, J. R. 1972. Optical constants of cupric oxide from 450 to 800 m μ . *Thin Solid Films*, 10, 403-411.
- LANGELIER, M.-F., SERVENT, K. M., ROGERS, E. E. & PASCAL, J. M. 2008. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 4105-4114.
- LARIN, D., MEKIOS, C., DAS, K., ROSS, B., YANG, A.-S. & GILLIAM, T. C. 1999. Characterization of the Interaction between the Wilson and Menkes Disease Proteins and the Cytoplasmic Copper Chaperone, HAH1p. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 28497-28504.
- LIMBACH, L. K., WICK, P., MANSER, P., GRASS, R. N., BRUININK, A. & STARK, W. J. 2007. Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. *Environmental Science & Technology*, 41, 4158-4163.
- LINDER, M. C. 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475, 141-152.
- LINDER, M. C. 2012. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733, 83-91.
- LIU, X., GUREL, V., MORRIS, D., MURRAY, D. W., ZHITKOVICH, A., KANE, A. B. & HURT, R. H. 2007. Bioavailability of Nickel in Single-Wall Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*, 19, 2790-2796.
- LYNCH, I. & DAWSON, K. A. 2008. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 3, 40-47.

- MALVERN 2012. Zetasizer Nano Series User Manual. MAN0485 Issue 1.0. *Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, UK.*
- MENKES, J. H., ALTER, M., STEIGLEDER, G. K., WEAKLEY, D. R. & SUNG, J. H. 1962. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics*, 29, 764-779.
- MIDANDER, K., CRONHOLM, P., KARLSSON, H. L., ELIHN, K., MÖLLER, L., LEYGRAF, C. & WALLINDER, I. O. 2009. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: A cross-disciplinary study. *Small*, 5, 389-399.
- MIDANDER, K., WALLINDER, I. O. & LEYGRAF, C. 2007. In vitro studies of copper release from powder particles in synthetic biological media. *Environmental Pollution*, 145, 51-59.
- MONOPOLI, M. P., ABERG, C., SALVATI, A. & DAWSON, K. A. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano*, 7, 779-786.
- MONTEILLER, C., TRAN, L., MACNEE, W., FAUX, S., JONES, A., MILLER, B. & DONALDSON, K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occupational and Environmental Medicine*, 64, 609-615.
- MUÑOZ, A. & COSTA, M. 2012. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 260, 1-16.
- MURDOCK, R. C., BRAYDICH-STOLLE, L., SCHRAND, A. M., SCHLAGER, J. J. & HUSSAIN, S. M. 2008. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences*, 101, 239-253.
- NEL, A. E., MADLER, L., VELEGOL, D., XIA, T., HOEK, E. M. V., SOMASUNDARAN, P., KLAESSIG, F., CASTRANOVA, V. & THOMPSON, M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, 8, 543-557.
- NORBERG, E., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. 2010. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 95-100.
- OVERDÖRSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K., CASTRANOVA, V., FITZPATRICK, J., AUSMAN, K., CARTER, J., KARN, B., KREYLING, W., LAI, D., OLIN, S., MONTEIRO-RIVIERE, N., WARHEIT, D. & YANG, H. 2005a. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2, 1-35.
- OVERDÖRSTER, G., OVERDÖRSTER, E. & OVERDÖRSTER, J. 2005b. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental health perspectives*, 113, 823-839.
- OLLER, A. R., COSTA, M. & OVERDÖRSTER, G. 1997. Carcinogenicity Assessment of Selected Nickel Compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143, 152-166.

- OSTRAKHOVITCH, E. A. & CHERIAN, M. G. 2005. Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 10, 111-121.
- PATTY, P. J. & FRISKEN, B. J. 2006. *Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data*, Washington, DC, ETATS-UNIS, Optical Society of America.
- PERREAULT, F., MELEGARI, S. P., DA COSTA, C. H., DE OLIVEIRA FRANCO ROSSETTO, A. L., POPOVIC, R. & MATIAS, W. G. 2012. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. *Science of The Total Environment*, 441, 117-124.
- PIRET, J.-P., VANKONINGSLOO, S., MEJIA, J., NOËL, F., BOILAN, E., LAMBINON, F., ZOUBOULIS, C. C., MASEREEL, B., LUCAS, S., SAOUT, C. & TOUSSAINT, O. 2012. Differential toxicity of copper (II) oxide nanoparticles of similar hydrodynamic diameter on human differentiated intestinal Caco-2 cell monolayers is correlated in part to copper release and shape. *Nanotoxicology*, 6, 789-803.
- POURAHMAD, J. & O'BRIEN, P. J. 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology*, 143, 263-273.
- PROHASKA, J. R. 1990. Biochemical changes in copper deficiency. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1, 452-461.
- PUCK, T. T., MARCUS, P. I. & CIECIURA, S. J. 1956 Clonal growth of mammalian cells in vitro: growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "feeder" layer *The Journal of Experimental Medicine* 103 273-284
- RAE, T. D., SCHMIDT, P. J., PUF AHL, R. A., CULOTTA, V. C. & V. O'HALLORAN, T. 1999 Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase *Science* 284 805-808
- RAHMAN, Q., LOHANI, M., DOPP, E., PEMSEL, H., JONAS, L., WEISS, D. G. & SCHIFFMANN, D. 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental health perspectives*, 110, 797-800.
- RALLE, M., HUSTER, D., VOGT, S., SCHIRRMEISTER, W., BURKHEAD, J. L., CAPPS, T. R., GRAY, L., LAI, B., MARYON, E. & LUTSENKO, S. 2010. Wilson disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 285, 30875-30883.
- RANA, S. V. S. 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22, 262-284.
- REDDY, V. P., KUMAR, A. V., SWAPNA, K. & RAO, K. R. 2009. Copper oxide nanoparticle-catalyzed coupling of diaryl diselenide with aryl halides under ligand-free conditions. *Organic Letters*, 11, 951-953.
- REN, G., HU, D., CHENG, E. W. C., VARGAS-REUS, M. A., REIP, P. & ALLAKER, R. P. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 587-590.

- RIEDEL, E. 2004. *Allgemeine und Anorganische Chemie*, De Gruyter, Berlin, Deutschland, pp xxx-yyy.
- ROEBBEN, G., RAMIREZ-GARCIA, S., HACKLEY, V. A., ROESSLEIN, M., KLAESSIG, F., KESTENS, V., LYNCH, I., GARNER, C. M., RAWLE, A., ELDER, A., COLVIN, V. L., KREYLING, W., KRUG, H. F., LEWICKA, Z. A., MCNEIL, S., NEL, A., PATRI, A., WICK, P., WIESNER, M., XIA, T., OBERDÖRSTER, G. & DAWSON, K. A. 2011. Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 2675-2687
- RÖMPP 2006. G. Eisenbrand, P. Schreier (Hrsg.). *RÖMPP Lexikon der Lebensmittelchemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp. 132-133.
- SAYES, C. M. & WARHEIT, D. B. 2009. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1, 660-670.
- SCHAEUBLIN, N. M., BRAYDICH-STOLLE, L. K., SCHRAND, A. M., MILLER, J. M., HUTCHISON, J., SCHLAGER, J. J. & HUSSAIN, S. M. 2011. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*, 3, 410-420.
- SCHULZE, C., KROLL, A., LEHR, C.-M., SCHÄFER, U. F., BECKER, K., SCHNEKENBURGER, J., SCHULZE ISFORT, C., LANDSIEDEL, R. & WOHLLEBEN, W. 2008. Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2, 51-61.
- SCHWERDTLE, T., HAMANN, I., JAHNKE, G., WALTER, I., RICHTER, C., PARSONS, J. L., DIANOV, G. L. & HARTWIG, A. 2007. Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 201-210.
- SCHWERDTLE, T. & HARTWIG, A. 2006. Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 37, 521-525.
- SEIFFERT, J. M., BARADEZ, M.-O., NISCHWITZ, V., LEKISHVILI, T., GOENAGA-INFANTE, H. & MARSHALL, D. 2011. Dynamic monitoring of metal oxide nanoparticle toxicity by label free impedance sensing. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 140-152.
- SHAH, I. D., RUZZI, P. L. & SCHLUTER, R. B. 1978. Decomposition of cupric oxide using a reducing scavenger. *United States Patent*, 4,080,430.
- SHI, Y., YADAV, S., WANG, F. & WANG, H. 2010. Endotoxin Promotes Adverse Effects of Amorphous Silica Nanoparticles on Lung Epithelial Cells in Vitro. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 73, 748-756.
- SONG, M. F., LI, Y. S., KASAI, H. & KAWAI, K. 2012. Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *J Clin Biochem Nutr*, 50, 211-6.
- STONE, V., JOHNSTON, H. & SCHINS, R. P. F. 2009. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*, 39, 613-626.
- STOPFORD, W., TURNER, J., CAPPELLINI, D. & BROCK, T. 2003. Bioaccessibility testing of cobalt compounds. *Journal of environmental monitoring : JEM*, 5, 675-680.

- STUDER, A. M., LIMBACH, L. K., VAN DUC, L., KRUMEICH, F., ATHANASSIOU, E. K., GERBER, L. C., MOCH, H. & STARK, W. J. 2010. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology letters*, 197, 169-174.
- SUZUKI, M. & GITLIN, J., D. 1999. Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatrics International*, 41, 436-442.
- TANZI, R. E., PETRUKHIN, K., CHERNOV, I., PELLEQUER, J. L., WASCO, W., ROSS, B., ROMANO, D. M., PARANO, E., PAVONE, L. & BRZUSTOWICZ, L. M. 1993. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature genetics*, 5, 344-350.
- TOPPAZZINI, M., COSLOVI, A., BOSCHELLE, M., MARSICH, E., BENINCASA, M., GENNARO, R. & PAOLETTI, S. 2011. Can the interaction between the antimicrobial peptide LL-37 and alginate be exploited for the formulation of new biomaterials with antimicrobial properties? *Carbohydrate Polymers*, 83, 578-585.
- TÜMER, Z. & MØLLER, L. B. 2010. Menkes disease. *European journal of human genetics : EJHG*, 18, 511-518.
- TURNLUND, J. R. 1998. Human whole-body copper metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 960S-964S.
- VALLHOV, H., QIN, J., JOHANSSON, S. M., AHLBORG, N., MUHAMMED, M. A., SCHEYNIUS, A. & GABRIELSSON, S. 2006. The Importance of an Endotoxin-Free Environment during the Production of Nanoparticles Used in Medical Applications. *Nano Letters*, 6, 1682-1686.
- VERWEY, E. J. W. 1947. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 51, 631-636.
- VULPE, C., LEVINSON, B., WHITNEY, S., PACKMAN, S. & GITSCHIER, J. 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature genetics*, 3, 7-13.
- WANG, Y., HODGKINSON, V., ZHU, S., WEISMAN, G. A. & PETRIS, M. J. 2011. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2, 129-137.
- WANG, Z., LI, N., ZHAO, J., WHITE, J. C., QU, P. & XING, B. 2012. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: Cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 1512-1521.
- WARHEIT, D. B. 2008. How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicological Sciences*, 101, 183-185.
- WEIBEL, A., BOUCHET, R., BOULC'H, F. & KNAUTH, P. 2005. The big problem of small particles: A comparison of methods for determination of particle size in nanocrystalline anatase powders. *Chem. Mater.*, 17, 2378-2385.
- WILSON, S. A. K. & LOND, M. R. C. P. 1912. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*, IV, 295-509.

- WOODHOUSE, B. C. & DIANOV, G. L. 2008. Poly ADP-ribose polymerase-1: An international molecule of mystery. *DNA Repair*, 7, 1077-1086.
- WÖRLE-KNIRSCH, J. M., PULSKAMP, K. & KRUG, H. F. 2006. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Letters*, 6, 1261-1268.
- ZIETZ, B. 2007. Kupfer. In: Dunkelberg, H., Gebel, T., Hartwig, A. (Hrsg.). *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie*, Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KgaA, Weinheim, Deutschland, pp 2163-2202.

8 ANHANG

8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

10H	Murine Myelomzelllinie
A549	Humane Adenokarzinomzelllinie
AAF	Künstliche alveolare Flüssigkeit
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AIF	Apoptosis inducing factor
ALF	Künstliche lysosomale Flüssigkeit
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	Copper-transporting ATPase 1/ Menkes Protein
ATP7B	Copper-transporting ATPase 2/ Wilson Protein
ATOX 1	Chaperon für ATP7A und ATP7BB
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BET	Brunauer-Emmett-Teller Analyse
Bp	Basenpaare
Caspase	Cystein aspartic acid-specific protease
CAT	Katalase
CCS	Chaperon für Superoxiddismutase
COX	Cytochrom c-Oxidase
COX17	Chaperon für Cytochrom c-Oxidase
CuCl ₂	Kupfer (II)chlorid
CuO MP	Kupferoxidmikropartikel
CuO NP	Kupferoxidnanopartikel
d	Tag
D	Dimension
DAPI	3',6-Diamidino-2-phenylindol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
ds	Doppelsträngig
DVLO	Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek Theorie

η	Viskosität
EDS	Energiedispersive Röntgenspektrometrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Ethidiummonoazid
es	Einzelsträngig
EU	Endotoxin Units
eV	Elektronenvolt
F	Fluoreszenz
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit
g	Gravitation
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie
GHz	Gigahertz
GSH	Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
h	Stunde
hCTR 1	Human copper transporter 1
HD-PE	High Density Polyethylen
HeLa S3	Humane Epithelkarzinomzelllinie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
J	Joule
kV	Kilovolt
μM	Mikromolar ($\mu\text{mol/l}$)
M	Mol
MDA	Malondialdehyd
MHz	Megahertz
min	Minute
MT	Metallothionein
mV	Millivolt
nm	Nanometer
Ω	Ohm
PAR	Poly-(ADP-Ribosyl)ierung

PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
Pa·s	Einheit der Viskosität
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PdI	Polydispersitätsindex
PTFE	Polytetrafluorethylen
ρ	Massendichte
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SB	Strangbruch
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SSBR	Single strand break repair
SubG1-peak	Zellen die subdiploide DNA enthalten
τ	Schubspannung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
U	Units
UVC	Ultraviolette Strahlung (100 – 280 nm)
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatrium-Salz

8.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Roth (Karlsruhe, D)
Aktivkohle	Roth (Karlsruhe, D)
Albumin Fraktion V	Merck (Darmstadt, D)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bacillol	Roth (Karlsruhe, D)
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth (Karlsruhe, D)

Cell Counting Kit-8	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Citronensäure (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe, D)
Clenz-Lösung	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Coomassie Brilliantblau G 250	Merck (Darmstadt, D)
Coulter Isoton II Diluent	Beckman (Krefeld, D)
CuCl ₂	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
CuO < 5 µm	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
CuO Nanopowder	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DAPI-Färbelösung (CyStainDNA)	Partec (Münster, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe, D)
di-Natriumtartrat Dihydrat/ Brenztraubensäure, Natriumsalz	Roth (Karlsruhe, D)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe, D)
Di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe, D)
DMEM (mit und ohne Phenolrot)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
EDTA- di-Natriumsalz Dihydrat	Roth (Karlsruhe, D)
EMA	Invitrogen GmbH
Essigsäure 100%tig	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol, 96% vergällt	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FITC Conjugate goat anti-mouse IgG	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Formaldehyd (37%)	Roth (Karlsruhe, D)
Fötale Kälberserum	Invitrogen (Darmstadt, D)
Fötale Kälberserum	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblaulösung)	Roth (Karlsruhe, D)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, D)
Glycin	Roth (Karlsruhe, D)
HEPES	Roth (Karlsruhe, D)
Hybridoma SFM Medium	Invitrogen (Darmstadt, D)
Hydroxylapatit (high resolution)	Merck (Darmstadt, D)
Igepal CA 630 (NP-40)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Isoton II	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Kalibrierlösungen (pH 4, 7, 10)	Roth (Karlsruhe, D)
Kalium-di-hydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
LAL Reagent Water	Lonza

Lecithin	Roth (Karlsruhe, D)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Magnesiumchlorid (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe, D)
Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau, D)
MEM Amino Acids Solution (50X), liquid	Invitrogen (Darmstadt, D)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
n-Hexan	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumacetat Trihydrat	VWR International (Darmstadt, D)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (Feststoff)	Molekula (Taufkirchen, D)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumhydroxid (Pulver)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydroxid Maßlösung 1 N	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhypochlorit-Lösung	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Natriumlactat	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumsulfat	Roth (Karlsruhe, D)
NCTC-109 Medium (1X), liquid	Invitrogen (Darmstadt, D)
OptEIATM 555244 IL-8 Assay Kit	BD Biosciences (Heidelberg, D)
PageRuler Prestained Protein ladder	Fermentas (St. Leon- Rot, D)
Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau, D)
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phenylmethansulfonylfluorid	Roth (Karlsruhe, D)
Protein A Antibody Purification Kit	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Bradford-Reagenz)	BIO- RAD (München, D)
Reinigungslösung für Durchflusszytometer	Partec (Münster, Deutschland)
RNAse A	Roche
Saccharose	Roth (Karlsruhe, D)
Salpetersäure Supra Qualität, 69%	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure Maßlösung 1 N/ 0,1 N	Roth (Karlsruhe, D)
Schwefelsäure 2M	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
SDS 10% Lösung	Roth (Karlsruhe, D)
Sheeth Fluid	Partec (Münster, Deutschland)

Single Element AAS-Standardsolution Kupfer	Roth (Karlsruhe, D)
Staurosporin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Sterilium	Roth (Karlsruhe, D)
SYTOX Green	VWR International (Darmstadt, D)
Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
ToxinSensor TM Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	Genscript (Piscataway, USA)
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe, D)
Trichloressigsäure	Roth (Karlsruhe, D)
TRIS Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe, D)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe, D)
Trypsin 10 ×	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, D)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)
Wasserbadkonservierer	Roth (Karlsruhe, D)
Wasserstoffperoxid Supra Qualität, 31%	Roth (Karlsruhe, D)
Zitronensäure	Roth (Karlsruhe, D)

8.3 VERWENDETE ANTIKÖRPER

<i>Primärantikörper</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>
AIF	Kaninchen	polyclonal	
10H	Maus	monoclonal	

<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>
Cy3	Ziege	Anti-Kaninchen	
FITC	Ziege	Anti-Kaninchen	

8.4 LÖSUNGEN UND PUFFER

AAF (1 l) (Stopford et al., 2003)

- 0,0952 g Magnesiumchlorid, wasserfrei
 - 6,0193 g Natriumchlorid
 - 0,2982 g Kaliumchlorid
 - 0,1420 g di- Natriumhydrogenphosphat
 - 0,0710 g Natriumsulfat
 - 0,3676 g Calciumchlorid- Dihydrat
 - 0,9526 g Natriumacetat- Trihydrat
 - 2,6043 g Natriumhydrogencarbonat
 - 0,0970 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
 - 0,1000 g Lecithin
- ⇒ auf pH 7,4 einstellen

ALF (1 l) (Midander et al., 2007)

- 3,210 g Natriumchlorid
 - 6,000 g Natriumhydroxid
 - 20,800 g Citronensäure
 - 0,1285 g Calciumchlorid-Dihydrat
 - 0,0710 g di-Natriumhydrogenphosphat
 - 0,0390 g Natriumsulfat
 - 0,0476 g Magnesiumchlorid, wasserfrei
 - 0,0590 g Glycin
 - 0,0770 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
 - 0,0900 g Natriumtartrat-Dihydrat
 - 0,0850 g Natrimlactat
 - 0,0860 g Natriumpyruvat
- ⇒ auf pH 4,5 bis 5,0 einstellen

PBS

- 5,844 g Natriumchlorid
 - 0,335 g Kaliumchlorid
 - 0,993 g di-Natriumhydrogenphosphat
 - 0,408 g Kalium-di-hydrogenphosphat
- ⇒ auf pH 7,4 einstellen

PBS- EDTA (1 l)

- 5,844 g Natriumchlorid
 - 0,335 g Kaliumchlorid
 - 0,993 g di-Natriumhydrogenphosphat
 - 0,408 g Kalium-di-hydrogenphosphat
 - 0,200 g EDTA
- ⇒ auf pH 7,4 einstellen

Trypsin

Trypsin 10x in PBS-EDTA 1:10 verdünnen und sterilfiltrieren

8.5 VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platten, transparent	TPP (Trasadingen, CH)
Accuvetten	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Aluminiumhalter für Cryoröhrchen	Roth (Karlsruhe, D)
Capillary Cells, folded	Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, UK)
Cryoröhrchen	Biochrom (Berlin, D)
Cryoröhrchen mit Innengewinde	Roth (Karlsruhe, D)
Deckgläser Ø 12 mm	Roth (Karlsruhe, D)
Einmalspritzen, 1ml	Terumo (Vertrieb: Eschborn, D)
Einmalspritzen, 3 ml	Braun (Melsungen, D)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht D)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht D)
Glaspipetten (1,2, 5, 10, 20 ml)	Roth (Karlsruhe, D)
Küvetten, Polystyrol (10 × 10 × 45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Messkolben, PP, 50/ 100 ml	Roth (Karlsruhe, D)

Objektträger superfrost	Roth (Karlsruhe, D)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
pH-Indikatorstäbchen	Roth (Karlsruhe, D)
Pinzetten für Deckgläser	Roth (Karlsruhe, D)
Pipettencontainer	Roth (Karlsruhe, D)
Pipettenspitzen, 1-200 µl	Ratiolab (Dreieich, D)
Pipettenspitzen, 10 µl	Sarstedt (Nümbrecht D)
Pipettenspitzen, 100-1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht D)
Pipettenspitzen, 100-1000 µl	Brand (Wertheim, D)
Pipettenspitzen, 5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen, pyrogenfrei, 1000 µl	Biostep (Jahnsdorf, D)
Pipettenspitzen, pyrogenfrei, 200 µl	Biostep (Jahnsdorf, D)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel, 20 ml	Roth (Karlsruhe, D)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel, 50 ml	Roth (Karlsruhe, D)
Serologische Pipetten (5/ 10 ml)	Roth (Karlsruhe, D)
Spitzen für Multipette, 5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Spritzen, 3 ml	VWR International (Darmstadt, D)
Sterilfilter (500 ml), 0,2 µm, PES	VWR International (Darmstadt, D)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe, D)
Sterilindikatorband Heißluft	Roth (Karlsruhe, D)
Teflonmagnetrührkerne	Roth (Karlsruhe, D)
Vernichtungsbeutel	VWR International (Darmstadt, D)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe, D)
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturflaschen, 147,8 cm ²	TPP (Trasadingen, CH)

Zellkulturflaschen, 25 cm ²	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturschalen, 22,1 cm ² (Ø 9,6 cm)	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturschalen, 60,1 cm ² (Ø 6 cm)	TPP (Trasadingen, CH)
Zelluloseacetatspritzenfilter	VWR International (Darmstadt, D)
Zentrifugenröhrchen, 15 ml (120 x 17 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zentrifugenröhrchen, 50 ml (114 x 28 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, D)

8.6 VERWENDETE GERÄTE

Bezeichnung	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer Pinaccl 900T	Perkin Elmer (Rodgau, D)
Axio Imager Z2	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific (Langenselbold, D)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau, D)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold, D)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, D)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim, D)
Dielectric Probe Kit	Agilent Technologies (Böblingen, D)
Eppendorf Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Feinwaage BP 61S	Sartorius (Göttingen, D)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt, D)
Gas-Sicherheitsbrenner 1SCS micro	Roth (Karlsruhe, D)
Heizschüttler MKR 13	HLC-BioTech (Bovenden, D)
Heizschüttler SH 26	Cat (Staufen, D)
Heizschüttler TS- 100	peqlab (Erlangen, D)

ICP-MS 820-MS	Bruker Daltonics Inc. (Billerica, USA)
Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, CH)
LAS 3000	raytest (Straubenhardt, D)
Magnetrührer Variomag® Poly Komet	VWR International (Darmstadt, D)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, D)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mini Rocker MR-1	peqlab (Erlangen, D)
Multikanalpipette (30 – 300 µl)	Eppendorf (Hamburg, D)
Multipette®	Eppendorf (Hamburg, D)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim, D)
Pyknometer	VWR International (Darmstadt, D)
Refraktometer	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Rheometer Physica MCR 301	Anton Paar Germany GmbH (Ostfildern, D)
Rotator	Labinco B.V. (Bredastadt)
Sterilbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold, D)
Timer	Roth (Karlsruhe, D)
Ultrafeinwaage BP 61S	Sartorius (Göttingen, D)
Ultraschallspitze	Branson (Dietzenbach, D)
Vakuu System BVC21NT	Vakuubrand (Wertheim, D)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen, D)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Zellzählgerät Coulter Z2	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zetasizer Nano ZS, Nano Series	Malvern Industries (Herrenberg, Deutschland)

8.7 ERGÄNZENDE DATEN

8.7.1 ATOMABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

8.7.1.1 Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis-, die Erfassungs- und die Bestimmungsgrenze wurden nach der Leerwertmethode gemäß DIN 32645 ermittelt. Hierfür wurden fünf Blindwerte jeweils zehnmal vermessen. Aus den Daten konnten folgende Werte errechnet werden:

Nachweisgrenze:	0,05 µg/l = nM
Erfassungsgrenze:	0,10 µg/l = nM
Bestimmungsgrenze:	0,14 µg/l = nM

8.7.1.2 Bestimmung der Wiederfindung

Löslichkeit in AAF, ALF, H₂O und DMEM

Je 1 ml des jeweiligen Suspensionsmittels wurde vor dem Veraschen mit dem AAS-Standard versetzt. Die Konzentration des Standards wurde so gewählt, dass jeweils ein Wert im unteren (5 µg/l), mittleren (15 µg/l) bzw. oberen (25 µg/l) Kalibrierbereich lag. Die Wiederfindung betrug im Mittel 113% (AAF), 111% (ALF), 114% (H₂O) und 103% (DMEM mit 10% FKS).

Aufnahmeversuche

Um zu überprüfen, ob ein Teil des Analyten während der Veraschung verloren geht, wurde die Wiederfindung bestimmt. Aus je 1×10^6 Zellen wurden gemäß dem in Kapitel 4.2.9 aufgeführten Protokoll Proteinfraktionen des Zytosols und des Kerns extrahiert und vor dem Veraschen mit dem AAS-Standard versetzt. Die Konzentration des Standards wurde so gewählt, dass jeweils ein Wert im unteren (5 µg/l), mittleren (15 µg/l) bzw. oberen (25 µg/l) Kalibrierbereich lag. Die Wiederfindung betrug im Mittel 99% für die Zytosolfraktion und 101% für die Kernproteinfraktion.

8.7.1.3 Externe Kalibrierung

An jedem Messtag wurde eine externe Kalibrierung im Bereich von 1,25 µg/l bis 25 µg/l Cu durchgeführt. Die Standards wurden vom Gerät pipettiert. Die Volumina sind in Tabelle 9

aufgeführt. Die Konzentration der Cu-Stammlösung betrug 25 µg/l.

Tabelle 9: Pipettierschema der externen Kalibrierung

C_{Standard} [µg/l]	V_{Standard} [µl]	V_{HNO_3} (0,65%) [µl]	V_{Modifier} [µl]
0	0	20	5
1,25	1	19	5
2,5	2	18	5
5	4	16	5
10	8	12	5
15	12	8	5
20	16	4	5
25	20	0	5

8.7.2 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

8.7.2.1 CuO NP

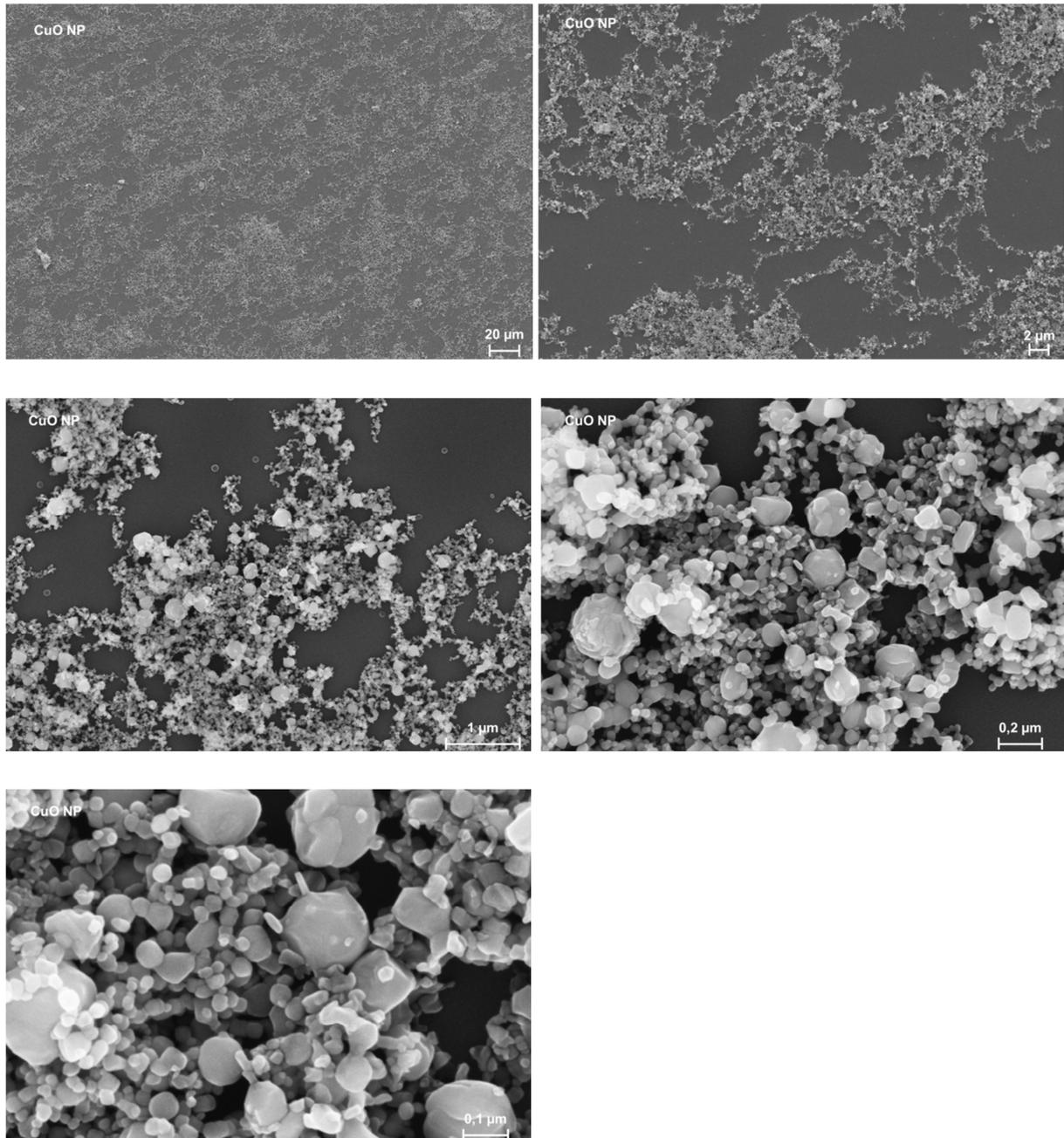


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von CuO NP bei verschiedenen Vergrößerungen.

8.7.2.2 CuO MP

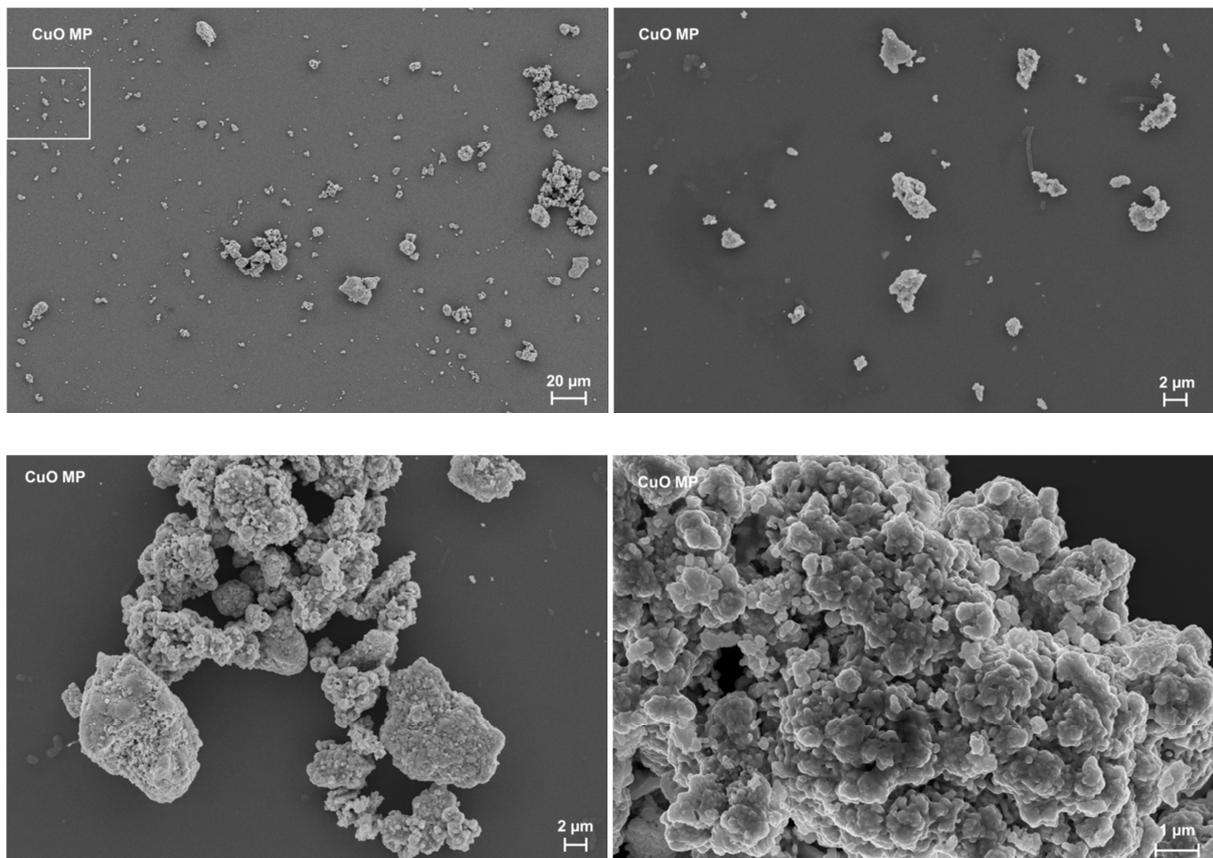


Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von CuO MP bei verschiedenen Vergrößerungen.

8.7.3 DLS DATEN

8.7.3.1 Wasser

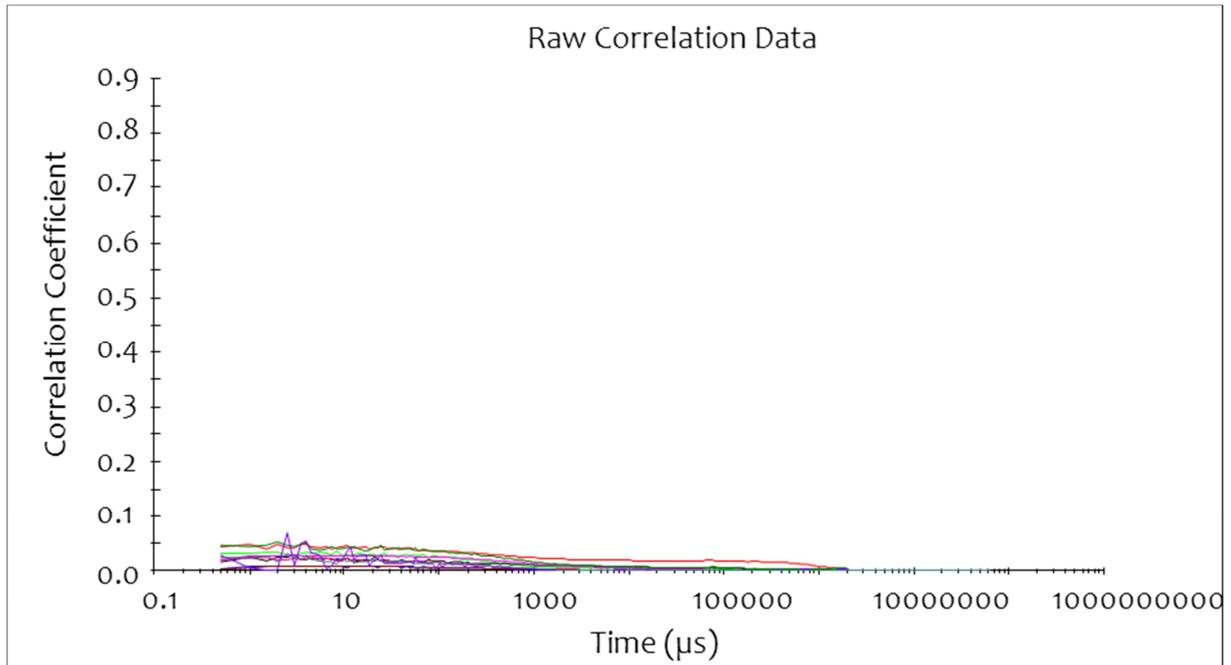


Abbildung 30: Korrelationskurven der Untersuchung von reinem Wasser. Das starke Rauschen und der niedrige Korrelationskoeffizient weisen auf die fehlende Existenz von Partikeln hin.

8.7.3.2 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP in Wasser

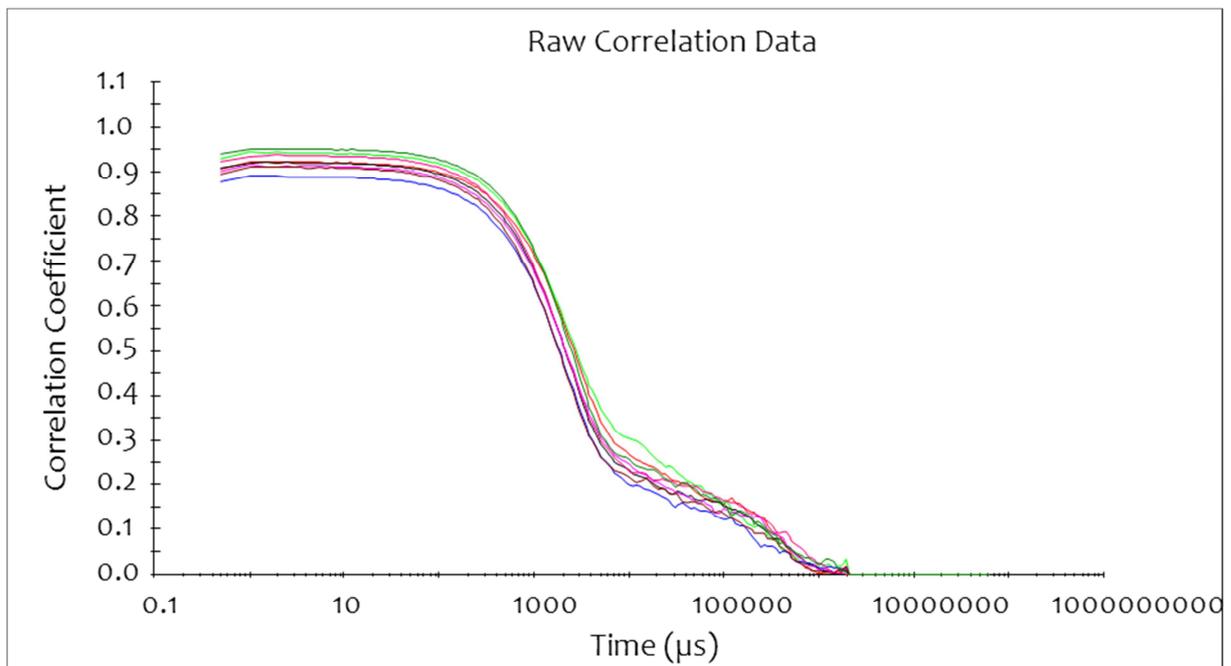


Abbildung 31: Korrelationskurven der Untersuchung einer Partikelsuspension von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NP in reinem Wasser. Die Stufe im Verlauf der Korrelationskurve weist auf das Vorliegen von Schwankungen der Partikelanzahl, vermutlich durch Sedimentation von Partikeln oder Agglomeraten, hin.

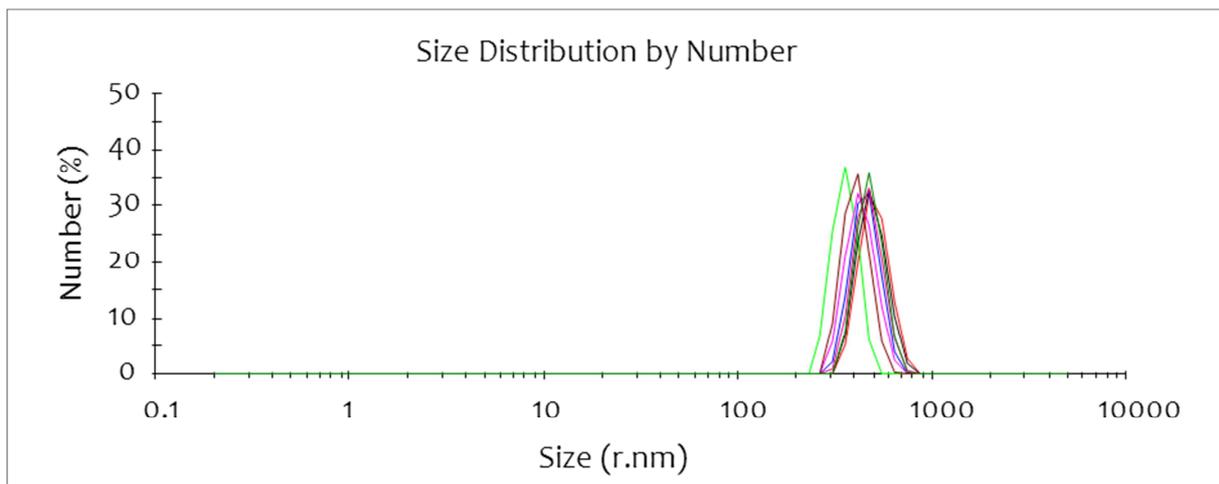
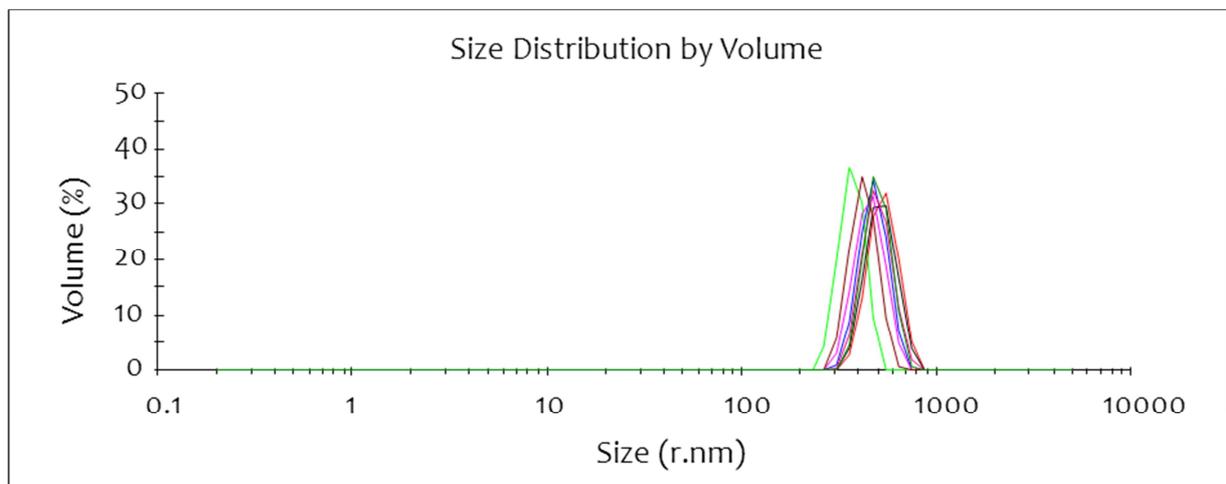
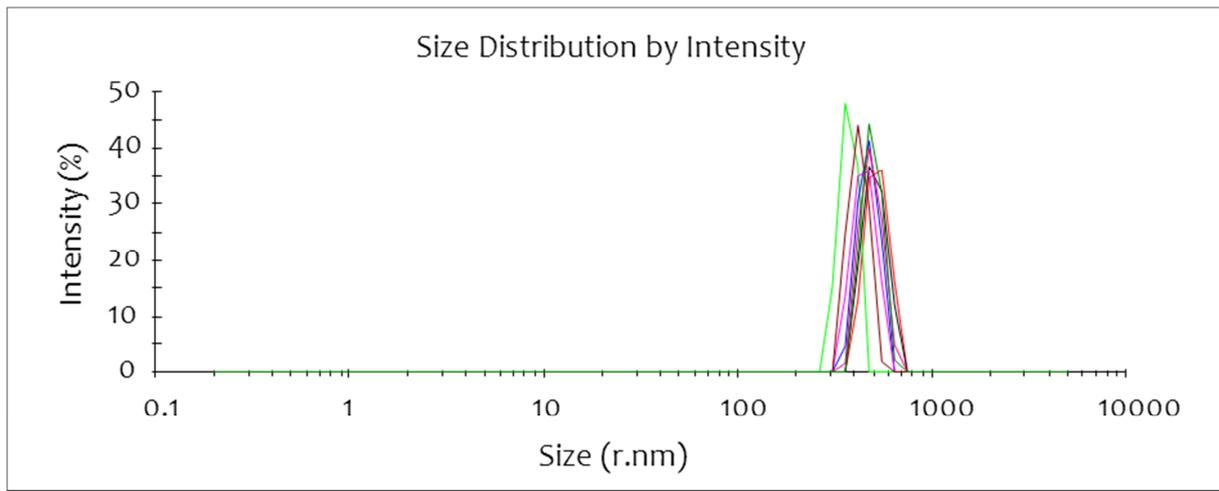


Abbildung 32: Partikelgrößenverteilungen von 50 µg/ ml CuO NP in reinem Wasser. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 31 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (oben), Volumen (Mitte) und Anzahl (unten) der Partikel.

8.7.3.3 DMEM ohne FKS

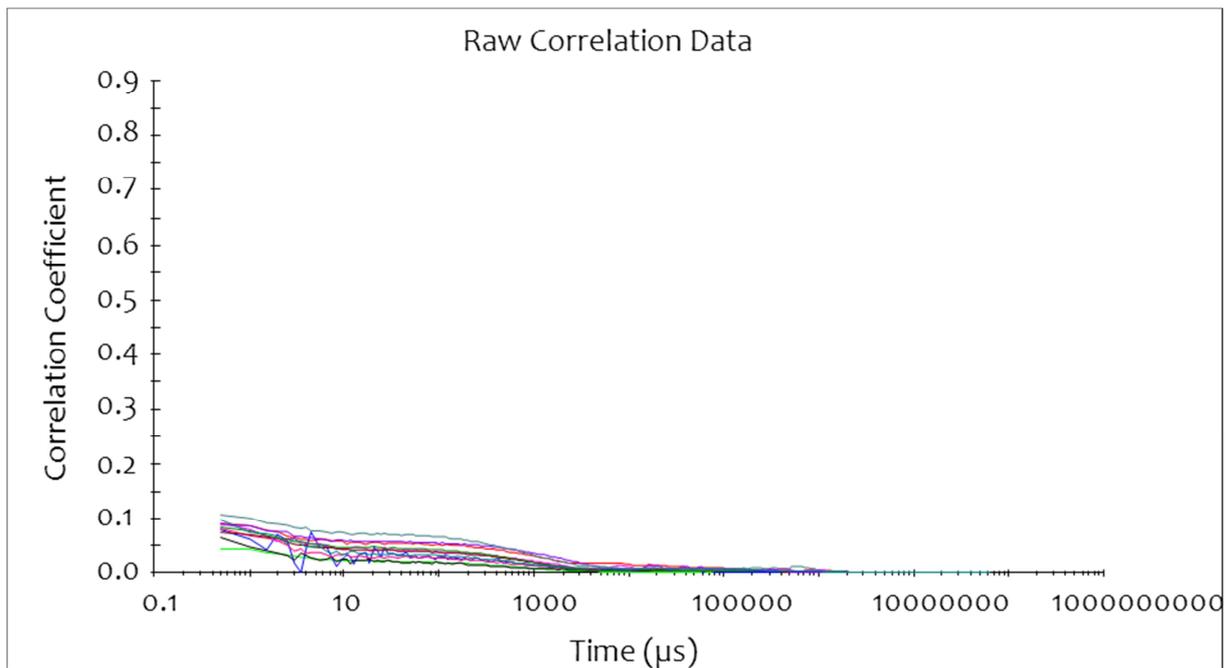


Abbildung 33: Korrelationskurven der Untersuchung von DMEM ohne FKS. Das starke Rauschen und der niedrige Korrelationskoeffizient weisen auf die fehlende Existenz von Partikeln hin.

8.7.3.4 50 µg/ ml CuO NP in DMEM ohne FKS

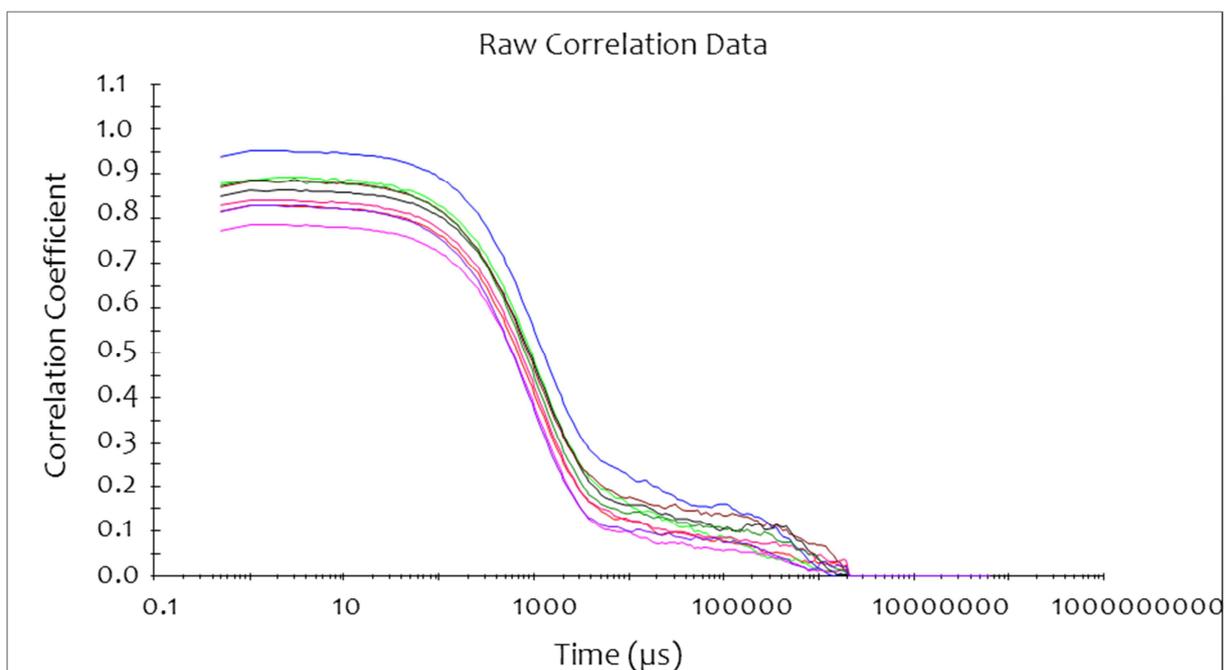


Abbildung 34: Korrelationskurven der Untersuchung einer Partikelsuspension von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM ohne FKS. Die Stufe im Verlauf der Korrelationskurve weist auf das Vorliegen von Schwankungen der Partikelanzahl, vermutlich durch Sedimentation von Partikeln oder Agglomeraten, hin.

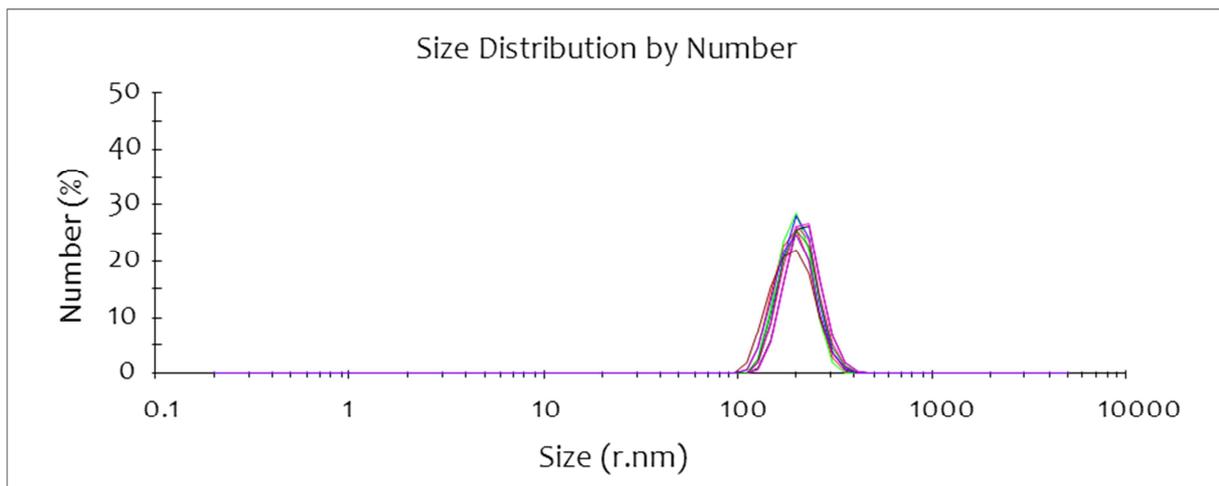
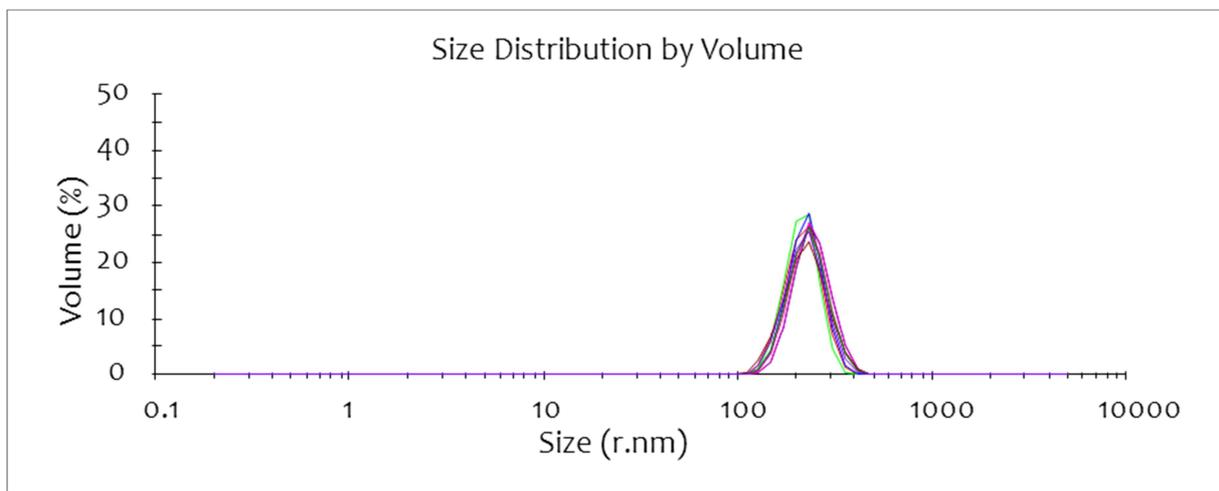
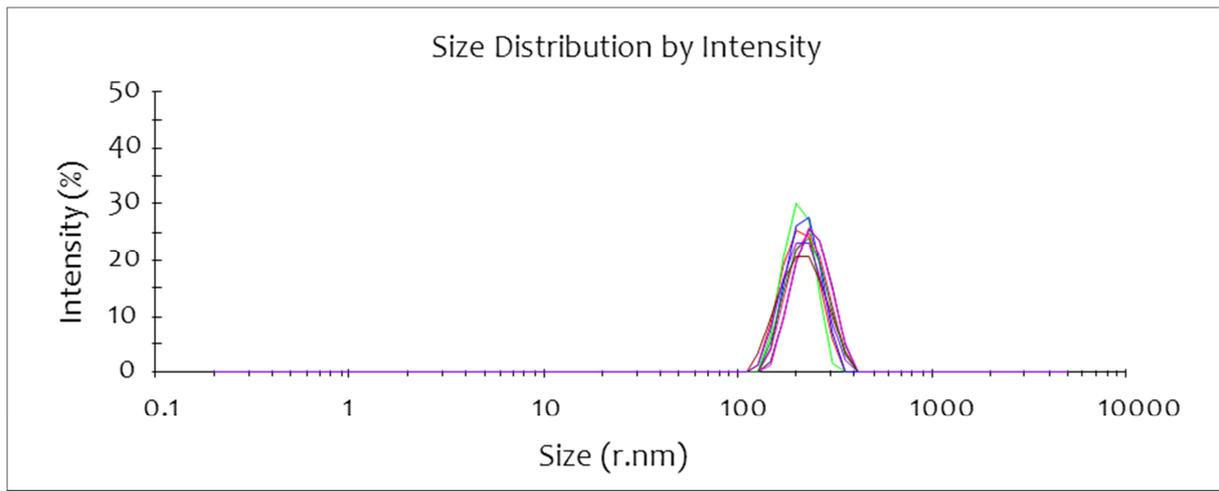


Abbildung 35: Partikelgrößenverteilungen von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM ohne FKS. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 34 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (oben), Volumen (Mitte) und Anzahl (unten) der Partikel.

8.7.3.5 DMEM mit 5% FKS

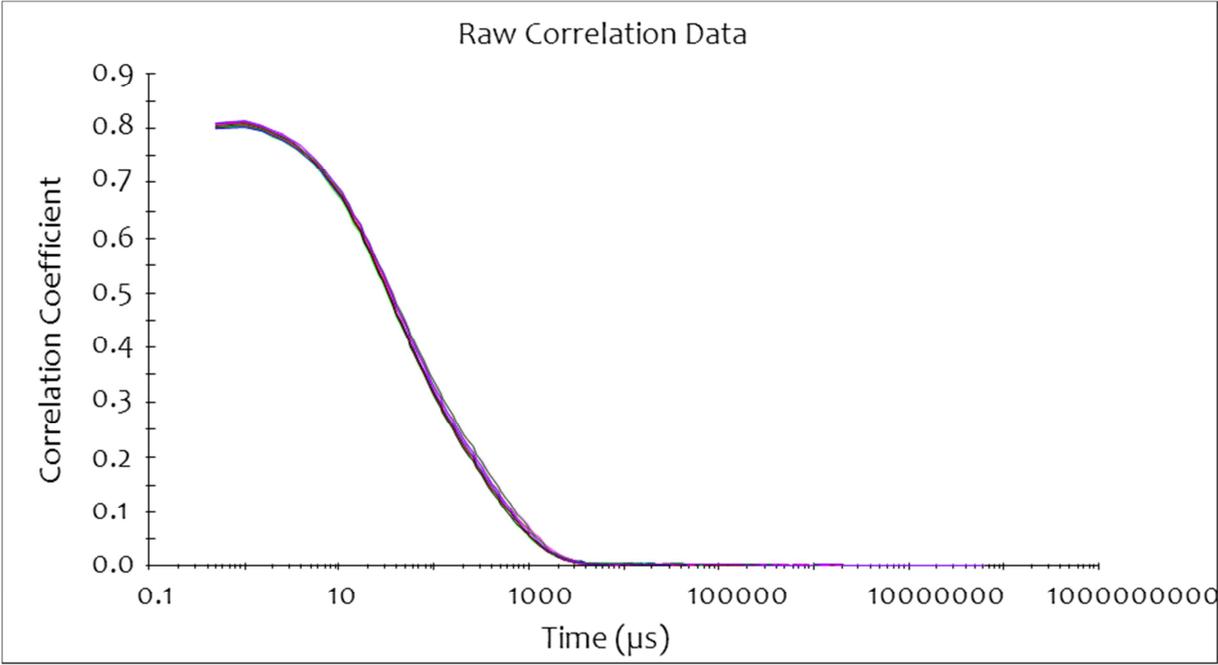
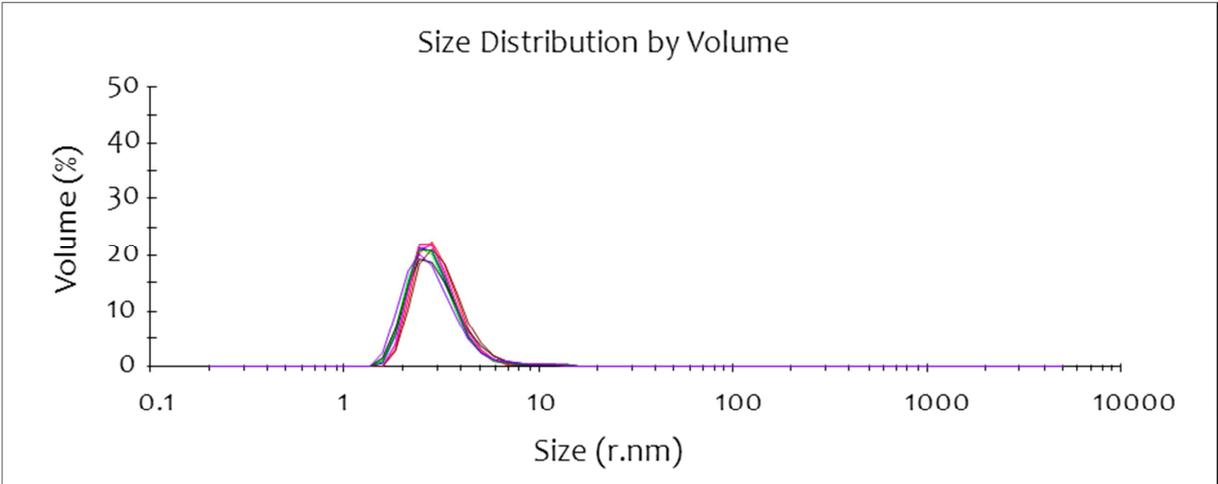
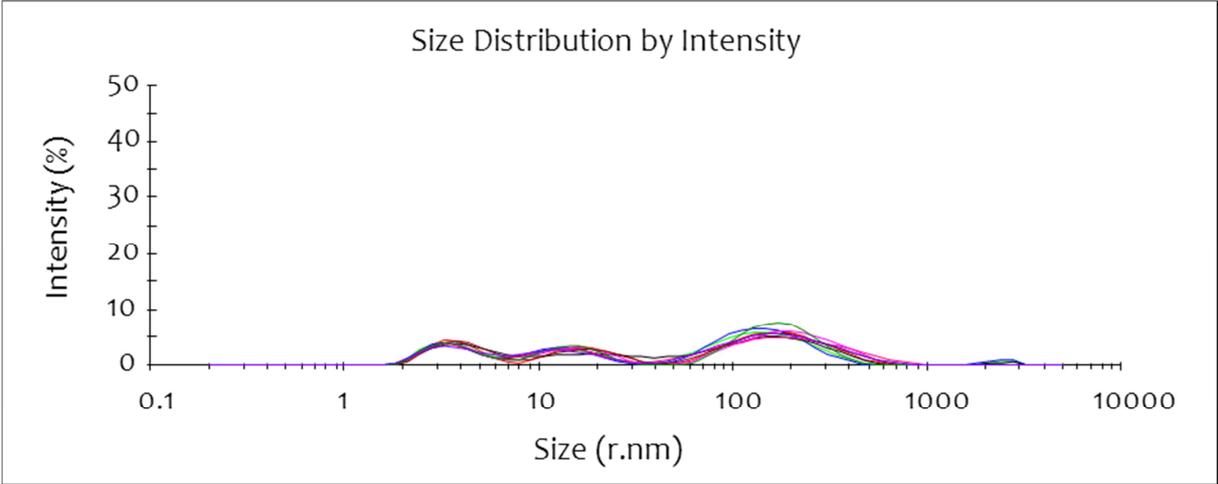


Abbildung 36: Korrelationskurven der Untersuchung von DMEM mit 5% FKS. Der steile und frühe Abfall der Kurven weist auf das Vorliegen kleiner monodisperser Partikel hin.



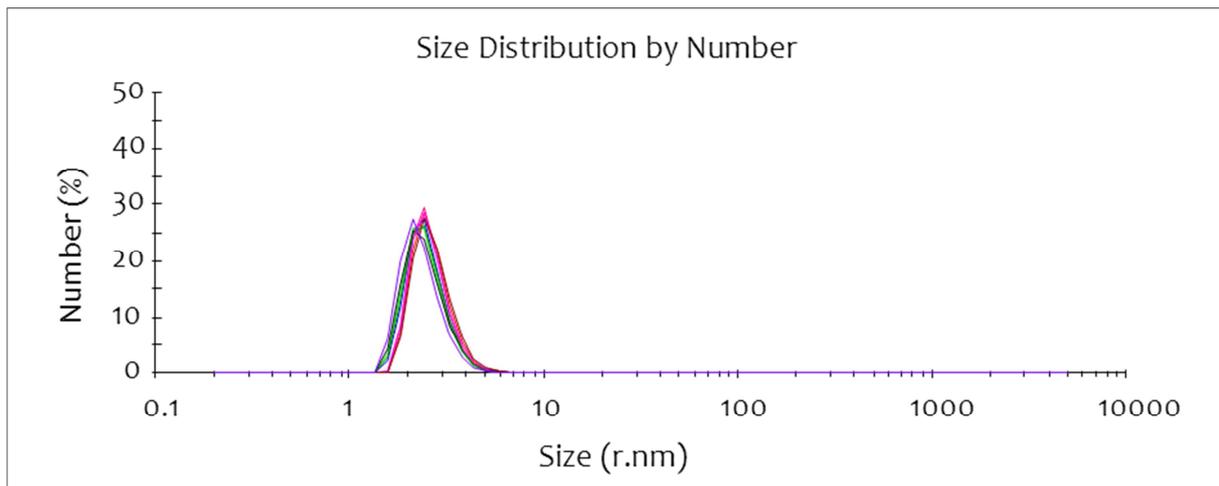


Abbildung 37: Partikelgrößenverteilungen von DMEM mit 5% FKS. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 36 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (S. 110, Mitte), Volumen (S.110, unten) und Anzahl (S. 111, oben) der Partikel.

8.7.3.6 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 5% FKS

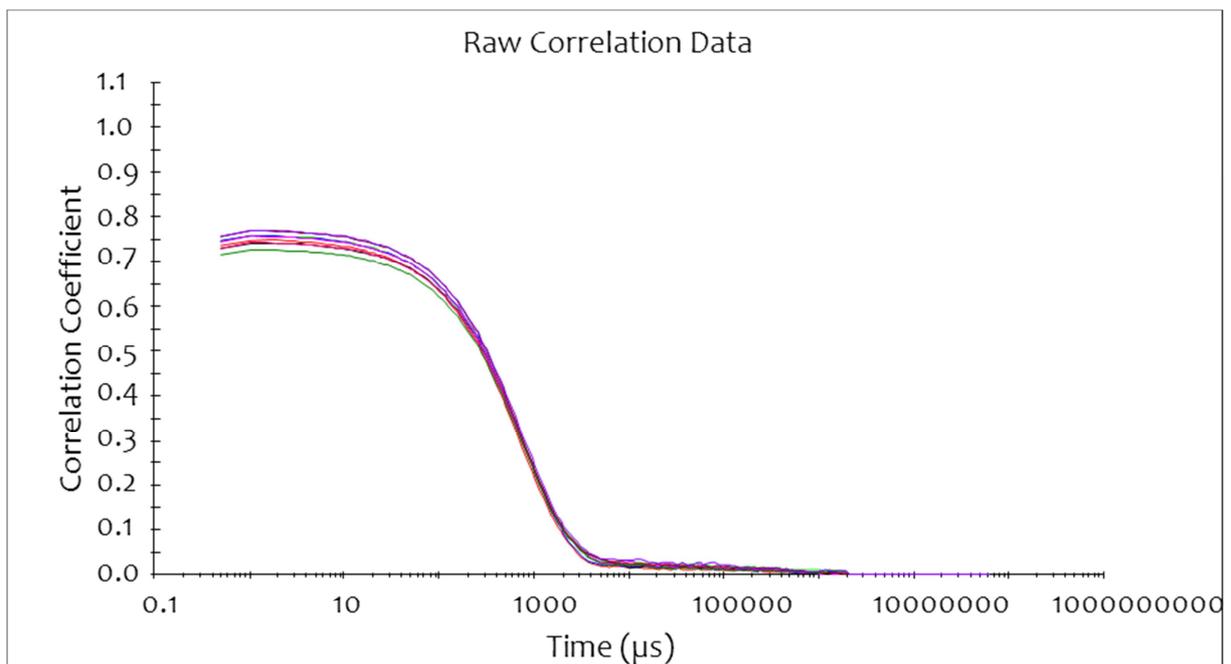


Abbildung 38: Korrelationskurven der Untersuchung von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 5% FKS. Der steile und frühe Abfall der Kurven weist auf das Vorliegen kleiner Partikel hin. Die bei $t > 2000 \mu\text{s}$ auftretende Stufe weist auf das Vorliegen einer weiteren, in der Größe verschiedenen Spezies von Partikeln (hier: CuO NP) hin.

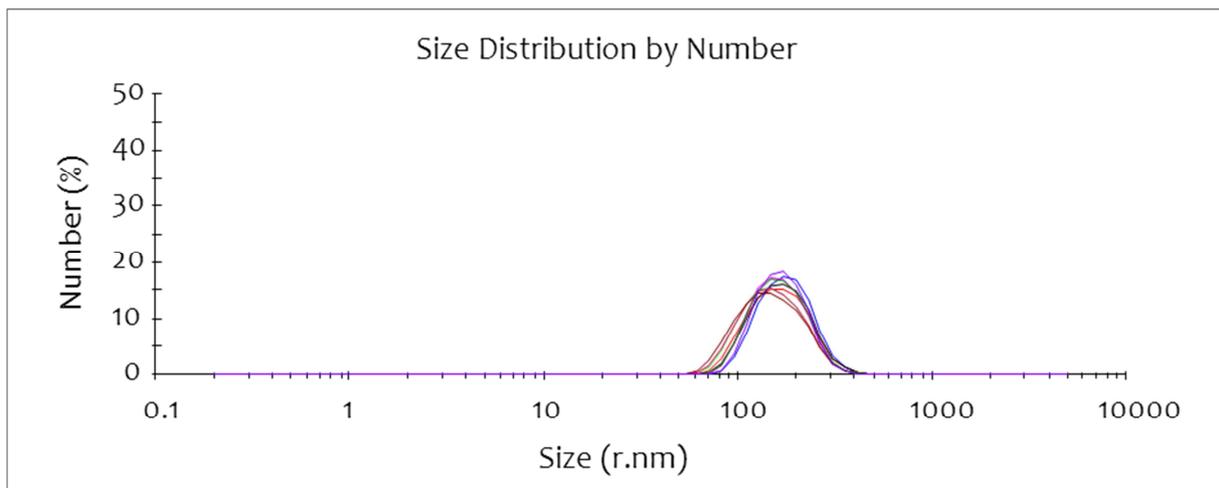
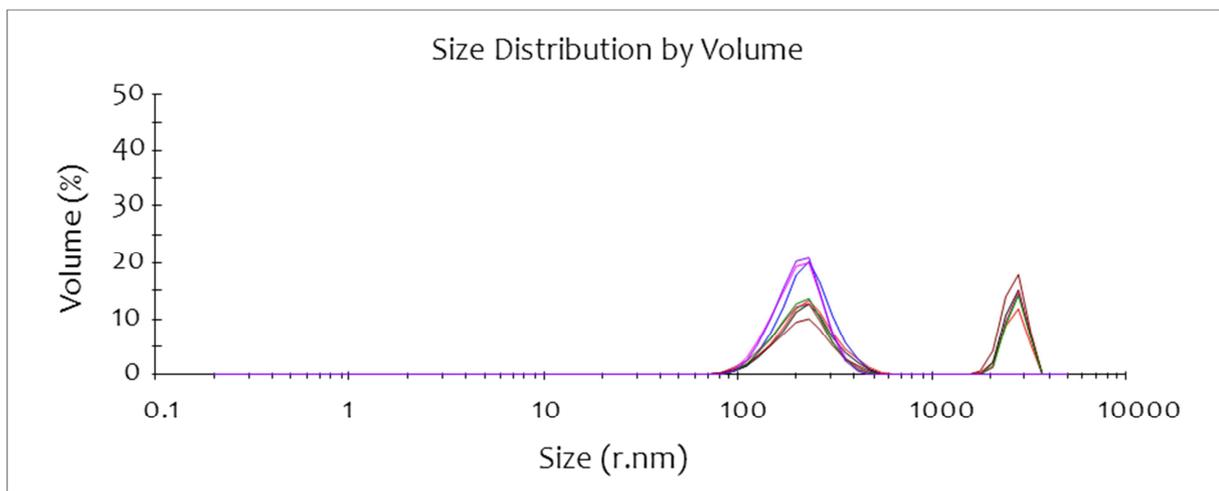
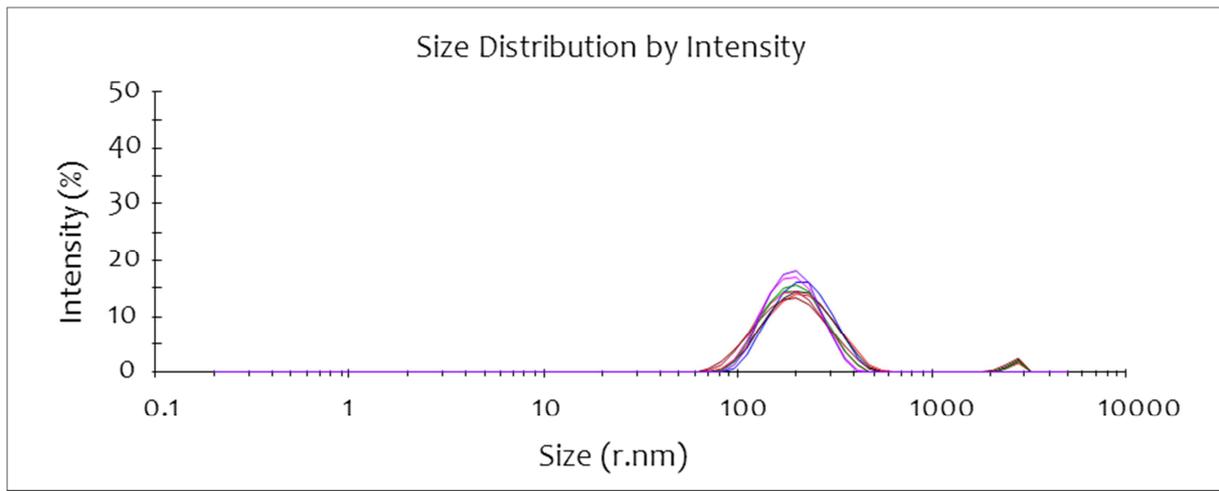


Abbildung 39: Partikelgrößenverteilungen von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 5% FKS. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 38 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (oben), Volumen (Mitte) und Anzahl (unten) der Partikel.

8.7.3.7 DMEM mit 10% FKS

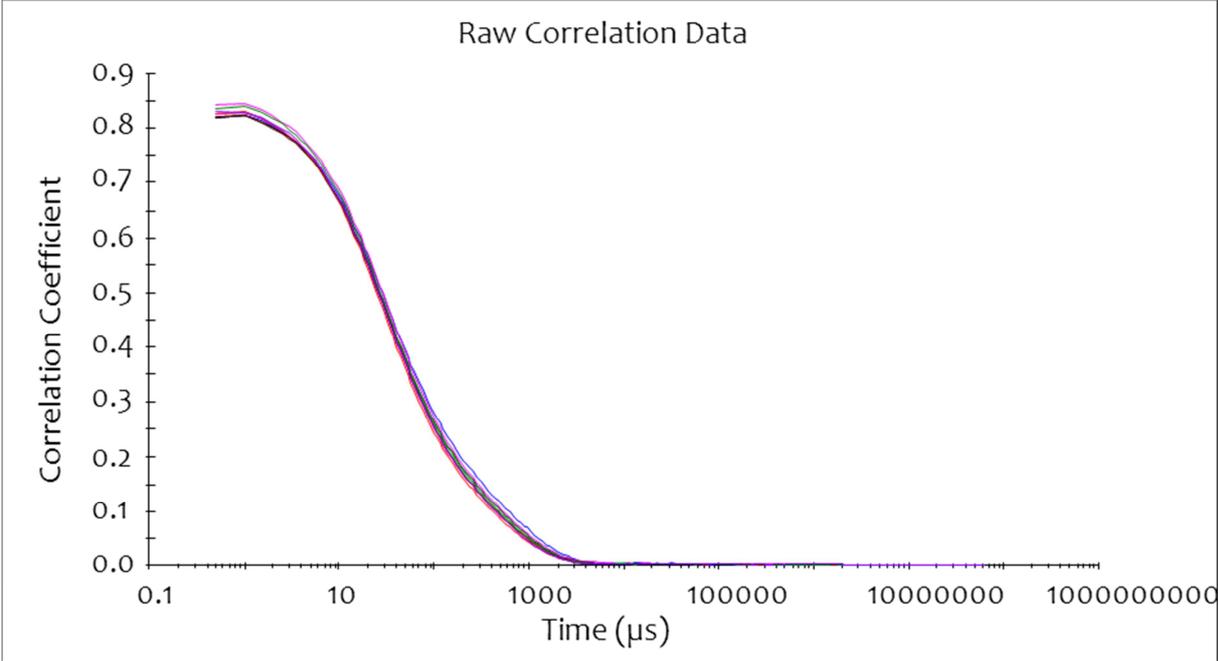
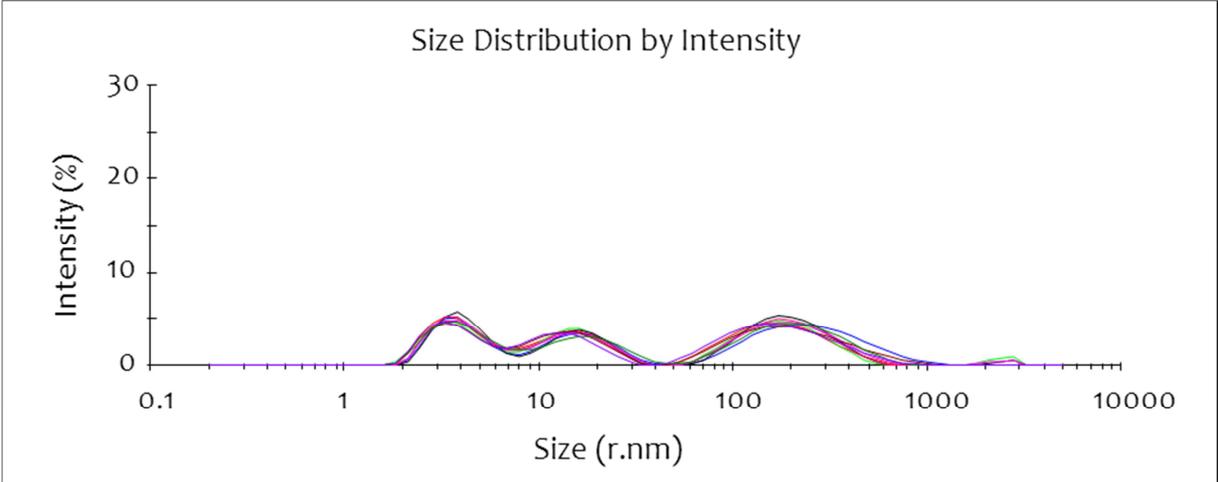


Abbildung 40: Korrelationskurven der Untersuchung von DMEM mit 10% FKS. Der steile und frühe Abfall der Kurven weist auf das Vorliegen kleiner monodisperser Partikel hin.



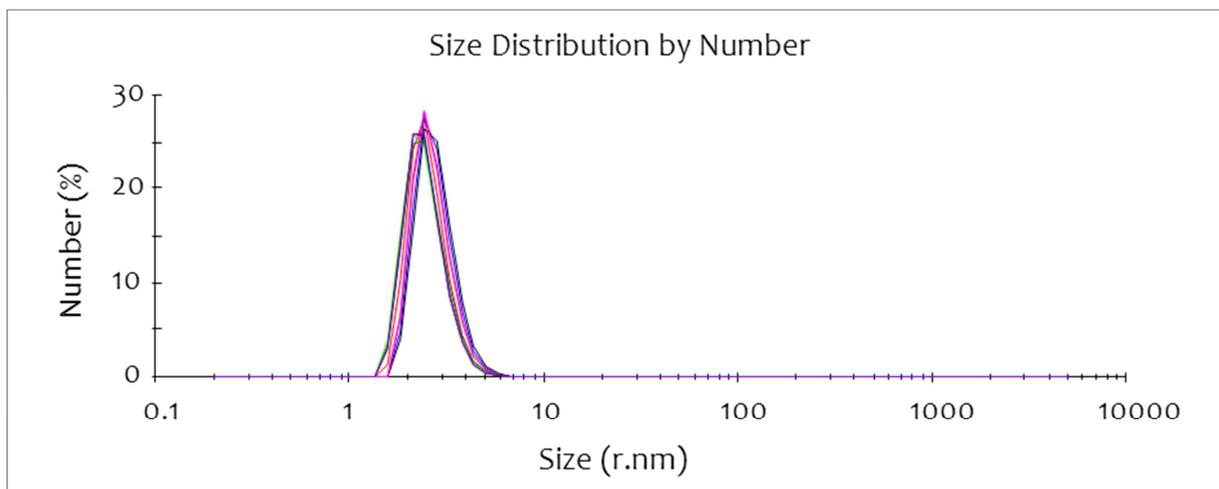
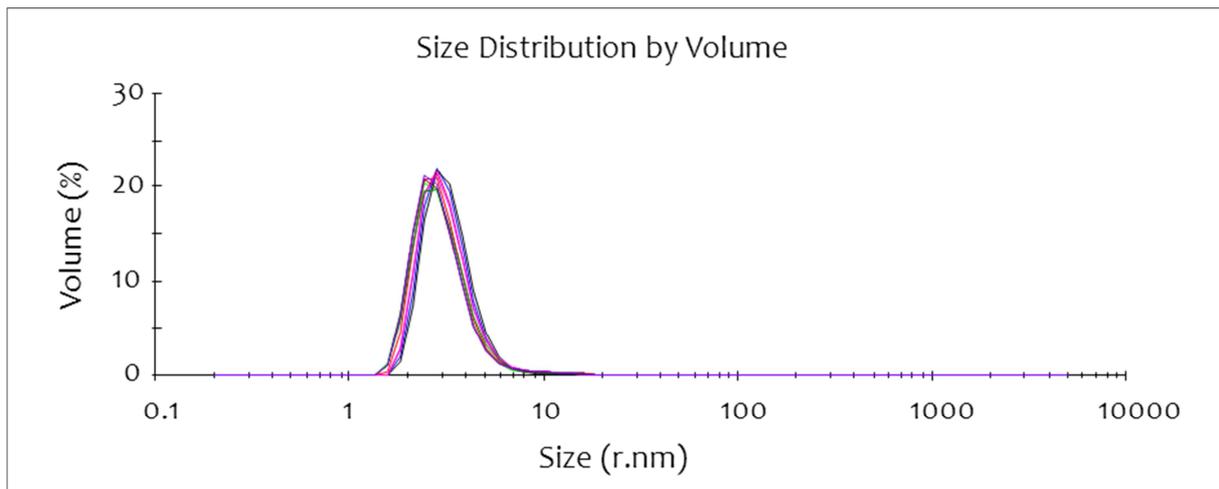


Abbildung 41: Partikelgrößenverteilungen von DMEM mit 10% FKS. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 40 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (S. 113, unten), Volumen (S. 114, oben) und Anzahl (S. 114, unten) der Partikel.

8.7.3.8 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS

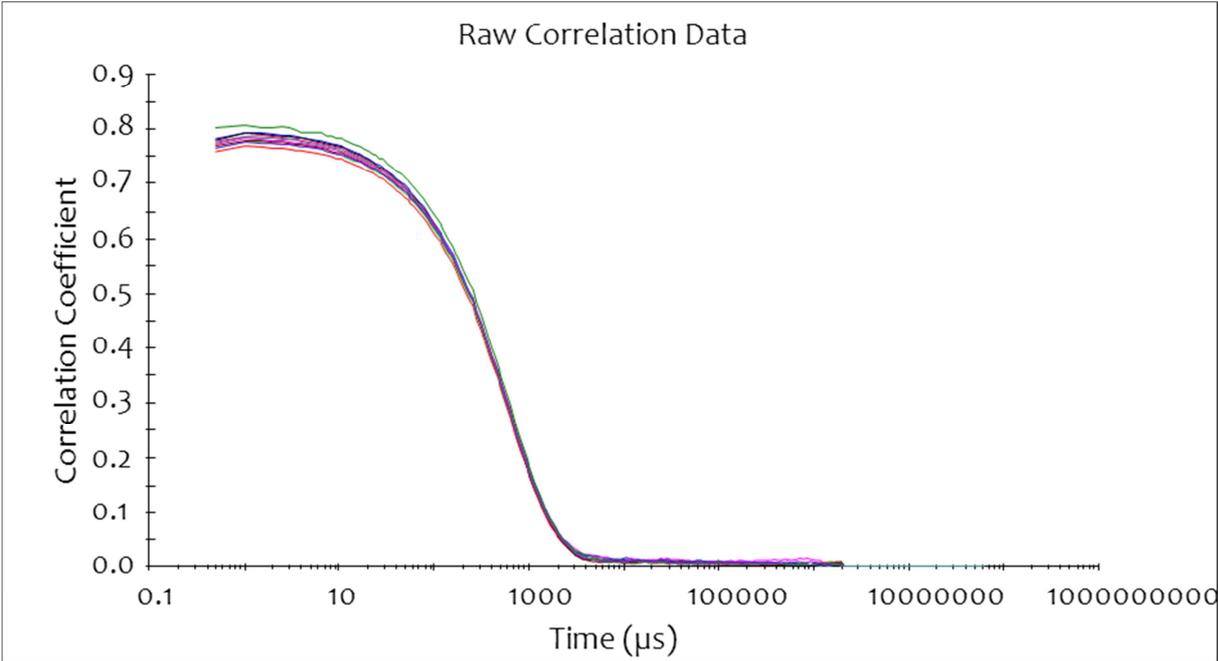
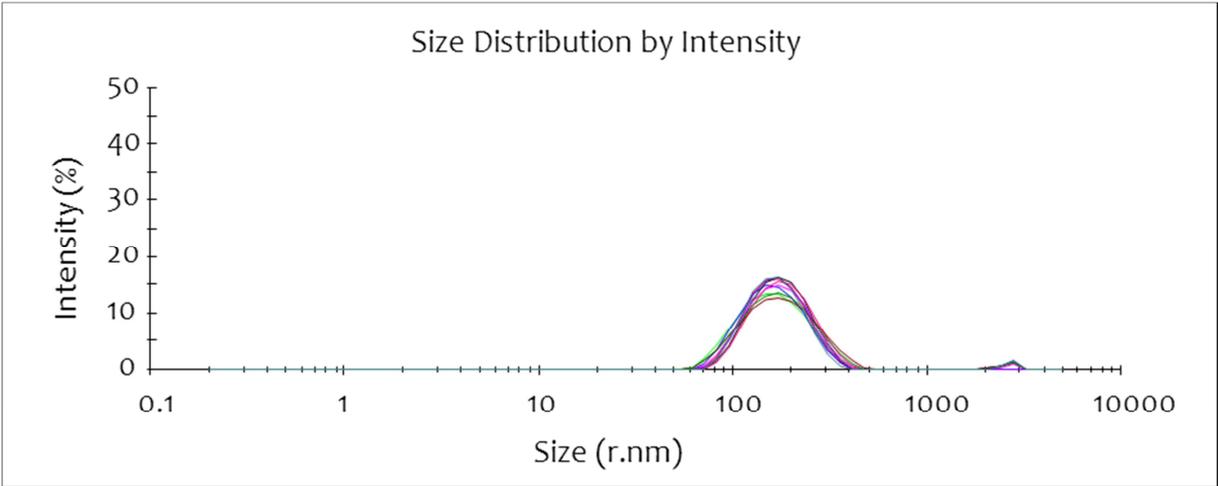


Abbildung 42: Korrelationskurven der Untersuchung von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS. Der steile und frühe Abfall der Kurven weist auf das Vorliegen kleiner Partikel hin. Die bei $t > 2000 \mu s$ auftretende Stufe weist auf das vorliegender einer weiteren, in der Größe verschiedenen Spezies von Partikeln (hier: CuO NP) hin.



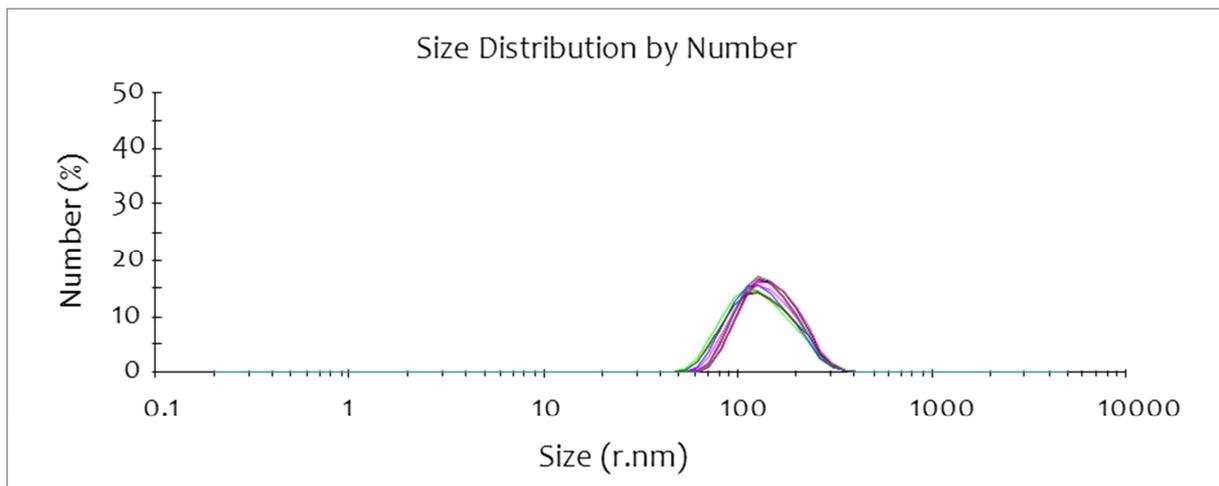
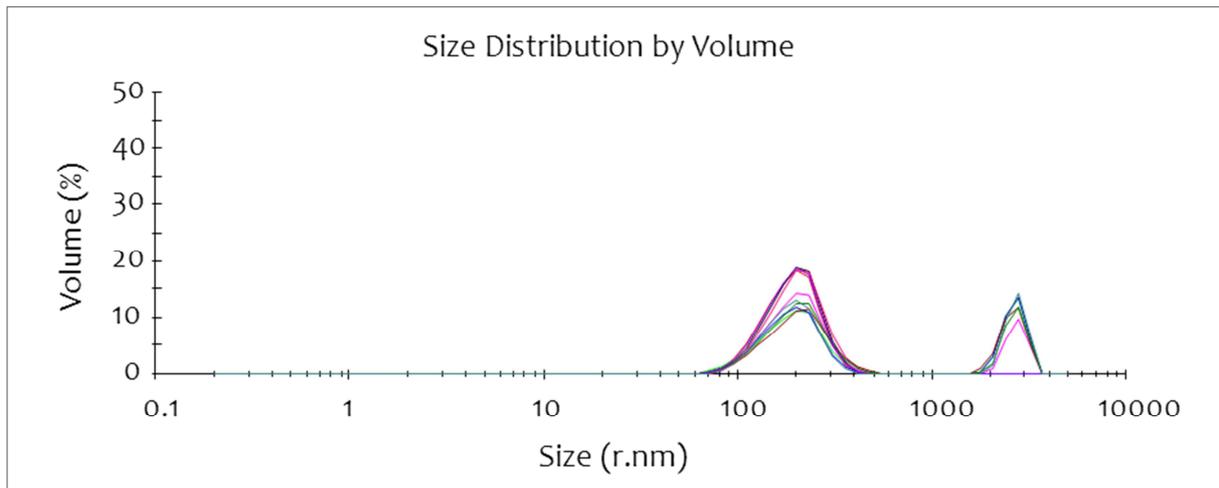


Abbildung 43: Partikelgrößenverteilungen von 50 µg/ ml CuO NP in DMEM mit 10% FKS. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 42 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (S. 115, unten), Volumen (S. 116, oben) und Anzahl (S. 116, unten) der Partikel.

8.7.3.9 CuO MP in 10% FKS

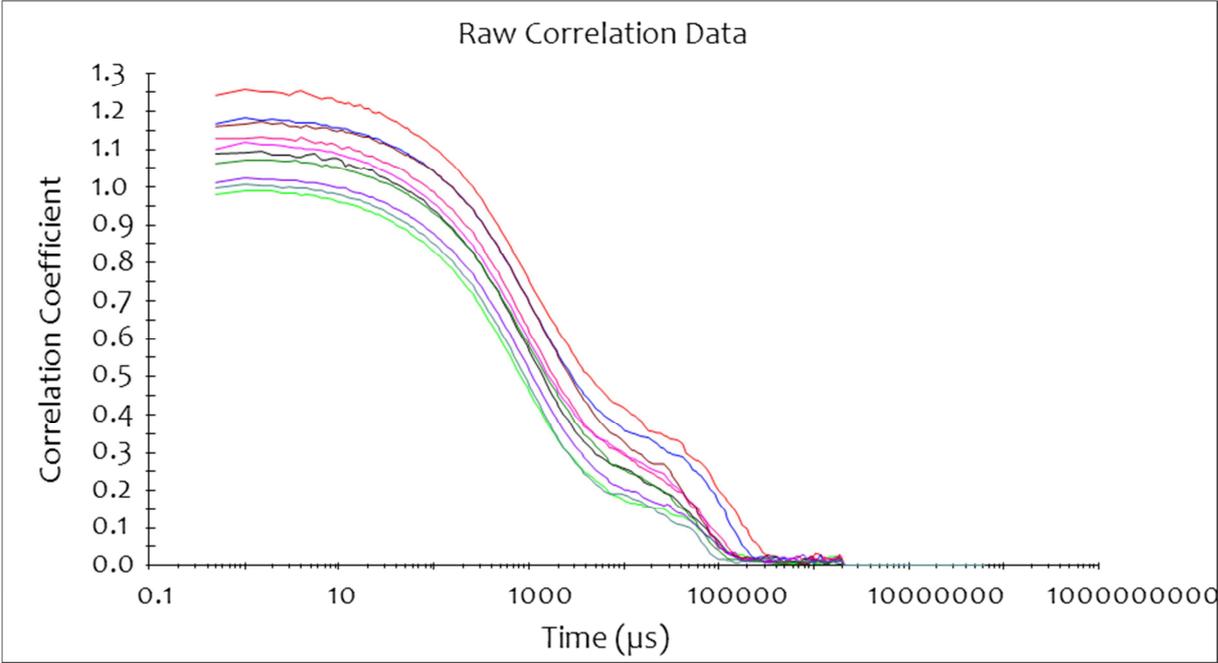
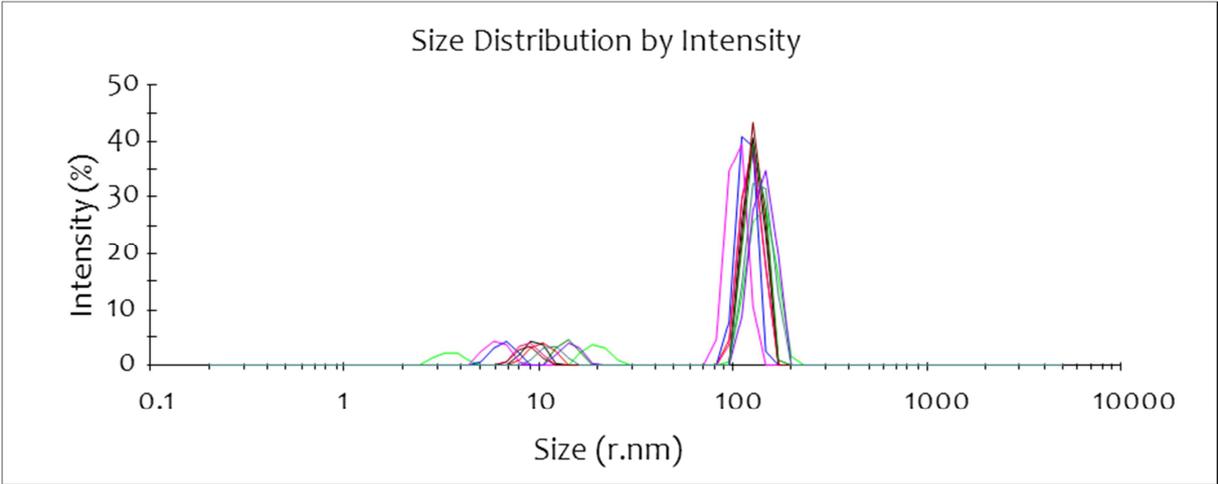


Abbildung 44: Korrelationskurven der Untersuchung von 50 µg/ ml MP in DMEM mit 10% FKS. Der späte, ungleichmäßige und in Stufen abfallende Verlauf der Kurven weist auf die Existenz von polydispersen und sedimentierenden Partikeln hin.



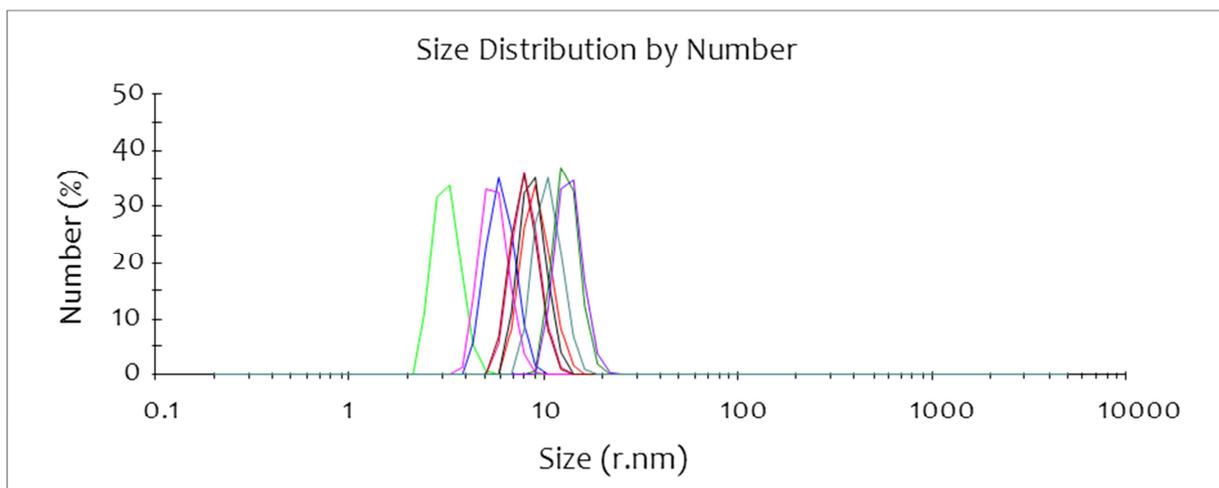
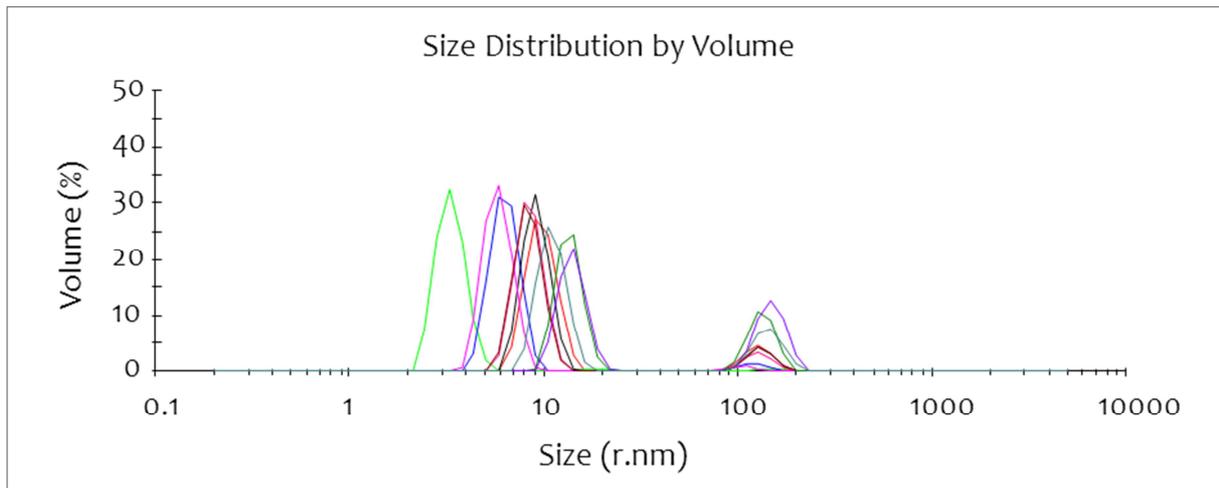


Abbildung 45: Partikelgrößenverteilungen von 1250 µg/ ml CuO MP in DMEM mit 10% FKS. Dargestellt sind aus den Korrelationskurven in Abbildung 38 errechnete Größenverteilungen nach Intensität (oben), Volumen (Mitte) und Anzahl (unten) der Partikel.

8.7.3.10 Hydrodynamischer Radius von CuO NP nach Intensität und Volumen

Zur Ergänzung der aus den Partikelgrößenverteilungen nach Anzahl der Partikel berechneten und in Kapitel 5.1.4 gezeigten mittleren Partikelgrößen, werden im Folgenden auch die aus den Partikelgrößenverteilungen nach Intensität (Tabelle 10) und Volumen (Tabelle 11) errechnete mittleren Partikelgrößen aufgeführt.

Tabelle 10: Hydrodynamischer Radius von CuO NP in Wasser, DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS. Gezeigt sind die prozentual häufigsten Mittelwerte der Größenverteilung nach Intensität aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zehn Bestimmungen und die Standardabweichung (SD).

Hydrodynamischer Radius [nm] ± SD					
	Konzentration [µg/ ml]	Wasser	DMEM ohne FKS	DMEM mit 5% FKS	DMEM mit 10% FKS
	0	-	-		
CuO NP	50	504 ± 58	218 ± 21	184 ± 26	174 ± 17
	100	481 ± 115	272 ± 40	184 ± 22	190 ± 13
	150	403 ± 78	310 ± 63	199 ± 18	183 ± 12

Tabelle 11: Hydrodynamischer Radius von CuO NP in Wasser, DMEM ohne FKS, DMEM mit 5% FKS und DMEM mit 10% FKS. Gezeigt sind die prozentual häufigsten Mittelwerte der Größenverteilung nach Volumen aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zehn Bestimmungen und die Standardabweichung (SD).

Hydrodynamischer Radius [nm] ± SD					
	Konzentration [µg/ ml]	Wasser	DMEM ohne FKS	DMEM mit 5% FKS	DMEM mit 10% FKS
	0	-	-		
CuO NP	50	517 ± 64	222 ± 18	204 ± 22	193 ± 19
	100	493 ± 127	268 ± 38	208 ± 19	217 ± 24
	150	402 ± 91	308 ± 66	221 ± 13	208 ± 10

8.7.4 LÖSLICHKEIT VON CUO NP UND CUO MP IN PBS

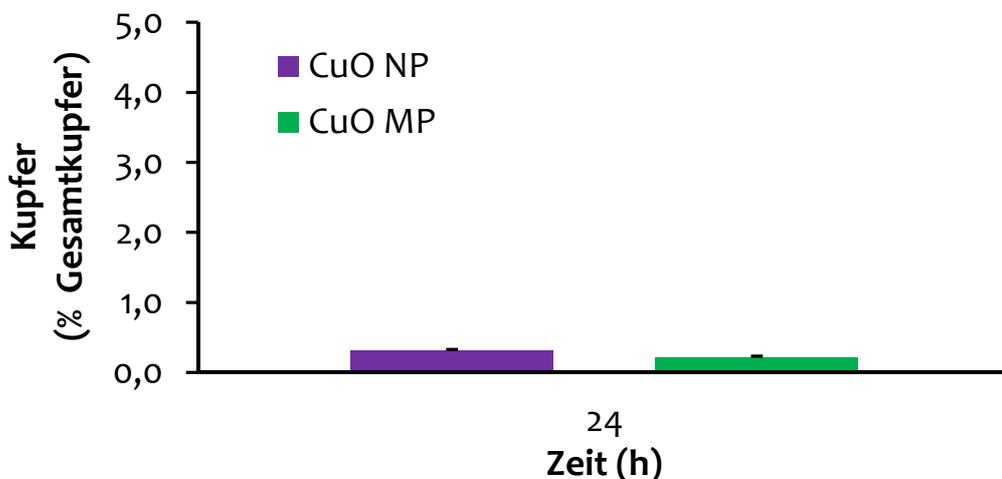


Abbildung 46: Löslichkeit von CuO NP und CuO MP in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4). CuO NP und CuO MP wurden in PBS 24 h bei 37°C inkubiert, mehrfach zentrifugiert und der Kupfergehalt des Überstandes mit GF-AAS ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen + SD.

8.7.5 ZYTOTOXIZITÄT

8.7.5.1 Absorption von CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS

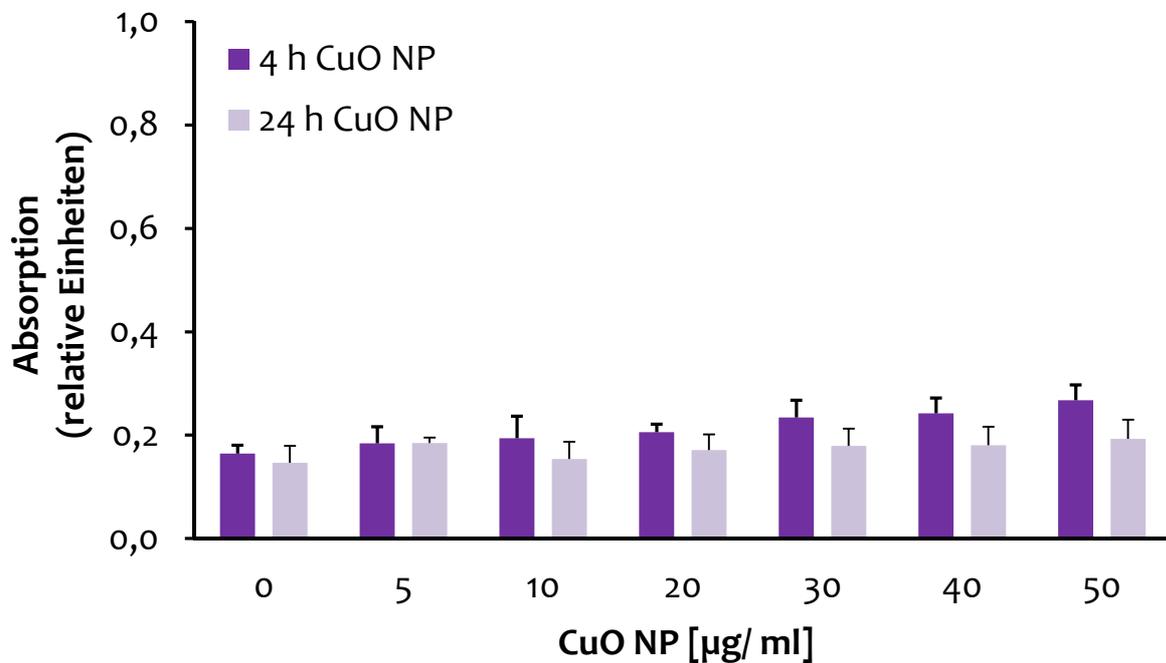


Abbildung 47: Absorption von CuO NP in DMEM mit 10% FKS bei 450 nm nach 4 h und 24 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen. Gezeigt sich Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuche + SD.

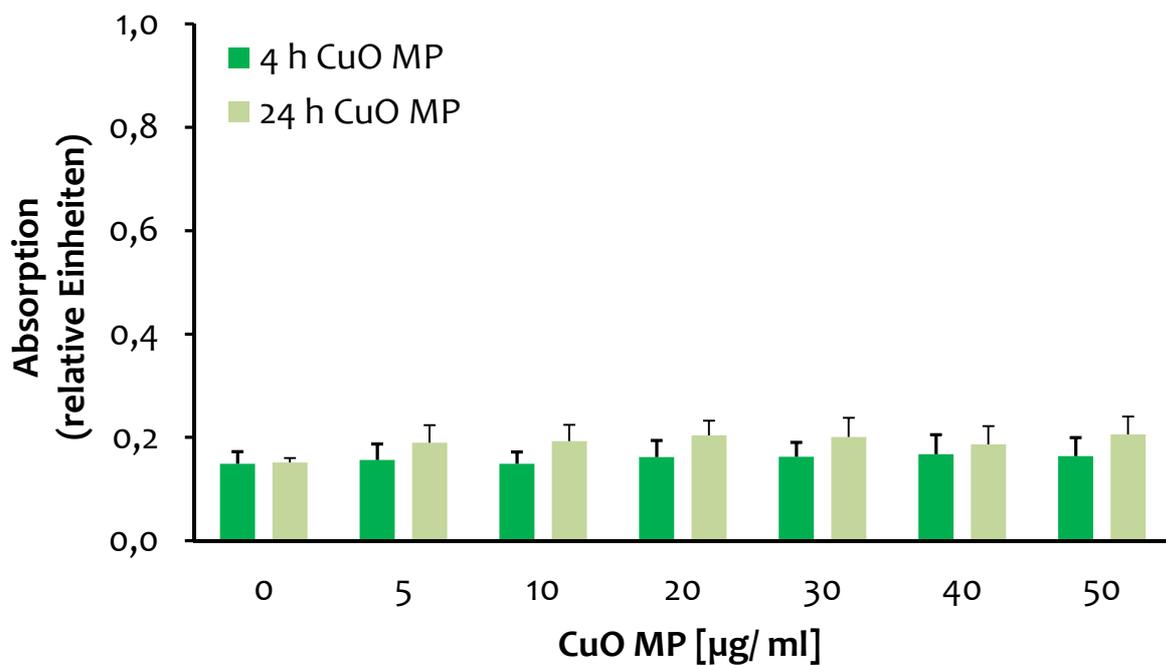


Abbildung 48: Absorption von CuO MP in DMEM mit 10% FKS bei 450 nm nach 4 h und 24 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen. Gezeigt sich Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuche + SD.

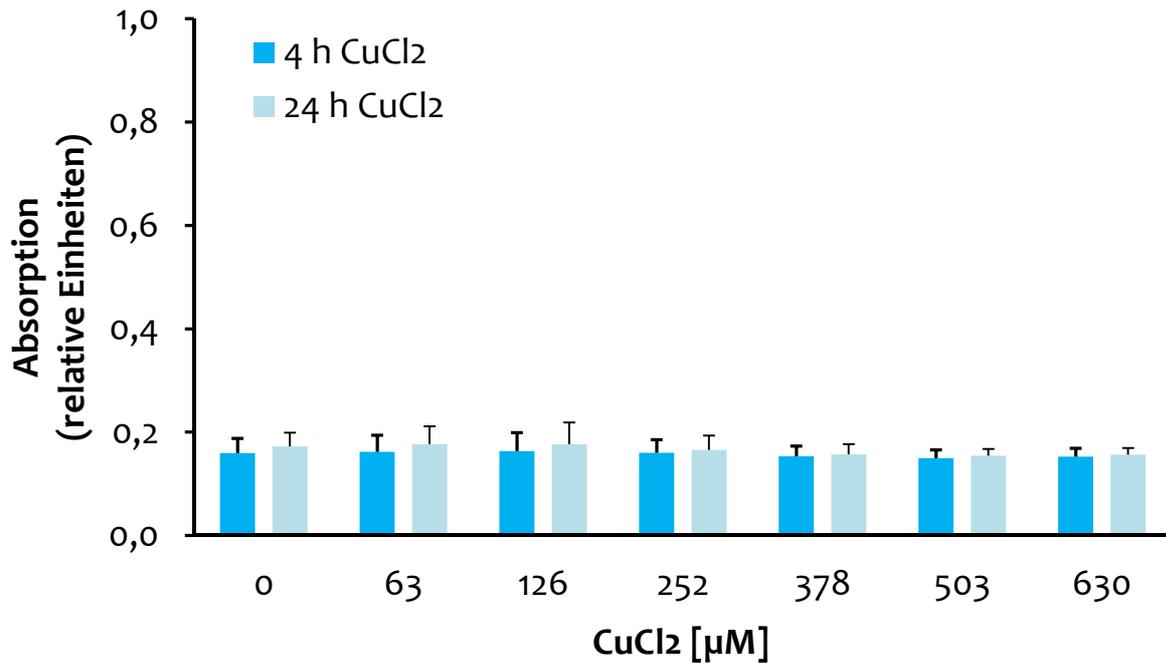


Abbildung 49: Absorption von CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS bei 450 nm nach 4 h und 24 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen. Gezeigt sich Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuche + SD.

8.7.5.2 Zellfreie Reduktion von WST-8 durch CuO NP, CuO MP oder CuCl₂

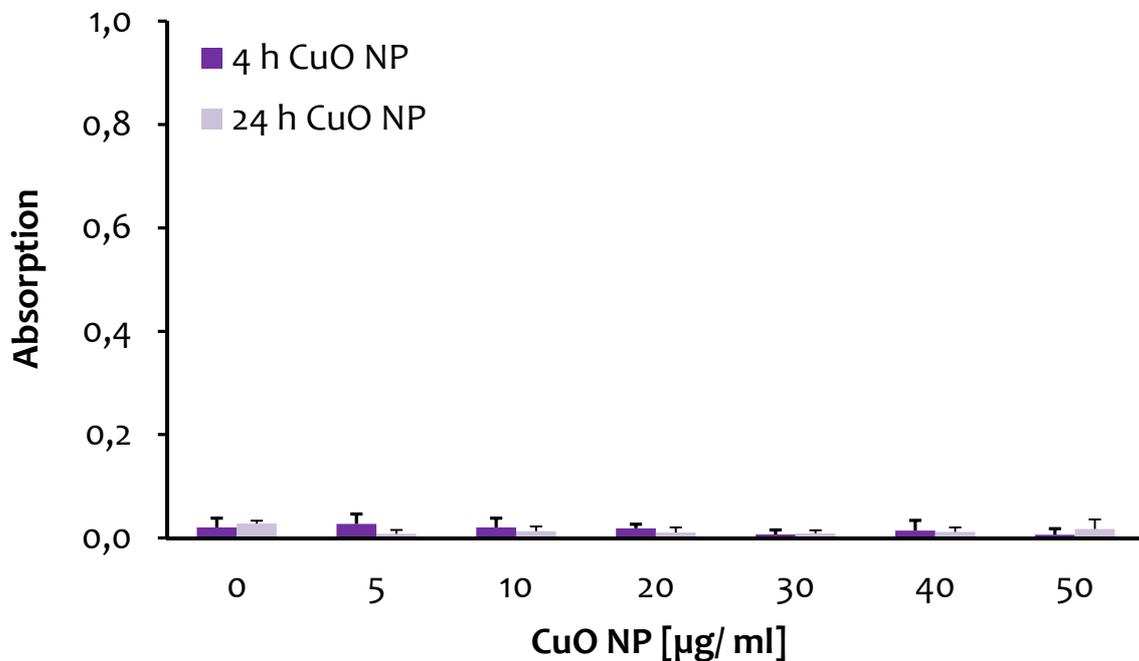


Abbildung 50: Absorption von WST-8-Formazan nach Inkubation mit CuO NP in DMEM mit 10% FKS. CuO NP wurde für 4 h oder 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend mit CCK-8-Reagenz versetzt und für 1 h inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm detektiert. Gezeigt sich Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuche + SD.

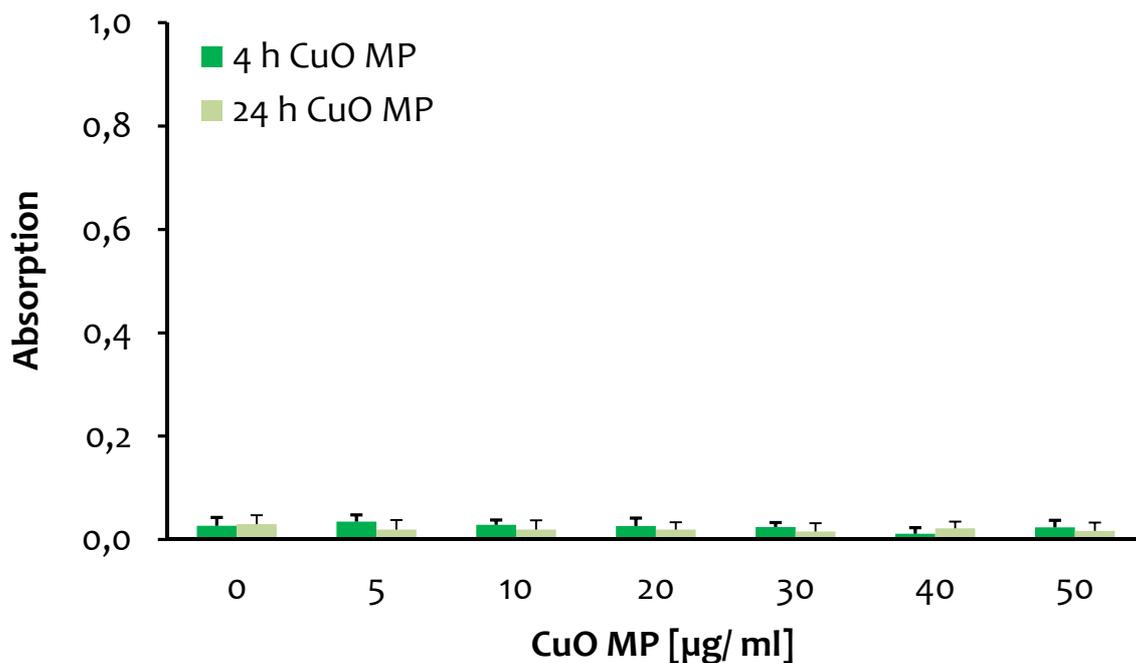


Abbildung 51: Absorption von WST-8-Formazan nach Inkubation mit CuO MP in DMEM mit 10% FKS. CuO MP wurde für 4 h oder 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend mit CCK-8-Reagenz versetzt und für 1 h inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm detektiert. Gezeigt sich Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuche + SD.

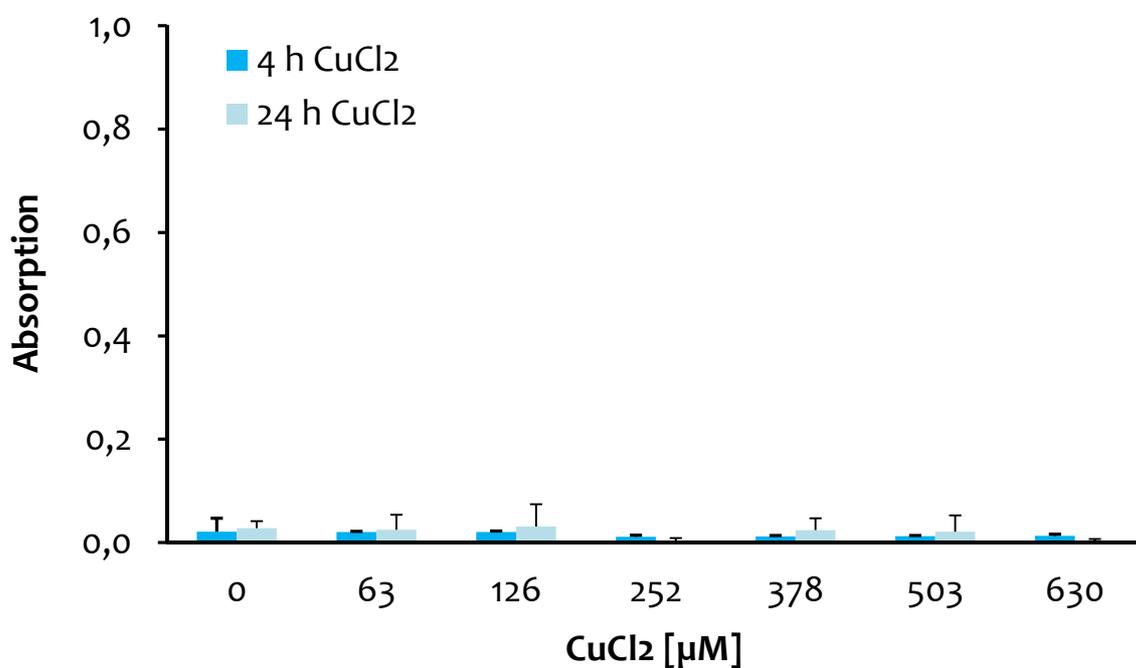


Abbildung 52: Absorption von WST-8-Formazan nach Inkubation mit CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS. CuCl₂ wurde für 4 h oder 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend mit CCK-8-Reagenz versetzt und für 1 h inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm detektiert. Gezeigt sich Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuche + SD.

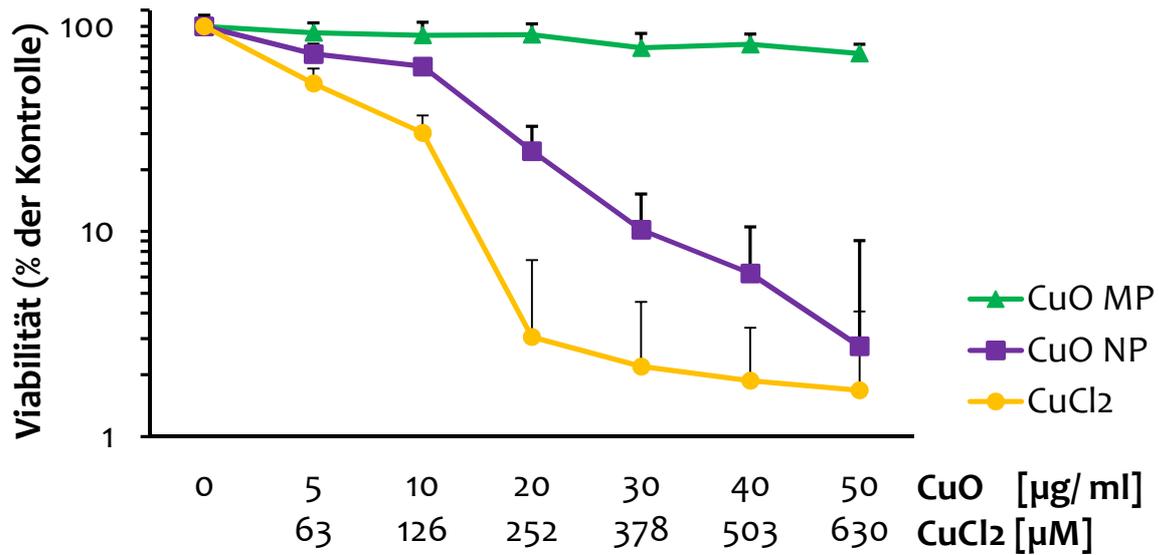


Abbildung 53: Einfluss auf die Viabilität. A549-Zellen wurden 4 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, anschließend mit CCK-8 versetzt, 1 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

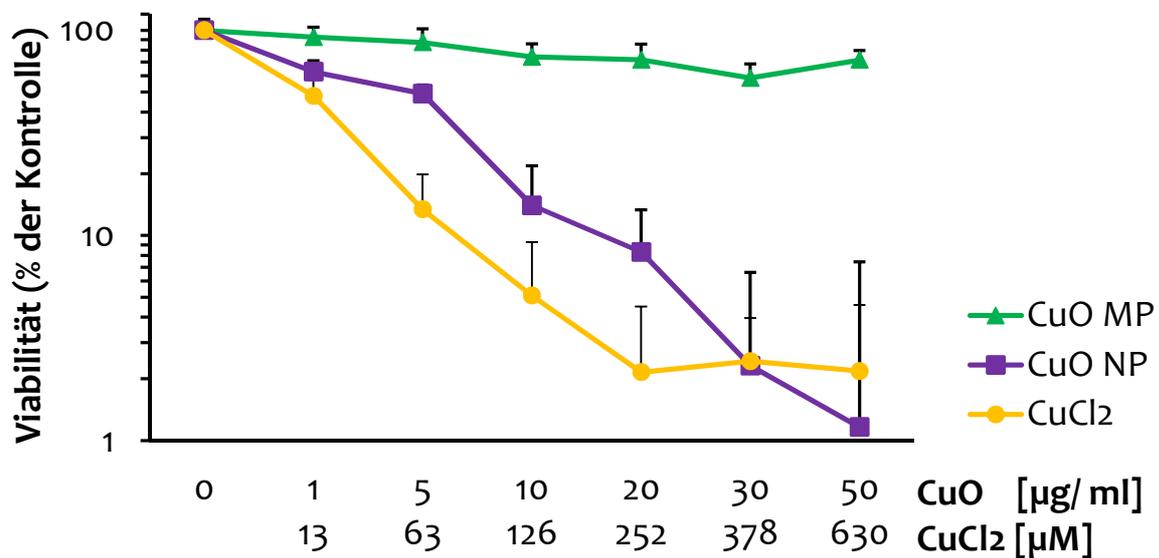


Abbildung 54: Einfluss auf die Viabilität. A549-Zellen wurden 24 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, anschließend mit CCK-8 versetzt, 1 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

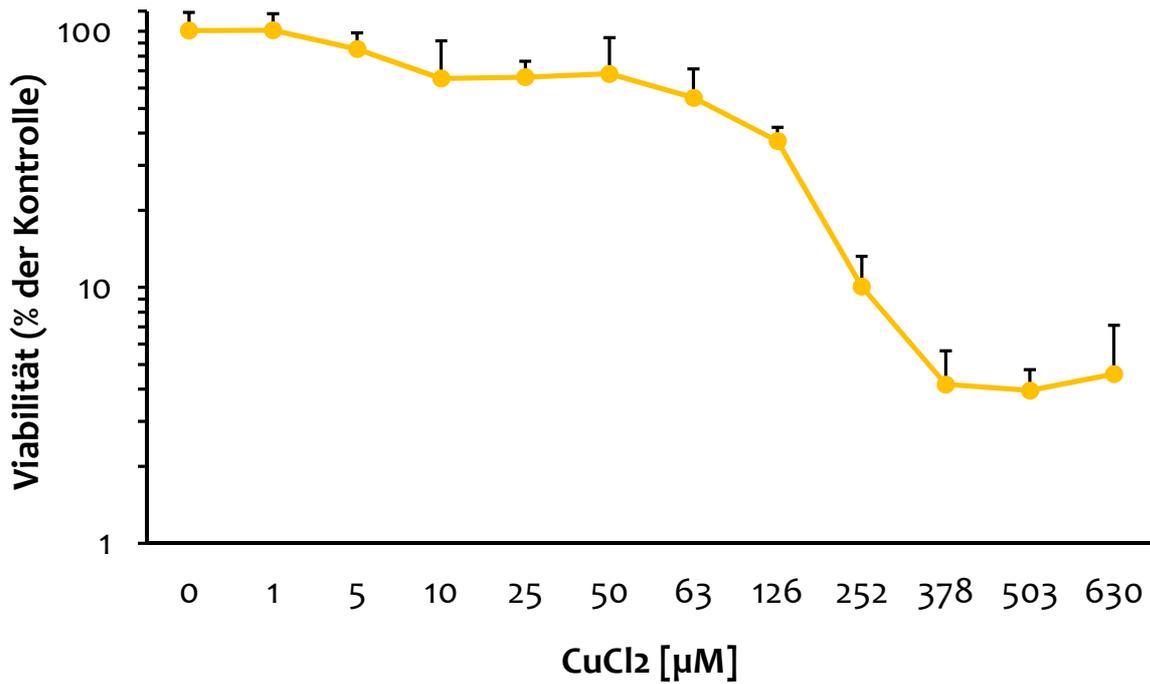


Abbildung 55: Einfluss einer einstündigen Koinkubation von CuCl₂ und CCK-8 auf die Viabilität. A549-Zellen wurden 1 h mit CuCl₂ und CCK-8 behandelt und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen + SD.

8.7.5.3 Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit nach 4 h Inkubation in A549-Zellen

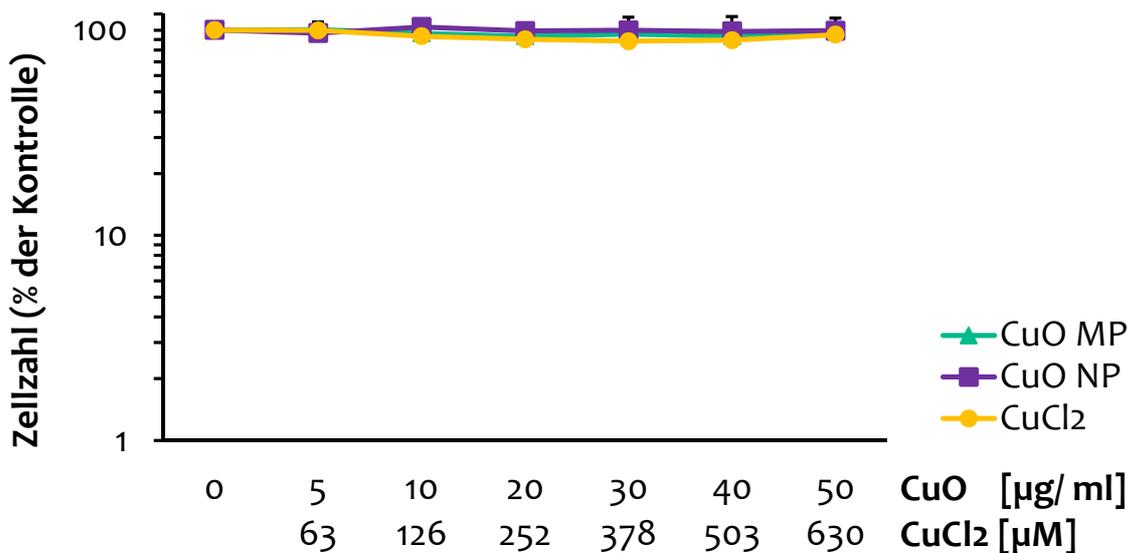


Abbildung 56: Einfluss auf die Zellzahl. A549-Zellen wurden für 4 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, trypsinisiert und gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

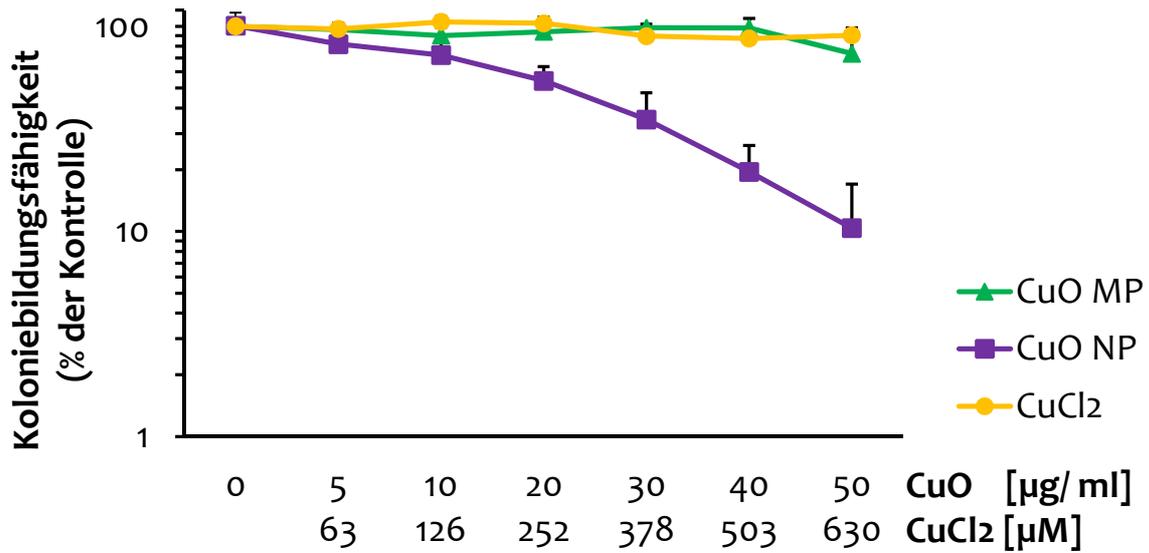


Abbildung 57: Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit. A549-Zellen wurden für 4 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ behandelt, trypsiniert, gezählt und erneut ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Löslichkeit.

8.7.6 APOPTOSEDATEN

8.7.6.1 AIF-Fluoreszenz im Zellkern und Koloniebildungsfähigkeit nach 4, 8 und 16 h

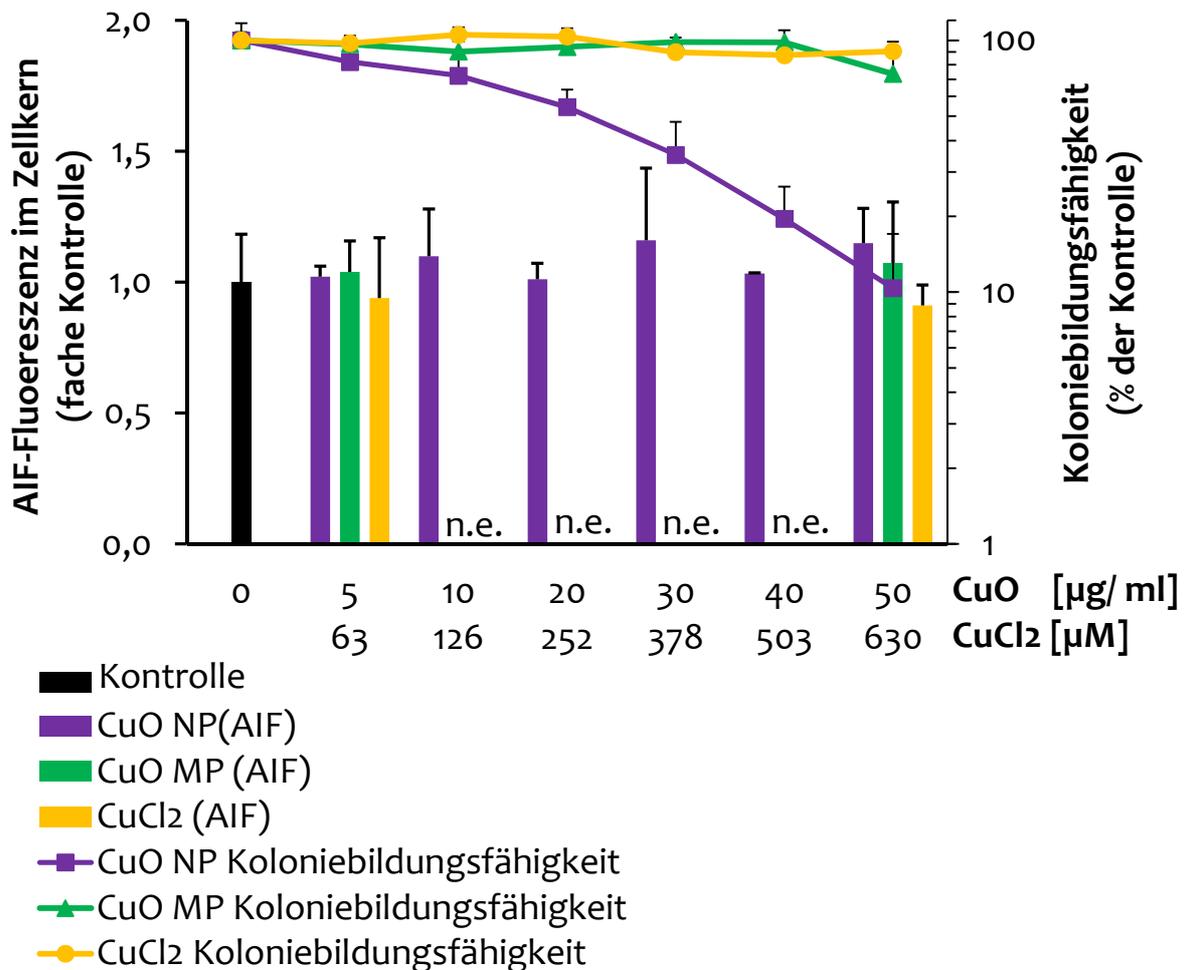


Abbildung 58: Einfluss auf die AIF-Lokalisation und die Koloniebildungsfähigkeit. A549 Zellen wurden für 4 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, mit einem gegen AIF gerichteten Antikörper behandelt und die AIF-Fluoreszenz im Kern am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte die $1,64 \pm 0,09$ -fache Erhöhung der AIF-Translokation im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (≥ 50 Zellen pro Experiment) + SD. Zur Ermittlung der Koloniebildungsfähigkeit wurden die Zellen nach der Behandlung trypsinisiert, gezählt und erneut ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e. nicht ermittelt.

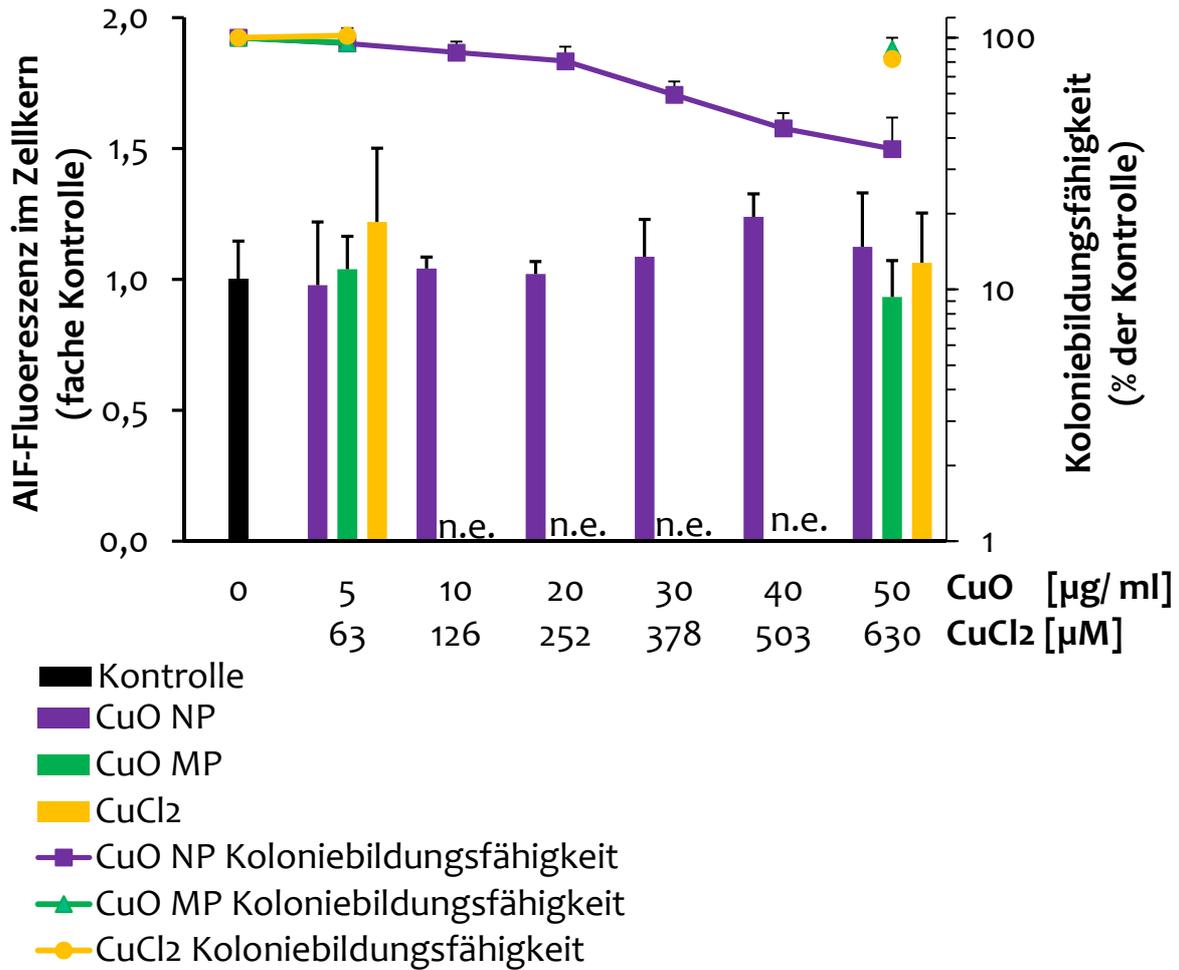


Abbildung 59: Einfluss auf die AIF-Lokalisation und die Koloniebildungsfähigkeit. A549 Zellen wurden für 8 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, mit einem gegen AIF gerichteten Antikörper behandelt und die AIF-Fluoreszenz im Kern am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte die $2,21 \pm 0,33$ -fache Erhöhung der AIF-Translokation im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (≥ 50 Zellen pro Experiment) + SD. Zur Ermittlung der Koloniebildungsfähigkeit wurden die Zellen nach der Behandlung trypsiniert, gezählt und erneut ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e. nicht ermittelt.

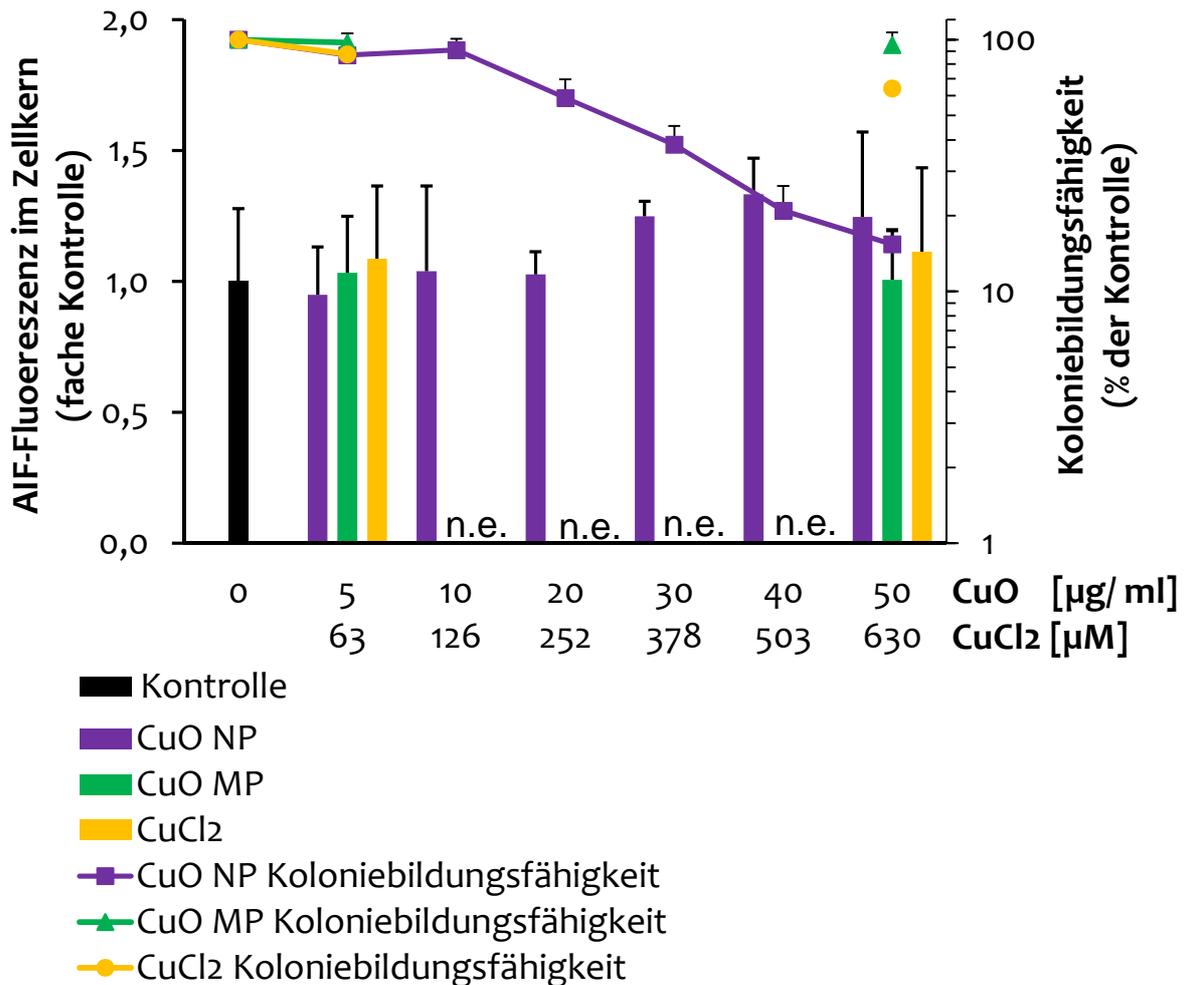


Abbildung 6o: Einfluss auf die AIF-Lokalisation und die Koloniebildungsfähigkeit. A549 Zellen wurden für 16 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, mit einem gegen AIF gerichteten Antikörper behandelt und die AIF-Fluoreszenz im Kern am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte die 2,33 ± 0,74-fache Erhöhung der AIF-Translokation im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (≥ 50 Zellen pro Experiment) + SD. Zur Ermittlung der Koloniebildungsfähigkeit wurden die Zellen nach der Behandlung trypsiniert, gezählt und erneut ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD. 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e. nicht ermittelt.

8.7.6.2 Caspase

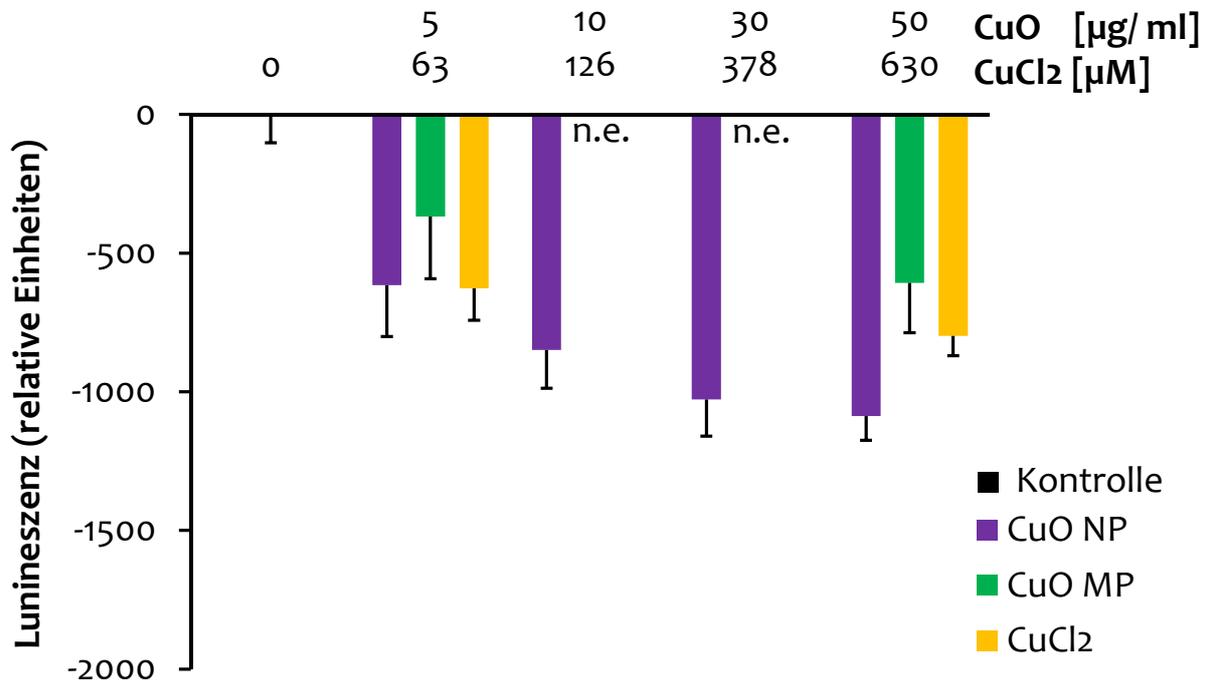


Abbildung 61: Abnahme der Lumineszenz durch CuO NP, CuO MP und CuCl₂ in DMEM mit 10% FKS. Die jeweiligen Suspensionen wurden unter den Versuchsbedingungen behandelt und die Lumineszenz ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten – SD. Abkürzung: n.e.: nicht ermittelt.

8.7.6.3 SubG1-Peak und Zellzahl nach 4 h, 8 h und 16 h

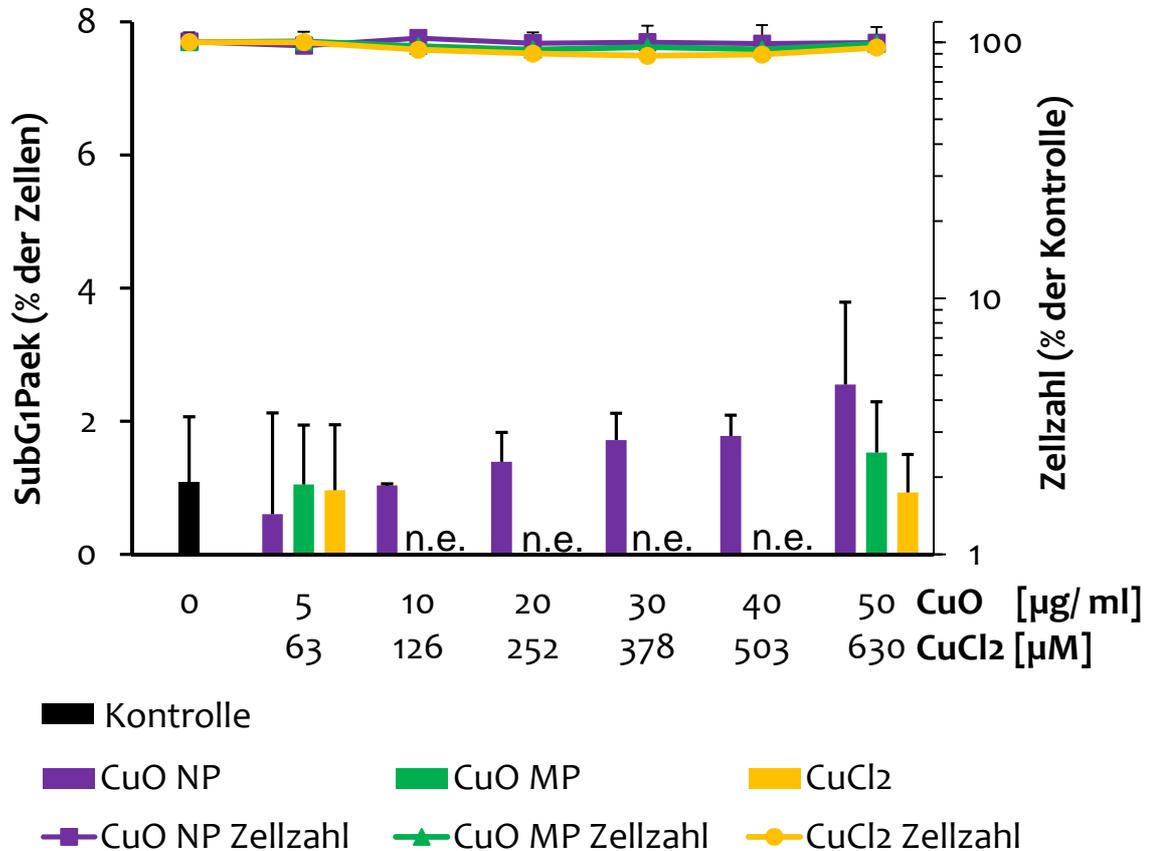


Abbildung 62: Anteil an Zellen die einen SubG1-Peak aufweisen. A549 Zellen wurden für 4 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, die DNA mit DAPI angefärbt und der Anteil Zellen mit SubG1-DNA-Gehalt am Durchflusszytometer quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte einen SubG1-Peak in $2,40 \pm 0,08\%$ der Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten + SD. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen nach der Behandlung trypsinisiert und gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD 50 µg/ml entsprechen $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CuO und $630 \mu\text{M}$ Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e.: nicht ermittelt.

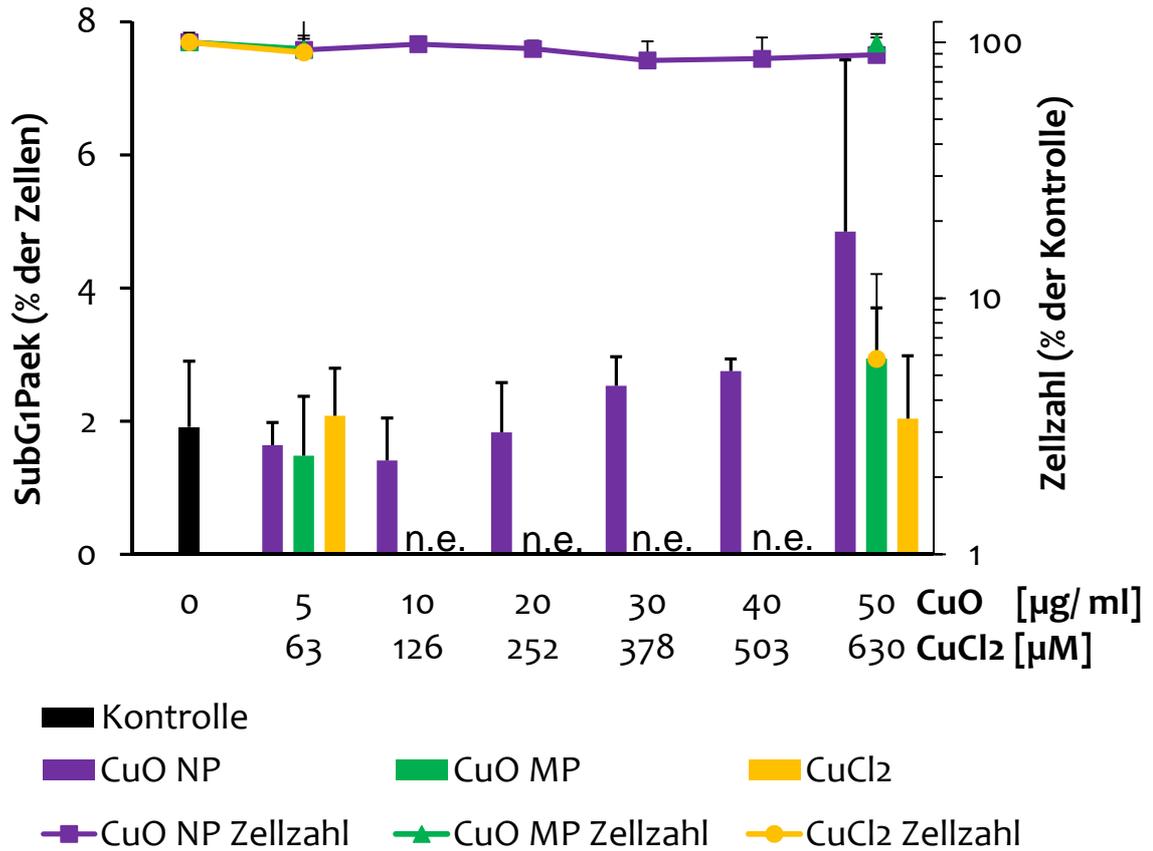


Abbildung 63: Anteil an Zellen die einen SubG1-Peak aufweisen. A549 Zellen wurden für 8 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, die DNA mit DAPI angefärbt und der Anteil Zellen mit SubG1-DNA-Gehalt am Durchflusszytometer quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte einen SubG1-Peak in 4,57 ± 1,70% der Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten + SD. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen nach der Behandlung trypsinisiert und gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD 50 µg/ml entsprechen 10 µg/cm² CuO und 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e.: nicht ermittelt.

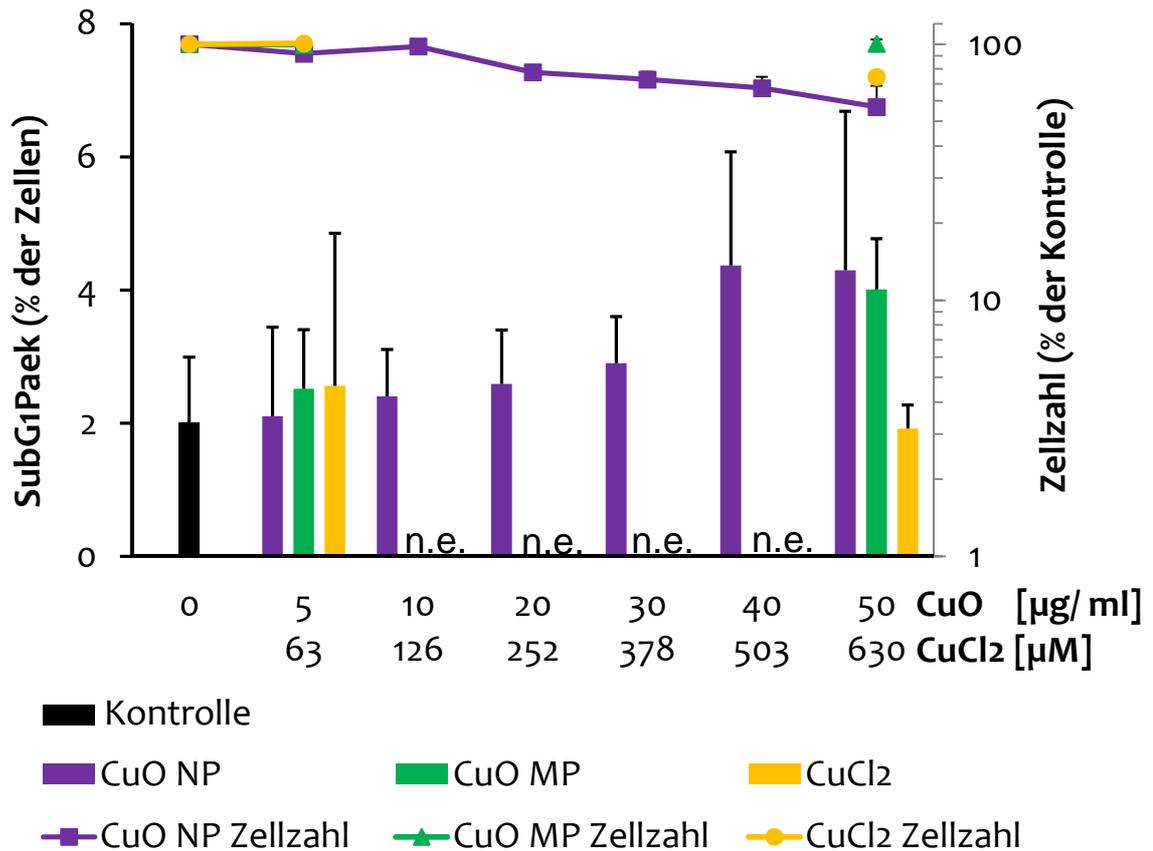


Abbildung 64: Anteil an Zellen die einen SubG1-Peak aufweisen. A549 Zellen wurden für 16 h mit CuO NP, CuO MP oder CuCl₂ inkubiert, fixiert, die DNA mit DAPI angefärbt und der Anteil Zellen mit SubG1-DNA-Gehalt am Durchflusszytometer quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde 400 nM Staurosporin verwendet; es bewirkte einen SubG1-Peak in $7,68 \pm 2,04\%$ der Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten + SD. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen nach der Behandlung trypsinisiert und gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 9 Bestimmungen + SD 50 µg/ml entsprechen $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CuO und $630 \mu\text{M}$ Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Abkürzung: n.e.: nicht ermittelt.

8.7.6.4 SubG1-Peak Methodenevaluierung

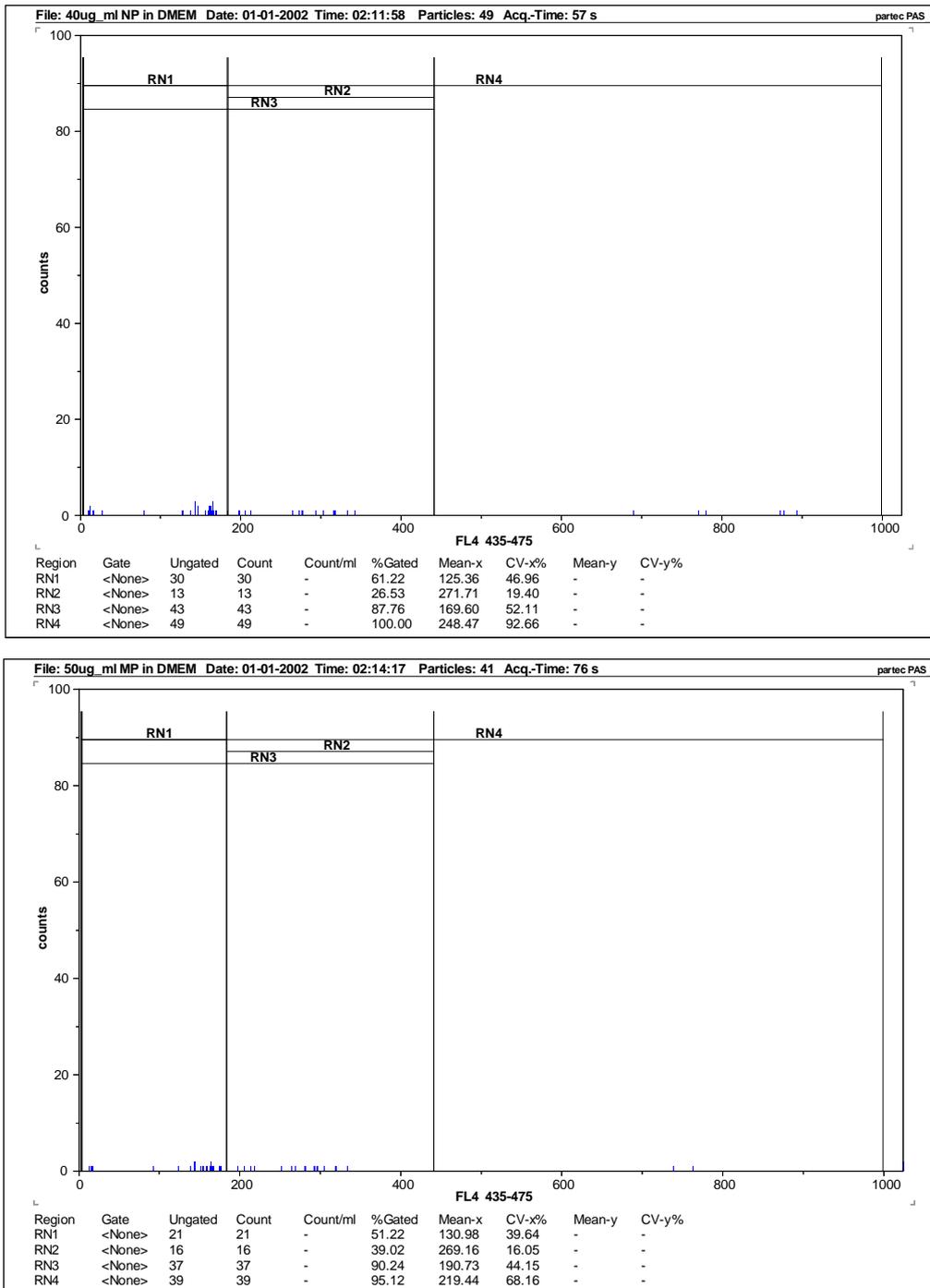


Abbildung 65: Repräsentative Histogramme von 40 µg/ ml CuO NP (oben) und 50 µg/ ml CuO MP (unten) in DMEM mit 10% FKS. Dargestellt sind die Ereignisse, die mit den Partikelsuspensionen im DAPI-Kanal gemessen wurden.

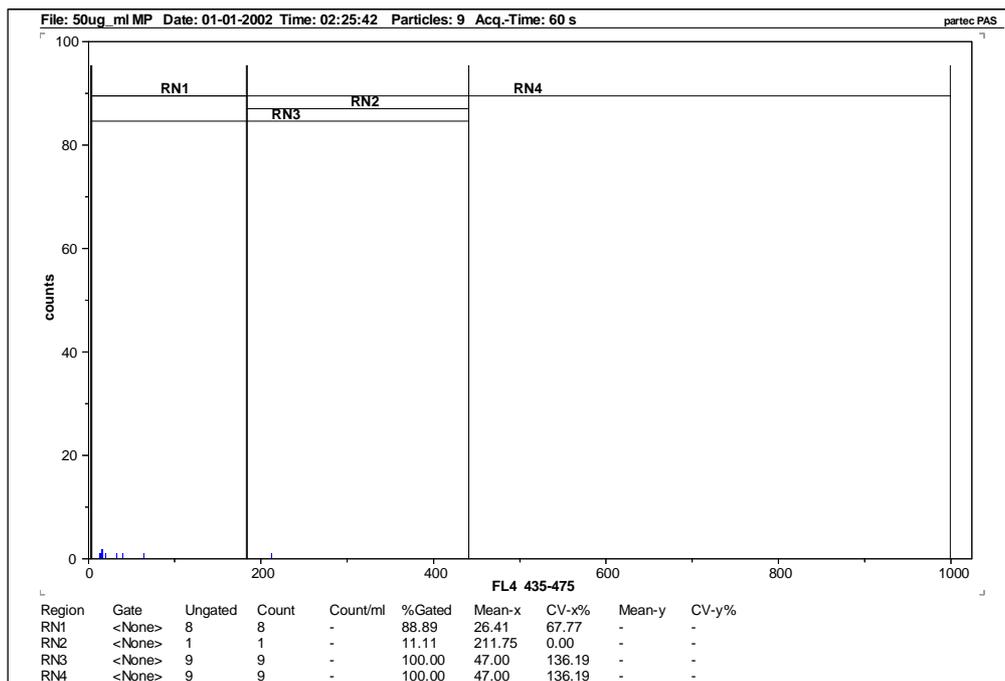
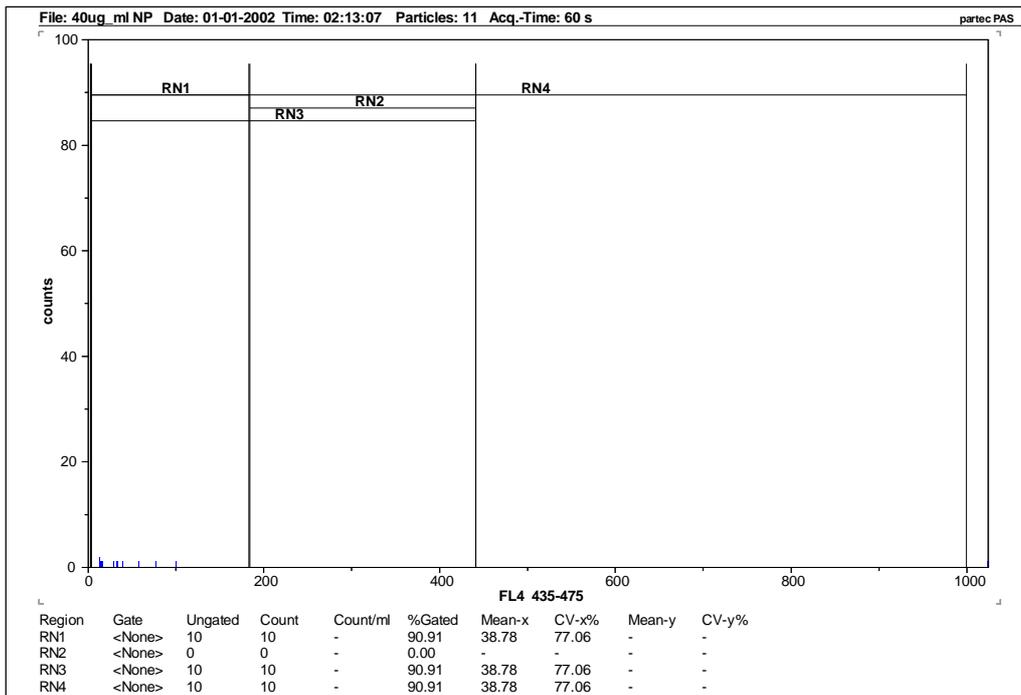
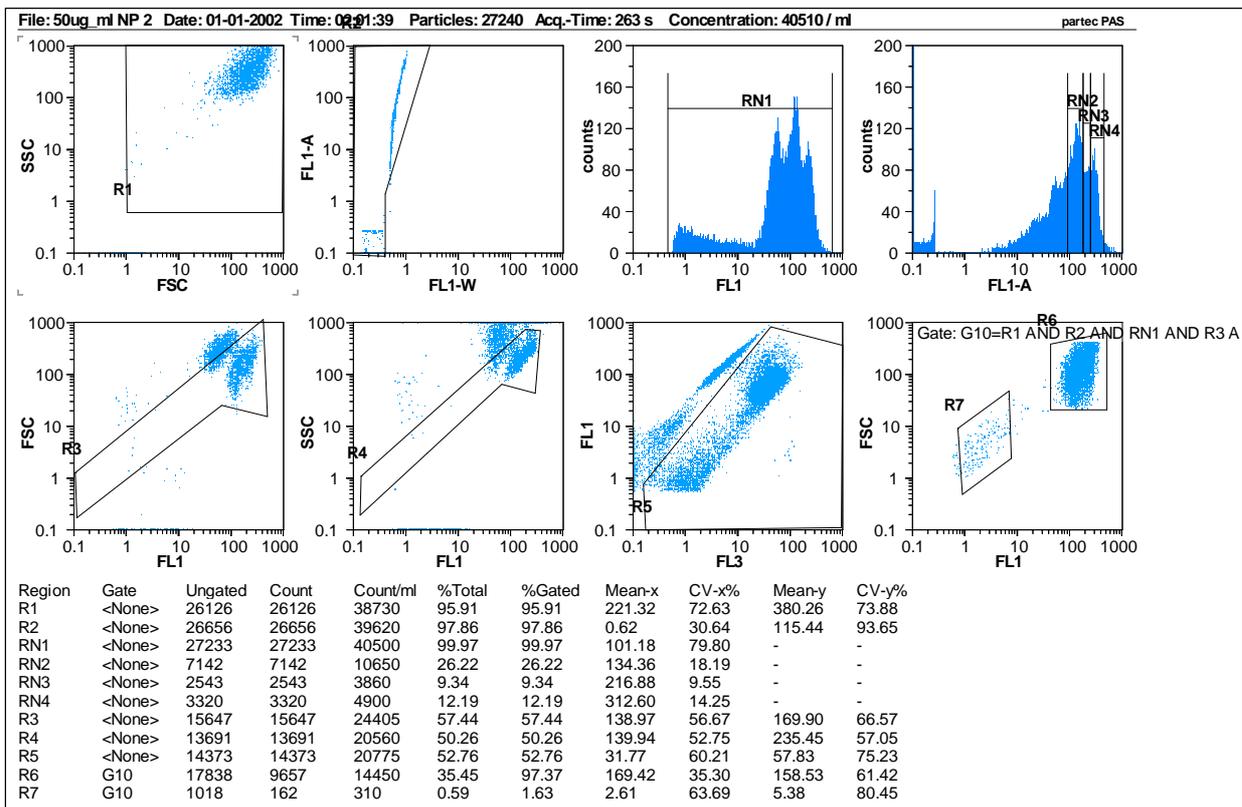
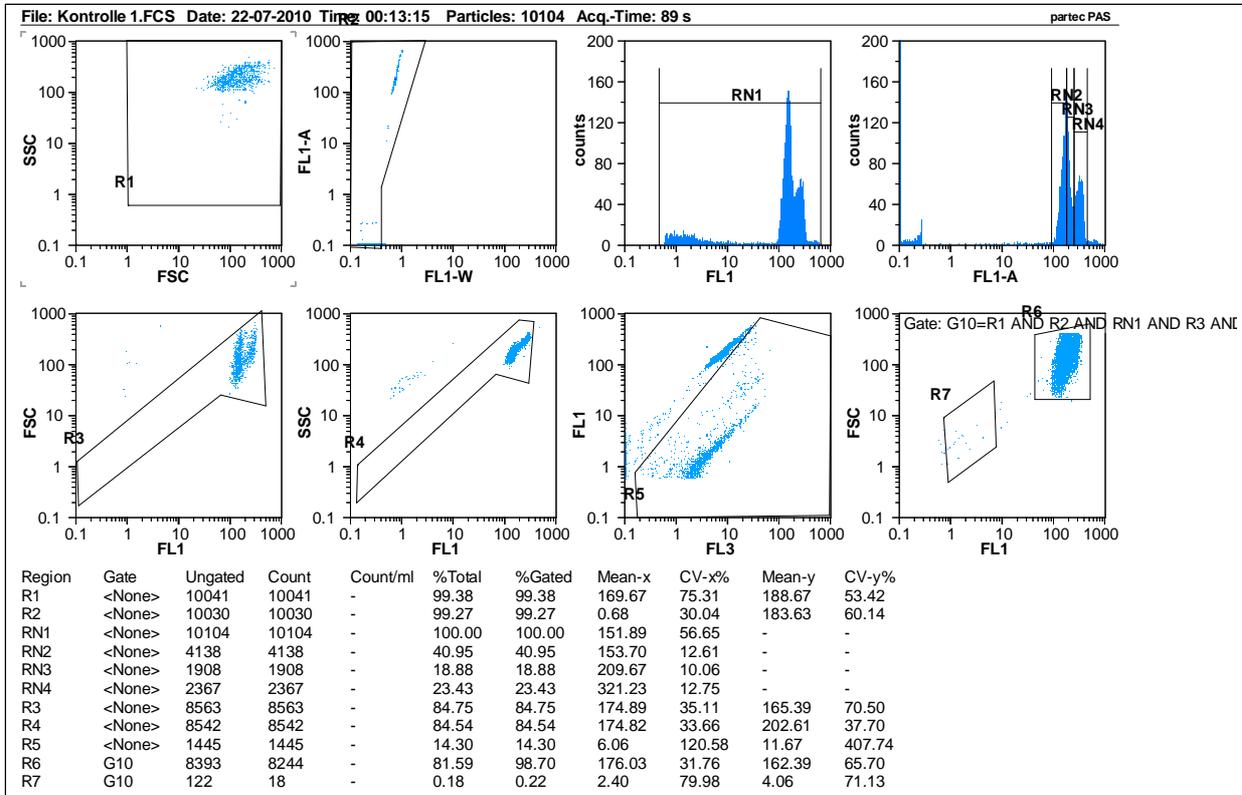


Abbildung 66: Repräsentative Histogramme von 40 µg/ ml CuO NP (oben) und 50 µg/ ml CuO MP (unten) nach Behandlung der Partikelsuspensionen analog zu den Zellkulturversuchen. Dargestellt sind die Ereignisse, die nach der Behandlung im DAPI-Kanal gemessen wurden.

8.7.7 MIKROKERNTEST-METHODENEVALUIERUNG

8.7.7.1 Zellkulturversuche



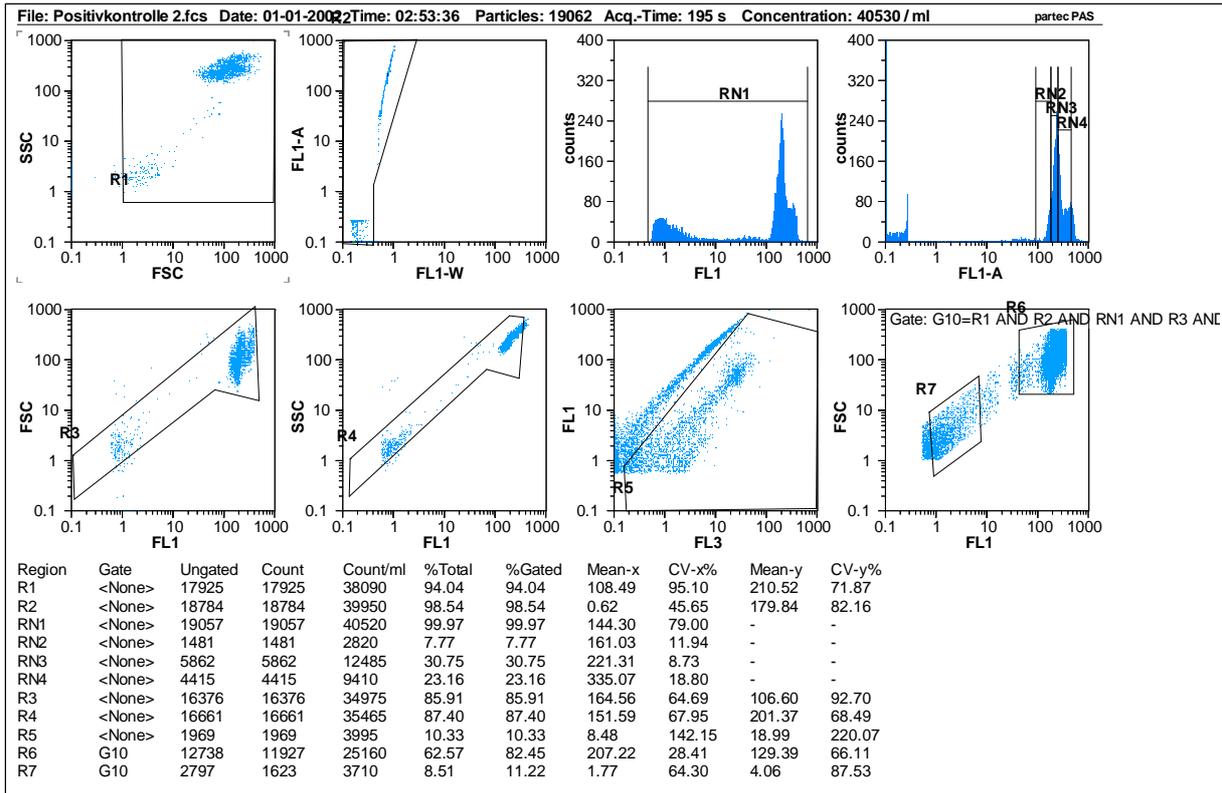
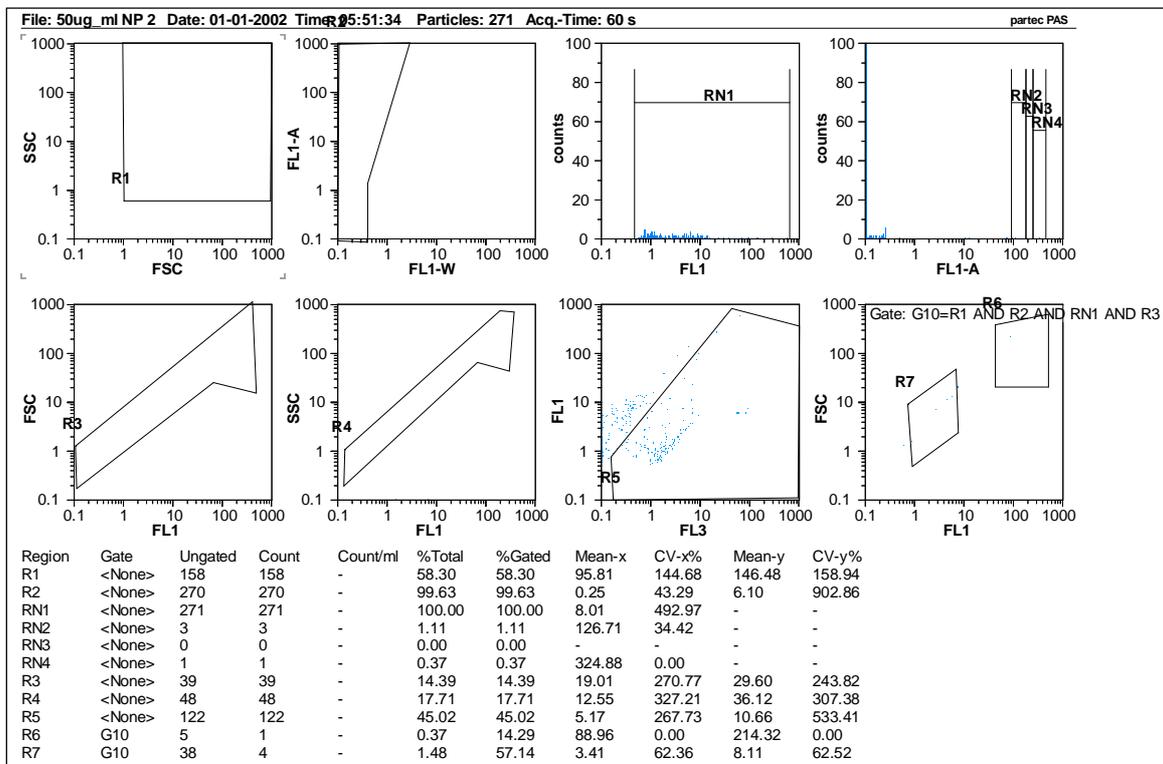
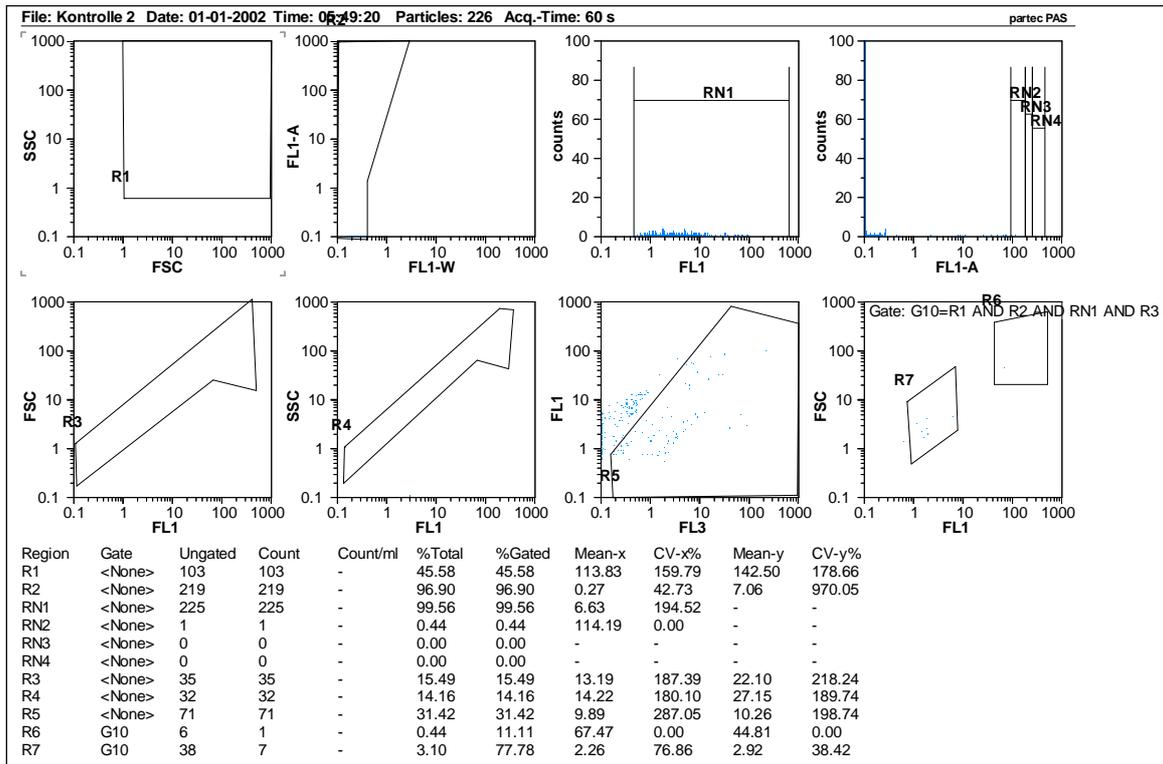


Abbildung 67: Repräsentative Histogramme der Daten des des Mikrokernversuchs. Dargestellt sind die Daten der Kontrollzellen (S. 144, oben), von mit 50 µg/ ml CuO NP behandelten A549-Zellen (S. 144, unten) und von mit 400 nM STaurosporin behandelten A549-Zellen (S. 145). Die Berechnung der Anzahl an Mikrokernen erfolgte über die in Region 6 (R6) und 7 (R7,) erfassten Ereignisse in der Spalte Count.

8.7.7.2 Kontrollmessungen mit den Partikeln



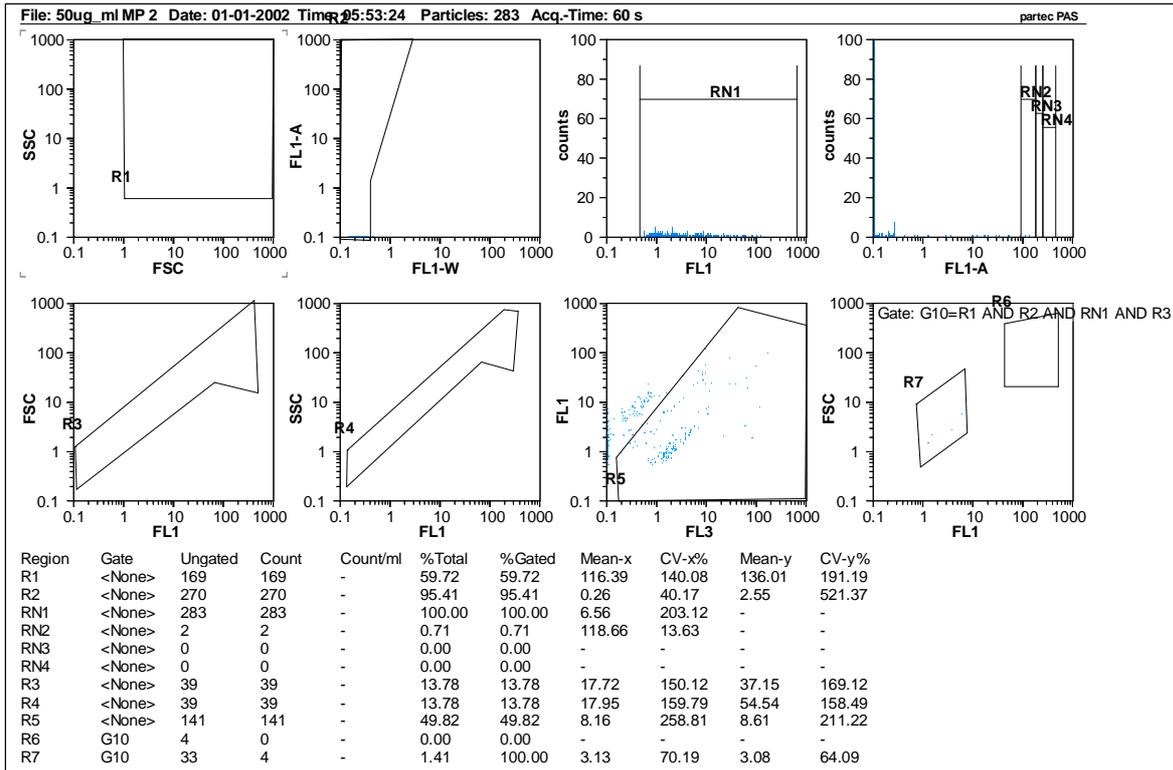
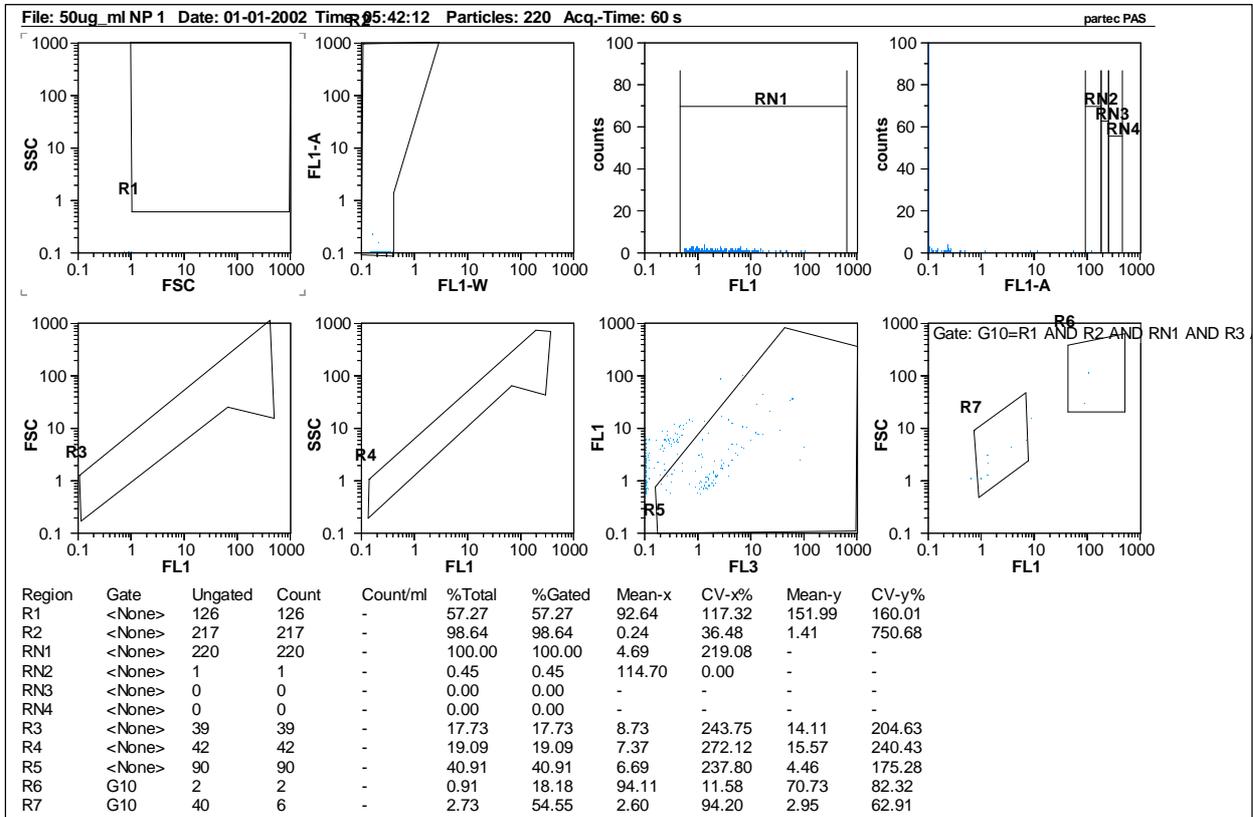


Abbildung 68: Repräsentative Histogramme des Mikrokerntests. DMEM mit 10% FKS (S. 146, oben), 50 µg/ml CuO NP (S. 146, unten) und 50 µg/ml CuO MP (S. 147, oben) in DMEM mit 10% FKS.



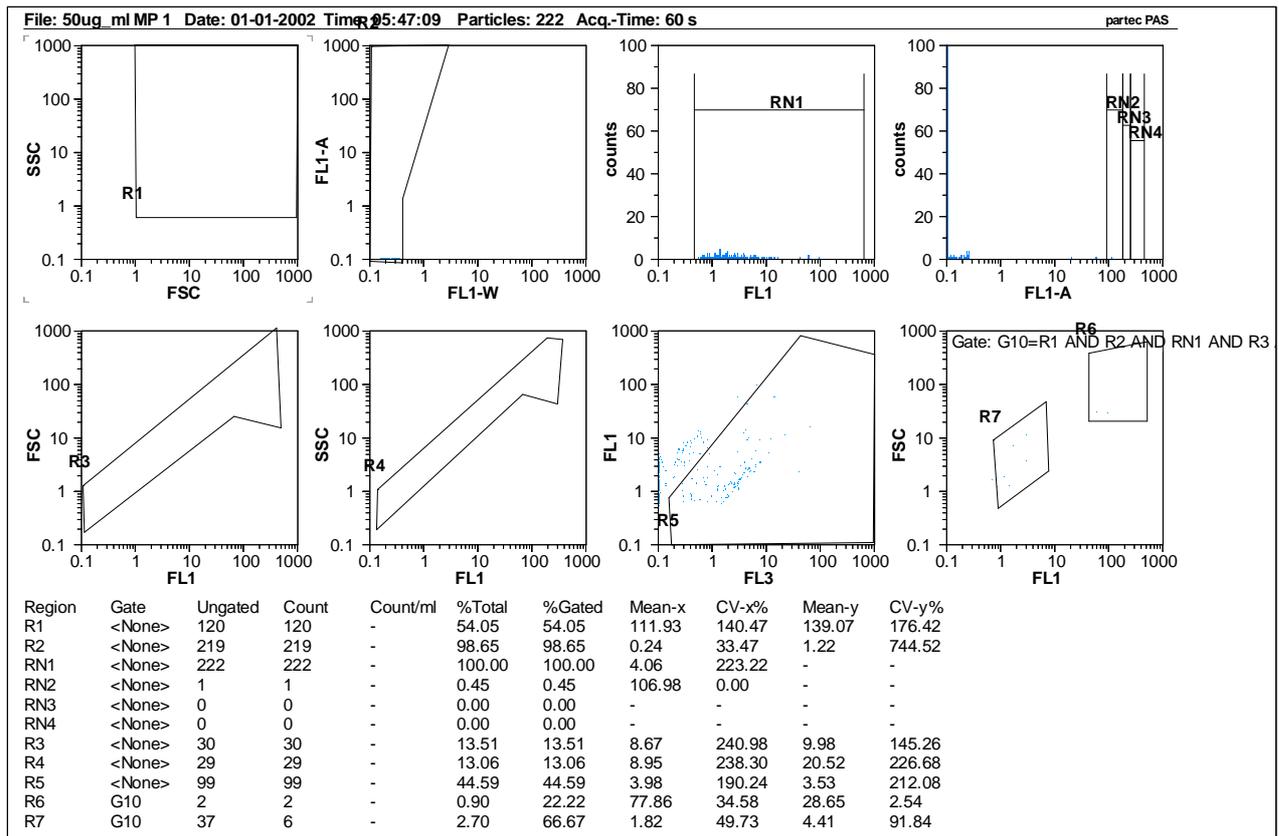


Abbildung 69: Repräsentative Histogramme des Mikrokerntests. Partikelsuspensionen wurden analog zu den Zellversuchen inkubiert und mit den Reagenzien behandelt. Gezeigt sind repräsentative Diagramme von 50 µg/ ml CuO NP (S. 147, unten) und 50 µg/ ml CuO MP (S. 148).

9 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

2008

- Duthie, M. Grassmann, A. Semisch, J. Beckmann (2008), Optically active organotin compounds derived from β -pinene. The quest for chiral polystannanes, *Organometallics*, 27(7), 1495-1500.

2010

- Hofmann, S. Thierbach, A. Semisch, A. Hartwig, M. Taupitz, E. Rühl, C. Graf (2010), Highly monodisperse water-dispersible iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *J. Mat. Chem.*, 20, 7842-7853.

Publikationen in Vorbereitung

- Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig, Cyto- and genotoxicity of nano- and microscale copper oxide particles: Role bioavailability.
- Semisch, A. Hartwig, Copper ions interfere with the extracellular reduction of water soluble tetrazolium salt 8 (WST-8).
- Semisch, E. Maser, J. Ohle, B. Witt, S. Diabaté, C. Weiss, A. Hartwig, Interleukin-6 and interleukin-8 release from A549 cells induced by nano- and microscale metal (oxide) particles.

Veröffentlichte Beiträge

- Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig: Toxizität von nano- und mikropartikulärem Kupferoxid: Zelluläre Aufnahme und der Einfluss auf die genomische Stabilität; Schriftenreihe der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente, in Druck.

Veröffentlichte Abstracts

- Semisch, R. Lohmann, K. Chodakowski, C. Strehmel, F. Teucher, A. Hartwig: Characterization of reference materials for the toxicological evaluation of nanomaterials; *Mutagenesis*, 26 (5), S. 689-722, Oxford University Press 2011 (ISSN 0267-8357).

Vorträge

- 11. Treffen des Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg, Konstanz, 13. Oktober 2011
Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg (BWTOX.NET)
“Are differences in bioavailability responsible for discrepancies in toxicity of nano- and microscale copper oxide?”
A. Semisch, E.Maser, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig
- 10th International Particle Toxicology Conference (IPTC), Düsseldorf, 4.-7. Juni 2013
„Impact of nano- and microscale copper oxide on genomic stability: Role of copper ion bioavailability and intracellular distribution”
A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig

Eingeladene Vorträge

- 28. Jahrestagung der GMS, Karlsruhe, 11.-13. Oktober 2012,
Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V. (GMS)
„Toxicological effects of nano-and microparticulate copper oxide: Cellular uptake and impact on genomic stability”
A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig
- Seminarvortrag in der Gruppe von Prof. Dr. C. Alexiou, Erlangen, 23.7.2013
„Vergleich der Toxizität von nano- und mikroskaligem Kupferoxid: Bioverfügbarkeit und Einfluss auf die genomische Stabilität“
A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig

Posterbeiträge auf Fachtagungen

- 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart, 20.-22. September 2010
Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker
„Charakterisierung von Vergleichsmaterialien für die toxikologische Bewertung von nanoskaligen Partikeln“
A. Semisch, R. Lohmann, K. Chodakowski, C. Strehmel, F. Teucher, A. Hartwig
- 26. Jahrestagung der GMS, Leipzig, 7.-9. Oktober 2010
Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V.
„Einfluss von nano- und mikroskaligem Kupferoxid sowie Kupferchlorid auf die genomische Stabilität“
A. Semisch, F. Teucher, A. Hartwig
- 10. Treffen des Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg, Freiburg, 12. Oktober 2010, Freiburg
Toxikologie-Netzwerk Baden Württemberg (TOXBW.NET)
“Comparison of nano- and microscale copper oxide and copper chloride: impact on genomic stability”
A. Semisch, F. Teucher, A. Hartwig,
- 25. Tagung der GUM, Potsdam, 12.-15. Oktober 2010
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V.
„Vergleichende Untersuchung des Einflusses von (nano)partikulären und löslichen Kupferverbindungen auf die genomische Stabilität“
A. Semisch, F. Teucher, A. Hartwig,
- 7th GUM 32P-postlabeling Workshop & UKEMS / Dutch EMS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Oxidative DNA damage, Münster, 28.-29. März 2011
United Kingdom Environmental Mutagen Society
“Characterization of reference materials for the toxicological evaluation of nanomaterials”
A. Semisch, R. Lohmann, K. Chodakowski, C. Strehmel, F. Teucher, A. Hartwig

- International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles (SPP 1313), Essen, 11.-15. September 2011
Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)
“Synthesis and characterization of selective sensor nanoparticles for magnetic resonance imaging”
D. Nordmeyer, P. Stumpf, D. Gröger, F. Paulus, R. Haag, A. Semisch, C. Richter, A. Hartwig, J. Dervede, R. Malz, U. Rauch-Kroehnert, J. Schnorr, I. Gemeinhardt, M. Taupitz, C. Graf, E. Rühl,
- 11. Treffen des Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg, Konstanz, 13. Oktober 2011
Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg (TOXBW.NET)
“Physicochemical and toxicological characterization of nickel and nickel oxide nanoparticles in human lung epithelial cells”
E. Maser, M. Dilger, A. Semisch, A. Hartwig
- 26. Tagung der GUM, Mainz, 27. Februar-3. März .2012
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V.
“Differences in bioavailability: Are they responsible for discrepancies in toxicity of nano- and microscale copper oxide?”
A. Semisch, A. Hartwig,
- 26. Tagung der GUM, Mainz, 27. Februar-3. März .2012
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V.
“Physicochemical and toxicological characterization of nickel and nickel oxide nanoparticles in human lung epithelial cells”
E. Maser, A. Semisch, M. Dilger, A. Hartwig
- 76. Jahrestagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Berlin, 25.-30. März 2012
Deutsche Physikalische Gesellschaft e.V. (DPG)
“Synthesis and characterization of selective sensor nanoparticles for magnetic resonance imaging”
D. Nordmeyer, P. Stumpf, D. Gröger, F. Paulus, R. Haag, A. Semisch, C. Richter, A. Hartwig, J. Dervede, R. Malz, U. Rauch-Kröhnert, J. Schnorr, I. Gemeinhardt, M. Taupitz, C. Graf, E. Rühl

- 111. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, Leipzig, 17.-19. Mai 2012
Deutsche Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e.V. (DBG)
“Synthesis and characterization of selective sensor nanoparticles for magnetic resonance imaging”
D. Nordmeyer, P. Stumpf, D. Gröger, F. Paulus, R. Haag, A. Semisch, C. Richter, A. Hartwig, J. Dervede, R. Malz, U. Rauch-Kroehnert, J. Schnorr, I. Gemeinhardt, M. Taupitz, C. Graf, E. Rühl
- 42. Conference of the European Environmental Mutagen Society, Warschau, Polen, 16.-20. September 2012
European Environmental Mutagen Society (EEMS)
“Toxicity of nano- and microscale copper oxide: Investigations on cellular uptake and the impact on genomic stability”
A. Semisch, B. Witt, J. Ohle, A. Hartwig
- 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Halle/Saale, 5.-7.3.2013
Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT)
„Differences of intracellular bioavailability and metal ion release of nano- and microscale copper oxide: Impact on genomic stability“
A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig
- Arbeitstagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GdCh, Karlsruhe, 19./20.3.2013
Lebensmittelchemische Gesellschaft-Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh)
„Toxizität und Unterschiede der Löslichkeit sowie der intrazellulären Bioverfügbarkeit von nano- und mikroskaligem Kupferoxid“
A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig

Preise

- Sanofi-Aventis-Preis für das beste Poster der Deutschen Gesellschaft für Toxikologie e.V.
79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Halle/Saale, 5.-7.3.2013
Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT)
„Differences of intracellular bioavailability and metal ion release of nano- and microscale copper oxide: Impact on genomic stability“
A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, A. Hartwig

Reisestipendien

- Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)
79. Tagung der DGPT, 5.-7.3.2013, Halle/Saale

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig, die meine Promotion betreute. Ihre unterstützende und motivierende Begleitung hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für Rat und Tat und praktische Tipps und Tricks bei der Umsetzung der Laborversuche bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Claudia Keil.

Dem gesamten Arbeitskreis sowie den Mitgliedern der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) danke ich für die nette, motivierende Atmosphäre und die Diskussionsbereitschaft.

Frau PD Dr. Beate Köberle, Frau Andrea Hammer, Frau Dr. Barbara Koch, Frau Elisa Schulze und Frau Dr. Ruth Lohmann gilt mein Dank für das Korrekturlesen meiner Dissertation und die wertvollen Anregungen.

Den Diplomanden Christine Strehmel, Franziska Teucher, Julia Ohle, Marco Dilger und Barbara Witt danke ich für die Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Mitarbeitern des Karlsruher Institutes für Technologie (KIT) bedanken: Herrn Dr. Thomas Bergfeldt und Frau Cuc Ly von der Abteilung Technische Infrastruktur und Dienste - Ver- und Entsorgungsanlagen (TID-VEA) für die ICP-MS-Messungen, Herrn Dipl.-Ing. Volker Zibat vom Laboratorium für Elektronenmikroskopie für die REM- und EDS-Messungen, Frau Dr. Christel Adelhelm und ihren Mitarbeitern vom Institut für Angewandte Werkstoffphysik (IAM) für die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes, Frau Anna Schuch vom Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik für die Unterstützung bei den Viskositätsmessungen sowie Herrn Dr. Mario Pauli vom Institut für Hochfrequenztechnik und Elektronik (IHE) für die Messung der Dielektrizitätskonstanten. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dipl.-Ing. Sören Selve von der Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie an der Technischen Universität Berlin (TU Berlin) für die XRD-Messungen sowie bei Herrn Dr. Stephan Costabel vom Institut für Angewandte Geophysik (TU Berlin) für die Messung der BET-Oberfläche. Herr Prof. Dr. Alexander Bürkle (Universität Konstanz) stellte freundlicherweise die Mausmyeloma-Zelllinie 10H bereit.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell unterstützt, im Rahmen des Exzellenzclusters „Unifying Concepts in Catalysis (UniCat)“ an der Technischen Universität Berlin (TU Berlin) und im Rahmen der Exzellenzinitiative am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die stete Unterstützung in allen Lebenslagen.