Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. Guido Hildebrandt

„*In vitro*-Testung von Goldnanopartikeln als Radioenhancer in der Strahlentherapie“

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Frieda-Marie Tyralla
geboren am 30.01.1997 in Radebeul

Rostock, Juni 2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004462

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hildebrandt, Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. B. Frerich, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: PD Dr.-Ing., Dr. habil. med. B. Frey, Stellvertretender Leiter Translationale Strahlenbiologie des Uniklinikums Erlangen

Datum der Einreichung: 01.06.2022

Datum der Verteidigung: 26.09.2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Frau PD Dr. rer. nat. habil. Katrin Manda angefertigt (Klinikdirektor: Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis……..IV-V
Tabellenverzeichnis……...VI
Abkürzungsverzeichnis……....VII-VIII

1. Einleitung……...……1
1.1 Gold-Nanopartikel…….……3
1.2 Gold-Nanopartikel als Radioenhancer…….……...4
1.3 Der Zellzyklus……4
1.4 Weitere Einsatzmöglichkeiten von Gold-Nanopartikeln in der Tumortherapie…….…6
1.5 Zielstellung…….……8

2. Material und Methoden…….…….....10
2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken…….……10
2.1.1 Tumorzellen A549…….……10
2.1.2 Normalgewebszellen BEAS-2B……...…….……....10
2.1.3 Zellkultivierung……11
2.1.4 Zellzahlbestimmung……...……...……12
2.1.5 Zellbestrahlung…….…….……12
2.2 Gold-Nanopartikel…….……...12
2.3 Wachstumskurven…….……...13
2.4 Koloniebildungstest…….……14
2.5 BrdU-Test…….……15
2.6 Untersuchung der Genexpression von *CDKN1B* und *RB1*…….……..16
2.6.1 RNA-Isolation……...17
2.6.2 cDNA-Synthese……18
2.6.3 Durchführung qRT-PCR…….……...19
2.7 Statistische Methoden…….……..22
2.8 Materialien und Geräte……23

3. Ergebnisse……..26
3.1 Wachstum……..……...26
3.1.1 Wachstum der A549-Zellen……..…….…….....……26

3.1.2 Wachstum der BEAS-2B-Zellen.....……29
3.1.3 Vergleich des Wachstums von A549- und BEAS-2B-Zellen.……32
3.2 Klonogenes Überleben…….33
3.2.1 Klonogenes Überleben der A549-Zellen unter Einfluss von GNP..……...33
3.2.2 Klonogenes Überleben der BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von GNP.……35
3.2.3 Vergleich des klonogenen Überlebens von A549- und BEAS-2B-Zellen.....36
3.3 Zellproliferation……...37
3.3.1 Zellproliferation der A549-Zellen unter Einfluss von GNP.……37
3.3.2 Zellproliferation der BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von GNP.……..38
3.3.3 Vergleich der Proliferation von A549- und BEAS-2B-Zellen.……..39
3.4 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1*…….……...39
3.4.1 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* in den A549-Zellen.……40
3.4.2 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* in den BEAS-2B-Zellen..……42
3.4.3 Vergleich der Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* in den A549- und BEAS-2B-Zellen.……...44

4. Diskussion……..45
4.1 Wachstum.…….……...45
4.1.1 Wachstum der A549-Zellen.……..45
4.1.2 Wachstum der BEAS-2B-Zellen.……...46
4.2 Klonogenes Überleben.……47
4.2.1 Klonogenes Überleben der A549-Zellen.……...……...47
4.2.2 Klonogenes Überleben der BEAS-2B-Zellen.……...……49
4.2.3 Einfluss der GNP auf das klonogene Überleben der A549- und BEAS-2B-Zellen.……49
4.3 Zellproliferation...……50
4.3.1 Zellproliferation der A549-Zellen.……...…..50
4.3.2 Zellproliferation der BEAS-2B-Zellen.……...……..51
4.4 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1*……..…..52
4.4.1 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* bei A549-Zellen.……52
4.4.2 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* bei BEAS-2B-Zellen.……..54
4.5 Ausblick und Einordnung der erhaltenen Ergebnisse für die Klinik..……...55

5. Zusammenfassung……..56

Literaturverzeichnis……A1-A6
Anhang……..A7-A12
Thesen
Eidesstattliche Erklärung
Lebenslauf
Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)…….....2
Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)…….....2
Abb. 3: Assoziation von Cyclin/CDK-Komplexen während des Zellzyklus und deren Inhibitoren…….....5
Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme der A549-Zellen bei 100facher Vergrößerung……..10
Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahme der BEAS-2B-Zellen bei 100facher Vergrößerung..…11
Abb. 6: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte für qRT-PCR…….….20
Abb. 7: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Gold-Nanopartikeln (GNP)……...26
Abb. 8: Anteil vitaler (vZ) und toter (tZ) A549-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von GNP in verschiedenen Konzentrationen, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well…….27
Abb. 9: Wachstum der BEAS-2B-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Gold-Nanopartikeln (GNP)……..29
Abb. 10: Anteil vitaler (vZ) und toter (tZ) BEAS-2B-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von GNP in verschiedenen Konzentrationen, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well....30
Abb. 11: Klonogenes Überleben (survival fraction, SF) der A549-Zellen mit und ohne GNP-Zugabe normiert auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle……33
Abb. 12: Klonogenes Überleben (survival fraction, SF) der BEAS-2B-Zellen mit und ohne GNP-Zugabe, normiert auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle……..……..…..35
Abb. 13: Proliferation der A549-Zellen, 24 h nach GNP-Zugabe, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP), Einsaatdichte 15 x 10^3 Zellen/Well. ..……..…36
Abb. 14: Proliferation der BEAS-2B-Zellen, 24 h nach GNP-Zugabe, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP), Einsaatdichte 15 x 10^3 Zellen/Well.....38
Abb. 15: Expression von *CDKN1B* in den A549-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP Zugabe in 1 x 10^{10} GNP/ml, gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz)……..39

Abb. 16: Expression von *RB1* in den A549-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP-Zugabe (1 x 10^{10} GNP/ml), gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz) ……..…….……40
Abb. 17: Expression von *CDKN1B* in den BEAS-2B-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP (1 x 10^{10} GNP/ml), gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz)…..……...……42
Abb. 18: Expression von *RB1* in den BEAS-2B-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP (1 x 10^{10} GNP/ml), gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz)…….....43
Abb. 19: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen (Kontrolle) mit exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……...……A7
Abb. 20: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……..…..…..A7
Abb. 21: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……..……A8
Abb. 22: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……..……A8
Abb. 23: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit und ohne GNP, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well…….……...……..……..…A9
Abb. 24: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen (Kontrolle) mit exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well…….……..A9
Abb. 25: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……...…....A10
Abb. 26: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……...……..A10
Abb. 27: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well…….....A11
Abb. 28: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit und ohne GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well……....A11

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Ansätze für die qRT-PCR mit und ohne Zusatz von Gold-Nanopartikeln (GNP)……17

Tab. 2: Zusammensetzung PCR-Mastermix mithilfe des „TaqMan“-Systems…….21

Tab. 3: Durch exponentielle Regressionsanalyse des exponentiellen Wachstums zwischen Tag 2 und Tag 6 bzw. Tag 4 und Tag 8 berechnete mittlere Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen…….28

Tab. 4: Durch exponentielle Regressionsanalyse des exponentiellen Wachstums zwischen Tag 2 und Tag 6 berechnete mittlere Zellpopulationsverdopplungszeiten der BEAS-2B-Zellen……31

Tab. 5: Vergleich Plattiereffizienzen und Überlebensfraktionen der A549-Zellen nach Bestrahlung und unter Einfluss von 1 x 10^{10} GNP/ml……....32

Tab. 6: Vergleich Plattiereffizienzen und Überlebensfraktionen der BEAS-2B-Zellen nach Bestrahlung und unter Einfluss von 1 x 10^{10} GNP/ml……..…….…….....34

Tab. 7: Umrechnung der GNP-Konzentrationen für alle Experimente……..……A12

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BAEC	Bovine Aortic Endothelial Cells
Bax	Bcl-2-associated X protein (Bcl-2-assoziiertes X Protein)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Protein)
BrdU	Bromdesoxyuridin
CDK	cyclin dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
CDKN1B	cyclin dependent kinase inhibitor 1B (Synonym: p27)
CMNa	Glycididazolum Natrium
CT	Computertomographie
Ct-Wert	Cycle Threshold (Zyklus-Schwelle)
DEF	Dose enhancement factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)
GAPDH	Glutathion-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
Glu-GNP	Glucose-Gold-Nanopartikel
GNP	Gold-Nanopartikel
Gy	Gray
H_2O	Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
kVp	peak kilovoltage (Spitzen-Kilospannung)
MeV	Megaelektronenvolt

M-Phase	Mitose-Phase (Zellzyklus)
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NIR	Nahes Infrarot
p53	(Tumor-)protein 53
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Plattiereffizienz
PEG	Polyethylenglycol
P/S	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RB1	Retinoblastom-Protein 1
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standardabweichung
SF	Survival fraction
SPR	Surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonenresonanz)
S-Phase	Synthese-Phase (Zellzyklus)
WK	Wachstumskurve
WT	Wachstum

1. Einleitung

Im Jahr 2016 erkrankten in Deutschland 21.500 Frauen und 35.960 Männer an einem Bronchialkarzinom und knapp 45.000 Patienten verstarben daran (ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, 2019). Wie aus dem Diagramm des ZENTRUMS FÜR KREBSREGISTERDATEN ersichtlich wird, ist die Lunge sowohl bei Frauen als auch bei Männern eine der drei häufigsten Tumorlokalisationen unter allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland (Abb. 1). Tumoren in der Lunge bilden bei Männern den höchsten und bei Frauen den zweithöchsten Anteil an Krebssterbefällen in Deutschland (Abb. 2). Aus diesem Grund wird fortlaufend nach neuen, effektiven Therapiemöglichkeiten gesucht.

Eine dieser Möglichkeiten stellt die Strahlentherapie dar. Dabei ist die gezielte Bestrahlung des Tumors, ohne Beschädigung von gesundem Gewebe, das sich in räumlicher Nähe befindet, eine medizinische und technische Herausforderung. Da die Lunge nicht fixiert werden kann und sich aufgrund der Ein- und Ausatmung des Patienten in ständiger Bewegung befindet, wird nach einer Möglichkeit gesucht, eine geringe Bestrahlungsdosis in den Tumorzellen so zu verstärken, dass eine effektive Therapie unter Schonung des umliegenden, gesunden Gewebes ermöglicht wird. Es wird nach potenziellen Radioenhancern gesucht, die die Sensitivität der behandelten Zellen für eine Bestrahlung erhöhen. Eine solche Möglichkeit wird seit längerem in der Verwendung von Nanopartikeln gesehen.

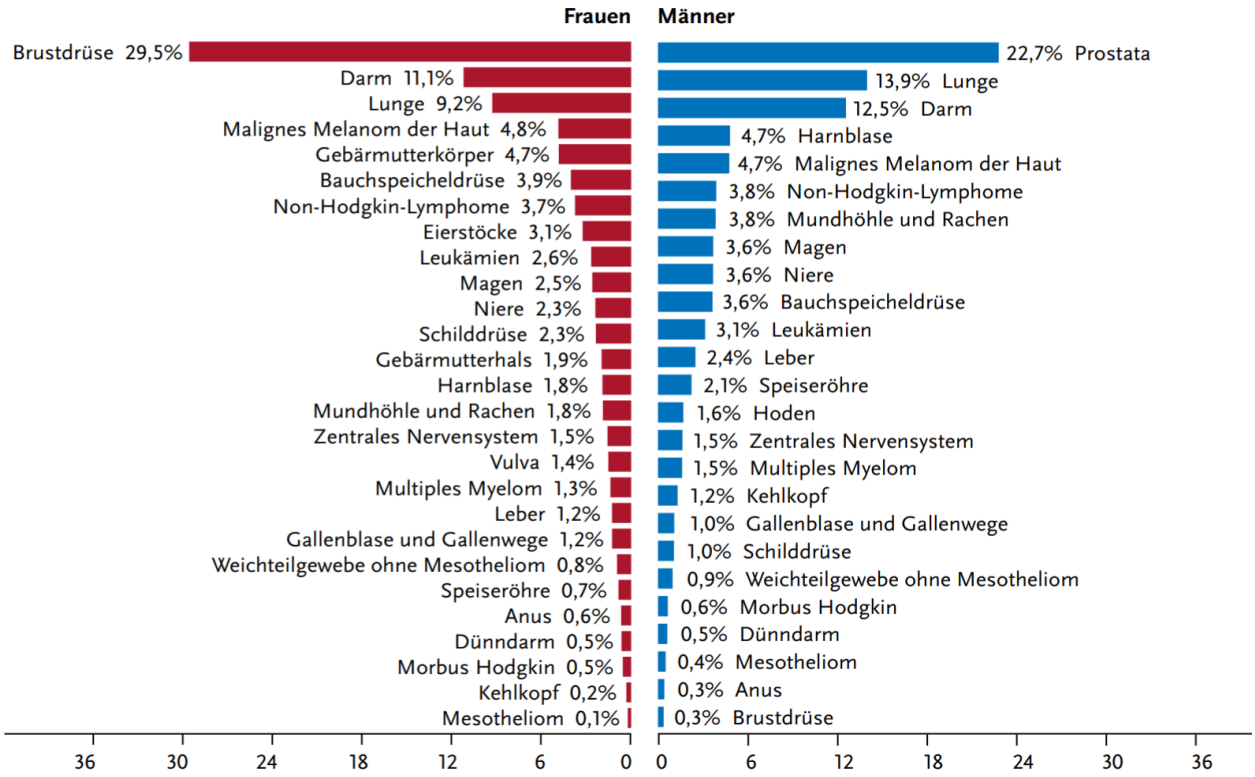

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), (ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, 2019).

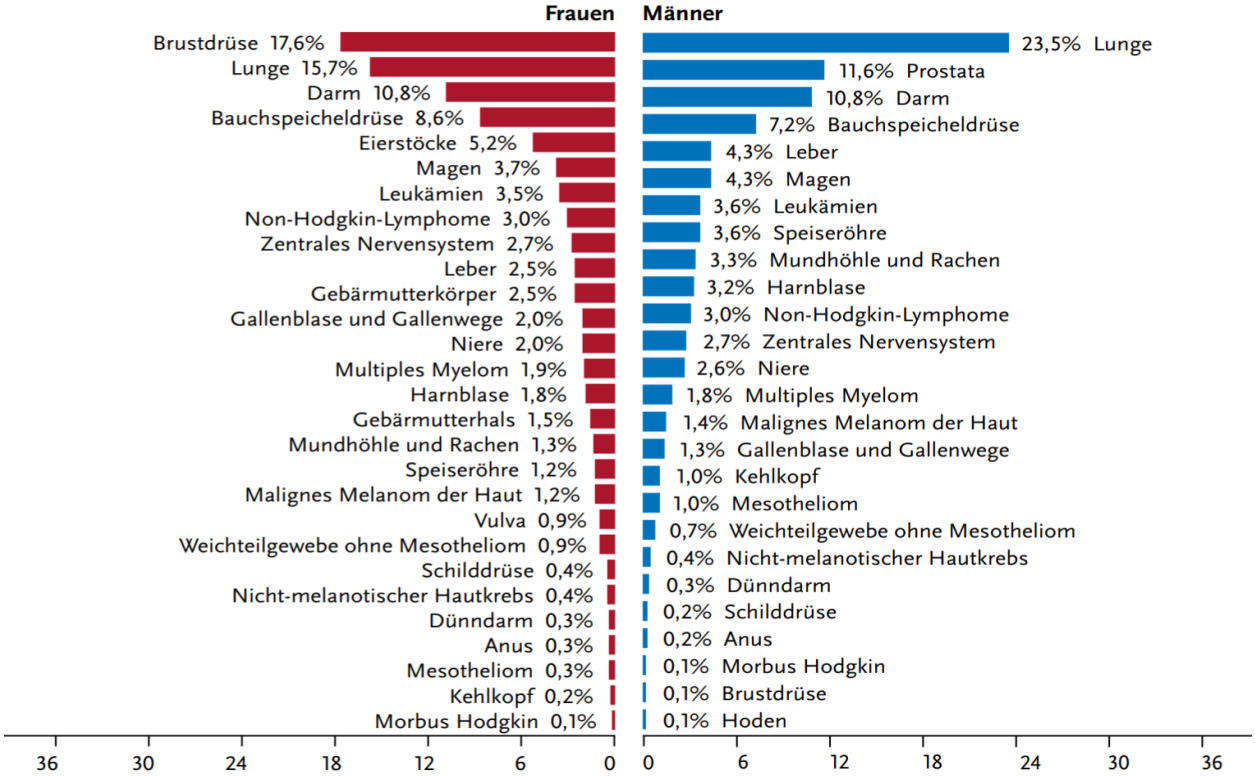

Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), (ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, 2019).

1.1 Gold-Nanopartikel

Die Verwendung von Nanopartikeln erlangte in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung in verschiedensten Bereichen. So kommen diese unter anderem in der Energieerzeugung, in der Herstellung elektronischer Geräte, in der Lebensmittelindustrie und in der Landwirtschaft zum Einsatz (LOPES *et.al*., 2019). Vor allem aber in der Medizin wird darüber hinaus viel am Einsatz und Nutzen von Nanopartikeln für den Menschen geforscht. Dabei ist zu beachten, dass Nanopartikel, also Partikel deren maximaler Durchmesser weniger als 100 nm beträgt, sehr variabel in ihrem Aussehen und ihrer Beschaffenheit sind. Zu diesen Partikeln gehören unter anderem Oxide, Lipide, Liposomen, Polymere und die metallbasierten Nanopartikel, wie auch die Gold-Nanopartikel (GNP).

Aufgrund ihrer hohen Ordnungszahl (Z=79) und Dichte (19,3 g/cm³) können die GNP, nach Zellaufnahme durch eine rezeptorvermittelte Endozytose, einen Großteil der bei der Bestrahlung freiwerdenden Energie absorbieren und in Form von Photoelektronen gezielt lokal abgeben (LIU *et. al.,* 2017). Aus diesem Grund wird ihr Einsatz in der Strahlentherapie als mögliche Radioenhancer erforscht, wobei eine optimale Zellaufnahme eine unbedingte Voraussetzung darstellt.

In der Literatur wurde beschrieben, dass GNP mit einem Durchmesser von 50 nm die höchste Zellaufnahme bei HeLa-Zellen realisierten, im Gegensatz zu GNP mit einem Durchmesser von 14 nm und 74 nm (CHITHRANI *et al.,* 2010). Dieses Ergebnis wurde damit begründet, dass die GNP dieser Größe genug Rezeptoren der Zellmembran erreichen und damit die Energie für eine rezeptorvermittelte Endozytose ausreicht. Sind die GNP zu klein, können nur wenige Rezeptoren binden. Sind die GNP jedoch zu groß, wächst auch die aufzubringende Energie der Zelle, die GNP in einem Vesikel zu umschließen. Darüberhinausgehend würden mehr Rezeptoren besetzt und insgesamt weniger GNP aufgenommen werden (ALBANESE *et. al*., 2012).

GNP unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer Form. Es gibt unter anderem stabförmige und kugelförmige GNP. Gelangen jedoch stabförmige GNP mit ihrer längeren Seite an die Zellmembran, werden mehrere Rezeptoren gleichzeitig besetzt. Dadurch kann nur eine bestimmte Menge an GNP aufgenommen werden und im Vergleich zu kugelförmigen GNP gelangen folglich weniger GNP in die Zelle (CHITHRANI *et. al*., 2006).

1.2 Gold-Nanopartikel als Radioenhancer

Die in der Radiotherapie eingesetzte Strahlung löst in den Atomen und Molekülen der bestrahlten Zellen und Gewebe Ionisationsvorgänge aus und wird deshalb als ionisierende Strahlung beschrieben. Diese kann entweder aufgrund radioaktiver Zerfallsprozesse, wie bei der Gamma- oder Betastrahlung der Fall, oder durch die Beschleunigung geladener Teilchen mittels Linearbeschleuniger entstehen (KRAMME, 2016).

Aufgrund der physikalischen Eigenschaften der GNP und der gezielten Abgabe der Photoelektronen kommt es zur gesteigerten Energieübertragung auf die Materie, was wiederum zu Doppelstrangbrüchen der DNA führen kann und somit die Sensitivität der Zellen erhöht (LIU *et. al*., 2017).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überlebensfraktion (engl. survival fraction; SF) bei HeLa-Zellen nach einer Bestrahlung zwischen 0 Gy und 8 Gy bei 6 MeV durch die Zugabe von GNP abnimmt. Dabei wurden GNP mit einem Durchmesser zwischen 14 nm und 74 nm verglichen. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass GNP mit einem Durchmesser von 50 nm die höchste Abnahme der SF nach der Bestrahlung erzielen (CHITHRANI *et.al.*, 2010).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass GNP in Lungenkarzinomzellen (A549) zu einer vermehrten Expression des Bax-Proteines und Verringerung der Expression des Bcl2-Proteines führen. Ersteres beschleunigt die Apoptose, letzteres besitzt anti-apoptotische Wirkung. Diese Umverteilung der Proteine der Bcl2-Familie könnte ein Grund für die nachgewiesene Abnahme der SF bei A549-Zellen sein, welche nach Dosen zwischen 0 Gy und 10 Gy bei Bestrahlung mit 6 MeV unter Einfluss von GNP festgestellt wurde (WANG *et. al.*, 2013).

Es gibt mehrere festgelegte Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus, die entweder den Übergang in die nächste Phase oder, falls die DNA fehlerhaft ist, die Apoptose einleiten. Für diese Kontrolle sind sogenannte Cyclin-abhängige Proteinkinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs) zuständig. Durch die von den CDKs phosphorylierten Signalproteinen wird der Übertritt in die nächste Phase des Zellzyklus eingeleitet.

1.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus mehreren Phasen: Zunächst wird die Zellteilung in der sogenannten Interphase vorbereitet, bevor es in der M-Phase zur Teilung des Zellkerns und der Zelle kommt.

Die Interphase kann in drei weitere Phasen unterteilt werden. In der G1-Phase werden Proteine und Zellorganellen synthetisiert. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Zelle nach dieser Phase in

eine Ruhephase, die G0-Phase, eintritt, in der sie spezielle Aufgaben erfüllt, sich jedoch nicht weiter teilt. Danach geht die Zelle in die S-Phase über, in der die DNA-Replikation stattfindet und die dafür benötigten Proteine synthetisiert werden. Falls es zu Fehlern in der Replikation gekommen ist, können diese in der letzten Phase, der G2-Phase, repariert werden (BUSELMAIER, 2012).

Ist die Interphase abgeschlossen, kann sich die Zelle teilen und es entstehen zwei identische Tochterzellen. Diese Phase wird als Mitose bezeichnet.

Wird fehlerhaftes Erbgut während des Zellzyklus erkannt, hemmen Inhibitorproteine (CDK-Inhibitoren) die CDKs und verhindern das weitere Wachstum der Zellen mit einer geschädigten DNA. Deshalb werden diese Proteine auch als Tumorsuppressoren bezeichnet.

Es wird zwischen der INK4 (inhibitor of kinase 4)-Familie und der KIP (cyclin inhibitor protein/kinase inhibitor protein)-Familie unterschieden. Erstere binden nur an CDK 4 und CDK 6 und umfassen p16, p15, p18 und p19. Die Proteine der KIP-Familie binden an Cycline (p21) sowie an die CDKs (p27, p57), wie in Abb. 3 ersichtlich wird.

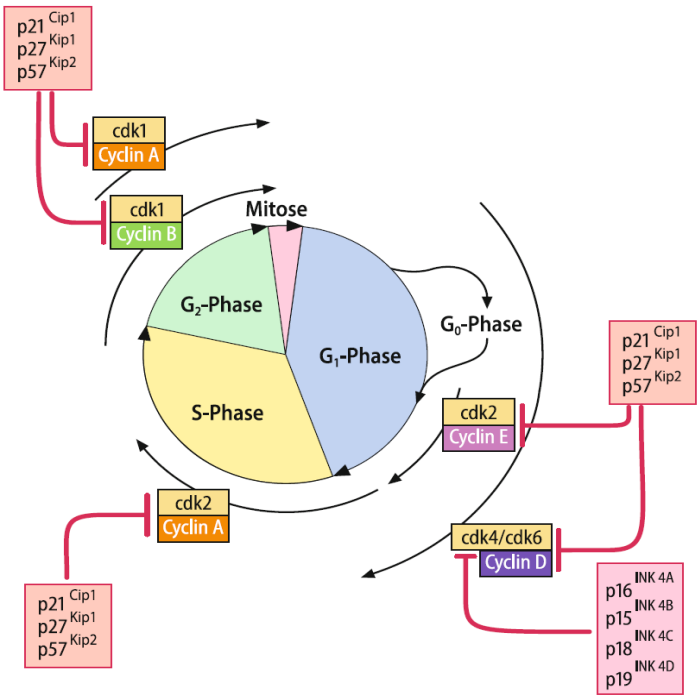

Abb. 3: Assoziation von Cyclin/CDK-Komplexen während des Zellzyklus und deren Inhibitoren (HEINRICH *et al.*, 2014).

Ein bedeutender Kontrollpunkt befindet sich am G1-S-Übergang und wird als G1-Kontrollpunkt bezeichnet. Durch den CDK4/Cyclin-D-Komplex und das p53-Protein wird hier die korrekte Kern-Plasma-Relation sowie der Nährstoffgehalt und eventuelle DNA-Schäden der Zelle kontrolliert.
Der CDK4/Cyclin-D-Komplex phosphoryliert das Retinoblastom-Protein (*RB1*). Dieses setzt den Transkriptionsfaktor E2F frei und leitet dadurch die Transkription vieler an der DNA-Replikation beteiligter Gene ein. Das p53-Protein kontrolliert die Zelle auf DNA-Schäden und leitet wiederum die Apoptose ein, falls die Schäden nicht beseitigt werden können. Wird der CDK4/Cyclin-D-Komplex jedoch von dem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p27 (*CDKN1B*) gehemmt, fällt die Phosphorylierung von *RB1* aus, dieses bleibt aktiviert und E2F gebunden. Der Zellzyklus wird am G1-Kontrollpunkt gestoppt und das Wachstum der Zelle unterbrochen. Erst wenn *CDKN1B* abgebaut oder *RB1* phosphoryliert wird, kann die Zelle in die S-Phase übergehen (HEINRICH *et. al*, 2014).
Weitere Kontrollpunkte befinden sich am G2-M-Übergang (G2-Kontrollpunkt) und in der Mitose am Übergang zwischen Metaphase und Anaphase (Metaphase-Kontrollpunkt).
Diese Vorgänge ermöglichen es, Wirkstoffe wie GNP so herzustellen, dass sie fehlerhaftes Erbgut von Tumorzellen für die CDK-Komplexe markieren und einen Ausschluss über die Kontrollpunkte unterstützen.

1.4 Weitere Einsatzmöglichkeiten von Gold-Nanopartikeln in der Tumor-Therapie

Neben dem Einsatz von GNP als Radioenhancer in der Strahlentherapie, welcher in dieser Arbeit näher betrachtet werden sollte, sind die weiteren Einsatzmöglichkeiten der GNP vielfältig. Auch in der diagnostischen Abklärung von Tumoren könnten GNP aufgrund ihrer hohen Ordnungszahl, ihrer hohen Dichte und dem resultierend hohen Schwächungskoeffizienten, eingesetzt werden.
Ein signifikantes Problem bei der Darstellung von Tumoren ist, dass gesundes und Tumorgewebe sehr ähnliche Massenenergieabsorptionen haben. Somit ist eine differenzierte Bestrahlung oftmals erschwert. GNP können durch eine Anreicherung im Tumorgewebe den Kontrast zwischen diesem und Normalgewebszellen erhöhen und erlauben somit eine bessere Kontrolle der Bestrahlung (ROSA *et. al*., 2017).
Es konnte bereits bewiesen werden, dass sowohl die GNP, als auch die Organe, in denen diese sich anreichern, in Röntgenaufnahmen sichtbar sind. Dafür wurden 1,9 nm große GNP intravenös Mäusen mit einem Mammakarzinom appliziert. Darüber hinaus wurde keine zytotoxische Wirkung von GNP in dieser Arbeit nachgewiesen (HAINFELD *et. al*., 2006).

Auch die Darstellbarkeit von GNP mittels Mikrocomputertomographen wurde bereits untersucht und bestätigt. Es wurden GNP mit einem Durchmesser von 11 nm intravenös in Mäuse mit bösartigen Gliomen injiziert. Anschließend wurden diese GNP mit 30 Gy bei 100 kVp dargestellt und eine Anreicherung im Tumorgewebe festgestellt (HAINFELD *et. al*., 2013).

Eine weitere Studie dazu berichtet vom Einsatz der GNP zur Detektion von Kopf- und Halstumoren. Dabei wurden UM-SCC-1, Krebszellen der Mundhöhle, und UM-SCC-5, Krebszellen des Larynx, verwendet. Da beide das sogenannte A9-Antigen tragen, wurden die einzusetzenden GNP mit UM-A9-Antikörpern versetzt. Es wurde festgestellt, dass diese Antikörper vermehrt an A9-Antigen-tragende Zellen binden. Die stabförmigen GNP waren 45 nm lang und hatten einen Durchmesser von 15 nm. Es konnte festgestellt werden, dass der Schwächungskoeffizient für die Krebszellen ohne einen GNP-Zusatz zwischen 28 HU und 32 HU lag, während er für die mit GNP versetzten Zellen in dem Bereich zwischen 168 HU und 172 HU anstieg. Damit kam es zu einer 5-fachen Verstärkung des Schwächungskoeffizienten durch den Einsatz der GNP. Somit kann bereits eine kleine Anzahl an Krebszellen im CT erkennbar gemacht werden (POPOVTZER *et. al*., 2008).

Da GNP nachweislich als Radioenhancer in der Therapie, aber auch zur Verstärkung der Darstellbarkeit der zu behandelnden Tumore in der Diagnostik, eingesetzt werden können, werden sie teilweise als „theranostics“ bezeichnet.

Diese Idee wurde auch von DOU *et. al*. aufgegriffen und die Effekte von GNP mit denen von Idohexol, einem jodhaltigen Kontrastmittel, und CMNa, einem bereits in der Klinik bewährten Radioenhancer, verglichen. Es wurde bei Mäusen durch den Einsatz von HeLa-Zellen ein Zervixkarzinom injiziert. Diesen Mäusen wurden dann mit PEG-überzogene GNP mit einer Größe von 13 nm injiziert. Anschließend wurden CT durchgeführt und festgestellt, dass die dargestellten Kontraste durch die Zugabe der GNP 1,8-fach höher waren als durch die Zugabe von Idohexol. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die GNP das Tumorwachstum stärker unterdrückten als das CMNa (DOU *et. al.,* 2016).

Neben der Bestrahlung ist auch die Chemotherapie eine wichtige Säule in der Therapie von Tumoren. Es wurde bereits untersucht, ob GNP als Transporter für Arzneimittel dienen können. Sie werden mit den für die zu transportierenden Wirkstoffen spezifischen Rezeptoren beschichtet und bilden einen Komplex, welcher an das jeweilige Organ gelangt und dort den Wirkstoff wieder abgibt. So konnte festgestellt werden, dass an GNP gebundenes Methotrexat, einem in der Krebstherapie gebräuchlichen Folsäure-Antagonisten, toxischer auf Lungenkarzinomszellen wirkt als freies Methotrexat. Ein ähnlicher Effekt konnte bei der Kombination von Oxaliplatin, einem in der Klinik eingesetzten Zytostatikum, und GNP in Bezug auf A549-Zellen festgestellt werden.

Auch hier bewirkte der kombinierte Einsatz eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber dem einzelnen Gebrauch des Wirkstoffs (SINGH *et.al*., 2018).
GNP wurden nicht nur in ihrer Wirkung als Radiosensitizer, sondern auch als sogenannte Photosensitizer erforscht. Als Photosensitizer könnten sie in der photothermischen Therapie ihren Einsatz finden und die während der Bestrahlung absorbierte Energie in Wärme umwandeln. Dadurch kommt es zur lokalen Produktion von Reaktiven Oxygenen Stress (ROS), sowie zur Denaturierung von Proteinen des Tumorgewebes und damit verbundener Nekrose. Außerdem gelangen vereinzelte intrazelluläre Substanzen in den Extrazellulärraum, wo sie zu Entzündungen und irreversiblen Zellschäden führen. Da diese Therapie hauptsächlich auf zellulärer Ebene stattfindet, wird sie im Gegensatz zur häufig in der Tumortherapie verwendeten Radiotherapie als „minimal invasiv" beschrieben. Ein Nachteil der Phototherapie ist jedoch die erschwerte Erreichbarkeit vor allem tiefliegender Tumore (LOPES *et. al*., 2019).
Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass durch den Zusatz von GNP eine geringere Bestrahlungsdosis notwendig ist um dennoch den gleichen therapeutischen Effekt zu erreichen.

1.5 Zielstellung

Die am Anfang aufgeführten Zahlen zum Anteil des Bronchialkarzinoms an allen Krebssterbefällen in Deutschland, sowie dessen Anteil an Krebsneuerkrankungen machen die Notwendigkeit der vielfältigen Therapieforschung auf diesem Gebiet deutlich. Die alleinige Bestrahlung ist jedoch häufig mit schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie zum Beispiel der Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes verbunden, da sich die Lunge auch während der Bestrahlung ständig in Bewegung befindet. Der Einsatz eines Wirkstoffes wie der Gold-Nanopartikel (GNP) zur Verstärkung des Bestrahlungseffektes unter gleichbleibender oder reduzierter Strahlendosis würde die Therapie des Bronchialkarzinoms deutlich verbessern.
Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Eignung von Gold-Nanopartikeln als Radioenhancer und somit die kombinierte Wirkung von GNP und ionisierender Strahlung auf die Tumorzelllinie A549 und die Normalgewebszelllinie BEAS-2B zu untersuchen.
Es sollten verschiedene *In-vitro*-Methoden angewandt werden, um das Wirkspektrum der GNP auf beide Zelllinien genauer zu charakterisieren. Dabei war geplant, Wachstumskurven für beide Zelllinien zu erstellen, um eine mögliche Toxizität der GNP feststellen zu können. Anschließend sollte das klonogene Überleben untersucht werden, indem Koloniebildungstests nach Bestrahlungsdosen von 0 – 6 Gy angefertigt werden. Die Betrachtung der Zellproliferation beider

Zelllinien unter der Zugabe von GNP sollte mit Hilfe des Bromdesoxyurin-Tests (BrdU-Test) erfolgen. Abschließend sollte mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) die Expression von *CDKN1B* und *RB1* der A549-Zellen im Vergleich zu den BEAS-2B-Zellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

Alle Versuche wurden mit zwei verschiedenen Zelllinien epithelialen Ursprungs, den Tumorzellen A549 und den Normalgewebszellen BEAS-2B, durchgeführt. Die Zellkulturarbeiten wurden im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie durchgeführt. Alle sterilen Arbeiten erfolgten an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II.

2.1.1 Tumorzellen A549

Bei den A549-Zellen handelt es sich um Krebszellen aus menschlichen Alveolen, in diesem Fall von einem 58-jährigen männlichen Patienten kaukasischer Herkunft. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und wöchentlich gesplittet (Abb. 4).

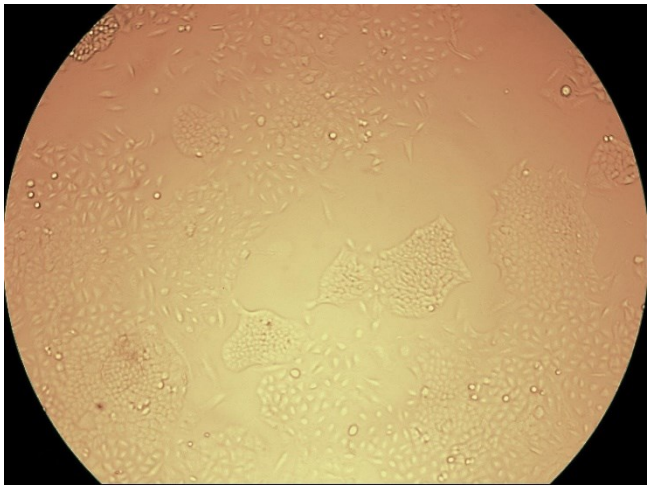

Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme der A549-Zellen bei 100facher Vergrößerung.

2.1.2 Normalgewebszellen BEAS-2B

Diese Zelllinie beinhaltet Zellen des Bronchialepithels und wurde während einer Autopsie einem gesunden Patienten entnommen. Danach wurden die Zellen mit dem Adenovirus 12-SV40

behandelt und geclont. Die für diese Arbeit genutzten Zellen stammten von der European Collection of Cell Cultures (ECACC).
Die Zellen wurden ebenfalls wöchentlich gesplittet (Abb. 5).

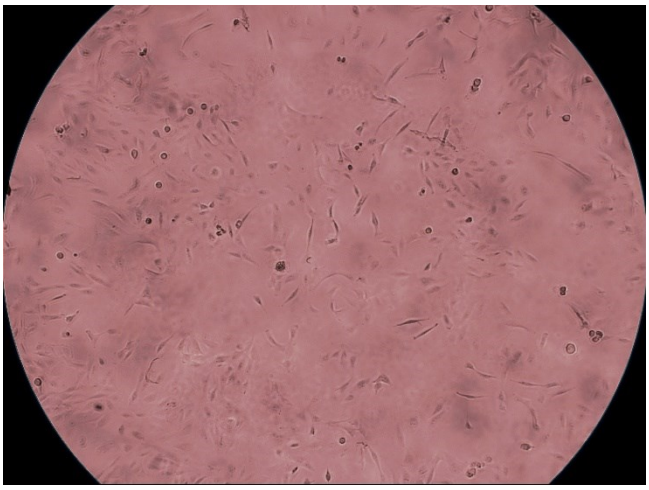

Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahme der BEAS-2B-Zellen bei 100facher Vergrößerung.

2.1.3 Zellkultivierung

Beide Zelllinien wurden in T75-Flaschen mit jeweils 15 ml Vollmedium, bestehend aus „Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM), 1% Penicillin und Streptomycin (P/S) und 10% Fetal Bovine Serum (FBS), bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Die P/S-Zugabe soll die zu kultivierenden Zellen vor einer Kontamination mit Bakterien schützen. Dabei ist Streptomycin für die Hemmung der Proteinsynthese und Penicillin für die Hemmung der Zellwandsynthese verantwortlich. Das FBS enthält Wachstumsfaktoren sowie andere Proteine und nährt, neben DMEM, die zu kultivierenden Zellen (SCHMITZ, 2009).
Ein Subkultivieren der Zellen fand stets bei 70-80%iger Konfluenz der Zellkultur statt. Zur Passagierung wurde das verbrauchte Medium verworfen und die Flaschen anschließend mit 5 ml Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) gespült. Dieses wurde ebenfalls verworfen und die Flaschen mit jeweils 3 ml 0,05%igen Trypsin befüllt und bis zur Zellablösung im Brutschrank gelagert.
Anschließend wurden 7 ml DMEM zum Trypsin pipettiert und dieses Gemisch für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Danach konnte die Flüssigkeit aus dem Röhrchen vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die

Zellzahlbestimmung mittels CASY. Anhand dieses Ergebnisses wurde berechnet, wie viel von der Zellsuspension in eine neue T75-Flasche überführt werden musste. Diese T75-Flaschen wurden mit jeweils 15 ml DMEM befüllt. Pro Zellpassage wurden 2,5 x 10^5 A549-Zellen und 3,75 x 10^5 BEAS-2B Zellen ausgesät.

2.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde mit dem CASY-Zellzählgerät gearbeitet. Nachdem das Zellpellet in 6 ml neuem Medium resuspendiert war, wurden 50 µl dieses Gemisches in ein Counter Gefäß gegeben, welches mit 1 ml CASY-Ton Lösung befüllt wurde. Durch vorsichtiges Schwenken konnten die Inhalte miteinander vermischt werden. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung. Dabei werden die Zellen über eine Messpore gesaugt, an der eine elektrische Spannung angelegt ist. Beim Durchtritt der Zellen durch die Pore wird ein elektrisches Signal erzeugt, dessen Anzahl mit der Zellzahl korreliert. Die Stärke des elektrischen Signals lässt auf die Zellzahl schließen. Nach der Messung erfolgt die Ausgabe der Zellzahl/ml, anhand derer das für die Aussaat benötigte Volumen der Zellsuspension berechnet werden konnte.

2.1.5 Zellbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in den T25-Flaschen oder Wellplatten mit Hilfe des VERO-Linearbeschleunigers (Mitsubishi Heavy Industries & Brainlab AG, München). Dieser erzeugt gezielt Elektronen- und Photonenstrahlung von 2-25 MeV (COSSMANN, 2015). Es wurde mit 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die unterschiedlichen Dosen ergaben sich aus variierenden Bestrahlungszeiten. Die Dosisleistung betrug 5 Gy/min.

2.2 Gold-Nanopartikel

Die hier verwendeten GNP wurden speziell für diese Arbeit angefertigt. Die Auswahl ihrer Eigenschaften orientierte sich an bisherigen Forschungsergebnissen (CHITHRANI *et. al.*, 2010).
Es wurde mit zwei verschiedenen GNP-Lösungen gearbeitet. Die erste Lösung beinhaltete 3,97 x 10^{10} GNP/ml und wurde nur für die Erstellung der ersten drei Wachstumskurven (WK)

genutzt. Die zweite GNP-Lösung wies eine Konzentration von 4 x 10^{12} GNP/ml auf und wurde sowohl bei den WK, als auch für alle darauffolgenden Methoden genutzt. Beide Lösungen stammten von der Firma micromod Partikeltechnologie GmbH (Warnemünde), der maximale Durchmesser der kugelförmigen GNP betrug 50 nm.

Die verwendeten GNP zeigten eine dunkelrote Färbung. Ursächlich dafür ist, dass GNP eine spezifische optische Eigenschaft, die Oberflächenplasmonenresonanz (engl. Surface plasmon resonance, SPR) besitzen, welche dadurch entsteht, dass eine Interaktion der GNP mit dem Licht der Resonanzfrequenz stattfindet. Das wiederum führt zu einer Extinktion im Bereich von 520 nm, welche bis auf den nahen Infrarotbereichen (NIR) ausgeweitet werden kann, beispielsweise durch Formänderung der GNP. Die Größe und Form der GNP bestimmen ihre Farberscheinung, welche von hellrot bis grau variieren kann. Diese Eigenschaft ermöglicht es den GNP, Licht bis zu 1000-mal stärker zu absorbieren oder zu zerstreuen als andere Moleküle, weshalb auch der Einsatz in der Bildgebung sowie in der Phototherapie weiter erforscht wird (LOPES *et. al*., 2019).

Da für die verschiedenen *In-vitro*-Methoden unterschiedliche Volumina pro Well genutzt wurden, erfolgt die Konzentrationsangabe der GNP für diese Arbeit pro ml. Eine Umrechnung pro Well und pro µl ist dem Anhang zu entnehmen.

2.3 Wachstumskurven

Für das Erstellen der Wachstumskurven wurden 96-Well-Platten verwendet, die pro Well eine Zellsuspension mit 1 x 10^3 Zellen in 200 µl Volumen beinhalteten. Die Zellzahlbestimmung erfolgte pro Ansatz jeweils als Triplikat.

Pro WK und Zelllinie erfolgte die Einsaat an Tag 0. Nach 24 h (Tag 1) wurde die Zellzahl der Kontrollen bestimmt. Dies erfolgte wie im entsprechenden Kapitel bereits beschrieben.

Zudem wurden die GNP in drei unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Von der verwendeten GNP-Stammlösung, welche eine Konzentration von 3,97 x 10^{10} Partikel/ml hatte, wurden 20 µl (GNP-Endkonzentration 4 x 10^9 Partikel/ml) bzw. 2 µl (GNP-Endkonzentration 4 x 10^8 Partikel/ml) pipettiert. Ein Beispiel zur Berechnung ist am Ende des Kapitels dargestellt.

Um eine Konzentration von 4 x 10^7 Partikel/ml zu erreichen, wurde eine Verdünnungslösung hergestellt. Dafür wurde die GNP-Stammlösung 1:10 mit Medium verdünnt und pro Well 20 µl pipettiert. Nach der GNP-Zugabe wurden die 96-Well-Platten wieder in den Brutschrank inkubiert.

Ab dem darauffolgenden Tag (Tag 2) erfolgte jeweils nach 48 Stunden eine Zellzahlbestimmung der Kontrollen und der Ansätze mit den unterschiedlichen GNP-Konzentrationen.

Beispielrechnung zur Umrechnung der GNP-Konzentration pro Well auf 1 ml:

$3{,}97 \times 10^{10}$ Partikel/ml = $3{,}97 \times 10^{7}$ Partikel/µl
$3{,}97 \times 10^{7}$ Partikel/µl x 20 µl = 8×10^{8} Partikel

In 200 µl Volumen befinden sich 8×10^{8} Partikel;
8×10^{8} Partikel/200 µl x 5 = 4×10^{9} Partikel/ml

Für eine weitere WK wurde eine 2. GNP-Stammlösung der Konzentration 4 x 10^{12} GNP/ml verwendet. 20 µl dieser Lösung ergaben eine GNP-Endkonzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml.

2.4 Koloniebildungstest

Für den Koloniebildungstest wurden 6-Well-Platten verwendet, in die an Tag 0 pro Well 300 Zellen in 2 ml Medium ausgesät wurden.
An Tag 1 und somit 24 Stunden vor der Bestrahlung, wurden die Wells mit 5 µl der 2. GNP-Stammlösung versetzt, um eine GNP-Endkonzentration von 1 x 10^{10} Partikel/ml zu erreichen. Danach wurden die Platten erneut im Brutschrank inkubiert.
An Tag 2 wurden die Zellen bei 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy bestrahlt. Die unbestrahlte Kontrolle (0 Gy) wurde ebenfalls mitgeführt. An Tag 5 erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel.
An Tag 9 wurden die Platten fixiert und gefärbt. Dafür wurde zunächst das alte Medium verworfen und die Zellen mit einer 70%igen Ethanol-Lösung für 10 Minuten fixiert und mit einer 1%igen Kristallviolett-Lösung 15 Minuten gefärbt. Danach wurde die Kristallviolett-Lösung abpippetiert und jedes Well anschließend zweimal mit kaltem Wasser gespült und luftgetrocknet.
Die Kolonien konnten per Mikroskop ausgezählt werden. Dabei wurden nur Kolonien gezählt, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, da davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen dieser Kolonien mindestens 6 Mitosen durchlaufen haben und somit ihre proliferative Integrität bewahrt haben (SCHMITZ, 2009).
Um die Koloniebildungstests auswerten zu können, wurde aus den gezählten Kolonien die Überlebensfraktion (engl. survival fraction SF), sowie die Plattiereffizienz (PE) berechnet. Die Plattiereffizienz beschreibt die Kolonieanzahl im Verhältnis zu der Anzahl ausgesäter Zellen.

$$PE = \frac{Anzahl\ gezählte\ Kolonien}{Anzahl\ ausgesäter\ Zellen}$$

Die SF gibt das Verhältnis der Kolonieanzahl nach einer Bestrahlung zu der Kontrollprobe an.

$$SF = \frac{Anzahl\ gezählter\ Kolonien\ unter\ Bestrahlung}{Anzahl\ gezählter\ Kolonien\ ohne\ Bestrahlung}$$

2.5 BrdU-Test

Mit Hilfe des BrdU-Tests konnte die von den GNP ausgehende Toxizität, sowie die Zellproliferation gemessen werden; er wurde mit Hilfe eines Kits durchgeführt. Dabei wird das Pyrimidin-Analogon Bromdesoxyuridinsäure (BrdU) verwendet und während der S-Phase in die neu synthetisierte Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Zellen eingebaut. Anschließend kommt es durch die Zugabe des BrdU-Antikörpers zu einer Komplexbildung, die durch den Umsatz einer Substratlösung sichtbar gemacht wird. Folgend kommt es zur Extinktion, welche mittels eines ELISA-readers bei 450 nm (Referenz-Wellenlänge: 690 nm) gemessen werden kann. Die gemessenen Werte korrelieren mit der Anzahl proliferierender Zellen sowie mit der Menge neu synthetisierter DNS (BRAASCH, 2006).

Pro Test wurden zwei 96-Well-Platten angesetzt. Eine Platte wurde mit 6 Gy bestrahlt, die andere blieb unbestrahlt. Es gab eine Blank-Kontrolle „B“ (Medium + BrdU+ Anti-BrdU), sowie eine Background-Kontrolle „BG“ (Zellen + Anti-BrdU). Um Temperaturschwankungen und andere äußere Einflüsse auf die Zellen so gering wie möglich zu halten, wurden die Zellen links und rechts von DPBS begrenzt.

An Tag 0 wurden pro Well 15 x 10^3 Zellen in 200 µl Medium ausgesät sowie die Blank-Kontrolle mit Medium und Background-Kontrolle mit Zellen angesetzt. An Tag 1 wurden alle Zellen, mit Ausnahme der Kontrollzellen, mit folgenden GNP-Konzentrationen versetzt: 4 x 10^7 GNP/ml, 4 x 10^8 GNP/ml, 4 x 10^9 GNP/ml und 4 x 10^{10} GNP/ml.

An Tag 2 wurden alle Wells, bis auf die BG-Kontrolle, 2 Stunden vor der Bestrahlung mit jeweils 20 µl „BrdU-labeling solution“ versetzt. Diese wurde in einem Verhältnis 1:100 aus dem „BrdU-labeling reagent“ und DMEM angesetzt. Anschließend erfolgte die Bestrahlung einer Platte mit 6 Gy am VERO-Linearbeschleuniger. 24 Stunden später, an Tag 3, erfolgte die Auswertung entsprechend dem Protokoll des Herstellers des Kits.

2.6 Untersuchung der Genexpression von *CDKN1B* und *RB1*

Die hier angewandte quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bietet den Vorteil, ein bestimmtes Genexpressionsmuster ausgehend von der präsentierten mRNA besonders schnell und sensitiv zu erkennen und zu analysieren. Durch die 40 Zyklen, die die cDNA während der PCR durchläuft, wird ein hohes Amplifikationsplateau erreicht und es ist teilweise unmöglich, präzise Aussagen über die am Anfang vorhandene Molekülanzahl der verwendeten mRNA zu treffen. Deswegen wird mit sogenannten „Housekeeping Genen" gearbeitet. Dabei handelt es sich um mRNAs, deren Expressionsstatus in den zu untersuchenden Zellen bereits bekannt ist und deren Expression sich nicht durch die zu untersuchenden Bedingungen, in diesem Fall der Bestrahlung und dem GNP-Zusatz, ändert (THERMOFISHER, 2019). Für diese Arbeit wurde Glutathion-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) als ein solcher Standard verwendet und parallel zu den zu untersuchenden Genen *CDKN1B* und *RB1* eingesetzt, um Aussagen über deren Genexpressionsstatus treffen zu können.

Es wurden pro Zelllinie 8 Ansätze (Tab.1) betrachtet und in T25-Flaschen mit 3 ml Medium angesetzt. An Tag 0 erfolgte die Einsaat der Zellen in den in der Tabelle 1 aufgeführten Zellzahlen. 24 h später (Tag 1) wurden 7,5 µl der GNP-Lösung zu den dafür vorgesehenen Proben gegeben, damit eine Konzentration von 1 x 10^{10} GNP/ml erreicht wurde. An Tag 2 wurden pro Zelllinie 4 Ansätze mit 6 Gy am VERO-Linearbeschleuniger bestrahlt. An Tag 3, 24 h nach der Bestrahlung, fand die RNA-Isolierung der 4 dafür vorgesehenen Ansätze statt. An Tag 4 wurde die RNA der anderen 4 Ansätze, somit 48 h nach Bestrahlung, isoliert.

Tab.1: Übersicht über die Ansätze für die qRT-PCR mit und ohne Zusatz von Gold-Nanopartikeln (GNP).

A549-Zellen	24 h nach Bestrahlung	Ohne GNP	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/T25-Flasche
			6 Gy	12,5 x 10^4 Zellen/T25-Flasche
		Mit 7,5 µl GNP (1 x 10^{10} GNP/ml)	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/T25-Flasche
			6 Gy	15 x 10^4 Zellen/T25-Flasche
	48 h nach Bestrahlung	Ohne GNP	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/T25-Flasche
			6 Gy	12,5 x 10^4 Zellen/T25-Flasche
		Mit 7,5 µl GNP (1 x 10^{10} GNP/ml)	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
			6 Gy	15 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
BEAS-2B-Zellen	24 h nach Bestrahlung	Ohne GNP	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
			6 Gy	12,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
		Mit 7,5 µl GNP (1 x 10^{10} GNP/ml)	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
			6 Gy	12,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
	48 h nach Bestrahlung	Ohne GNP	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
			6 Gy	12,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
		Mit 7,5 µl GNP (1 x 10^{10} GNP/ml)	0 Gy	8,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche
			6 Gy	12,5 x 10^4 Zellen/ T25-Flasche

2.6.1 RNA-Isolation

Um die RNA isolieren zu können, wurden die Ansätze mit 250 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Medium verworfen. Die Zellpellets wurden in 1 µl kaltem PBS resuspendiert und in 1,5 µl Mikroreaktionsgefäße überführt. Diese wurden auf Eis gelagert, bis sie für 5 Minuten bei 4 °C und 11 000 x g zentrifugiert wurden. Im nächsten Schritt konnte der restliche Mediumüberstand verworfen und mit der RNA-Isolation begonnen werden.

Es wurde das NucleoSpin RNA isolation Kit verwendet und entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen. Pro Mikroreaktionsgefäß wurden 350 µl des RA1 Puffers und 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben und anschließend mithilfe des Vortexers vermischt. Anschließend wurde das Lysat in den Filter appliziert und für 1 Minute bei 11 000 x g zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen und 350 µl 70%iges Ethanol zu dem homogenisierten Lysat hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurden 350 µl Membrane Desalting Buffer (MDB) zugefügt. Anschließend wurde die DNAse Reaktionsmischung vorbereitet, indem in einem neuen sterilen Mikroreaktionsgefäß pro Isolierung 10 µl rekonstituierte rDNase mit 90 µl Reaktionspuffer gemischt wurden. 95 µl dieser Mischung wurden direkt auf die dünne Membran der Säule gegeben und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor mit dem Waschvorgang begonnen werden konnte.
Danach wurde die Säule verworfen und der RNA-Gehalt des Filtrats gemessen. Dafür wurden pro Ansatz 2 µl mit 18 µl RNAse freiem H_2O gemischt und davon 4 µl auf das Biophotometer pipettiert. Für alle Proben wurden Werte zwischen 20 µg/ml – 80 µg/ml ermittelt. Anschließend wurde das Mikroreaktionsgefäß eingefroren, bis es für die Synthese des cDNA benötigt wurde.

2.6.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA handelt es sich um die sogenannte komplementäre DNA (engl. complemantary DNA). Diese wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der RNA synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurde das im Kapitel *Materialen und Geräte* beschriebene RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit benutzt und entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen. Alle benötigten Komponenten des Kits und die nach der RNA-Isolation eingefrorenen Ansätze wurden auf Eis aufgetaut. Vor dem Gebrauch wurden sie invertiert und anschließend anzentrifugiert.
Es wurden jeweils 4 µl dieser Ansätze in ein Nuklease-freies Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Bei einem maximal gemessenen RNA-Gehalt von 80 µg/ml beinhalten 4 µl dieser Ansätze höchstens 320 ng reine RNA. Für die cDNA-Synthese sollte der RNA-Gehalt zwischen 0,1 ng und 5 µg pro Mikroreaktionsgefäß liegen.
Zu den 4 µl der reinen RNA wurde 1 µl des im Kit enthaltenen Primers pipettiert. Danach wurden 7 µl Nuklease-freies H_2O hinzugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 12 µl entstand. Alle 3 Komponenten wurden vorsichtig gemischt und bei 65 °C in einem Thermomixer für 5 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe aller weiteren Komponenten lag ein Gesamtvolumen von 20 µl vor. Anschließend wurden sie wieder mit Hilfe des PCR-Cyclers inkubiert, welcher so eingestellt

wurde, dass er zunächst für 5 Minuten eine Temperatur von 25 °C, danach für 60 Minuten eine Temperatur von 42°C und final für 5 Minuten eine Temperatur von 70 °C erzeugte. Die Ansätze mit der synthetisierten cDNA wurden eingefroren, bis sie für die Durchführung der quantitativen Real-Time- Polymerase-Kettenreaktionen (qRT-PCR) benötigt wurden.

2.6.3 Durchführung der qRT-PCR

Das Prinzip der PCR basiert auf der Denaturierung von doppelsträngiger DNA. Dafür lagern sich spezifische Oligonucleotidmoleküle an das 5‘- und 3‘ – Ende des zu vermehrenden Bereichs an. Dieser Vorgang wird als „Annealing“ bezeichnet. Anschließend werden die Oligonucleotide mithilfe einer DNA-Polymerase und freien Desoxynukleosid-Triphosphaten verlängert. Diese Verlängerung wird als „Elongation“ bezeichnet und findet solange statt, bis die Reaktion unterbrochen wird, beispielsweise durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95 °C. Wird der Ansatz wieder auf einen Temperaturbereich zwischen 60 °C- 40 °C gekühlt, können sich die freien Oligonucleotide erneut an die Sequenzen der DNA-Matrize anlagern und die Synthese eines weiteren DNA-Doppelstrangs wird ermöglicht.
Um feststellen zu können, bis zu welchem Zyklus der PCR noch eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet, ist es sinnvoll, jeden PCR-Zyklus in Echtzeit zu beobachten, weshalb in dieser Arbeit der Real-Time-PCR-Cycler (RT-PCR-Cycler) eingesetzt wurde. Dies ist durch den Einsatz fluoreszierender Moleküle (Fluorophore) als Real-Time-Proben möglich. (MÜLLER & PRANGE, 2016).
Für diese Arbeit wurde das „TaqMan“-System verwendet, welches auf der 5‘-3‘- Exonucleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase beruht. Als PCR-Primer werden hierbei 5‘-und 3‘-Oligonucleotide sowie doppelt markierte Real-Time-Proben verwendet. Alle Primer binden an die jeweilige DNA-Matrize, bis sie von der *Taq*-DNA-Polymerase elongiert werden.
Um mit der qRT-PCR beginnen zu können, mussten alle Komponenten auf Eis aufgetaut werden. Dazu gehörten die cDNA-Ansätze, die TaqMan Primer (TaqMan Gene Expression Assay), in diesem Fall *GAPDH*, *CDKN1B* und *RB1*, sowie der TaqMan Gene Expression Master Mix und RNAse freies Wasser. Anschließend wurde der cDNA-Gehalt der einzelnen Ansätze bestimmt. Es wurden wie bei der vorherigen Bestimmung des RNA-Gehalts jeweils 2 µl der cDNA-Ansätze mit 18 µl RNAse freiem H_2O gemischt. Das Biophotometer ermittelte cDNA-Werte zwischen 200 µg/ml – 400 µg/ml. Da für die PCR zwischen 1 ng – 100 ng reine cDNA pro Well benötigt

werden, wurden 18 µl jedes Ansatzes mit 18 µl RNAse freiem H_2O zu *Verdünnung 1* aufgefüllt. Ein Beispiel zur Berechnung ist am Ende des Kapitels dargestellt.

Pro qRT-PCR wurde eine 96-Well-Platte bestückt (Abb. 6). Für jeden Ansatz wurden 6 Wells bestückt, 2 für jeden Primer.

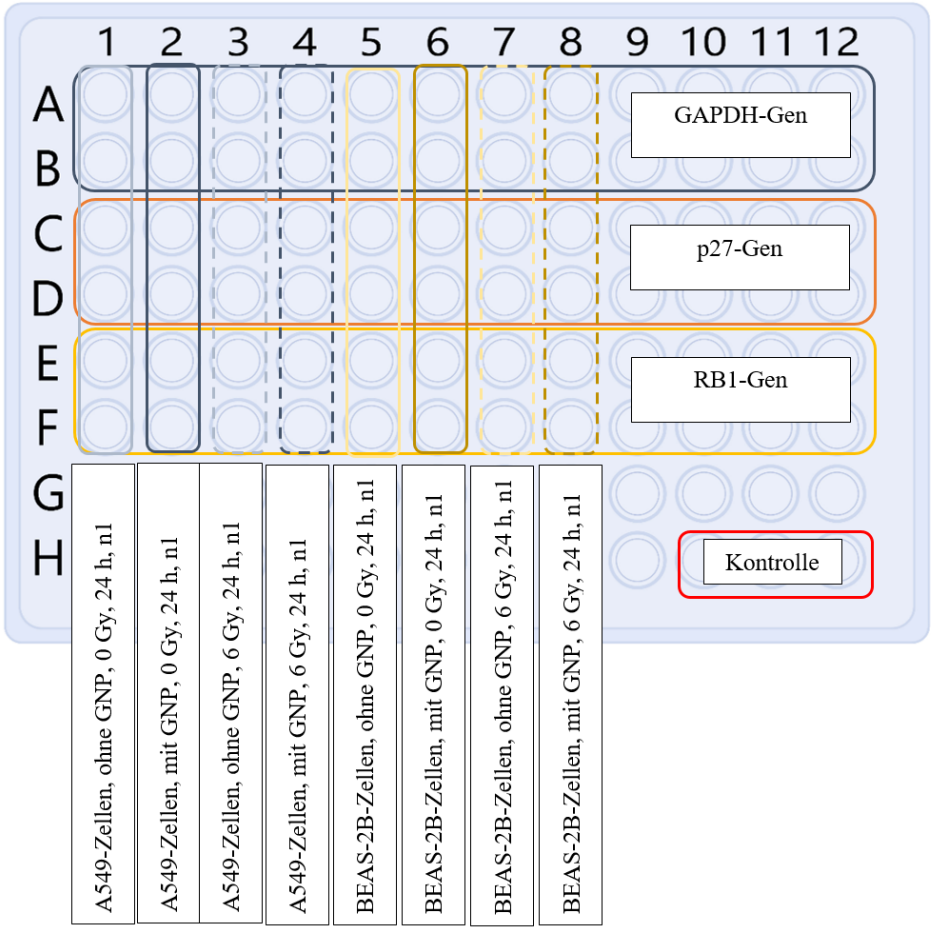

Abb. 6: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte für die qRT-PCR.

Pro Primer wurde ein Mastermix angesetzt. Die Berechnung pro Mastermix ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab 2.: Zusammensetzung PCR-Mastermix mithilfe des „TaqMan"-Systems.

PCR Mastermix Komponenten	Volumen in µl	
	Einzelreaktion	Pro Platte
TaqMan Gene Expression Assay	1	35
TaqMan Gene Expression Master Mix	10	350
RNAse freies H_2O	5	175
gebrauchsfertiger Mastermix	**16**	**560**

Von dem erstellten Mastermix wurden jeweils 16 µl pro Well pipettiert. Von *Verdünnung 1* wurden 4 µl mit 36 µl RNAse-freiem H_2O zu *Verdünnung 2* gemischt, davon 4 µl in jedes der 6 Wells pipettiert ergab ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Well. Je Platte gab es 3 Kontroll-Wells. Diese wurden mit 16 µl RNAse freiem H_2O befüllt und mit 4 µl des jeweiligen Primers ebenfalls auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Auf die fertig bestückte PCR-Platte wurde eine Schutzfolie verklebt. Danach wurde die PCR-Platte kurz anzentrifugiert und anschließend mittels des QuantStudio3 PCR-Systems die PCR gestartet. Für die ersten 2 Minuten wurde eine Temperatur von 50 °C erzeugt, danach für weitere 10 Minuten auf 95 °C gesteigert und anschließend für 1 Minute auf 60 °C eingestellt. Die Temperaturwechsel erfolgten durch das Programm mit einer Geschwindigkeit von 1,6 °C/s.

Beispielrechnung zur Berechnung von Verdünnung 1 und Verdünnung 2

Maximaler cDNA-Gehalt: 400 µg/ml = 400 ng /µl

Verdünnung 1 = 18 µl cDNA + 18 µl RNAse freies H_2O = 7200 ng / 36 µl
Verdünnung 2 = 4 µl von Verdünnung 1 (800 ng) + 36 µl RNAse freies H_2O= 800 ng/ 40 µl

800 ng/40 µl=80 ng / 4 µl

Die Amplifikationskurven sowie die Schwellenwertlinien wurden für jede Probe automatisch grafisch dargestellt und die Ct-Werte (Cycle Threshold, Zyklus-Schwelle) als Schnittpunkte dieser

beiden Linien angezeigt. Anschließend wurde ein ΔCt-Wert aus dem Ct-Wert des untersuchten Gens, *CDKN1B* oder *RB1*, und *GAPDH* des gleichen Ansatzes, gebildet. Folgend wurde ein ΔΔCt-Wert aus dem berechneten ΔCt-Wert und dem ΔCt-Wert von Zielgen und *GAPDH* der Kontrolle errechnet. Dieser ΔΔCt-Wert wurde anschließend in die Formel

$$n\text{-fache Expression (Zielgen zu GAPDH)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

eingesetzt und dadurch berechnet, wie viel des Zielgens im Vergleich zu *GAPDH* in der untersuchten Zelle vorhanden war.

2.7 Statistische Methoden

Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf mindestens jeweils drei unabhängigen Versuchen. Die jeweiligen Versuche der ersten drei Wachstumskurven wurden als Triplikate, die darauffolgenden Wachstumskurven sowie die Ansätze des Koloniebildungstests und der PCR als Duplikate, analysiert. Für den BrdU-Test wurden Quadruplikate angesetzt. Alle Werte waren normalverteilt. Die *p*-Werte aller Experimente wurden mit Hilfe des Anderson-Darling-Tests ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel.
Da bei allen Experimenten eine Kontrolle festgelegt und diese mit mindestens einer zweiten, unabhängigen Probe verglichen wurde, wurde für alle Versuche der Zweistichproben-*t*-Test durchgeführt, bei dem *p*-Werte $\leq 0{,}05$ als signifikant galten.

2.8 Materialien und Geräte

Zellkulturmedium:	**Hersteller, Ort:**
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Walkersville (USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Subkultivierung und Zellzahlbestimmung:	**Hersteller, Ort:**
Phosphae buffered Saline (PBS)- Dulbecco	PAN BioTech, Aidenbach
Trypsin (0,05%)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Casyton-Lösung (Isotone Lösung)	Omni Life Science GmbH & Co.KG, Bremen

Verbrauchsmaterialien:	**Hersteller, Ort:**
Falconröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T75-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen bis 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 5ml- 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Versiegelungsfolien	applied biosystems by Thermo Fisher scientific, Waltham (USA)

Geräte:	**Hersteller, Ort:**
Begasungsbrutschrank I	Binder, Tuttlingen
Begasungsbrutschrank II	Varolab® GmbH, Giesen
Sicherheitswerkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Casy-Zellzählgerät	Omni Life Science GmbH &Co.KG, Bremen
Laborzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Mikroliterzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Kaiser Leuchtplatte (prolite basic)	Genius TechnoConsult, München
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Minizentrifuge	peqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen
Photometer plus	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg

Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
DNA/RNA UVT-B-AR Reinigungsbox	biosan, Riga
Vortexer	scientific industries, Inc., New York
Laborabzug	Köttermann GmbH, Uetze
Label Guard Messzelle für Photometer	implen GmbH, München
Quantstudio3 PCR-System	applied biosystems by Thermo Fisher scientific, Waltham (USA)
VERO Linearbeschleuniger	Mitsubishi Heavy Industries & Brainlab AG, München
ELISA-reader	anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe
Plattformschüttler	Edmund Bühler GmbH, Tübingen/ Hechingen

Kultivierung und Wirkstoffe:	**Hersteller, Ort:**
96-Well-Platten	Techno Plastic Products AG, Tarsadingen
6-Well-Platten	Techno Plastic Products AG, Tarsadingen
Gold-Nanopartikel	micromod Partikeltechnologie GmbH, Warnemünde
0,25% Trypsin	Merck/Millipore, Berlington
Ethanol (70%), vergällt	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Kristallviolett-Lösung 1%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
H_2SO_4 1 mol/l	Morphisto GmbH, Offenbach

Kits:	
BrdU-Testkit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NucleoSpin RNA isolation	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher scientific, Waltham

cDNA-Synthese:

TaqMan Fast Advanced Master Mix,
TaqMan Gene Expression Assay,
RB1 Primer FAM HS 01078066,

CDKN1B Primer FAM HS 01597588, GAPDH Primer HS 00266705_91	applied biosystems by Thermo Fisher scientific, Waltham

3. Ergebnisse

3.1 Wachstum

3.1.1 Wachstum der A549-Zellen

Das Wachstum der A549-Zellen wurde unter dem Einfluss von 4 x 10^7, 4 x 10^8 und 4 x 10^9 sowie 4 x 10^{11} GNP/ml im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe betrachtet und in Abb. 7 dargestellt.

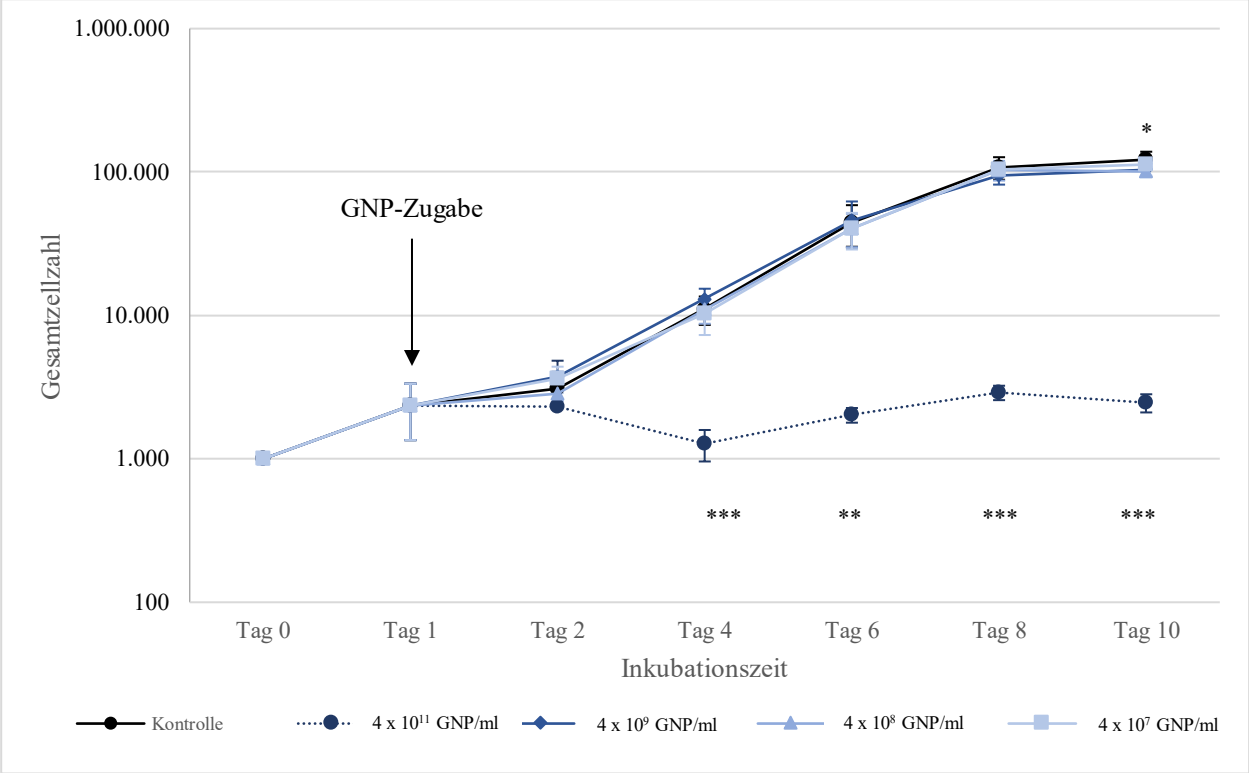

Abb. 7: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Gold-Nanopartikeln (GNP), dargestellt sind MW ± SD aus n=6 (Kontrolle) bzw. n=3, *p≤0,05, **p≤0,02, ***p≤0,01 bezogen auf die Kontrolle ohne GNP.

Zwischen Tag 1 und Tag 2 war bereits eine Wachstumshemmung zu erkennen (Abb. 7). Sowohl die unbehandelten, als auch die mit einer Konzentration bis zu 4 x 10^9 GNP/ml behandelten Zellen gingen in ein deutlich exponentielles Wachstum über und die log-Phase wurde erkennbar. Diese dauerte bis Tag 8 an, danach gingen die Zellen in die stationäre Phase über, in der sich genauso viele Zellen neu teilten, wie abstarben.

Die nur sehr geringen Standardabweichungen zeigten, dass es keine großen Abweichungen zwischen den Versuchsdurchläufen gab. Da es bis auf eine signifikante Abnahme (p=0,022) an Tag 10 bei den mit 4 x 10^8 GNP/ml behandelten A549-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kaum Effekte unter dem Einsatz der bisher beschriebenen GNP-Konzentrationen gab, wurde die GNP-Konzentration nochmals erhöht und das Wachstum der Zellen unter Einfluss von 4 x 10^{11} GNP/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe betrachtet.

Dabei wurde deutlich, dass der Zusatz von GNP in dieser hohen Konzentration das Wachstum der A549-Zellen ab Tag 4 signifikant hemmte (Tag 4: p=0,006; Tag 6: p=0,012; Tag 8: p=0,001; Tag 10: p=0,001). Es konnte keine log-Phase bei den mit 4 x 10^{11} GNP/ml behandelten A549-Zellen beobachtet werden, im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus der unbehandelten Kontrollgruppe. Durch die Zugabe einer hohen GNP-Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml blieb das exponentielle Wachstum aus.

Anschließend wurde der Anteil der vitalen Zellen mit dem Anteil toter Zellen verglichen und in Form eines Balkendiagramms dargestellt (Abb. 8).

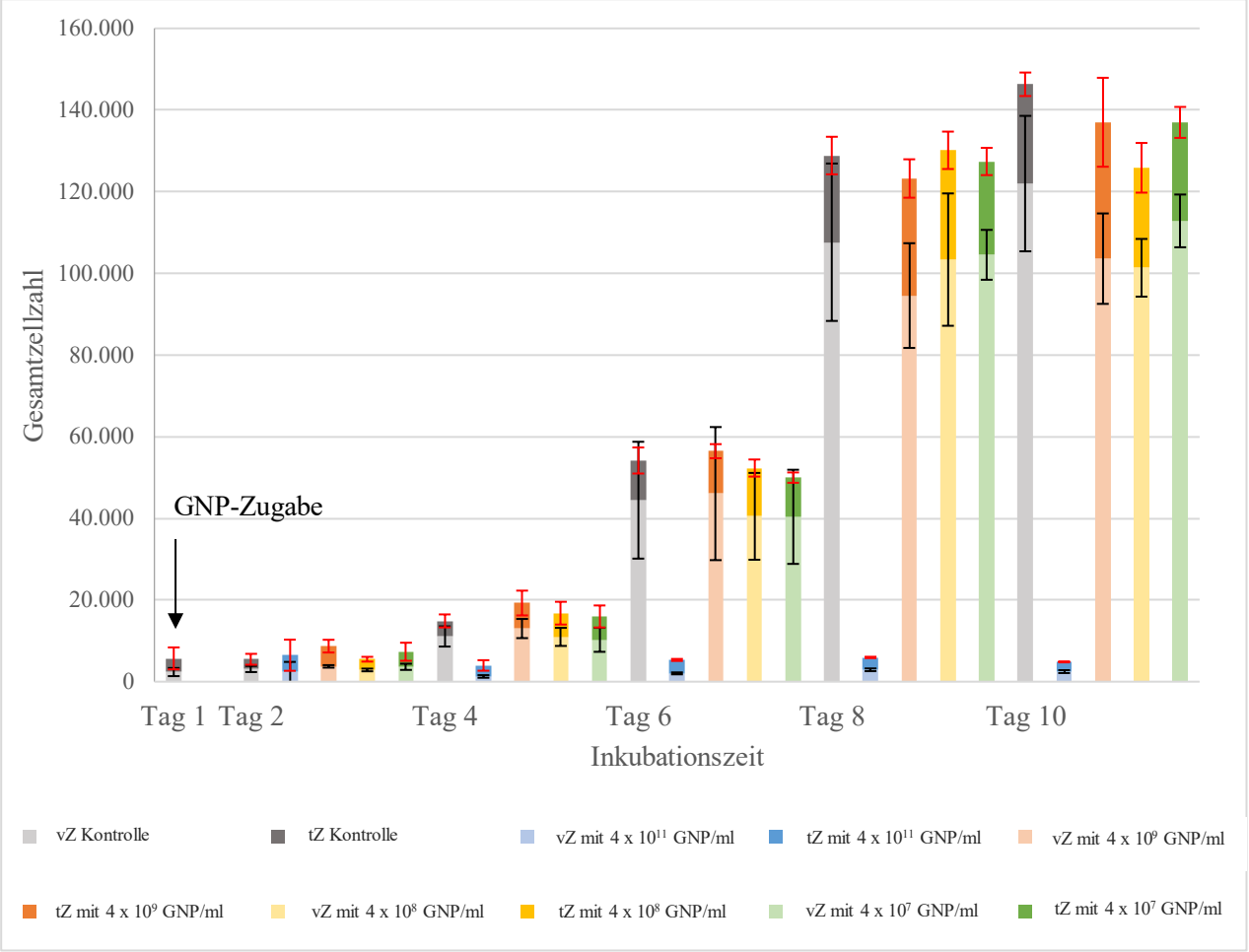

Abb. 8: Anteil vitaler (vZ) und toter (tZ) A549-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von GNP in verschiedenen Konzentrationen, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind die MW ± SD aus n=6 (Kontrolle) bzw. n=3.

Aus Abb. 8 wird deutlich, dass der Anteil vitaler Zellen sowohl bei der Kontrolle, als auch bei den mit bis zu 4 x 10^9 GNP/ml behandelten Zellen immer weiter anstieg. Vor allem bis Tag 8 war eine deutliche Zunahme der vitalen Zellen zu beobachten, was sich mit dem Verlauf der in den Wachstumskurven sichtbaren log-Phase deckte. Auch nach Tag 8 wurden noch hohe Zellzahlen gemessen, jedoch ohne eine ähnlich starke Steigerung wie an den Tagen davor. Der Anteil toter Zellen war nach Beginn des exponentiellen Wachstums stets geringer als der Anteil vitaler A549-Zellen.

Beim Vergleich der vitalen und toten Zellen welche mit der höchsten Konzentration behandelt wurden, fiel auf, dass die Anzahl der vitalen Zellen nur sehr gering blieb. Während bei den durch 4 x 10^{11} GNP/ml beeinflussten Zellen das Verhältnis von vitalen und toten Zellen fast gleich war, war der Anteil der vitalen Zellen der Kontrollgruppe deutlich höher als der Anteil toter Zellen.

Durch die Darstellung des exponentiellen Wachstums zwischen Tag 2 und Tag 6 und der dadurch ermittelten Funktionsgleichungen konnten die Zellpopulationszeiten für die A549-Zellen berechnet werden (Tab.3). Die einzelnen Diagramme zum exponentiellen Wachstum der A549-Zellen sowie die verwendeten Formeln zur Berechnung der Zellpopulationszeiten für die einzelnen Konzentrationen können dem Anhang entnommen werden (Abb. 19 - Abb. 23). Die Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen unter Zusatz von maximal 4 x 10^9 GNP/ml lagen alle im selben Bereich (Tab.3). Die Populationsverdopplungszeit der mit 4 x 10^{11} GNP/ml behandelten Zellen stieg jedoch um den Faktor 2,8 an. Die A549-Zellen wurden unter der höchsten GNP-Konzentration deutlich in ihrem Wachstum gehemmt.

Tab. 3: Durch exponentielle Regressionsanalyse des exponentiellen Wachstums zwischen Tag 2 und Tag 6 bzw. Tag 4 und Tag 8 berechnete mittlere Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen.

A549-Zellen	**Zellpopulationsverdopplungszeit (h)**
Kontrolle, ohne GNP-Zusatz	13,9 / 14,4
mit 4 x 10^9 GNP/ml	13,2
mit 4 x 10^8 GNP/ml	12,5
mit 4 x 10^7 GNP/ml	13,7
mit 4 x 10^{11} GNP/ml	40,3

3.1.2 Wachstum der BEAS-2B-Zellen

Auch das Wachstum der BEAS-2B-Zellen wurde unter dem Einfluss von 4 x 10^7, 4 x 10^8 und 4 x 10^9 GNP/ml, sowie 4 x 10^{11} GNP/ml im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe betrachtet.

Die Ergebnisse des Effektes der verschiedenen Konzentrationen können Abb. 9 entnommen werden.

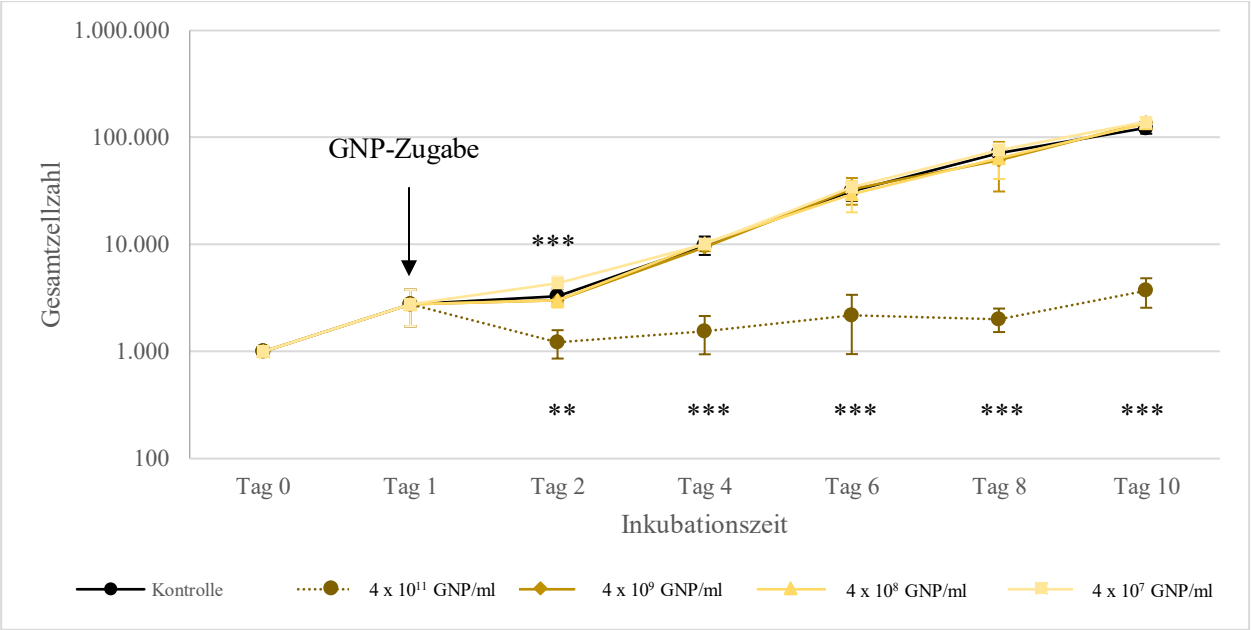

Abb. 9: Wachstum der BEAS-2B-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Gold-Nanopartikeln (GNP), dargestellt sind MW ± SD aus n=6 (Kontrolle), bzw. n=3, **p≤0,02, ***p≤0,01, bezogen auf die Kontrolle ohne GNP.

Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, kam es zwischen Tag 1 und Tag 2 zu einer Wachstumshemmung aller fünf Gruppen, danach gingen sowohl die unbehandelten, als auch die BEAS-2B-Zellen unter einer Konzentration von maximal 4 x 10^9 GNP/ml in ein exponentielles Wachstum und somit in die log-Phase über. Im Gegensatz zu den Wachstumskurven der A549-Zellen war anhand dieser noch nicht abzuschätzen, wann die log-Phase beendet ist. Eine stationäre Phase war ebenso noch nicht auszumachen. Es wird deutlich, dass die Zugabe von GNP in Konzentrationen zwischen 4 x 10^7 GNP/ml und 4 x 10^9 GNP/ml keinen anhaltenden hemmenden Effekt auf das Wachstum der BEAS-2B-Zellen haben. Lediglich an Tag 2 kann eine signifikante Wachstumshemmung (p=0,005) bei den mit 4 x 10^9 GNP/ml behandelten BEAS-2B-Zellen beobachten werden. Bei den mit 4 x 10^{11} GNP/ml behandelten Zellen kam es bereits ab Tag 2, 24 h nach der Zugabe der GNP, zu einer signifikanten Wachstumshemmung, welche eine Einteilung der einzelnen Wachstumsphasen nicht mehr zuließ (Tag 2: p=0,012; Tag 4: p=0,001; Tag 6: p=0,004; Tag 8: p=0,00002; Tag 10: p=0,0002).

Auch für die BEAS-2B-Zellen wurden die Anteile vitaler und toter Zellen verglichen (Abb. 10).

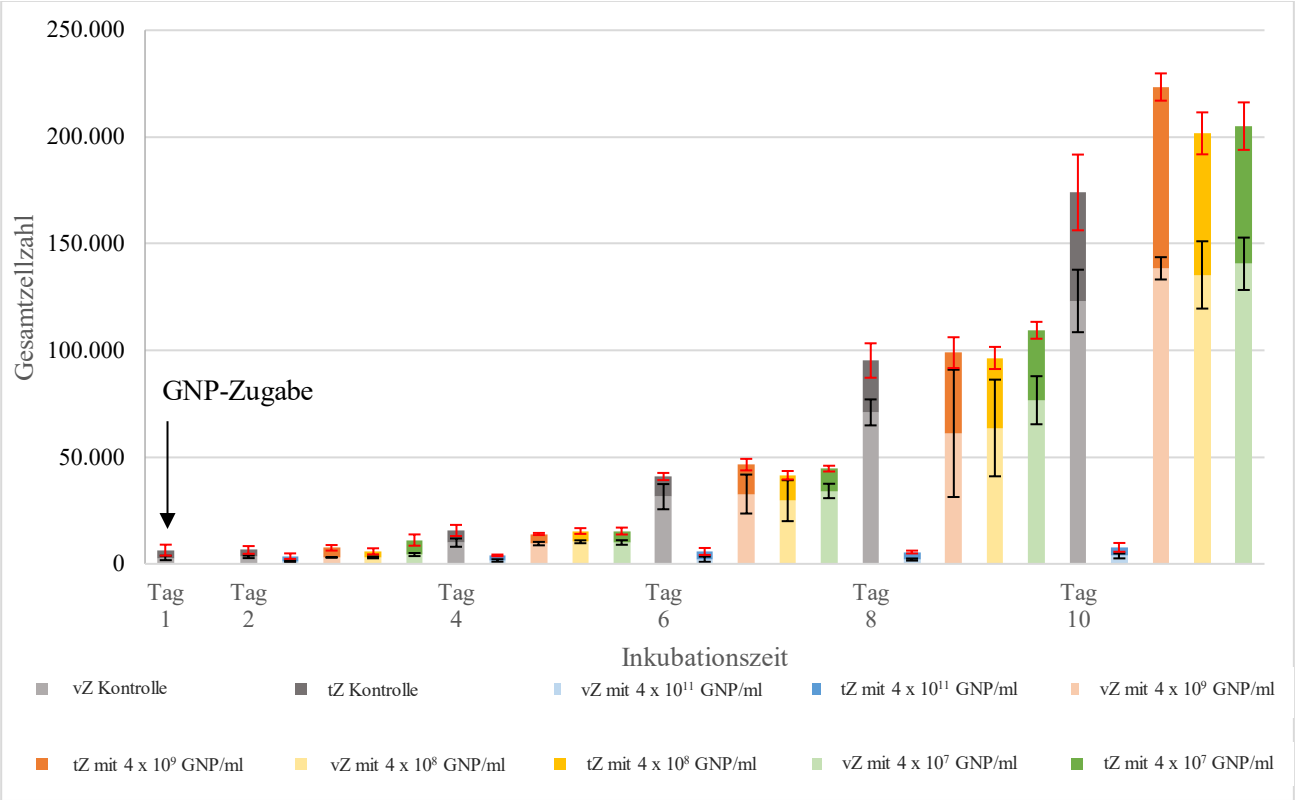

Abb. 10: Anteil vitaler (vZ) und toter (tZ) BEAS-2B-Zellen während des Wachstums unter Einfluss von GNP in verschiedenen Konzentrationen, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind die MW ± SD aus n=6 (Kontrolle), bzw. n=3.

Bei Auswertung der Abb. 10 konnte festgestellt werden, dass der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl geringer blieb, als der Anteil vitaler Zellen unter einer maximalen Konzentration von 4 x 10^9 GNP/ml. Der Anteil vitaler Zellen nahm bis Tag 10 stark zu, es war darüber hinaus eine deutliche Zunahme der Zellzahl zwischen Tag 8 und Tag 10 zu erkennen. Dies deckte sich mit der langen log-Phase. Die Darstellung der vitalen und toten Zellen zeigte, dass die Zugabe von maximal 4 x 10^9 GNP/ml auf das Wachstum der BEAS-2B-Zellen ähnliche Effekte wie auf die A549-Zellen hervorrief.

Die Zugabe von GNP in einer Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml führte dazu, dass der Anteil vitaler Zellen nicht zunahm.

Auch für die BEAS-2B-Zellen konnte anhand der Regressionsanalyse des exponentiellen Wachstums von Tag 2 bis Tag 6 eine Funktionsgleichung ermittelt werden, mit Hilfe derer die Zellpopulationsverdopplungszeiten (Tab. 4) für die BEAS-2B-Zellen unter den verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen berechnet werden konnten (Anhang Abb. 24 -Abb. 28).

Die Betrachtung der Zellpopulationsverdopplungszeiten ließ erkennen, dass die mit 4 x 10^{11} GNP/ml behandelten Zellen sowohl gegenüber den unbehandelten, als auch den mit

niedrigeren GNP-Konzentrationen behandelten Zellen vierfach länger zur Verdopplung benötigten. Die Zellpopulationsverdopplungszeiten für die unbehandelten, als auch für die Konzentrationen zwischen 4 x 10^7 GNP/ml und 4 x 10^9 GNP/ml betrugen zwischen 13,9 h und 16,1 h. Die der BEAS-2B-Zellen unter der höchsten Konzentration betrug 58,1 h.
In den Konzentrationen bis 4 x 10^9 GNP/ml konnte kein hemmender Effekt der GNP auf die BEAS-2B-Zellen festgestellt werden. Unter der höchsten Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml kam es zu einer deutlichen Wachstumshemmung.

Tab. 4: Durch exponentielle Regressionsanalyse des exponentiellen Wachstums zwischen Tag 2 und Tag 6 berechnete mittlere Zellpopulationsverdopplungszeiten der BEAS-2B-Zellen.

BEAS-2B-Zellen	**Zellpopulationsverdopplungszeit (h)**
Kontrolle, ohne GNP-Zusatz	15,6 / 13,9
mit 4 x 10^9 GNP/ml	13,9
mit 4 x 10^8 GNP/ml	14,6
mit 4 x 10^7 GNP/ml	16,1
mit 4 x 10^{11} GNP/ml	58,1

3.1.3 Vergleich des Wachstums von A549- und BEAS-2B-Zellen

Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum beider Zelllinien unter den Konzentrationen zwischen 4 x 10^7 GNP/ml und 4 x 10^9 GNP/ml unbeeinflusst blieb und sich die Verhältnisse der vitalen zu den toten Zellen an den Gesamtzellzahlen ähnlich verhielten. Bei Zugabe von GNP in einer hohen Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml wurde das Wachstum signifikant gehemmt. Es kam sowohl zu einer deutlichen Erhöhung der Zellpopulationsverdopplungszeit, als auch zu einem deutlichen Rückgang der Gesamtzellzahl bei beiden Zelllinien.
Ein auffallender Unterschied war, dass unter Zugabe der GNP in den Konzentrationen von 4 x 10^7, 4 x 10^8 und 4 x 10^9 GNP/ml die A549-Zellen bereits nach Tag 8 in eine stationäre Phase übergingen. Bei den BEAS-2B-Zellen waren bis Tag 10 steigende Zellzahlen zu beobachten.
Des Weiteren machte der Vergleich der Zellpopulationsverdopplungszeiten beider Zelllinien deutlich, dass diese bei den BEAS-2B-Zellen insgesamt etwas höher als bei den A549-Zellen waren. Die BEAS-2B-Zellen benötigten demzufolge länger um sich zu verdoppeln als die Tumorzellen.

3.2 Klonogenes Überleben

Der Effekt von GNP auf das klonogene Überleben beider Zelllinien wurde mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht.

3.2.1 Klonogenes Überleben der A549-Zellen unter Einfluss von GNP

Anhand von Koloniebildungstests war es möglich, das klonogene Überleben der A549-Zellen zu ermitteln. Die Plattiereffizienzen (PE) sowie die Überlebensfraktionen (engl. survival fraction, SF) unbehandelter sowie GNP-beeinflusster Zellen sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Vergleich Plattiereffizienzen und Überlebensfraktionen der A549-Zellen nach Bestrahlung und unter Einfluss von 1 x 10^{10} GNP/ml, MW ± SD.

Bestrahlung	1 x 10^{10} GNP	Plattiereffizienz	Überlebensfraktion
0 Gy	-	0,42 ± 0,03	1,0 ± 0,0
0 Gy	x	0,34 ± 0,04	1,0 ± 0,0
2 Gy	-	0,31 ± 0,04	0,73 ± 0,04
2 Gy	x	0,23 ± 0,04	0,69 ± 0,05
4 Gy	-	0,12 ± 0,02	0,28 ± 0,03
4 Gy	x	0,06 ± 0,01	0,16 ± 0,01
6 Gy	-	0,04 ± 0,01	0,1 ± 0,03
6 Gy	x	0,02 ± 0,004	0,06 ± 0,009

Wie aus Tab. 5 ersichtlich ist, nahmen sowohl die PE als auch die SF mit steigender Bestrahlungsdosis ab.

Die Zugabe von GNP in einer Konzentration von 1 x 10^{10} GNP/ml verstärkte die Abnahme bei allen Bestrahlungsdosen. Es wurde eine PE von 0,42 ± 0,03 für die unbehandelten Zellen (0 Gy, ohne GNP) ermittelt. Unter dem Einsatz von 1 x 10^{10} GNP/ml sank die PE auf 0,34 ± 0,04. Die PE betrug 0,31 ± 0,04 unter einer Bestrahlung mit 2 Gy ohne GNP. Bei Kombination einer Bestrahlung von 2 Gy und GNP sank die PE auf 0,23 ± 0,04. Die Kombination von Bestrahlung und GNP führte somit zu der geringsten PE. Dies konnte bei allen Bestrahlungsdosen beobachtet werden.

In Abbildung 11 sind die SF der A549-Zellen mit und ohne GNP-Zusatz von 1 x 10^{10} GNP/ml nach Bestrahlung zusätzlich grafisch als Überlebenskurven dargestellt.

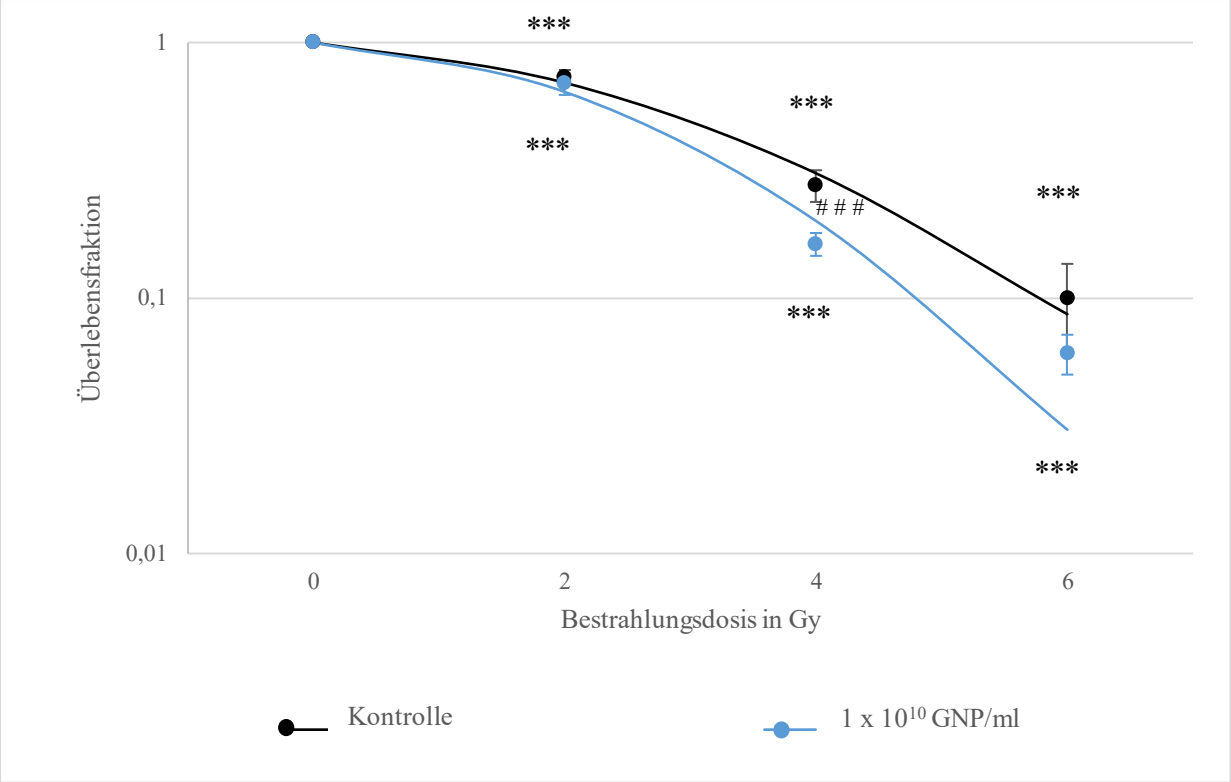

Abb. 11: Klonogenes Überleben (survival fraction, SF) der A549-Zellen mit und ohne GNP-Zugabe normiert auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle; dargestellt sind MW ± SD, n=3; ***p≤0,01; bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle ohne GNP; ### p≤0,01 bezogen auf die ohne GNP behandelte Kontrolle gleicher Bestrahlungsdosis.

Bei den A549-Zellen sank die SF mit steigender Bestrahlungsdosis zwischen 0 Gy und 6 Gy (Abb. 11). Die alleinige Bestrahlung führte zu einem signifikanten Rückgang der SF bei 2 Gy auf 0,73 ± 0,04 (p=0,0007), bei 4 Gy auf 0,28 ± 0,03 (p<0,01) und bei 6 Gy auf 0,1 ± 0,03 (p<0,01). Bei den mit GNP versetzten A549-Zellen führte die Bestrahlung zu einem stärkeren Rückgang der SF. Diese betrug unter 2 Gy 0,69 ± 0,05 (p=0,0013), unter 4 Gy 0,16 ± 0,01 (p<0,01) und unter 6 Gy 0,06 ± 0,009 (p<0,01).

Der Vergleich der SF unter einer Bestrahlung mit 4 Gy zwischen der Kontrolle und mit GNP behandelten A549-Zellen lässt ebenfalls einen signifikanten Rückgang der SF erkennen (p=0,01).

3.2.2 Klonogenes Überleben der BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von GNP

Mit Hilfe von Koloniebildungstests konnten die PE und SF für die BEAS-2B-Zellen unter Bestrahlung sowie unter der Zugabe von GNP ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Vergleich Plattiereffizienzen und Überlebensfraktionen der BEAS-2B-Zellen nach Bestrahlung und unter Einfluss von 1 x 10^{10} GNP/ml, MW ± SD.

Bestrahlung	1 x 10^{10} GNP	Plattiereffizienz	Überlebensfraktion
0 Gy	-	0,41 ± 0,02	1,0 ± 0,0
0 Gy	x	0,09 ± 0,04	1,0 ± 0,0
2 Gy	-	0,35 ± 0,03	0,86 ± 0,03
2 Gy	x	0,07 ± 0,03	0,82 ± 0,04
4 Gy	-	0,23 ± 0,07	0,56 ± 0,16
4 Gy	x	0,03 ± 0,008	0,32 ± 0,06
6 Gy	-	0,06 ± 0,007	0,15 ± 0,02
6 Gy	x	0,01 ± 0,002	0,15 ± 0,05

Sowohl die PE, als auch die SF der BEAS-2B-Zellen nehmen mit zunehmender Bestrahlungsdosis ab.

Wie aus Tab. 6 ersichtlich ist, betrug die PE der BEAS-2B-Zellen ohne Bestrahlung und GNP-Zugabe 0,41 ± 0,02. Die GNP-Zugabe bei gleicher Bestrahlungsdosis führte zu einer Abnahme der PE auf 0,09 ± 0,04. Die alleinige Bestrahlung ohne GNP-Zugabe führte zu einer PE von 0,35 ± 0,03. Die GNP-Zugabe beeinflusste somit die PE stärker als eine exklusive Bestrahlung.

In Abb. 12 wurden die SF der BEAS-2B-Zellen mit und ohne GNP-Zusatz unter Bestrahlungsdosen zwischen 0 Gy und 6 Gy dargestellt.

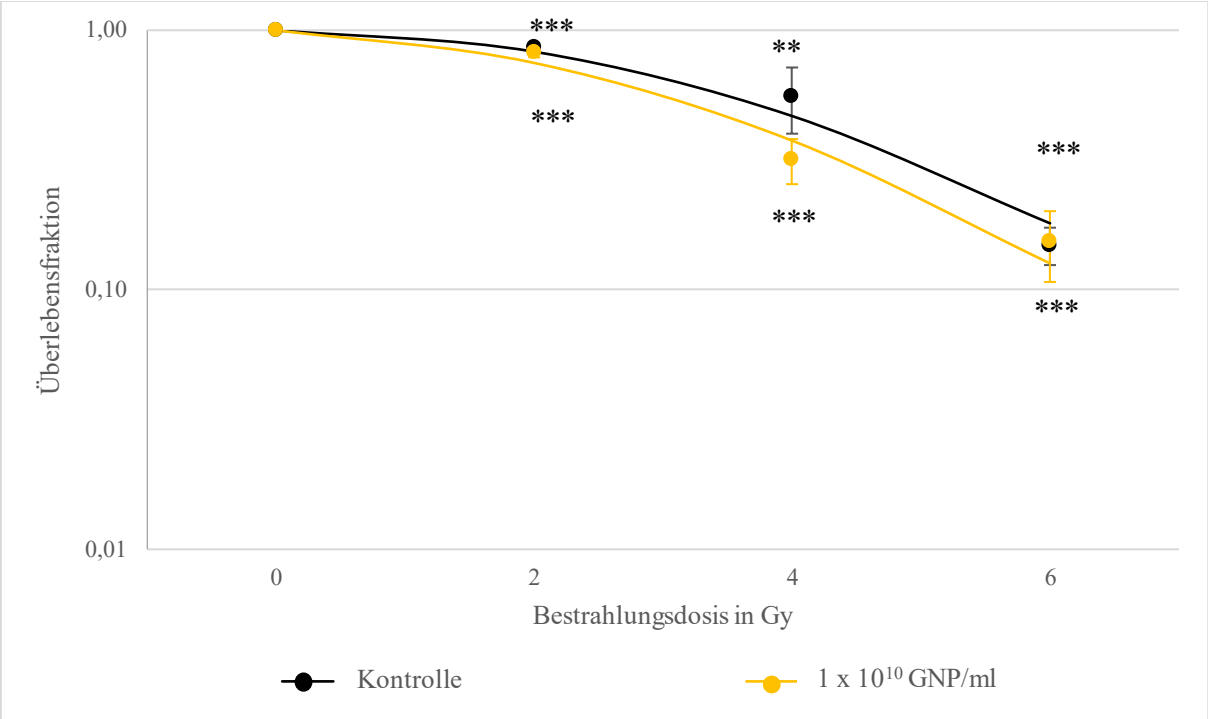

Abb. 12: Klonogenes Überleben (survival fraction, SF) der BEAS-2B-Zellen mit und ohne GNP-Zugabe, normiert auf die jeweils unbestrahllte Kontrolle; dargestellt sind MW ± SD, n=3; ** p≤0,02, *** p≤0,01 bezogen auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle ohne GNP.

Die alleinige Bestrahlung führte bei den BEAS-2B-Zellen zu einer signifikant abnehmenden SF (2 Gy p=0,003; 4 Gy p=0,017; 6 Gy p<0,01).

Bei den GNP-behandelten BEAS-2B-Zellen kam es ebenfalls zu einer signifikant abnehmenden SF (2 Gy p=0,003; 4 Gy p=0,0001; 6 Gy p<0,01).

3.2.3 Vergleich des klonogenen Überlebens von A549- und BEAS-2B-Zellen

Die PE der A549-Zellen ohne GNP betrug 0,42 bei 0 Gy und nahm mit steigender Bestrahlungsdosis ab. Ab einer Bestrahlung von 2 Gy (PE= 0,31) war sie geringer, als bei den BEAS-2B-Zellen (2 Gy: PE=0,35). Die A549-Zellen sind somit strahlensensibler als die Normalgewebszellen.

Der Vergleich der PE beider Zelllinien machte außerdem deutlich, dass die GNP-Zugabe auf die Normalgewebszellen wesentlich toxischer wirkt (PE 0 Gy mit GNP = 0,09), als auf die Tumorzellen (PE 0 Gy mit GNP = 0,34).

Auch die SF nahm bei beiden Zelllinien mit zunehmender Bestrahlungsdosis ab. Diese Abnahme wurde bei beiden Zelllinien durch die Zugabe von GNP verstärkt. Dies wird auch durch den

Vergleich der SF2 (survival fraction bei 2 Gy) deulich. Bei den Tumorzellen sank diese von 0,73 der Kontrollgruppe auf 0,69 durch den Zusatz von GNP in einer Konzentration von 1 x 10^{10} GNP/ml. Die SF bei den BEAS-2B-Zellen betrug bei den unbehandelten Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy 0,86 und sank bei den behandelten Zellen auf 0,82. Es ist daher bei beiden Zelllinien ein Rückgang zu erkennen, jedoch fiel dieser bei den A549-Zellen stärker aus.

3.3 Zellproliferation

Der Einfluss der GNP und der Bestrahlung auf die Proliferation der Zellen wurden anhand eines BrdU-Tests ermittelt.

3.3.1 Zellproliferation der A549-Zellen unter Einfluss von GNP

Die Ergebnisse der Untersuchung der Proliferation der A549-Zellen sind in Abb. 13 dargestellt.

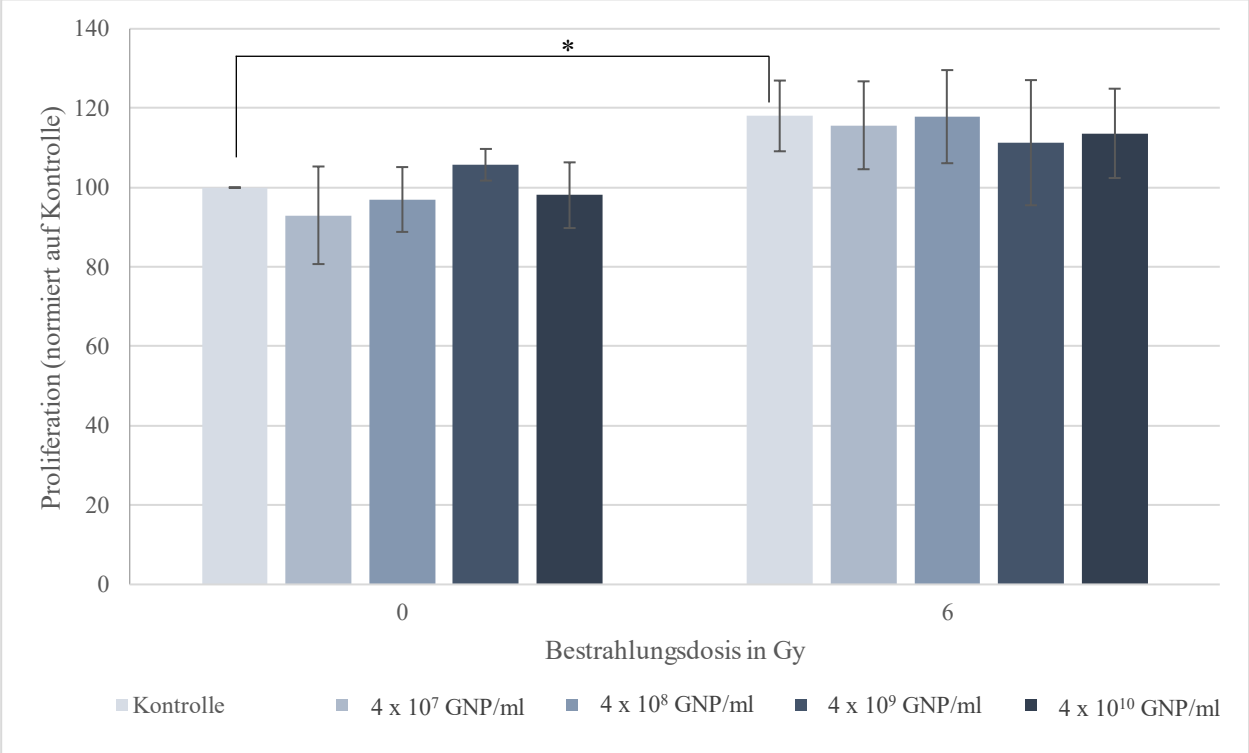

Abb. 13: Proliferation der A549-Zellen, 24 h nach GNP-Zugabe, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP), Einsaatdichte 15 x 10^3 Zellen/Well; *p≤0,05; dargestellt sind MW ± SD, n=3.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich wird, erhöhte die alleinige Bestrahlung die Proliferation signifikant (p=0,046). Bei der Kontrollgruppe der bestrahlten Zellen kam es zu einem Anstieg um 18,1 % im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrollgruppe.

Durch die GNP-Zugabe in verschiedenen Konzentrationen kam es zu einer leichten Hemmung der Proliferation bei den unbestrahlten Zellen. Beispielsweise sank diese nach einer Zugabe von 4 x 10^7 GNP/ml auf 93,0 % und bei der nächst höheren Konzentration auf 97,0 %. Eine Ausnahme stellte die mit 4 x 10^9 GNP/ml versetzte 0 Gy Probe dar, bei der ein leichter Anstieg der BrdU um 5,7 % erkennbar war.

Die Kombination von Bestrahlung und GNP-Zugabe führte zu einer gesteigerten Proliferation der kombiniert behandelten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen. Jedoch war die Proliferation aller mit GNP-behandelten Zellen etwas geringer als bei der Kontrollgruppe bei 6 Gy. Insgesamt konnte ein leicht inhibierender Einfluss der untersuchten GNP-Konzentrationen auf die Proliferation der A549-Zellen nachgewiesen werden, der jedoch nicht signifikant war.

3.3.2 Zellproliferation der BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von GNP

Die Ergebnisse zum Proliferationsverhalten der BEAS-2B-Zellen sind in Abb. 14 dargestellt.

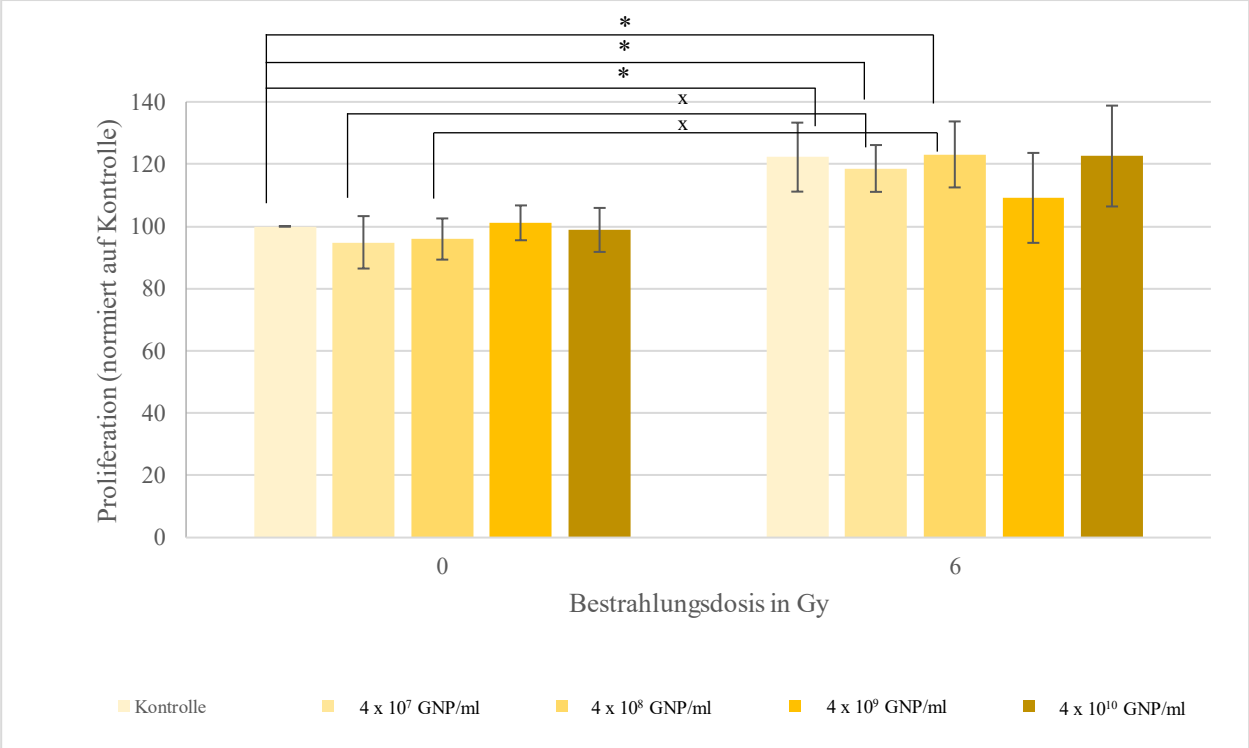

Abb. 14: Proliferation der BEAS-2B-Zellen, 24 h nach GNP-Zugabe, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP), Einsaatdichte 15 x 10^3 Zellen/Well; dargestellt sind MW ± SD, n=3; * p≤0,05 bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle ohne GNP; x p≤0,05 bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle gleicher GNP-Konzentrationen.

Auch bei den BEAS-2B-Zellen wurde deutlich, dass bereits die alleinige Bestrahlung zu einer signifikant (p=0,047) gesteigerten Proliferation führte. Diese war bei der bestrahlten Kontrollgruppe (ohne GNP) um 22,2 % stärker als bei der unbestrahlten Kontrollgruppe. Auch der Vergleich der 0 Gy Probe mit 4 x 10^7 GNP/ml mit der 6 Gy Probe gleicher GNP-Konzentration zeigte eine signifikante Proliferationszunahme (p=0,041). Dies war auch beim Vergleich der 0 Gy und 6 Gy Probe der nächst höheren Konzentration von 4 x 10^8 GNP/ml der Fall (p=0,037).
Die Zugabe von GNP in verschiedenen Konzentrationen führte bei den 0 Gy Proben, außer bei 4 x 10^9 GNP/ml zu einer leichten Abnahme der Proliferation.
Die Kombination aus Bestrahlung und GNP-Zugabe bei einer Konzentration von 4 x 10^7 GNP/ml führte zu einer signifikanten Zunahme der Proliferation um 23,7 % (p=0,025) und in der nächst höheren Konzentration von 4 x 10^8 GNP/ml um 27,2 % (p=0,037) im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen ohne Gold.
Somit konnte nachgewiesen werden, dass eine Bestrahlung mit 6 Gy die Proliferation der BEAS-2B-Zellen erhöhte und die untersuchten GNP-Konzentrationen überwiegend zu einer leichten Hemmung der Proliferation bei 0 Gy führten, die jedoch nicht signifikant war.

3.3.3 Vergleich der Proliferation von A549- und BEAS-2B-Zellen

Der Vergleich beider Zelllinien machte deutlich, dass die Zugabe von GNP bei 0 Gy, bis auf einzelne Ausnahmen, zu einem leichten Rückgang der Zellproliferation führte. Dieser war jedoch nicht signifikant. Des Weiteren kam es bei beiden Zelllinien zu einer gesteigerten Proliferation nach einer Bestrahlung mit 6 Gy. Die Kombination von Bestrahlung und GNP ließ bei den A549-Zellen weiterhin eine gesteigerte Proliferation im Vergleich mit den 0 Gy Proben erkennen, bei den BEAS-2B-Zellen war diese Steigerung teilweise signifikant. Insgesamt konnte sowohl in Bezug auf die alleinige Bestrahlung und GNP-Zugabe, als auch auf die Kombination, eine ähnliche Zellproliferation beider Zelllinien beobachtet werden.

3.4 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1*

Mit Hilfe der PCR konnte die Expression von *CDKN1B* und *RB1* unter dem Zusatz von GNP und dem Einfluss von Bestrahlung untersucht werden. Die behandelten Zellen wurden mit 1 x 10^{10} GNP/ml versetzt und bei 6 Gy bestrahlt.

3.4.1 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* in den A549-Zellen

Die Ergebnisse der Genexpression von *CDKN1B* sind in Abb. 15 dargestellt.

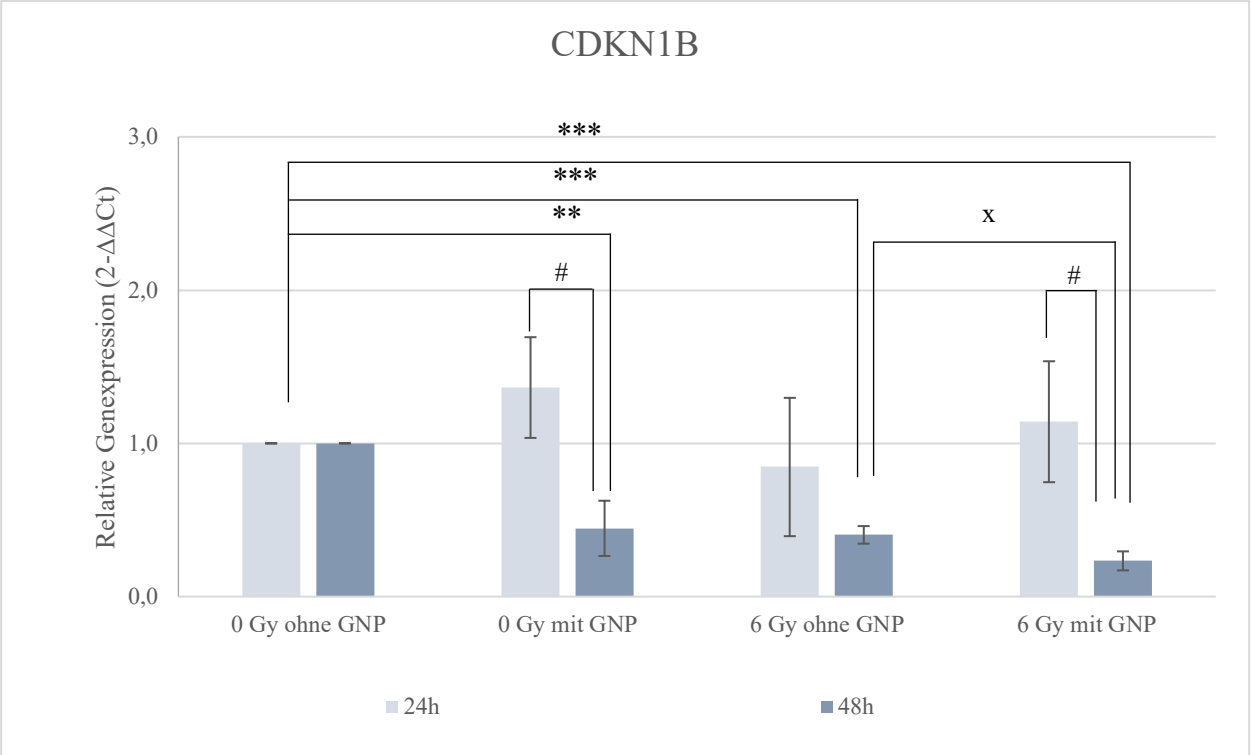

Abb. 15: Expression von *CDKN1B* in den A549-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP Zugabe in 1 x 10^{10} GNP/ml, gemessen mittels PCR; dargestellt ist der log_2 fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz); dargestellt sind MW ± SD, n=3; **p≤0,02, ***p≤0,01 bezogen auf die 0 Gy ohne GNP Proben; x p≤0,05 bezogen auf die ohne GNP behandelte Kontrolle bei 0 bzw. 6 Gy, # p≤0,05 bezogen auf die 24 h Probe bei 0 bzw. 6 Gy, für die relative Quantifizierung wurde *GAPDH* als Referenz verwendet.

Die Expression von *CDKN1B* nach 24 h bei den mit GNP behandelten Proben stieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 Gy, ohne GNP) sowohl bei den unbestrahlten (von 1,0 auf 1,36), als auch bei den bestrahlten (von 1,0 auf 1,14) A549-Zellen an.

Die Betrachtung nach 48 h machte hingegen einen signifikanten Rückgang der Genexpression deutlich. Sowohl bei der 0 Gy Probe mit GNP-Zugabe (p=0,026), als auch bei der 6 Gy Probe mit GNP-Zugabe (p=0,032) kam es zu einer signifikanten Abnahme nach 48 h im Vergleich zu der 24 h Probe (0 Gy mit GNP: von 1,36 auf 0,45; 6 Gy mit GNP: von 1,14 auf 0,23).

Desweiteren kam es zu einer signifkanten Abnahme der Expression von *CDKN1B* von 0,4 (6 Gy, ohne GNP, 48 h) auf 0,23 bei der 6 Gy Probe mit GNP (p=0,047).

Die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy führte zu einer signifikant verminderten *CDKN1B*-Expression, nach 48 h (p= 0,0001 bei 6 Gy ohne GNP 48 h). Der stärkste Rückgang konnte nach 48 h bei der mit GNP versetzten 6 Gy Probe im Vergleich zur 0 Gy Probe ohne GNP festgestellt werden (p=0,0001).

Die Expression von *RB1* in den A549-Zellen ist in Abb. 16 dargestellt.

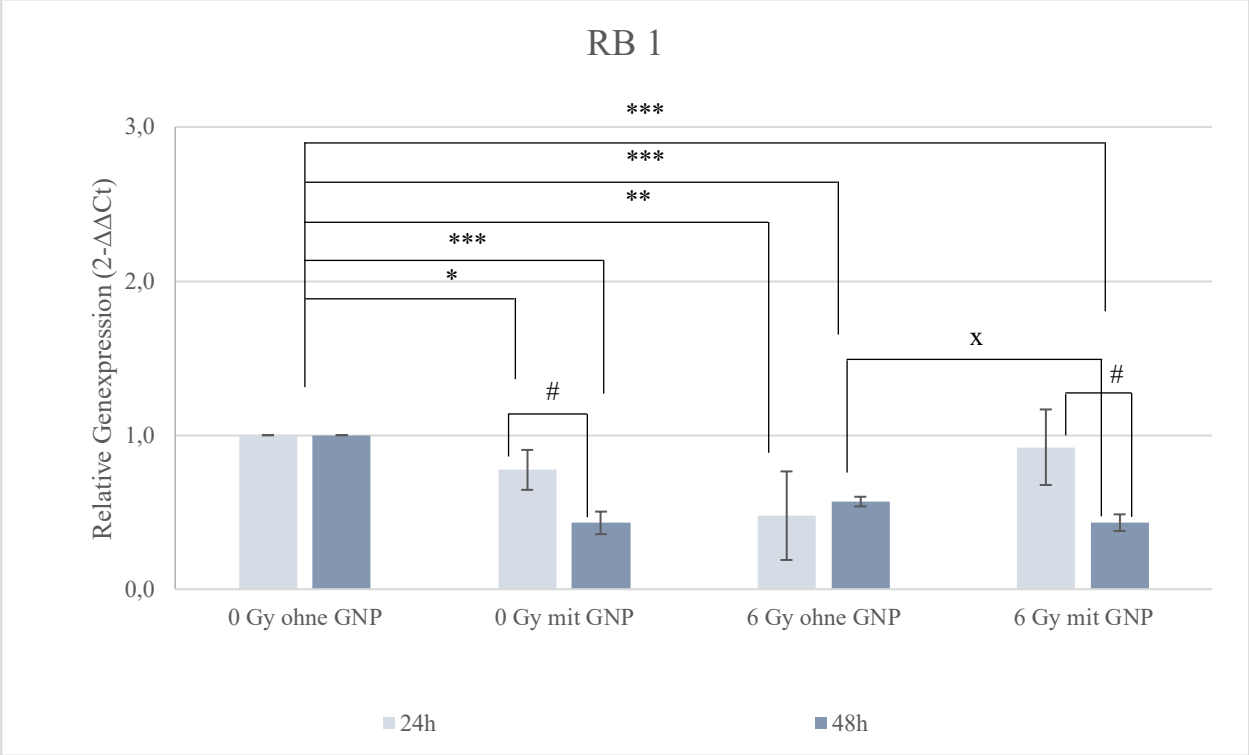

Abb. 16: Expression von *RB1* in den A549-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP-Zugabe (1 x 10^{10} GNP/ml), gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz); dargestellt sind MW ± SD, n=3; *p≤0,05, **p≤0,02, ***p≤0,01 bezogen auf die 0 Gy ohne GNP Proben; x p≤0,05 bezogen auf die ohne GNP behandelte Kontrolle bei 0 bzw. 6 Gy, # p≤0,05 bezogen auf die 24 h Probe bei 0 bzw. 6 Gy, für die relative Quantifizierung wurde *GAPDH* als Referenz verwendet.

Aus Abb. 16 wurde deutlich, dass bereits die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy zu einer signifikanten Abnahme der *RB1*-Genxpression im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, ohne GNP), sowohl nach 24 h (von 1,0 auf 0,48, p=0,02), als auch nach 48 h (von 1,0 auf 0,57, p<0,01), führte.

Durch den Zusatz von GNP kam es in den unbestrahlten Zellen ebenfalls zu einem signifikanten Rückgang der Expression von *RB1* im Vergleich zu der Kontrollgruppe (0 Gy, ohne GNP) von 1,0 auf 0,77 (24 h, p=0,024) und 1,0 auf 0,43 (48 h, p=0,0004).

Die Kombination von Bestrahlung und GNP führte bereits nach 24 h zu einer leichten Abnahme der Genexpression (von 1,0 auf 0,92). Diese sank signifikant von 0,92 (24 h) auf 0,43 nach 48 h (p=0,035). Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der unbestrahlten, mit GNP versetzten Probe

beobachtet werden, bei der es nach 48 h zu einer signifikanten Abnahme der *RB1*-Genexpression im Vergleich zu den nach 24 h gemessenen Werten (p=0,02) kam.
Nach 48 h kam es zu einer signifikanten Abnahme der *RB1*-Genexpression bei den bestrahlten, mit GNP behandelten Zellen auf 0,43 im Gegensatz zu den bestrahlten unbehandelten Zellen (0,57; p=0,04).

3.4.2 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* in den BEAS-2B-Zellen

Die Ergebnisse der Analyse der Genexpression von *CDKN1B* in den BEAS-2B-Zellen sind in Abb. 17 dargestellt.

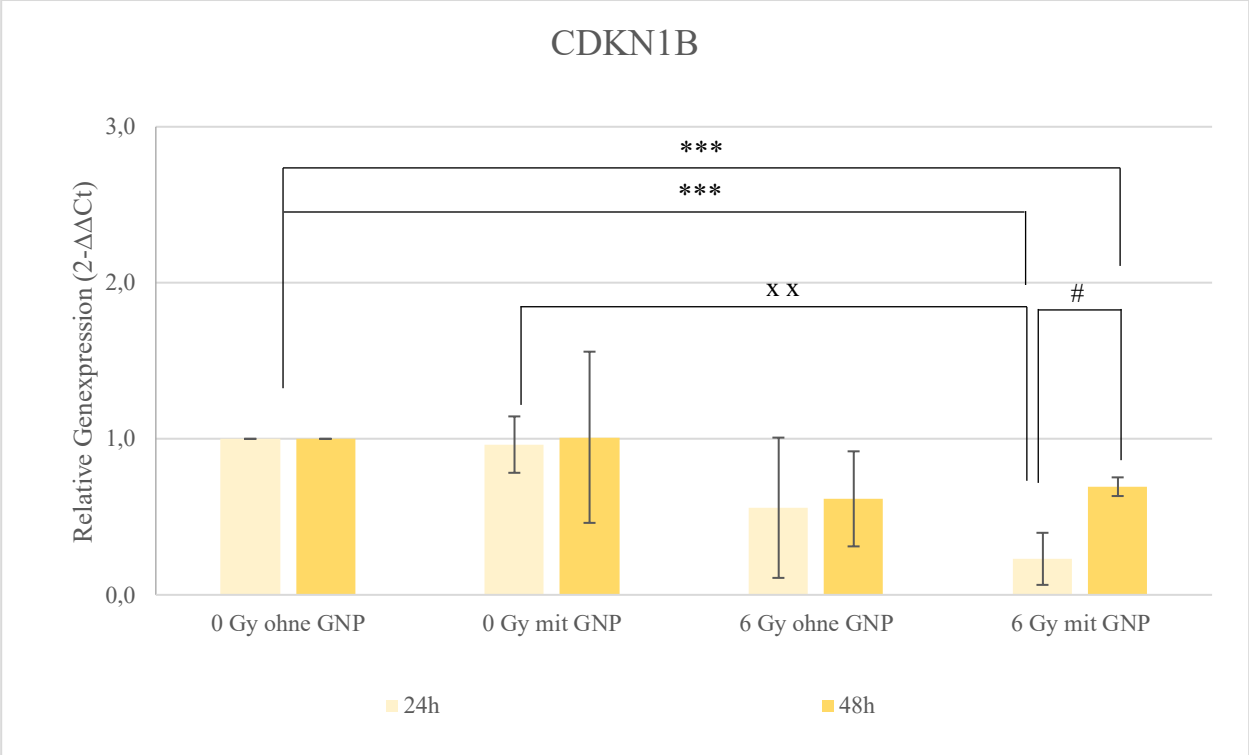

Abb. 17: Expression von *CDKN1B* in den BEAS-2B-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP (1 x 10^{10} GNP/ml), gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz); dargestellt sind MW ± SD, n=3; ***p≤0,01 bezogen auf die 0 Gy ohne GNP Proben; xx p≤0,02 bezogen auf die ohne GNP behandelte Kontrolle bei 0 bzw. 6 Gy, # p≤0,05 bezogen auf die 24 h Probe bei 0 bzw. 6 Gy, für die relative Quantifizierung wurde *GAPDH* als Referenz verwendet.

Aus Abb. 17 wird ersichtlich, dass die Bestrahlung mit 6 Gy zu einer starken Abnahme der *CDKN1B*-Genexpression in den unbehandelten Zellen sowohl nach 24 h (von 1,0 auf 0,56), als auch nach 48 h (von 1,0 auf 0,62) führte.

Durch die alleinige Zugabe von GNP ohne Bestrahlung kam es zu keiner signifikanten Hemmung der Genexpression.

Die Bestrahlung der mit GNP versetzten Probe führte bereits nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme der Genexpression im Vergleich zur unbestrahlten mit GNP versetzten Probe (von 0,96 auf 0,23; p=0,014). Nach 48 h stieg in dieser Probe (6 Gy, mit GNP) die Expression von *CDKN1B* signifikant von 0,23 (24 h) auf 0,69 (48 h) an (p=0,021).

Die Kombination aus Bestrahlung und GNP-Zugabe führte bereits nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme der Genexpression (p=0,003) und hielt nach 48 h weiter an (p=0,002).

Abb. 18 können die Ergebnisse der Expressionsanalyse von *RB1* in den BEAS-2B-Zellen entnommen werden.

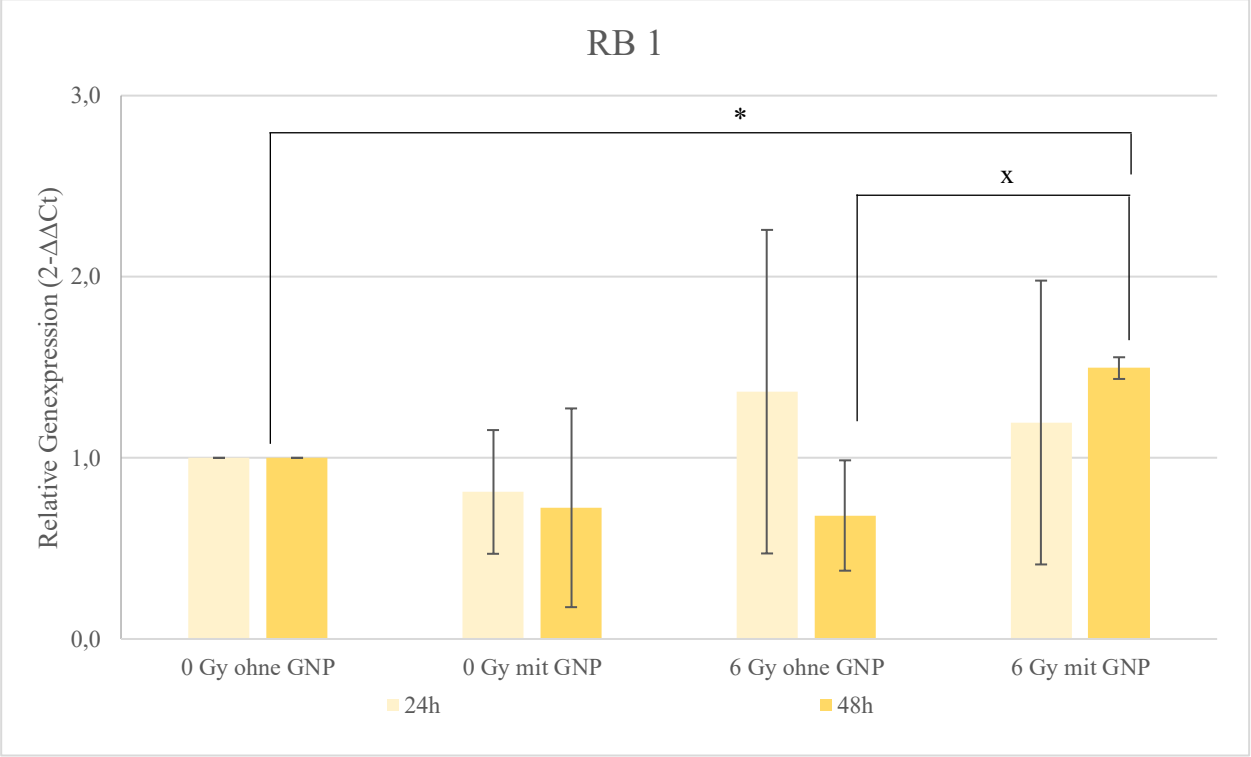

Abb. 18: Expression von *RB1* in den BEAS-2B-Zellen 24 h und 48 h nach deren Bestrahlung mit und ohne GNP (1 x 10^{10} GNP/ml), gemessen mittels PCR; dargestellt ist der $\log_2$ fold change (FC) des Gens, normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne GNP-Zusatz); dargestellt sind MW ± SD, n=3; *p≤0,05 bezogen auf die 0 Gy ohne GNP Proben; x p≤0,05 bezogen auf die ohne GNP behandelte Kontrolle bei 0 bzw. 6 Gy, für die relative Quantifizierung wurde *GAPDH* als Referenz verwendet.

Die Bestrahlung führte nach 24 h zu einem Anstieg der *RB1*-Expression in den BEAS-2B-Zellen (Abb. 18) von 1,0 (0 Gy, ohne GNP) auf 1,37 (6 Gy, ohne GNP). Nach 48 h kam es in der 6 Gy Probe ohne GNP jedoch zu einer deutlichen Abnahme von *RB1* (von 1,0 zu 0,68).

Die Zugabe von GNP führte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ohne Bestrahlung zu einem Rückgang der Genexpression. Auffallend war, dass die Zugabe von GNP nach 48 h zu einem signifikanten Anstieg (p=0,024) der *RB1*-Expression von 0,68 (6 Gy, ohne GNP) auf 1,5 (6 Gy, mit GNP) führte. Auch im Vergleich zur unbestrahlten Probe ohne Gold kam es zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression nach 48 h durch die Kombination von Bestrahlung und GNP (p=0,039).

3.4.3 Vergleich der Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* in den A549- und BEAS-2B-Zellen

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die alleinige Bestrahlung bei den A549-Zellen zu einer verminderten Expression des *CDKN1B*-Gens führte. Auch bei den BEAS-2B-Zellen konnte eine verminderte *CDKN1B*-Genexpression nach einer Bestrahlung beobachtet werden.
Die Zugabe von GNP führte bei den unbestrahlten A549-Zellen nach 24 h (0 Gy, mit GNP) zu einer Zunahme und nach 48 h zu einer Abnahme der *CDKN1B*-Genexpression; bei den BEAS-2B-Zellen kam es bei allen Proben (0 Gy, mit GNP) zu einer verminderten (24 h) bzw. gleichbleibenden (48 h) Expression von *CDKN1B*.
Die Kombination aus Bestrahlung und GNP führte bei den A549-Zellen nach 24 h zu einem Anstieg der *CDKN1B*-Genexpression und nach 48 h zu einer Abnahme von *CDKN1B*. Bei den BEAS-2B-Zellen kam es zu einem entgegengesetzten Effekt. Im Vergleich zur Kontrolle nahm die *CDKN1B*-Genexpression nach 24 h ab und stieg nach 48 h wieder an.
Bei Betrachtung der Genexpression des *RB1*-Gens fiel auf, dass diese nach alleiniger Bestrahlung der A549-Zellen bereits nach 24 h abnahm. Bei den BEAS-2B-Zellen nahm die Genexpression nach der Bestrahlung (6 Gy, ohne GNP) nach 24 h zu und erst nach 48 h ab.
Die alleinige GNP-Zugabe führte sowohl bei den A549-Zellen, als auch bei den BEAS-2B-Zellen zu einer Abnahme der *RB1*-Genexpression.
Die Kombination von Bestrahlung und GNP führte bei den A549-Zellen zu einer Abnahme der *RB1*-Genexpression. Es konnte erneut ein entgegengesetzter Effekt der BEAS-2B-Zellen beobachtet werden; die Kombination aus Bestrahlung und GNP führte zu einer Zunahme der *RB1*-Genexpression.

4. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der strahlensensibilisierenden Wirkung von Goldnanopartikeln (GNP) auf die humane Tumorzelllinie A549 der Lunge sowie auf die aus den menschlichen Bronchien stammende Normalgewebszelllinie BEAS-2B. Sowohl die Anzahl der Sterbefälle, als auch der Neuerkrankungen bedingt durch Bronchialkarzinome machen die unumgängliche Forschung zur Therapie deutlich. Ziel war es deshalb, *in vitro* zu untersuchen, ob der strahlensensibilisierende Effekt durch den Einsatz von GNP ausreicht, um die zur Therapie der Tumorzellen notwendige Bestrahlungsdosis und den damit verbundenen Nebenwirkungen einer höherdosierten Bestrahlung zu minimieren.

4.1 Wachstum

Mit Hilfe der Wachstumskurven konnte das Wachstumsverhalten beider Zelllinien ohne und mit Einfluss der GNP in verschiedenen Konzentrationen (4 x 10^7, 4 x 10^8, 4 x 10^9, 4 x 10^{11} GNP/ml) über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet werden. Es wurde festgestellt, dass sich die A549-Zellen und BEAS-2B-Zellen in ihrem Wachstumsverhalten unter dem Einfluss der getesteten GNP-Konzentrationen gleich verhielten.

4.1.1 Wachstum der A549-Zellen

Für die A549-Zellen konnte festgestellt werden, dass die GNP in den geringeren 3 Konzentrationen keinen Effekt auf das Wachstum der A549-Zellen zeigten. Dies bestätigten sowohl der Kurvenverlauf, als auch die berechneten Zellpopulationsverdopplungszeiten.
Die Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml hingegen führte zu einem deutlichen Rückgang der Zellzahl sowie einer Verlängerung der Zellpopulationsverdopplungszeit. Anhand dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die GNP von den Tumorzellen aufgenommen wurden, aber erst ab einer erhöhten Konzentration das Wachstumsverhalten der A549-Zellen beeinflussen.
Ein Grund für das gehemmte Wachstum nach Zugabe von 4 x 10^{11} GNP/ml könnte die vermehrte Bildung von oxidativem Stress sein (SZEKERES *et. al*., 2020). Da die GNP über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden, kann es zu einem Ausbruch der GNP aus den

Vesikeln kommen. Danach können sich die GNP frei im Cytosol bewegen und so an verschiedene Zellorganellen gelangen. Dieser ungeplante Ausbruch und das Vorhandensein der GNP als zellfremder Wirkstoff in der Zelle führen zur vermehrten Bildung von oxidativem Stress und die Wahrscheinlichkeit der Beeinflussung des Zellzyklus sowie von Genmutationen nimmt deutlich zu. Dies kann bis zum Zelltod oder zur Karzinogenese führen (ALBANESE *et. al.*, 2012).
Es wurde außerdem beschrieben, dass es zu chemischen Reaktionen zwischen der GNP-Oberfläche und den in der Zelle vorhandenen Sauerstoff-Atomen kommen kann, wodurch Superoxide gebildet werden, die wiederum zu Sauerstoffradikalen reagieren können. Diese Radikale können dann die Mitochondrienmembran angreifen oder zu DNA-Schäden führen (ROSA *et. al*., 2017). Die erhöhte Konzentration der GNP könnte zu einer vermehrten Bildung von Superoxiden geführt und somit das Wachstumsverhalten der A549-Zellen stark beeinflusst haben. So konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass das Wachstumsverhalten sowie der Anteil vitaler Zellen nach einer GNP-Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml vermindert werden.
WANG *et. al*. kamen 2013 zu ähnlichen Resultaten. Sie untersuchten den Einfluss von mit Thio-Glucose überzogenen GNP mit einem Durchmesser von 13 nm in verschiedenen Konzentrationen auf die A549-Zellen. Dabei war bei einer Konzentration von 5 nM kein stark toxischer Effekt auf die Zellvitalität auszumachen. Jedoch wurde bei Konzentrationen sowohl von 10 nM als auch von 20 nM ein stärkerer Rückgang der Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollproben deutlich.
Dies deckte sich nicht nur mit dieser Arbeit sondern auch mit den von PATRA *et. al*. (2007) beschriebenen Beobachtungen. Dort wurde eine starke Abnahme der Zellvitalität der A549-Zellen dokumentiert, nach Zugabe von GNP mit einem Durchmesser von 33 nm in Konzentrationen bis 120 nM.

4.1.2 Wachstum der BEAS-2B-Zellen

Auch das Wachstum der BEAS-2B-Zellen wurde unter Zugabe von 4 x 10^7, 4 x 10^8 und 4 x 10^9 GNP/ml nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum durch den Einsatz von GNP in einer höheren Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml ebenfalls stark gehemmt. Dies zeigte sich an einer deutlich erhöhten Zellpopulationsverdopplungszeit.
Es konnte festgestellt werden, dass auch bei den Normalgewebszellen eine hohe Konzentration von GNP notwendig ist, um einen wachstumshemmenden Effekt auszulösen.
Ein Vergleich mit der Literatur erwies sich bei den BEAS-2B-Zellen deutlich schwieriger als bei den A549-Zellen, da es kaum Forschungen zu dieser Zelllinie unter GNP-Zugabe gibt. VETTEN *et. al.* verglichen 2013 BEAS-2B-Zellen, CHO-Zellen (Hamster Ovarialzellen) und HEK 293-Zellen

(humane embryonale Nierenzellen) miteinander und stellten fest, dass die Zugabe von 5 nM GNP zu einer stärkeren Abnahme der Zellviabilität der BEAS-2B-Zellen führte, als die Zugabe von 1 nM. Die GNP hatten einen Durchmesser von 14 nm und eine Konzentration von 2,25 x 10^{12} GNP/ml. Eine Steigerung der Konzentration führte zu einer gesteigerten Abnahme der Zellviabilität. Dies war auch in dieser Arbeit der Fall. VETTEN *et. al*. untersuchten auch die Toxizität von GNP mit einem Durchmesser von 20 nm und einer Konzentration von 7,76 x 10^{11} GNP/ml auf die Zelllinien und stellten fest, dass diese auf die CHO-Zellen am höchsten war.

In der Arbeit von FREESE *et. al*. (2012) wurden die hCMEC/D3-Zellen (humane cerebrale microvaskuläre Endothelzellen) und HDMEC (humane dermale microvaskuläre Endothelzellen) mit GNP zwischen 10 nm und 25 nm in verschiedenen Konzentrationen (50 µM – 1000 µM) versetzt. Wie auch in dieser Arbeit kam es bei beiden Zelllinien unter einer Steigerung der GNP-Konzentration zu einem signifikanten Rückgang der Zellviabilität.

Sowohl die BEAS-2B-Zellen, als auch die A549-Zellen, unterlagen einem wachstumshemmenden Effekt unter dem Einfluss von 4 x 10^{11} GNP/ml. Es wurde deutlich, dass die Zellpopulationsverdopplungszeit der BEAS-2B-Zellen mit 4 x 10^{11} GNP/ml fast 1,5-fach verlängert war, im Vergleich zu der Zellpopulationsverdopplungszeit der A549-Zellen unter gleicher GNP Konzentration. Dies bedeutet, dass die Normalgewebszellen sensibler auf die GNP reagierten.

4.2 Klonogenes Überleben

Nachdem das Wachstumsverhalten der A549- und BEAS-2B-Zellen unter dem Zusatz der GNP sehr ähnlich war, konnte mithilfe des Koloniebildungstests das Langzeitüberleben als Fähigkeit beider Zelllinien, Kolonien zu bilden, untersucht und der Einfluss der Bestrahlung bzw. der GNP und die Kombination beider Behandlungen darauf bewertet werden.

4.2.1 Klonogenes Überleben der A549-Zellen

Aus den Koloniebildungstests der A549-Zellen wurde deutlich, dass die Zugabe von GNP in einer Konzentration von 1 x 10^{10} GNP/ml zu einer Abnahme der PE (0,34) im Vergleich zur Kontrollprobe (0,42) führte. Damit zeigte sich, wie bereits in den Wachstumskurven beobachtet, ein zytotoxischer Effekt der GNP in dieser Konzentration. Durch die Bestrahlung mit 2 Gy sank

die SF signifikant auf 0,73 (SF2). Eine Kombination von Bestrahlung ab 2 Gy und GNP führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der SF, welche bei den GNP-behandelten A549-Zellen stärker als bei GNP-unbehandelten Zellen zu beobachten war. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der GNP-Zusatz in dieser Konzentration die Strahlensensibilität der A549-Zellen erhöht.

Dies bestätigten die in der Literatur gemachten Angaben zum Überleben der A549-Zellen auf die Kombination von Bestrahlung und anderen GNP. Dabei wurden A549-Zellen mit Glu-GNP mit einem Durchmesser von 13 nm inkubiert und bei 6 MeV zwischen 0 Gy und 10 Gy bestrahlt. Die SF2 der A549-Zellen ohne GNP betrug 0,69, bei den A549-Zellen mit GNP sank die SF2 auf 0,5. Die SF nahm unter dem Zusatz der GNP deutlich stärker ab als bei der Kontrollgruppe (WANG *et. al*., 2013).

Auch BUCH *et. al.* beschäftigten sich 2012 mit der Strahlensensibilität von A549-Zellen. Die SF2 betrug 0,62, ohne die Zugabe weiterer Wirkstoffe. Die A549-Zellen sprachen sowohl bei BUCH *et. al*., als auch in dieser Arbeit auf eine Bestrahlung mit 2 Gy an.

Es konnte bereits in vielen anderen Tumorzelllinien der strahlensensibilisierende Effekt von GNP beschrieben werden.

Zum Beispiel bei HeLa-Zellen, welche mit GNP (50 nm) inkubiert wurden. Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen mit GNP behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden. Die SF nahm bei den Zellen, die mit Dosen zwischen 0 Gy und 8 Gy bestrahlt und zusätzlich mit GNP versetzt wurden, stärker ab, als bei den Zellen ohne GNP (CHITHRANI *et. al*., 2010).

Interessant sind die von SHAHHOSEINI *et. al.* 2019 gemachten Angaben. Die Autoren beschrieben, dass GNP den zytotoxischen Effekt einer Bestrahlung auf A549-Zellen nicht verstärken. Des Weiteren gaben sie an, bewusst GNP mit einem Durchmesser von 15 nm gewählt zu haben, da diese die höchste Zellaufnahme für Prostatazellen besitzen und auch in höheren Konzentrationen nicht zytotoxisch seien. Dass die hier vorliegende Arbeit jedoch auf Tumorzellen der Lunge und eine zytotoxische Wirkung auf eben diese abzielte, könnte die verschiedenen Ergebnisse begründen.

GENG *et. al*. (2011) verwendeten GNP mit einem Thioglukose-Überzug und einem Durchmesser von 15 nm. Sie beschrieben eine Abnahme der SF5 von 0,64 bei Krebszellen des Ovars, den SK-OV-3-Zellen, ohne GNP, auf 0,45 bei einer kombinierten Behandlung von Bestrahlung und GNP und bestätigte damit die Wirkung von GNP bei anderen Tumorzellen.

Und auch in Tumorzellen der Brust (MDA-MB-231-Zellen) konnte ein radiosensibilisierender Effekt durch sphärische, 1,9 nm große GNP von JAIN *et. al*. (2011) beschrieben werden. Dabei betrug die SF4 bei den MDA-MB-231-Zellen ohne GNP 0,28 und nach GNP-Zugabe nur 0,12.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass die Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen durch eine Bestrahlung abnahm und durch den Zusatz der hier verwendeten GNP noch stärker gehemmt wurde.

4.2.2 Klonogenes Überleben der BEAS-2B-Zellen

Auch bei den BEAS-2B-Zellen wurde deutlich, dass bereits bei 0 Gy die PE durch die Zugabe der GNP (PE 0 Gy mit GNP = 0,9) sehr stark im Vergleich gegenüber der Kontrollgruppe (PE 0 Gy ohne GNP = 0,41) abnahm.
Da die PE nach einer Bestrahlung von 2 Gy ohne GNP 0,35 betrug konnte gezeigt werden, dass die GNP-Zugabe toxischer auf die BEAS-2B-Zellen wirkte, als die alleinige Bestrahlung. Die Kombination von Bestrahlung und GNP führte zu der geringsten PE von 0,07.
Anhand der Koloniebildungstests konnte die Strahlensensibilität der BEAS-2B-Zellen bestätigt werden, da eine stetige Abnahme der SF mit steigender Bestrahlungsdosis zu erkennen war. Diese beobachtete Strahlensensibilität deckte sich mit den von TAN *et. al.* (2020) gemachten Angaben zum Überleben von BEAS-2B-Zellen nach Bestrahlung zwischen 0 Gy und 6 Gy, auch wenn die SF2 geringer ausfiel (0,55) als in dieser Arbeit (0,86). Die Autoren stellten ebenfalls fest, dass die SF mit zunehmender Bestrahlungsdosis signifikant abnahm.
Zu dem Einfluss von GNP auf die BEAS-2B-Zellen mit und ohne Bestrahlung gab es keine Aussagen in der Literatur. Jedoch untersuchte COULTER *et. al*. (2012) den Einfluss von sphärischen GNP mit einem Durchmesser von 1,9 nm auf epitheliale Lungenzellen, den L132, und beschrieb einen stärkeren Rückgang der SF durch eine Bestrahlung mit 3 Gy als durch den Zusatz von 12 µM GNP. In dieser Arbeit wurde ein stärkerer Einfluss auf die BEAS-2B-Zellen, bedingt durch die GNP-Zugabe, als durch die alleinige Bestrahlung mit 2 - 6 Gy festgestellt. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse von COULTER *et. al*. zu den hier gemachten Erkenntnissen. Ursache dafür könnte sowohl die Zelllinie, als auch die Größe der verwendeten GNP sein. Jedoch kamen auch COULTER *et. al*. zu der Erkenntnis, dass eine Kombination von Bestrahlung und GNP zu einer stärkeren Abnahme der SF führt, als der jeweilige exklusive Einfluss.

4.2.3 Einfluss der GNP auf das klonogene Überleben der A549- und BEAS-2B-Zellen

Es konnte mit dieser Untersuchung belegt werden, dass die Normalgewebszellen (BEAS-2B) deutlich strahlenresistenter waren als die Tumorzellen A549. Durch die Zugabe von GNP wurde

die Koloniebildungsfähigkeit der BEAS-2B-Zellen weniger stark herabsetzt als die der A549-Zellen. Ähnliches beschrieben auch KONG *et. al.* (2008). Die Autoren verglichen den Einfluss von GNP auf Brustkrebszellen (MCF7) und nicht malignen Brustzellen (MCF7-10A) und stellten fest, dass die GNP nur die Strahlensensibilität der Krebszellen erhöhten und keinen signifikanten Einfluss auf die Normalgewebszellen hatten. Die Nanopartikel bei KONG *et. al*. waren 10,8 nm groß und entweder mit Cysteaminen oder Thioglukose modifiziert. Die Autoren begründeten die erhöhte Strahlensensibilität der Krebszellen mit einer vermehrten Produktion reaktiven oxidativen Stresses sowie dem längeren Arrest der Zellen in der G2/M-Phase.
Die Strahlensensibiliserung der Normalgewebszellen durch GNP war in dieser Arbeit deutlich geringer ausgeprägt als bei den Tumorzellen. Gründe dafür könnten u.a. eine veränderte Proliferationsfähigkeit oder eine unterschiedliche Menge von Tumorsuppressorgenen in den Zellen sein. Beides wurde mit den nachfolgenden Tests untersucht.
Es wurde außerdem die Koloniebildungsfähgkeit beider Zelllinien nach Zugabe von GNP in den Konzentrationen von 1,4 x 10^{10} GNP/ml, 2 x 10^{10} GNP/ml, 4 x 10^{10} GNP/ml sowie 1 x 10^{11} GNP/ml untersucht. In allen aufgeführten Konzentrationen wirkten die GNP stark zytotoxisch, sodass es zu keiner Koloniebildung kam.

4.3 Zellproliferation

Mithilfe des BrdU-Tests konnte festgestellt werden, ob eine Bestrahlung von 6 Gy und/oder die Zugabe von GNP in Konzentrationen von 4 x 10^{7} GNP/ml, 4 x 10^{8} GNP/ml, 4 x 10^{9} GNP/ml und 4 x 10^{10} GNP/ml die Proliferation der Zellen anregt oder hemmt.

4.3.1 Zellproliferation der A549-Zellen

Der BrdU-Test zeigte bei den A549-Zellen, dass die Zugabe von GNP die Proliferation nicht steigerte, außer bei der mit einer Konzentration von 4 x 10^{9} GNP/ml versetzten Probe. Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy wurde bei allen Proben eine Zunahme des BrdU-Einbaus und damit eine gesteigerte Proliferation beobachtet. Damit scheint die Bestrahlung der entscheidende Faktor zu sein, welcher die Proliferation der A549-Zellen anregt.
Ähnliche Beobachtungen wurden auch gemacht von KAHKESH *et. al*. (2020). Sie beschrieben ebenfalls, dass eine Bestrahlung von A549-Zellen zwischen 0,5 Gy und 8 Gy die Proliferation der Tumorzellen steigert.

Jedoch gibt es auch Beschreibungen, in denen die Proliferation nach der Bestrahlung abnahm. So wurden in der Literatur von MANDA *et. al*. (2020) Angaben über einen Proliferationsrückgang bei den A549-Zellen nach einer Bestrahlung mit 6 Gy gemacht. Allerdings arbeiteten die Autoren mit einer geringeren Zellzahl und die BrdU-Messung erfolgte bereits nach 48 h. Es ist nicht auszuschließen, dass dies Gründe für die gesteigerte Proliferation der A549-Zellen nach der Bestrahlung sein könnten.

ÖZCELIK & PRATX beschrieben 2020 in ihrer Arbeit ebenfalls eine Reduktion der Proliferation von A549-Zellen beim kombinierten Einsatz von Bestrahlung und GNP. Die dabei verwendeten GNP hatten jedoch im Gegensatz zu den GNP in der vorliegenden Arbeit einen Durchmesser von 40 nm und auf ihrer Oberfläche befanden sich verschiedene Peptide. Bestrahlt wurden die Tumorzellen bei 225 kV und 13 mA mit einer Dosisrate von 1,03 Gy/min. Es gibt daher einige Unterscheidungspunkte zwischen der Arbeit von ÖZCELIK & PRATX und der hier vorliegenden.

RIESTERER *et. al*. beobachteten 2011 in ihrer Arbeit eine gesteigerte Proliferation nach Bestrahlung, wie sie auch bei den A549-Zellen in dieser Arbeit beobachtet wurde. Dabei verwendeten RIESTERER *et al*. Zellen von Kopf-Hals-Tumoren (FaDu) und bestrahlten sie mit 10 Gy.

Stressfaktoren, wie eine Bestrahlung oder die Zugabe eines Wirkstoffes, können das Fortschreiten des Zellzyklus- und damit auch die Proliferation- verlangsam, da sie zu DNA-Schäden führen können, welche an den eingebauten Kontrollpunkten überprüft werden müssen.

LIU *et. al*. (2014) untersuchten den Einfluss verschiedener GNP-Größen, zwischen 5 nm und 40 nm, auf das Verhältnis der einzelnen Zellzyklusphasen bei A549-Zellen ohne eine zusätzliche Bestrahlung. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zugabe dieser GNP keinen starken Effekt auf die einzelnen Phasen haben. Das bestätigt die hier gemachten Beobachtungen, dass die Zugabe der GNP die Zellproliferation nicht signifikant beeinflusst.

4.3.2 Zellproliferation der BEAS-2B-Zellen

Auch bei den BEAS-2B-Zellen blieb ein deutlicher Effekt auf die Proliferation durch die GNP-Zugabe bei 0 Gy aus. Erst durch die Bestrahlung kam es zu einem vermehrten Einbau des BrdU und somit zu einer erhöhten Proliferation. Die Kombination von Bestrahlung und GNP-Zugabe steigerte die Zellproliferation nicht mehr als die alleinige Bestrahlung.

HOLMILA *et. al*. beschrieben 2019 einen Rückgang der Proliferation bei BEAS-2B-Zellen nach Zugabe von Silbernanopartikeln (AgNP). Dabei wurde deutlich, dass sich die Proliferationsabnahme proportional zur verwendeten AgNP-Konzentration verhielt. Bei einer

AgNP-Konzentration von 1µg/ml war sie gering, erst ab Konzentrationen von 10 µg/ml wurde die Abnahme signifikant. Die verwendeten AgNP waren sphärisch gebaut und 23 nm groß.
In der Arbeit von FU *et. al*. (2016) wurde ein starker Proliferationsrückgang nach einer Bestrahlung mit 1 Gy bei den BEAS-2B-Zellen beschrieben. Dafür wurde ein alpha-Teilchenbeschleuniger verwendet mit einer Dosisleistung von 0,244 Gy/min und einem linearen Energietransfer von 100 keV/µm. Dieser war somit wesentlich höher, als bei dem hier eingesetzten VERO-Linearbeschleuniger. COSSMANN beschrieb 2015, dass der Strahlenwichtungsfaktor ω_R der Alphastrahlung ungefähr 20 beträgt, weshalb sie eine ca. 20-fach höhere schädliche Wirkung auf das bestrahlte Gewebe besitzt als Beta- oder Gamma-Strahlung (ω_R = 1) mit einer vergleichbaren Dosis. Die bei FU *et. al*. verwendete Strahlung unterschied sich somit deutlich von der dieser Arbeit.
Zu dem Einfluss von GNP auf die Zellproliferation der BEAS-2B-Zellen wurden in der Literatur keine Angaben gemacht.

Da die Zellen, um in die S-Phase zu gelangen, den G1-Kontrollpunkt passieren müssen, welcher wiederum von Genen wie beispielswiese *CDKN1B* und *RB1* beeinflusst wird, wurde mit Hilfe der qRT-PCR die Expression dieser beiden Gene in beiden Zelllinien bestimmt.

4.4 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1*

4.4.1 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* bei A549-Zellen

Die alleinige Bestrahlung führte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zu einer verminderten Expression von *CDKN1B* bei den A549-Zellen. Auch bei den mit GNP versetzten Proben war die Genexpression im Vergleich zu den unbestrahlten, mit GNP versetzten Proben nach einer Bestrahlung mit 6 Gy vermindert.
Bei den unbestrahlten Proben führte eine Zugabe von GNP nach 24 h zu einer vermehrten, und nach 48 h zu einer verminderten Expression von *CDKN1B*. Dieser Effekt war auch bei den Proben zu beobachten, die sowohl bestrahlt als auch mit GNP behandelt wurden.
Ein Anstieg von *CDKN1B* bedeutet eine vermehrte Hemmung des Cdk4-Cyclin-D-Komplexes, wodurch die Zellen während des Zellzyklus daran gehindert werden, in die S-Phase über zu treten. Erst durch den Abbau von *CDKN1B* kann die Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase übergehen und der Zellzyklus fortfahren.

Dies wird auch von CHOI *et. al*. (2011) beschrieben, die den Zellzyklus der A549-Zellen nach der Zugabe von GNP mit einem Durchmesser von 17 nm 24 h nach der Zugabe analysiert haben. Dabei wurde festgestellt, dass sich fast 40 % der Zellen in der sub-G1 befanden, diese Zellen also den G1-Kontrollpunkt noch nicht passiert hatten.

In dieser Arbeit konnte 48 h nach Bestrahlung bei allen Proben eine deutlich verminderte Expression des *CDKN1B*-Gens beobachtet werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen die sub-G1-Phase verlassen haben und auch den G1-Kontrollpunkt passiert haben. Eine Zellzyklusanalyse hätte diese Annahme stützen können; leider war diese aus zeitlichen Gründen nicht durchführbar.

Ziel wäre es, dass die Tumorzellen solange wie möglich in der sub-G1-Phase arretieren, um weiteres Tumorwachstum zu vermeiden oder zumindest zu verlangsamen. LIU *et. al.* (2014) stellten fest, dass es in den A549-Zellen unter GNP-Einfluss zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 und MMP-9 kam. MMP-9 greift u.a. das Typ 4 Kollagen in der Basalmembran an und erleichtert so die Ausbreitung der Tumorzellen. ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül und ebenfalls an der Interaktion von Tumorzellen beteiligt. Um dem Tumorwachstum entgegen zu wirken müssten diese beiden Proteine reduziert werden. In der Arbeit von LIU *et. al*. kam es jedoch zu einer verstärkten Expression, nachdem GNP mit einem Durchmesser von 5 nm zu den A549-Zellen hinzu gegeben wurden. GNP mit einem Durchmesser von 10-40 nm führten in der gleichen Arbeit entweder zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 oder einer gleichbleibenden Expression beider Proteine. Auch hier wurde deutlich, dass eine allgemeingültige Aussage über die Wirkung der GNP nicht möglich ist.

Im Gegensatz dazu beschrieben CHOI *et. al*. 2011, dass durch die Zugabe von GNP mit einem Durchmesser von 17 nm die Expression der pro-apoptotischen Gene BAX und BAK anstieg. Eine vermehrte Expression dieser Proteine lässt darauf schließen, dass die GNP den intrinsischen Apoptoseweg in A549-Zellen fördern (CHOI *et. al*. 2011). Desweiteren wurde auch eine vermehrte Expression von Caspase-8, welche für den extrinischen Apoptoseweg verantwortlich ist, als auch von Caspase-3, welche sowohl Teil des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptosewegs ist, beschrieben. CHOI *et. al*. schlussfolgerten, dass die GNP auf beiden Apoptosenwegen zu starken Schäden der Tumorzellen führen können.

BRANDENBERGER *et. al*. (2010) untersuchten die Genepression der proinflammatorischen Marker IL-8, TNFα und iNOS und der Marker für oxidativen Stress, SOD2 und HO-1, in A549-Zellen unter der Zugabe von 15 nm großen GNP. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass die verwendeten GNP weder eine inflammatorische, noch eine oxidative Stressreaktion in den Tumorzellen auslösen.

Es wird deutlich, dass es bereits in der Literatur verschiedene Angaben über die Wirkung von GNP auf die A549-Zellen gibt.

Die Expression des *RB1*-Gens in den A549-Zellen war im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, ohne GNP) in allen anderen Proben vermindert. Sowohl die GNP-Zugabe, die alleinige Bestrahlung als auch die Kombination aus beiden Faktoren führten zu einer verminderten Genexpression von *RB1*. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die von GNP angeregte Expression von *CDKN1B* der Cdk4-Cyclin-D-Komplex vermehrt gehemmt wird. Damit entfällt die Phosphorylierung von *RB1* und somit auch die Freisetzung des Transkriptionsfaktors. Nach 48 h nimmt die Hemmung und auch die Expression von *RB1* ab, da dieses nun phosphoryliert und inaktiviert wird.

4.4.2 Genexpression von *CDKN1B* und *RB1* bei BEAS-2B-Zellen

Die alleinige Bestrahlung führte zu einer verminderten *CDKN1B*-Expression bei den BEAS-2B-Zellen. Die *RB1*-Expression war nach einer Bestrahlung mit 6 Gy ohne GNP nach 24 h gesteigert und nach 48 h vermindert.

Bei den unbestrahlten Proben kam es durch den Zusatz von GNP zu einer nahezu unveränderten *CDKN1B*- und verminderten *RB1*-Genexpression.

Bei den mit GNP versetzten und bestrahlten Proben kam es zu einer verminderten *CDKN1B*- und gesteigerten *RB1*-Expression.

CHANG *et. al*. (2008) gehen davon aus, dass eine Hemmung der *CDKN1B*-Expression sowie eine Steigerung der *RB1*-Phosphorylierung die Zellproliferation erhöht und eine erhöhte Zellproliferation als Frühstadium der Lungenkarzinogenese gesehen wird. Eine solche Hemmung war bei den BEAS-2B-Zellen sowohl ohne als auch mit GNP nach der Bestrahlung zu beobachten. Die Betrachtung von *RB1* zeigte nach 24 h eine vermehrte Expression bei den bestrahlten Proben, welche jedoch nach 48 h bei den Zellen ohne GNP-Zusatz wieder abfiel und bei den Proben mit GNP signifikant anstieg. Damit verhielt sich die Expression des *RB1*-Gens gegensätzlich zu *CDKN1B*.

Aufgrund des sehr gegensätzlichen Expressionsmusters von *CDKN1B* und *RB1*, sowie der hohen Standardabweichungen, fällt es insgesamt schwer, aus den erhobenen Daten eine allgemein gültige Regelmäßigkeit für die BEAS-2B-Zellen zu finden.

Ein Grund für die erschwerte Einordnung der Ergebnisse und hohen Standardabweichungen könnte ein unterschiedlicher cDNA-Gehalt in den verwendeten Proben sein. Um diese Fehlerquote so gering wie möglich zu halten, wurden sowohl die RNA-Gehalte der Proben vor dem Einfrieren, als auch der cDNA-Gehalt nach Synthese, gemessen. Dennoch kann es durch ungenügendes

Durchmischen der Proben zu einer ungleichen Verteilung innerhalb dieser kommen. Ein geringerer cDNA-Gehalt führt folgend nur zu einer geringeren Expression der untersuchten Gene.

4.5 Ausblick und Einordnung der erhaltenen Ergebnisse für die Klinik

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die GNP einen strahlensensibilisierenden Effekt auf die A549-Zellen hatten. Dies konnte mit Hilfe des Koloniebildungstests nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des BrdU-Tests machten jedoch auch deutlich, dass die Zellproliferation vor allem durch die Bestrahlung und weniger durch die alleinige GNP-Zugabe gesteigert wurde.
Anhand der PCR wurde nach 24 h deutlich, dass bei den unbestrahlten Zellen durch die GNP-Zugabe *CDKN1B* gehäuft auftrat und somit die Zellen vermehrt in der G1-Phase verweilten. Dies kann auf eine erhöhte Kontrolle der Zellen zurückgeführt werden, die bei Fehlern in der DNS zu Apoptose führt. Ohne vergleichbare Literaturangaben und weiterführende Untersuchungen bleibt es jedoch schwierig, die gewonnenen Ergebnisse für die Klinik einzuordnen.
Natürlich sollte der Einsatz von GNP in der Klinik dem Patienten nutzen, in dem Tumorzellen strahlensensibler gemacht, Normalgewebszellen aber nicht geschädigt werden. Da sich jedoch sowohl das Wachstum, als auch das klonogene Überleben der BEAS-2B-Zellen nicht stark von dem der A549-Zellen unterschieden, kann dieser Anspruch an eine Therapie mit GNP nicht gewährleistet werden. Im Gegensatz, die PE der BEAS-2B-Zellen gab einen zytotoxischen Effekt der GNP wieder. Es bleibt jedoch zu beachten, dass es sich bei den hier verwendeten Zellen nur um 2 beispielhafte Zelllinien für Tumor- und Normalgewebszellen handelte.
Es wurde deutlich, dass der Einsatz von GNP vor einem komplexen Hintergrund abläuft, den es weiterhin gewissenhaft zu kontrollieren gilt, bevor ein Einsatz *in vivo* geplant werden kann, um das Verhalten von Normalgewebszellen, die es unter jeder Behandlung, egal ob einer Bestrahlung oder einer Wirkstoffzugabe, so gut es geht zu schonen gilt, eindeutig beschreiben zu können.
Auch die unterschiedlichen Literaturangaben bestätigten, wie vielschichtig das Gebiet der Nanomedizin ist, wie viel Einfluss Form, Größe und Beschichtung der Nanopartikel haben und unterstreichen die Herausforderung, die ein Einsatz der GNP in der Klinik darstellen würde.
Bis jetzt bleibt es schwierig, eine belastbare Vorhersage für das Zellverhalten während einer Krebstherapie unter Bestrahlung oder GNP-Zugabe im Kontext schonender Behandlungen zu treffen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Tumorzelllinie A549 und die Normalgewebszellen BEAS-2B in ihrem Ansprechen auf Gold-Nanopartikel (GNP) mit einem Durchmesser von 50 nm zu untersuchen und festzustellen, ob diese sich als Radioenhancer eignen. Dazu wurden verschiedene *In-vitro*-Methoden angewandt, die die Wirkung der GNP sowohl auf die Tumorzellen, als auch auf die Normalgewebszellen, genauer charakterisieren sollten. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- Eine Konzentration von 4 x 10^{11} GNP/ml hemmte das Wachstum beider Zelllinien signifikant. Gold-Nanopartikel in geringeren Konzentrationen von 4 x 10^{7}, 4 x 10^{8} bzw. 4 x 10^{9} GNP/ml beeinflussten das Wachstum nicht.
- In den A549-Tumorzellen konnte eine Reduktion des klonogenen Überlebens und ein strahlensensibilisierender Effekt durch die Zugabe von Gold-Nanopartikeln nachgewiesen werden.
- Bei den BEAS-2B-Normalgewebszellen konnte mittels Koloniebildungstest eine von den GNP ausgehende Zytotoxizität nachgewiesen werden; eine Strahlensensibilisierung wurde nicht ermittelt.
- Die mittels BrdU-Assay analysierte Zellproliferation wurde bei beiden Zelllinien durch die Zugabe von GNP leicht gehemmt. Die alleinige Bestrahlung führte zu einer gesteigerten Zellproliferation. Die Kombination von Bestrahlung und GNP konnten diesen Effekt nicht verstärken.
- Die mittels qRT-PCR analysierte *CDKN1B*-Genexpression war in den A549-Zellen nach alleiniger Bestrahlung mit 6 Gy vermindert. Sowohl die exklusive GNP-Zugabe, als auch die Kombination aus Bestrahlung und GNP führten nach 24 h zu einem Anstieg der *CDKN1B*-Genexpression bei den A549-Zellen und nach 48 h zu einer Abnahme. Bei den BEAS-2B-Zellen kam es sowohl durch die alleinige Bestrahlung, als auch durch die Kombination von Bestrahlung und GNP zu einer verminderten *CDKN1B*-Genexpression.
- Das mittels qRT-PCR gemessene *RB1*-Gen wurde bei den A549-Zellen sowohl durch die GNP-Zugabe, die exklusive Bestrahlung als auch durch die Kombination weniger exprimiert. Bei den BEAS-2B-Zellen nahm die Genexpression durch die alleinige Bestrahlung nach 24 h zu und nach 48 h ab. Die GNP-Zugabe führte bei den unbestrahlten BEAS-2B-Zellen zu einer verminderten Genexpression. Die Kombination aus Bestrahlung und GNP steigerte die *RB1*-Expression bei den BEAS-2B-Zellen.

Literaturverzeichnis

ALBANESE A, TANG PS, CHAN WCW (2012): „The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems“, Annual Reviews, 14:1-16, S.1-18.

American Type Culture Collection (ATCC): „A549 (ATCC CCL-185)“ abgerufen am 02.02.2020 von https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#generalinformation.

ATCC: „BEAS-2B (ATCC CRL-9609)“, abgerufen am 02.02.2020 von https://www.lgcstandards- atcc.org/products/all/CRL-9609.aspx#characteristics.

BRAASCH K (2006): „Auswirkungen des Chloracetaldehyd auf den Zellmetabolismus und die DNA-Synthese von Tumorzellen. Ein Vergleich der Toxizität des Ifosfamid-Metaboliten durch zwei *in vitro* Chemosensitivitätsassays.“, Lübeck, S.11. Abgerufen am 31.01.21 von https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss303.pdf.

BRANDENBERGER C, ROTHEN-RUTISHAUSER B, MÜHLFELD C, SCHMID O, FERRON G A, MAIER K L, GEHR P, LENZ A G (2010): „Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air liquid interface of a human epithelial airway model“, Toxicology and Applied Pharmacology 242, S. 56-65.

BUCH K, PETERS T, NAWROTH T, SÄNGER M, SCHMIDBERGER H, LANGGUTH P (2012): „Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay-A comparative study“, Radiation Oncology, 7:1, S. 1-6.

CHOI SY, JEONG S, JANG SH, PARK J, OARK JH, OCK KS, LEE SY, JOO SW (2011): „*In vitro* toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells“, Toxicology *in Vitro* 26, Elsevier, S. 229-237.

CHITHRANI BD, GHAZANI AA, CHAN WCW (2006): „Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells“, Nano Letters Vol. 6, No. 4, S. 662- 668.

CHITHRANI BD, JELVEH S, JALALI F, VAN PROOIJEN M, ALLEN C, BRISTOW RG, HILL R, JAFFRAY D (2010): „Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy“, Radiation Research 173, Radiation Research Society, S. 719-728.

CHANG Y, LIN P (2008): „*Trans, trans*-2,4-decadienal induced cell proliferation via p27 pathway in human bronchial epithelial cells“, Toxicology and Applied Pharmacology 228, S. 76-83.

COSSMANN PH (2015): „Strahlentherapie – Systeme, Geräte und Methoden.“ In: Kramme R. (eds) Medizintechnik. Springer Reference Technik. Springer, Berlin, Heidelberg, abgerufen am 27.01.2021 von https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-662-45538-8_32-1.

COULTER J A, JAIN S, BUTTERWORTH K T, TAGGART L E, DICKSON G R, MCMAHON S J, HYLAND W B, MUIR M F, TRAINOR C, HOUNSELL A R, O'SULLIVAN J M, SCHETTINO G, CURRELL F J, HIRST D G, PRISE K M (2012): „Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles“, International Journal of Nanomedicine 7, 2673-2685.

DOU Y, GUO Y, LI X, LI X, WANG S, WANG L, LV G, ZHANG X, WANG H, GONG X, CHANG J (2016): „Size-Tuning Ionization To Optimize Gold Nanoparticles of Simultaneous Enhanced CT Imaging and Radiotherapy“, American Chemical Society Nano 10, S. 2536-2548.

FREESE C, UBOLDI C, GIBSON M I, UNGER R E, WEKSLER B B, ROMERO I A, COURAUD P-O, KIRKPATRICK C J (2012): „Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells“, Particle and Fibre Toxicology 9:23, S. 1-11.

FU J, YUAN D, XIAO L, TU W, DONG C, LIU W, SHAO D (2016): „The crosstalk between α-irradiated Beas-2B cells and ist bystander U937 cells through MAPK and NF- κB signaling pathways“, Mutation Research 783, S. 1-8.

GENG F, SONG K, XING J Z, YUAN C, YAN S, YANG Q, CHEN J, KONG B (2011): „Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer“, Nanotechnology 22, S.1-8.

HAINFELD JF, SLATKIN DN, FOCELLA TM, SMILOWITZ HM (2006): „Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent.“, The British Journal of Radiology 79, S. 248-253.

HAINFELD JF, SMILOWITZ HM, O'CONNOR MJ, DILMANIAN FA, SLATKIN DN (2013): „Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice“, Nanomedicine 8 (10), S. 1601-1609.

HEINRICH P C, KOCH H G, BRIX J (Autoren) (2014): „Biochemie und Pathobiochemie“, 9. Auflage, Springer- Verlag Berlin Heidelberg, S.539- 540.

HOLMILA R J, VANCE S A, KING S B, TSANG A W, SINGH R, FURDUI C M (2019): „Silver Nanoparticles Induce Mitochondrial Protein Oxidation in Lung Cells Impacting Cell Cycle and Proliferation“, Antioxidants 8, 552, S. 1-15.

HWANG C, KIM J, KIM J (2017): „Influcence of concentration, nanoparticle size, beam energy, and material on dose enhancement in radiotion therapy“, Journal of Radiation Research, Vol. 58, No. 4, Oxford University Press, S. 405-411.

JAIN S, COULTER J A, HOUNSELL A R, BUTTERWORTH K T, MCMAHON S J, HYLAND W B, MUIR M F, DICKSON G R, PRISE K M, CURRELL F J, O'SULLIVAN J M, HIRST D G (2011): „Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies“, International Journal Radiation Oncology Biology Physics, Vol. 79, No. 2, S. 531- 539.

JEREMIC B, AGUERRI A, FILIPOVIC N (2013): „Radiosensitization by gold naoparticles“, Clinical and Translational Oncology 15, Springer, S.593-601.

KAHKESH M H, SALEHI Z, NAJAFI M, GHOBADI A, IZAD M, SHIRAZI A (2020): „The inhibitory effect of melatonin on the proliferation of irradiated A549 cell line“, Journal of Cancer Research and Therapeutics, Vol. 16, 6: 1500-1505.

KONG T, ZENG J, WANG X, YANG X, YANG J, MCQUARRIE S, MCEWAN A, ROA W, CHEN J, XING J Z (2008): „Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles“, Small, 4, No. 9, 1537-1543.

KUNCIC Z, LACOMBE S (2018): „Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment“ Physics in Medicine & Biology 63, S. 1-27.

KRAMME, R (Hrsg.), COSSMANN P.H. (Autor), (2015): „Medizintechnik“, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S.542, S. 547, S. 548.

LIU Y, ZHANG P, LI F, JIN X, LI J, CHEN W, LI Q (2017): „Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells“ Theranostics Vol. 8, Issue 7, Ivyspring, S. 1824-1849.

LIU Z, WU Y, GUO Z, LIU Y, SHEN Y, ZHOU P, LU X (2014): „Effetcs of Internalized Gold Nanoparticles with Respect to Cytotoxicity and Invasion Activity in Lung Cancer Cells“, PLoS One, 9(6), S. 1-11.

LOPES T S, ALVES G G, PEREIRA M R, GRANJEIRO J M, CORRÊA LEITE P E C (2019): „Advances and potential application of gold nanoparticles in nanomedicine“, Journal of Cellular Biochemistry 120, Wiley Periodicals, S. 16370-16378.

MANDA K, PRÄKELT T, SCHRÖDER T, KRIESEN S, HILDEBRANDT G (2020): „Radiosensitizing effects of trabectedin on human A549 lung cancer cells and HT-29 colon cancer cells“, Investigational New Drugs 38: 967-976.

MÜLLER H-J, PRANGE D R (2016): „PCR-Polymerase-Kettenreaktion“, 2. Auflage, Springer Spektrum, S.66-68.

ÖZCELIK S, PRATX G (2020): „Nuclear-targeted gold nanoparticles enhance cancer cell radiosensitization“, Nanotechnology 31, 415102, S. 1-8.

PATRA H, BANERJEE S, CHAUDHURI U, LAHIRI P, DASGUPTA A (2007): „Cell selective response to gold nanoparticles“, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine Vol. 3, Issue 2, Elsevier, S. 111-119.

POPOVTZER R, AGRAWAL A, KOTOV NA, POPOVTZER A, BALTER J, CAREY TE, KOPELMAN R (2008): „Targeted Gold Nanoparticles enable Molecular CT Imaging of Cancer“, Nano Lett, 8 (12), S. 4593-4596.

RAHMAN W, BISHARA N, ACKERLY T, HE C, JACKSON P, WONG C, DAVIDSON R, GESO M (2009): „Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy“, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 5, Elsevier, S. 136-142.

RIESTERER O, YANG Q, RAJU U, TORRES M, MOLKENTIN D, PATEL N, VALDECANAS D, MILAS L, ANG K K (2011): „Combination of anti-IGF-1R antibody and ionizing radiation in upper respiratory tract cancers“, International Journal Radiation Oncology Biology Physics, Vol. 79, No. 4, S. 1179-1187.

ROA W, ZHANG X, GUO L, SHAW A, HU X, XIONG Y, GULAVITA S, PATEL S, SUN X, CHEN J, MOORE R, XING JZ (2009): „Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle“, Nanotechnology 20, IOP Publishing, S. 1-9.

ROSA S, CONNOLLY C, SCHETTINO G, BUTTERWORTH KT, PRISE KM (2017): „Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization“, Cancer Nanotechnology 8:2, Springer, S. 1-25.

SCHMITZ S (2009): „Der Experimentator, Zellkultur“, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 18, S.107, S. 119.

SCHUEMANN J, BERBECCO R, CHITHRANI B D, CHO S, KUMAR R, MCMAHON S, SRIDHAR S, KRISHNAN S (2016): „Roadmap to clinical use of gold nanoparticles for radiosensitization“, Int J Radiat Oncol Biol Phys 94 (1), S. 189-205.

SHAHHOSEINI E, FELTIS BN, NAKAYAMA M, PIVA TJ, POUNIOTIS D, ALGHAMDI SS, GESO M (2019): „Combined Effects of Gold Nanoparticles and Ionizing Radiation on Human Prostae and Lung Cancer Cell Migration“, International Journal of Molecular Science 20, MDPI, S. 1-14.

SINGH P, OANDIT S, MOKKAPATI V R S S, GARG A, RAVIKUMAR V, MIJAKOVIC I (2018): „Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer“, International Journal of Molecular Science 19, MDPI, S. 1-16.

SZEKERES G P, WERNER S, GUTTMANN P, SPEDALIERI C, DRESCHER D, ZIVANOVIC V, MONTES-BAYÓN M, BETTMER J, KNEIPP J (2020): „Relating the composition and interface interactions in the hard corona of gold nanoparticles to the induced response mechanisms in living cells“, Nanoscale. 12, 17450-17461.

TAN S, PEI W, HUANG H, ZHOU G, HU W (2020): „Additive effects of simulated microgravity and ionizing radiation in cell death, induction of ROS and expression of RAC2 in human bronchial epithelial cells“, nature partner journals 6:34, Microgravity, S. 1-6.

ThermoFisher Scientific (2019): „Using TaqMan Endogenous Control Assays to select an endogenous control.“, application note, applied biosystems, S. 1. Abgerufen am 19.02.2012 von http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_042279.pdf.

VETTEN M A, TLOTLENG N, RASCHER D T, SKEPU A, KETER F K, BOODHIA K, KOEKEMOER L, ANDRAOS C, TSHIKHUDO R, GULUMIAN M (2013): „Label-free *in vitro* toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines“, Particle and Fibre Toxicology, 10:50, S. 1-15.

WANG C, LI X, WANG Y, LIU Z, FU L, HU L (2013): „Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies.“, Journal of Nanoparticle Research 15:1642, Springer, S. 1-12.

ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN UND DER GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (2019): „Krebs in Deutschland für 2015/2016“, 12. Ausgabe, Robert Koch Institut, Berlin, S. 17, S. 60. Abgerufen am 08.02.2021, von https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile.

Anhang

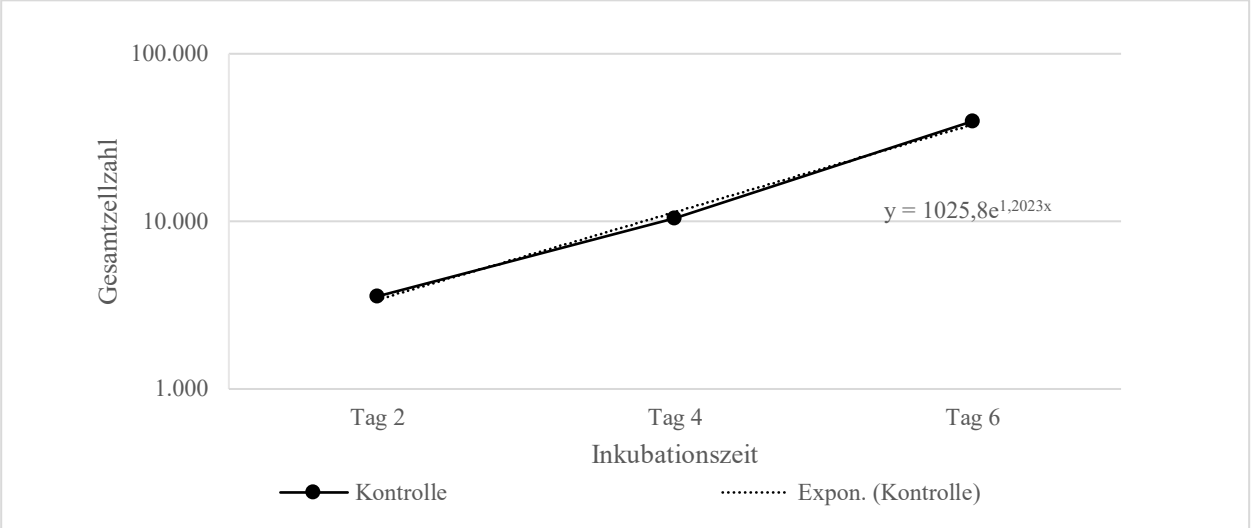

Abb. 19: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen (Kontrolle) mit exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

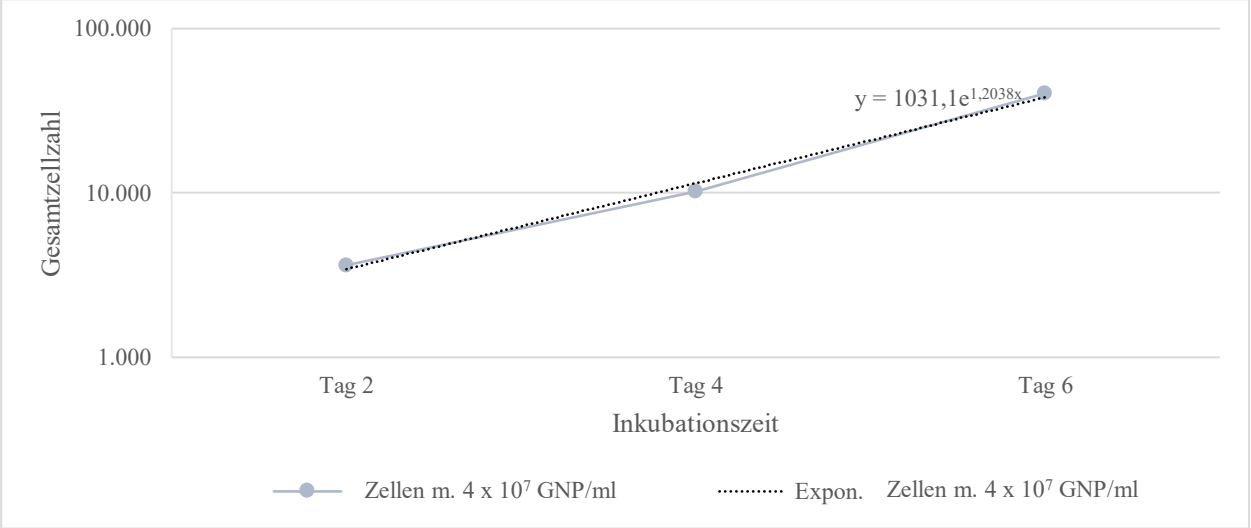

Abb. 20: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

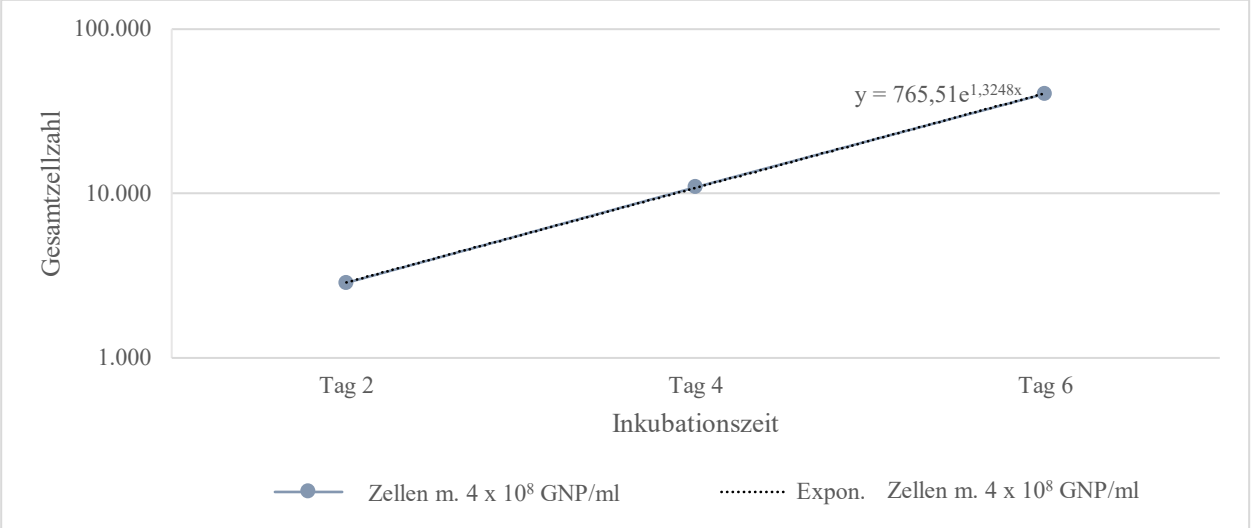

Abb. 21: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

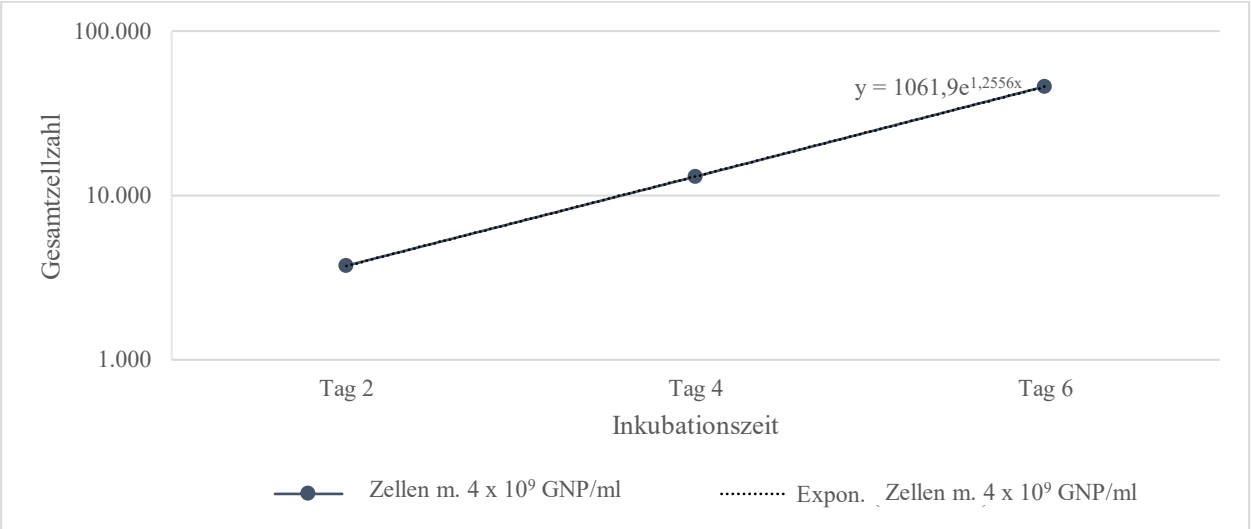

Abb. 22: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

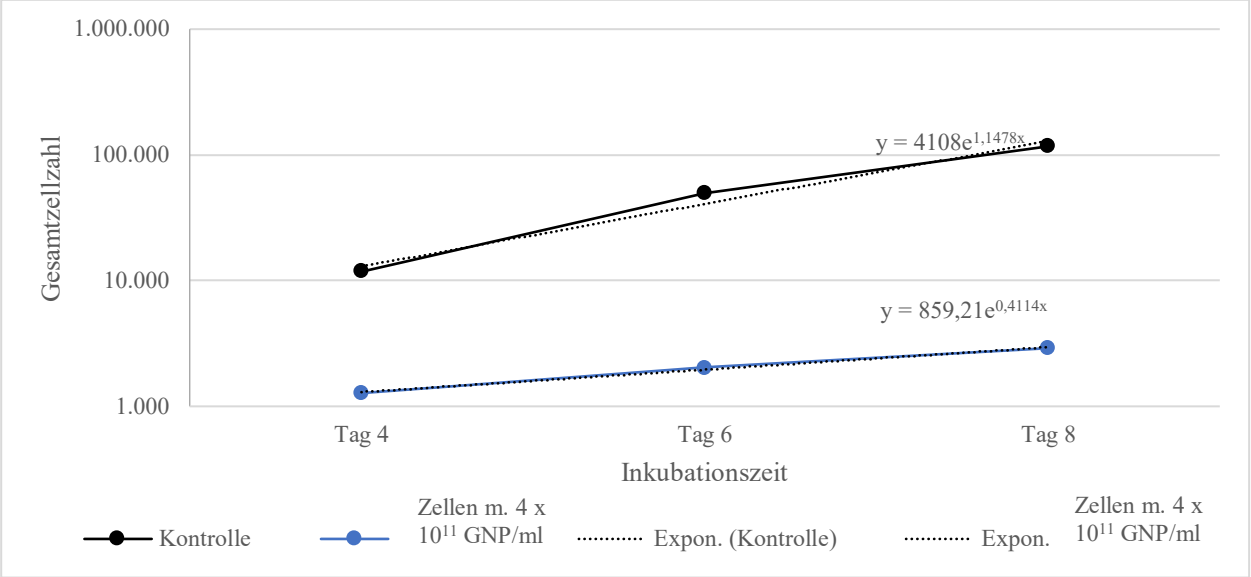

Abb. 23: Exponentielles Wachstum der A549-Zellen mit und ohne GNP, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

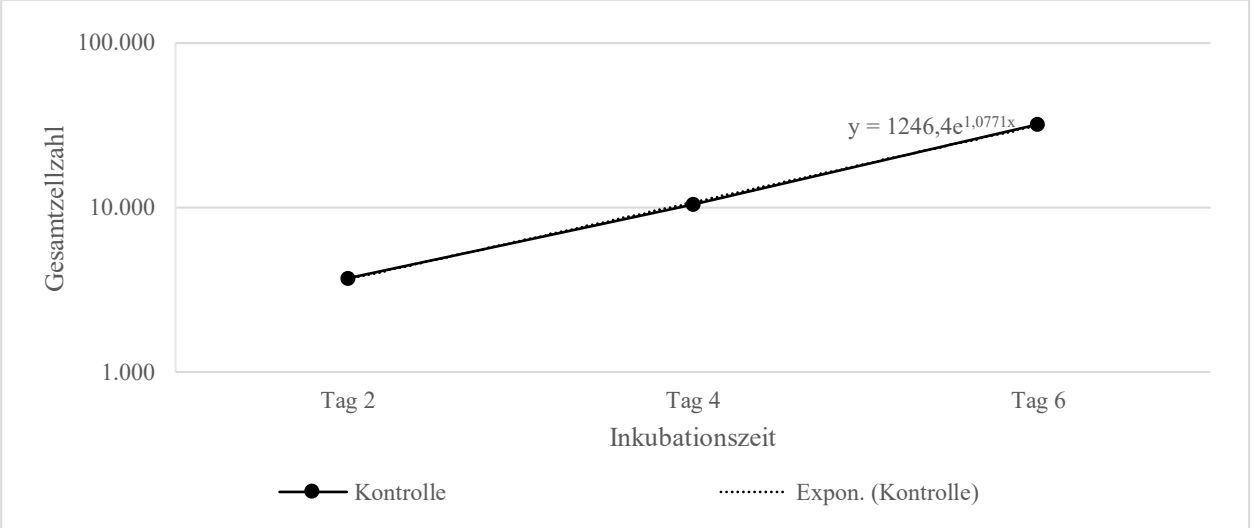

Abb. 24: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen (Kontrolle) mit exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

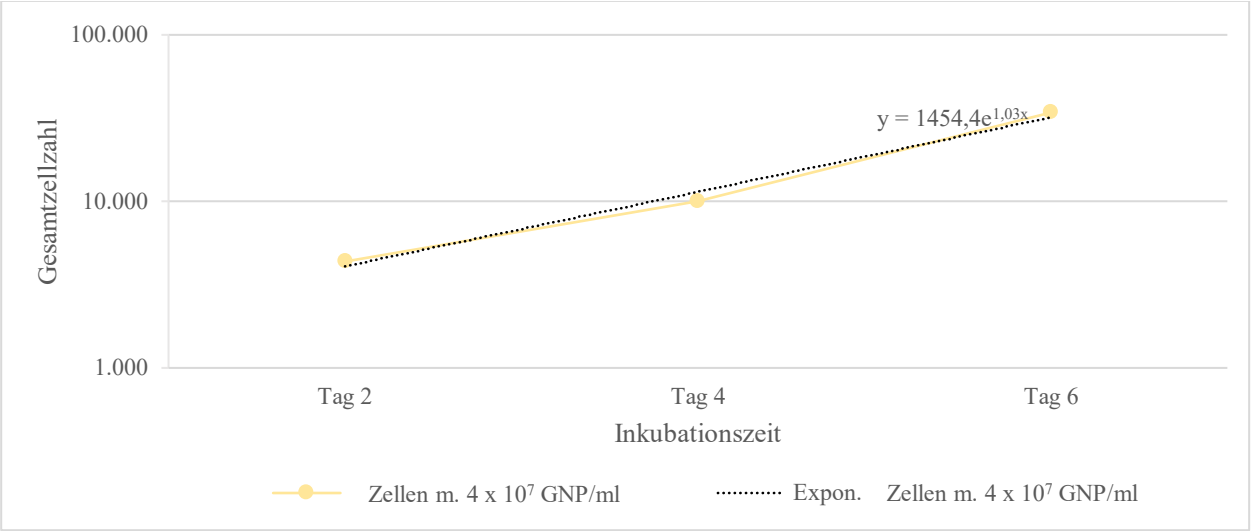

Abb. 25: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

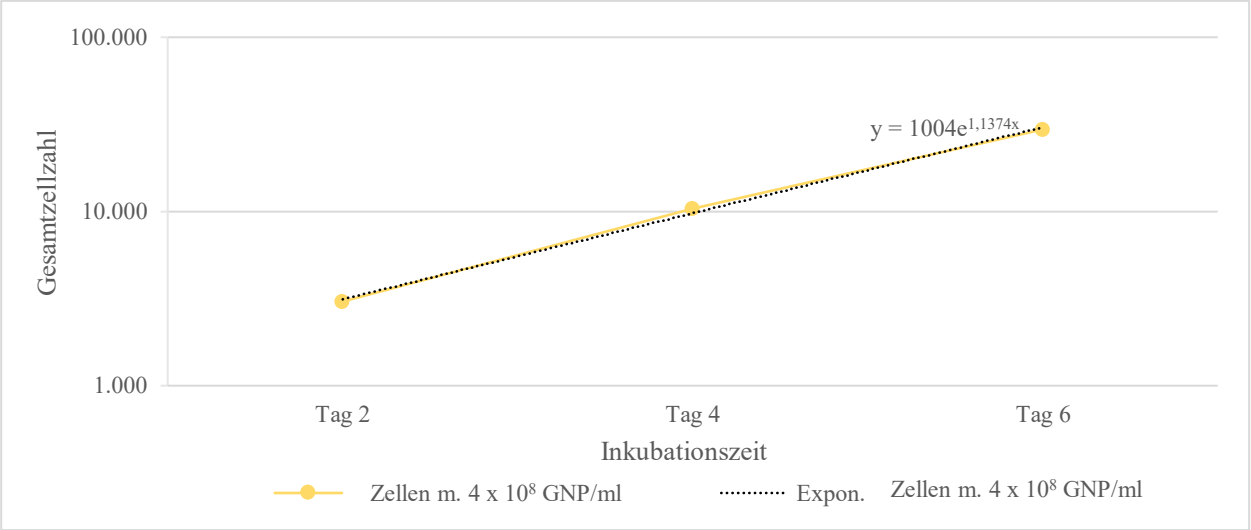

Abb. 26: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

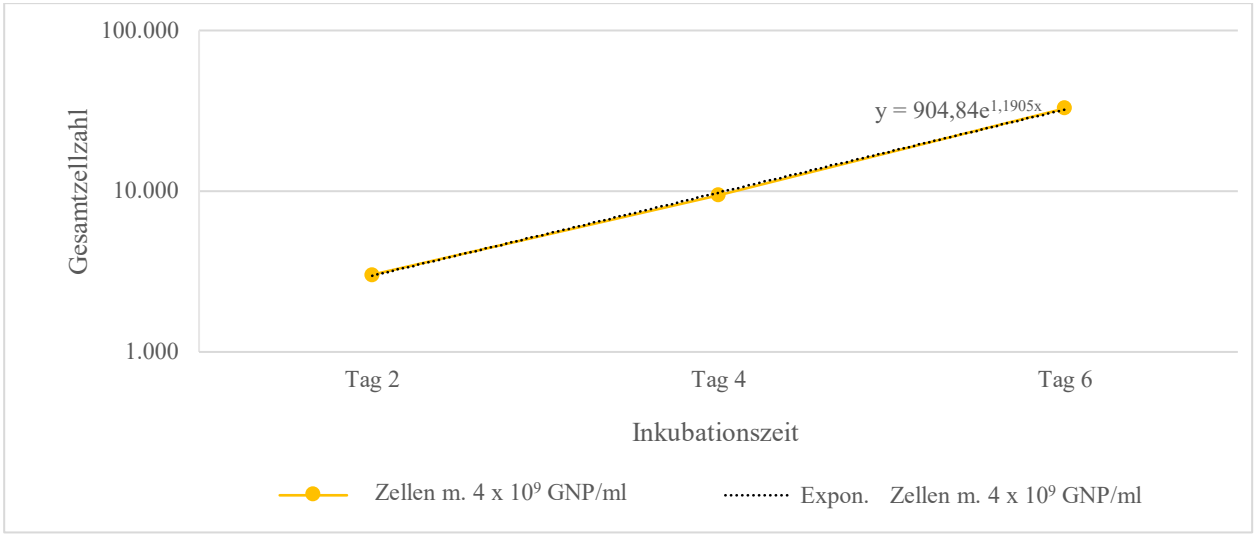

Abb. 27: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit GNP und exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

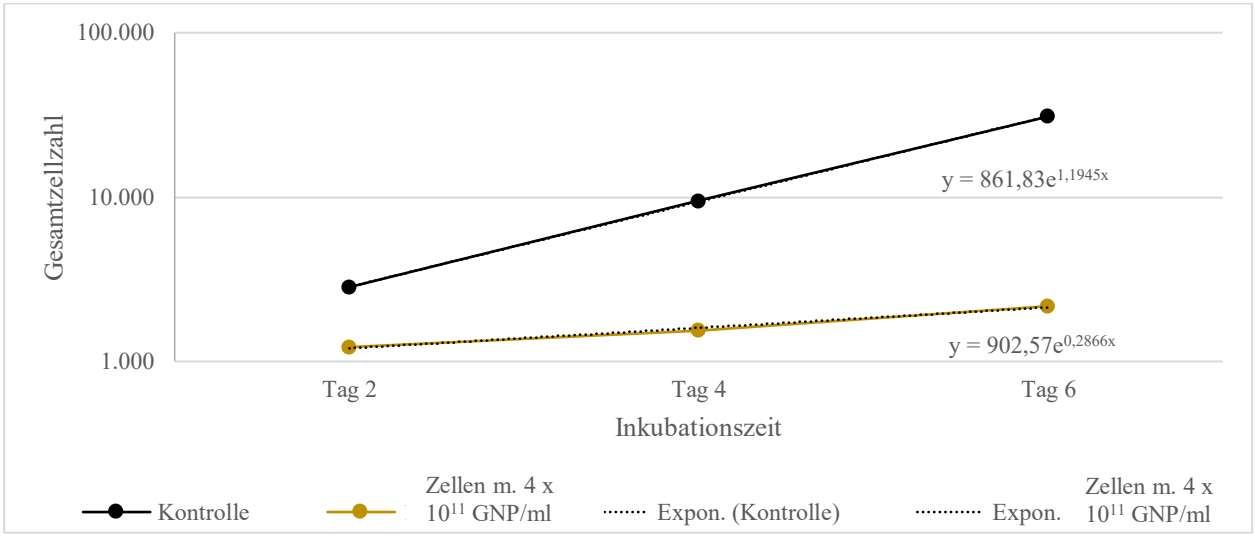

Abb. 28: Exponentielles Wachstum der BEAS-2B-Zellen mit und ohne GNP mit exponentieller Trendlinie von Tag 2-6, Einsaatdichte 1 x 10^3 Zellen/Well, dargestellt sind MW aus n=3.

Tab. 7: Umrechnung der GNP-Konzentrationen für alle Experimente.

	Pro Well	**Pro ml**	**Pro µl**
WK 1-3	8×10^6 GNP/200 µl	4×10^7 GNP/ml	4×10^4 GNP/µl
WK 1-3	8×10^7 GNP/200 µl	4×10^8 GNP/ml	4×10^5 GNP/µl
WK 1-3	8×10^8 GNP/200 µl	4×10^9 GNP/ml	4×10^6 GNP/µl
WK 4-6	8×10^{10} GNP/200 µl	4×10^{11} GNP/ml	4×10^8 GNP/µl
KBT	2×10^{10} GNP/2000 µl	1×10^{10} GNP/ml	1×10^7 GNP/µl
BrdU	8×10^6 GNP/200 µl	4×10^7 GNP/ml	4×10^4 GNP/µl
	8×10^7 GNP/200 µl	4×10^8 GNP/ml	4×10^5 GNP/µl
	8×10^8 GNP/200 µl	4×10^9 GNP/ml	4×10^6 GNP/µl
	8×10^9 GNP/200 µl	4×10^{10} GNP/ml	4×10^7 GNP/µl
PCR	3×10^{10}/3000 µl	1×10^{10} GNP/ml	1×10^7 GNP/µl

Thesen

Aus der Literatur ist bekannt, dass Gold-Nanopartikel (GNP) das Überleben von HeLa-Zellen nach einer Bestrahlung reduzieren. Lungengewebe befindet sich in ständiger Bewegung, was die gezielte Bestrahlung von Tumorgewebe erschwert. Der Einsatz eines Wirkstoffes wie der GNP zur Verstärkung des Bestrahlungseffektes unter gleichbleibender oder reduzierter Strahlendosis würde die Therapie des Bronchialkarzinoms deutlich verbessern und sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Mithilfe verschiedener *In-vitro*-Methoden wurde das Wirkspektrum von GNP auf die Normalgewebszelllinie BEAS-2B und die Tumorzelllinie A549 untersucht.

Das Wachstum beider Zelllinien wurde unter der höchsten Konzentration von 4×10^{11} GNP/ml signifikant gehemmt. Geringere Konzentrationen beeinflussten das Wachstumsverhalten nicht.

Die kombinierte Behandlung der A549-Zellen mit GNP und ionisierender Strahlung zeigte einen strahlensensibilisierenden Effekt, der anhand einer Reduktion des klonogenen Überlebens nachgewiesen werden konnte.

Die GNP zeigten eine zytotoxische Wirkung auf die BEAS-2B-Zellen, welche mittels Koloniebildungstest ermittelt wurde. Die Strahlensensibilität der BEAS-2B-Zellen unter der Kombination von Bestrahlung und GNP blieb unbeeinflusst.

Es kam bei beiden Zelllinien zu einer gesteigerten Zellproliferation nach der Bestrahlung mit 6 Gy und einer verminderten Zellproliferation durch die Zugabe von GNP. Diese wurde mittels BrdU-Assay analysiert.

Die mittels qRT-PCR analysierte *CDKN1B*-Genexpression zeigte unter GNP-Zugabe bei den A549-Zellen eine Zunahme nach 24 h. Bei den BEAS-2B-Zellen war sie stets vermindert. Ein Anstieg dieses Gens führte zu einer vermehrten Hemmung des Cdk4-Cyclin-D-Komplexes. Damit entfällt die Phosphorylierung des *RB1*-Gens.

Erst durch die Phosphorylierung von *RB1* wird der Transkriptionsfaktor E2F frei und die Zelle kann in die S-Phase übergehen. Die *RB1*-Genexpression war bei allen Proben der A549-Zellen vermindert. Bei den BEAS-2B-Zellen zeigte sich eine vermehrte Genexpression bei den bestrahlten Proben nach 24 h.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Genexpression der in dieser Arbeit untersuchten Gene keine belastbaren Schlussfolgerungen auf das Zellverhalten beider Zelllinien zulässt.

Aufgrund des zytotoxischen Effekts auf die Normalgewebszellen, sowie der unregelmäßigen *CDKN1B*- und *RB1*-Genexpression beider Zelllinien in dieser Arbeit bedarf es weiterführenden Untersuchungen um einen klinischen Einsatz realisieren zu können.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten.

Ort, Datum, Unterschrift

Lebenslauf

Frieda-Marie Tyralla
Geboren am 30.01.1997 in Radebeul

Schulische Ausbildung

2003-2007	Besuch der Grundschule Weinböhla
2007-2015	Besuch des Gymnasiums in Coswig mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Akademische Laufbahn

2015-2022	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
September 2017	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M1)
Oktober 2020	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M2)
Mai 2022	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M3)

Berufliche Erfahrung

2018-2020	Studentische Hilfskraft im Schlaflabor der Universitätsmedizin Rostock
April - Mai 2020	Studentische Hilfskraft in der Notfallambulanz im Elblandklinikum Meißen

Promotion

April 2019	Beginn der Promotion im Bereich der Strahlentherapie, betreut durch PD Dr. rer. nat. habil. Manda und Prof. Dr. med. habil. Hildebrandt

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. habil. Manda für die ständige Unterstützung, andauernde Geduld und wertschätzende Betreuung beim Planen und Erstellen dieser Arbeit.

Ich möchte außerdem Frau Jana Baake und Anke Sund herzlich danken, die mich während meiner Zeit im strahlenbiologischen Labor fachkundig begleitet haben. Und ein wirklich besonderes Dankeschön möchte ich Frau Dr. Annemarie Schröder aussprechen, welche vor allem in den letzten Abstimmungen dieser Arbeit alles Mögliche getan hat, um mich zu unterstützen und dabei zu jeder Tages- und Nachtzeit für mich da war.

Außerdem möchte ich mich bei Luisa Lampe bedanken, für die ununterbrochene Versorgung mit Kaffee und Verständnis. Du bist eine wertvolle Bereicherung in meinem Leben.

Und bei Tim für die Bedingungslosigkeit, mit der er mich, mein Studium und diese Arbeit annahm. Deine stetige Geduld und ununterbrochene Ausdauer, mit der du mich seitdem jeden Tag unablässig motivierst und moralisch stützt ist phänomenal.

Mein letztes Dankeschön gilt meinem Papa und meiner Mama. Ihr habt am 04. April alles richtig gemacht. Für mich, aber vor allem für euch ist diese Arbeit.