

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin
Klinikum rechts der Isar

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Molls

**Effekte der Kombination von Bestrahlung und Koffein auf die
Apoptose bei den HNO-Tumorzelllinien SAS und XF354**

Leonie Friederike Türck

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin
Klinikum rechts der Isar

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Molls

**Effekte der Kombination von Bestrahlung und Koffein auf die
Apoptose bei den HNO-Tumorzelllinien SAS und XF354**

Leonie Friederike Türck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff
2. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 05.02.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen zu Tumoren im Hals-Nasen-Ohren-Bereich.....	1
1.2	Zellzyklus und Zelltod.....	3
1.2.1	Der Zellzyklus.....	3
1.2.2	Der Zelltod.....	6
1.3	Strahlenwirkung auf Tumorzellen.....	9
1.3.1	Strahlenwirkung auf die DNA.....	9
1.3.2	Strahlenwirkung auf den Zellzyklus.....	11
1.3.3	Zelltod nach Bestrahlung.....	13
1.4	Beeinflussung der Strahlenwirkung.....	14
1.4.1	Strahlenbiologie.....	15
1.4.2	Chemotherapeutika.....	16
1.4.3	Koffein.....	19
2	Zielsetzung.....	25
3	Materialien.....	27
3.1	Zelllinien.....	27
3.2	Medium und Mediumszusätze.....	27
3.3	Reagenzien.....	27
3.4	Geräte.....	28
3.5	Software.....	29
4	Methoden.....	30
4.1	Zellkultur.....	30
4.2	Apoptoseinduktion.....	30
4.2.1	Aufbereitung des Koffeins.....	30
4.2.2	Koffeinbehandlung und Bestrahlung.....	31
4.3	Durchflusszytometrie.....	31
4.3.1	Annexin-V-Test.....	31
4.3.1.1	Grundlagen.....	31
4.3.1.2	Annexin-V-Färbung.....	32
4.3.1.3	Analyse.....	32
4.3.2	Caspase-3-Test.....	34
4.3.2.1	Grundlagen.....	34

4.3.2.2	Caspase-3-Färbung.....	34
4.3.2.3	Analyse.....	35
4.4	Statistik.....	36
5	Ergebnisse	38
5.1	Effekt von Koffein und Bestrahlung auf die Zelllinie SAS	39
5.1.1	Apoptosenachweis mittels Annexin-V	39
5.1.2	Apoptosenachweis mittels Caspase-3	44
5.2	Effekt von Koffein und Bestrahlung auf die Zelllinie XF354	49
5.2.1	Apoptosenachweis mittels Annexin-V	49
5.2.2	Apoptosenachweis mittels Caspase-3	55
5.3	Zusammenfassung.....	60
6	Diskussion	66
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	76
8	Danksagung	79
9	Verzeichnisse	80
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	80
9.2	Tabellenverzeichnis.....	82
9.3	Literaturverzeichnis	83

1 Einleitung

1.1 Grundlagen zu Tumoren im Hals-Nasen-Ohren-Bereich

HNO-Tumore, auch Kopf-Hals-Tumore genannt, sind eine heterogene Gruppe von Malignomen, die nach ihrem Entstehungsort in Tumoren der Mundhöhle, des Pharynx, des Larynx, der Nase und Nasennebenhöhlen und der Speicheldrüsen eingeteilt werden können. Argiris, Karamouzis [1], [2]

Tumore im Kopf-Hals-Bereich sind relativ häufig und mit etwa 650000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die vierthäufigste bösartige Tumor-Erkrankung. [3]

Es handelt sich dabei ganz überwiegend um Plattenepithelkarzinome. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 60 Jahren. Männer sind häufiger betroffen als Frauen, der Anteil der erkrankten Frauen nimmt jedoch stetig zu. In den letzten zwei Jahrzehnten konnte ein leichter Rückgang der Inzidenz für Kopf-Hals-Tumore insgesamt festgestellt werden. [1, 3]

In 75 – 80 % der Fälle sind für die Entstehung des Malignoms bestimmte Risikofaktoren verantwortlich, am häufigsten Zigaretten- und Alkoholkonsum. Liegen diese beiden Risikofaktoren gemeinsam vor, verstärken sie sich multiplikativ und es ergibt sich ein mehr als 200-fach erhöhtes Risiko für die Erkrankung. [1, 3, 4] Auch HPV-Infektionen spielen bei der Entstehung von HNO-Tumoren eine Rolle und können in 25% der Malignome nachgewiesen werden. [1]

Da der kontinuierliche Kontakt mit den genannten Noxen gleichmäßig auf große Bereiche der Kopf-Hals-Region wirkt, kann die Tumorentstehung an vielen Stellen gleichzeitig stattfinden. HNO-Tumore treten deshalb häufig mehrfach und in verschiedenen Stadien zugleich auf. [5]

Die Therapie der HNO-Tumore richtet sich nach der befallenen Region und dem Stadium des Tumors. Dazu werden die Tumore in ein frühes, ein lokal fortgeschrittenes und ein Spätstadium eingeteilt. [6]

Etwa ein Drittel der Patienten präsentiert sich im frühen Stadium. Hier sind alleinige Radio- bzw. Radio-Chemotherapie oder Chirurgie Behandlungsmittel der Wahl und in ihrer Effektivität als gleichwertig anzusehen. [1, 3, 6]

Bei etwa zwei Drittel der Patienten wird die Erkrankung erst im fortgeschrittenen Stadium festgestellt. In diesen Fällen erfolgt standardmäßig eine Tumorresektion mit

anschließender Radio(-Chemo)therapie. Diese Therapiekombination kommt auch zum Einsatz, sobald Risikofaktoren wie eine unvollständige Tumorresektion oder Lymphknotenbefall vorliegen. Ist der Tumor irresektabel oder nicht organerhaltend operierbar, wird häufig eine Radiochemotherapie angewendet. [1, 3]

Nur etwa 10 % der Patienten befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem späten Stadium mit Fernmetastasen. In diesen letztgenannten Fällen wird die Therapie individuell entschieden und es kommen häufig palliative Radio- oder kombinierte Radio- oder Chemotherapien zum Einsatz. [1, 3, 6]

Die Aufgaben der Chirurgie bei der Therapie der HNO-Tumoren sind einerseits, den Tumor möglichst mit Sicherheitsabstand restlos zu entfernen, andererseits aber auch kosmetisch-ästhetische Aspekte im Kopf-Hals Bereich zu berücksichtigen. Zudem ist der Erhalt grundlegender Organfunktionen wie Sprechen und Schlucken zu gewährleisten [3, 7, 8]. Aus diesen Gründen spielen rekonstruktive Verfahren und zurückhaltendes Operieren in Kombination mit anderen onkologischen Therapien bei Kopf-Hals Tumoren eine große Rolle. [1, 3]

Bei der konventionellen strahlentherapeutischen Behandlung der HNO-Tumore wird perkutan eine Gesamtdosis von 70 Gray (Gy; entspricht 1 J/Kg) in 7 Wochen in Einzeldosen von 2 Gy pro Tag an 5 Tagen pro Woche appliziert. Bei fortgeschrittenen Tumoren stehen auch akzelerierte (gleiche Gesamtdosis in kürzeren Zeitintervallen) und hyperfraktionierte (höhere Gesamtdosis bei niedrigerer Einzeldosis) Verfahren zur Verfügung. [3] Die Strahlentherapie bietet zwar effiziente Möglichkeiten zur organerhaltenden Therapie, kann aber auch ausgeprägte Nebenwirkungen hervorrufen. Akute Strahlenfolgen sind Mukositis, Dysphagie, Geschmacksverlust, Heiserkeit und Dermatitis, die innerhalb von 2 bis 3 Wochen nach Therapiebeginn bis zu 3 Monate nach Therapieende auftreten und meist vollständig reversibel sind. Chronische Strahlenfolgen sind Osteoradionekrosen, Hautfibrosen, Teleangiektasien, pharyngale oder ösophagale Stenosen und Xerostomien, welche später als 3 Monate nach Therapieende auftreten und meist irreversibel oder sogar progredient sind. [1, 3]

Die Chemotherapie der HNO-Tumoren beinhaltet meist eine Kombination aus Platinverbindungen, wie Cisplatin, Antimetaboliten, wie 5-Fluorouracil und Taxanen, wie Taxotere. [1, 3]

Eine besondere Herausforderung bei der Therapie der HNO-Tumoren ist der Anspruch, den Tumor zu kontrollieren und dabei sowohl wichtige Organfunktionen

als auch die Ästhetik im Kopf-Hals-Bereich und die Lebensqualität des Patienten zu bewahren. [3, 7, 8]

Die Prognose für Patienten mit HNO-Tumoren hängt stark von der Lokalisation und dem Stadium des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose ab.

Das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben für Lippentumoren beträgt 90 %, für Larynx Tumoren 63 %, für Nasopharynx Tumoren 50 %, für Tumoren des äußeren Ohres, der Mundhöhle, der Nase, der Nasennebenhöhlen, der Zunge und des Oropharynx 39 – 46 % und für Hypopharynx Tumoren 23 %. [3]

Für die 30 – 40 % der Patienten, deren Erkrankung im frühen Stadium entdeckt wird, liegt die Chance auf Heilung zwischen 60 und 98 % [5]. Mehr als 50 % der Tumoren werden allerdings erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und lassen damit nur ein 5-Jahres-Überleben von unter 40 % zu. [3] Eine Heilung von Tumoren im späten Stadium ist nicht mehr möglich, hier liegt das durchschnittliche Überleben mit palliativer Therapie unter einem Jahr. [1, 5]

1.2 Zellzyklus und Zelltod

1.2.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus umfasst alle Vorgänge, die der Teilung einer Mutterzelle in zwei genetisch identische Tochterzellen dienen.

Der Zellzyklus kann in zwei wesentliche Phasen eingeteilt werden: Interphase und Mitosephase.

Die Interphase, in der sich die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet, lässt sich weiter in die drei Abschnitte G1-, S- und G2-Phase unterteilen. In diesen Phasen findet vor allem die Synthese von Proteinen und Nukleotiden sowie die Replikation der DNA statt. Zellen, die den Zellzyklus in der G1-Phase verlassen und temporär oder endgültig in die G0-Phase eintreten, können zwar weiterhin ihre jeweiligen metabolischen Aufgaben erfüllen, sich jedoch nicht weiter vermehren. Abbildung 1 zeigt den Ablauf eines vollständigen Zellzyklus.

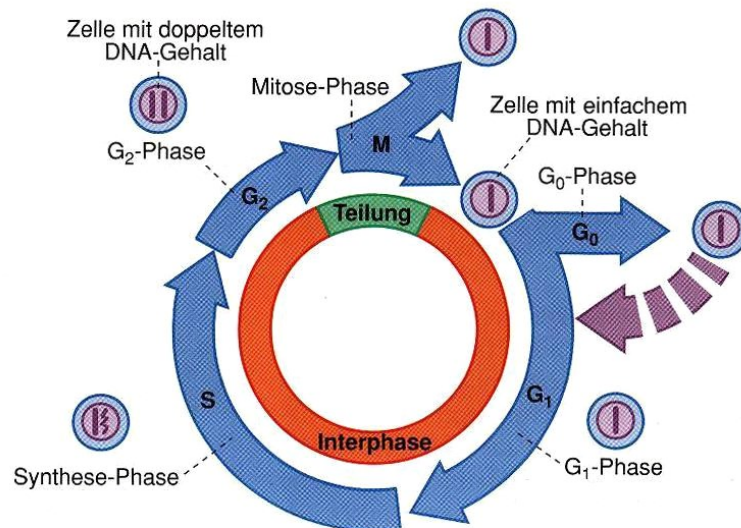


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus [9]

Die Mitosephase, in der die eigentliche Zellteilung stattfindet, lässt sich in die Abschnitte Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese einteilen. In diesen Phasen bildet sich der Mitoseapparat aus, die in der S-Phase verdoppelten Chromosomen werden in der Äquatorialebene der Zelle ausgerichtet, getrennt und zu den beiden Zellpolen gezogen. Anschließend schnürt sich die Zelle zwischen den beiden Polen ab, so dass zwei Tochterzellen entstehen. [9-11] Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Stadien des Zellzyklus.

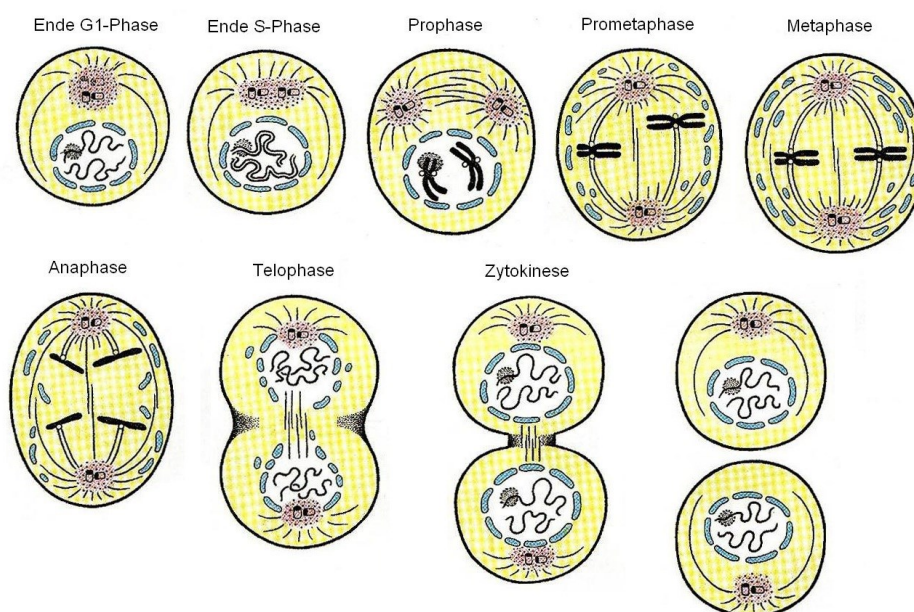


Abbildung 2: Stadien des Zellzyklus [9]

Der Zellzyklus unterliegt einer strengen Regulation. Dafür existieren spezifische Kontrollpunkte, sogenannte „*Checkpoints*“. Diese überwachen die essentiellen Phasenübergänge und arretieren den Zellzyklus im Falle von DNA-Schäden oder sonstigen Defekten.

Grundsätzlich wird der Zellzyklus von einem komplexen System aus Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs), Zyklinen und CDK-Inhibitorproteinen (CKIs) vorangetrieben. Zyklone stellen die aktivierenden Untereinheiten der CDKs dar und steuern durch ihre phasenspezifische Expression und Degradation die entsprechenden Kinaseaktivitäten. Dies führt zu periodisch wechselnder Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Komponenten der Zellzyklus-maschinerie die für die jeweiligen Zellzyklusübergänge notwendig sind.

CKIs entfalten ihre Wirkung, indem sie mit unterschiedlicher Spezifität an die CDKs binden und diese so hemmen. Die CKIs können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die INK4-Familie, zu der p15, p16, p18 und p19 gehören, welche spezifisch CDK 4 und 6 hemmen, und die CIP/KIP-Familie, zu der p21, p27 und p57 gehören und welche eine breitere Substratspezifität aufweisen. Der Übergang von der G1- in die S-Phase wird erst durch CDK 4 oder 6 mit Zyklin D und dann durch CDK 2 mit Zyklin E gesteuert. Zur Aufrechterhaltung der S-Phase wirkt CDK 2 mit Zyklin A. Den G2-/M-Phasenübergang kontrolliert CDK 1 mit Zyklin B. [10-12] Abbildung 3 zeigt die Regulation des Zellzyklus.

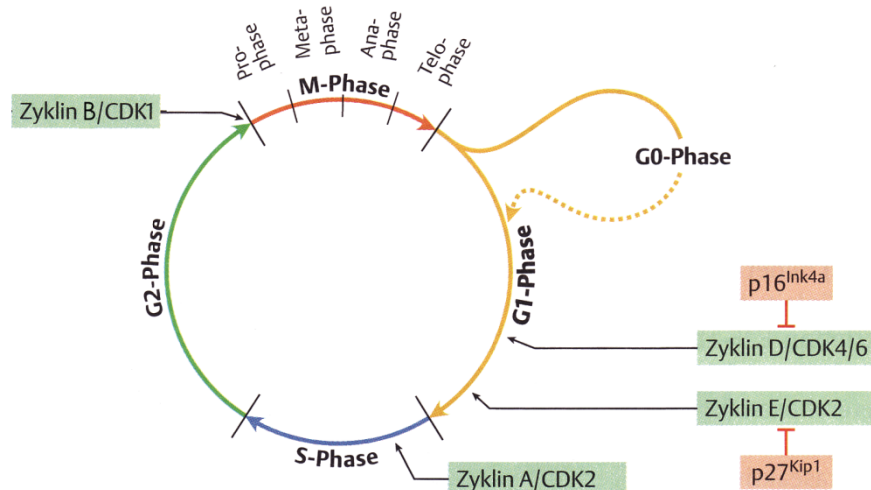


Abbildung 3 : Zellyklusregulation durch CDKs und Zyklone [11]

1.2.2 Der Zelltod

Der Untergang einer Zelle kann grob in die Apoptose und die Nekrose unterteilt werden. Diese beiden Mechanismen des Zelltodes unterscheiden sich grundlegend in den auslösenden Faktoren, in ihrer Morphologie und in dem Hervorrufen einer Entzündungsreaktion.

Die Nekrose, auch „provozierter Zelltod“ genannt, bezeichnet die Zerstörung der Zelle durch pathologische Mechanismen wie ATP-Mangel oder chemische und physikalische Noxen, die von der Membran ausgehen. Die Zellen gehen durch den Verlust der Integrität der Zellmembran, durch den Verlust des Membranpotentials bei ATP-Mangel oder durch ausfallende Schutzmechanismen gegen toxische Intermediärprodukte zugrunde.

Morphologisch zeichnen sich nekrotische Zellen durch das Anschwellen ihrer Organellen, insbesondere des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, sowie durch ein Schrumpfen des Zellkernes aus. Dieser löst sich anschließend auf oder zerfällt. Sowohl Organellenmembranen als auch die Plasmamembran werden somit geschädigt, und der Zellinhalt gelangt in den Extrazellulärraum. Dies hat meist eine Entzündungsreaktion zur Folge, welche von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vermittelt wird. [9, 10, 13]

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Apoptose, auch „programmierter Zelltod“ genannt, um einen physiologischen, kontrollierten Untergang von Zellen, die entweder nicht mehr benötigt werden oder deren Funktionsfähigkeit beeinträchtigt ist. Bei der Apoptose schrumpft die Zelle, verliert die Verbindung zu den Nachbarzellen und löst sich aus dem Zellverband. Desweiteren wird das Chromatin kondensiert, die DNA abgebaut und der Zellkern fragmentiert. Es bilden sich typische Zytoplasmaausstülpungen und Blasen an der Zellmembran. Schließlich zerfällt die Zelle durch Abschnürung von Vesikeln, welche ebenfalls von Makrophagen phagozytiert werden. Abbildung 4 zeigt die typische Morphologie von Nekrose und Apoptose.

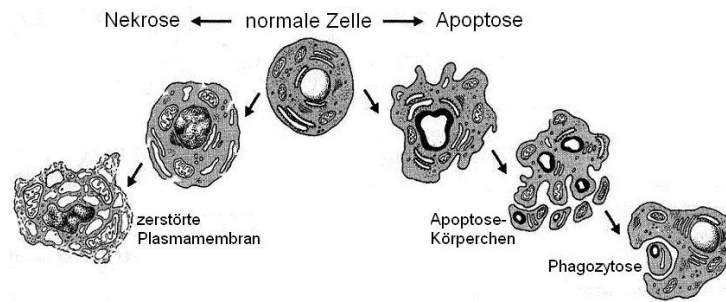


Abbildung 4: Morphologie von Nekrose und Apoptose [14]

Apoptose spielt bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. In der Embryonalentwicklung trägt sie zur Entstehung der endgültigen Körpergestalt und des Nervensystems bei. Für die Immuntoleranz werden autoreaktive Zellen durch Apoptose negativ selektioniert. Zum Erhalt der Zellhomöostase in Wechselgeweben werden überschüssige Zellen entfernt. Auch durch Erreger infizierte oder durch Noxen schwer geschädigte Zellen werden über Apoptose eliminiert.

Eine exakte Regulation der Apoptose ist daher essentiell. Eine vermehrte Apoptose ist die Ursache von Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington oder amyotropher Lateralsklerose, wohingegen eine verminderte Apoptoseleistung zur Tumorentstehung führen kann. [9, 11]

Die wichtigsten Enzyme beim Vorgang der Apoptose sind die Caspasen, eine Gruppe von Proteasen die als inaktive Pro-Caspasen in der Zelle vorliegen und sequenziell in einer Signalkaskade durch Proteolyse aktiviert werden.

Grundsätzlich lassen sich Caspasen in Initiator-Caspasen (Caspasen-2, -8, -9, -10) und Effektor-Caspasen (Caspasen-3, -6, -7) einteilen. Initiator-Caspasen lösen die Apoptose aus und starten die Signalkaskade. Effektor-Caspasen bauen die Zelle ab indem sie Zellbestandteile wie das Aktin des Zytoskeletts und das Lamin der Kernmembran spalten und außerdem Nukleasen aktivieren, die zur Fragmentierung der DNA führen.

Entscheidend für das Einleiten der Apoptose ist das Gleichgewicht an pro- und antiapoptotischen Faktoren, welches Auswirkungen auf die Integrität der Mitochondrienmembran und somit auf die Aktivierung von Caspasen hat. Zu den proapoptotischen Faktoren gehören unter anderem Bax-, Bak- und Bid-Proteine, zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Desweiteren gibt es sogenannte *Inhibitors-of-apoptosis* (IAPs), welche u.a. in Tumorzellen durch Wachstumssignale stimuliert

werden und daraufhin über die Hemmung von Caspase-3, -7 und -9 die Apoptose inhibieren.

Die Apoptose kann durch extrinsische und / oder intrinsische Signalwege ausgelöst werden. Beim extrinsischen Signalweg binden Zelltod-auslösende Faktoren (z.B. Tumor- nekrosefaktor, TNF) an sogenannte Todesrezeptoren (z.B. Fas) auf der Zellmembran. Dadurch wird intrazellulär eine Signalkaskade ausgelöst: Das Adaptermolekül *Fas-associated-death-domain* (FADD) bindet intrazellulär an den Rezeptor und leitet die autoproteolytische Aktivierung der Pro-Caspase-8 ein, welche wiederum Caspase-3, -6 und -7 durch proteolytische Spaltung aktiviert.

Der intrinsische Signalweg wird durch Stresssituationen wie Hypoxie, reaktive Sauerstoffradikale, Toxine, Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung ausgelöst, und führt zu einer erhöhten Expression proapoptotischer Faktoren. Diese bilden Poren in der Mitochondrienmembran und zerstören diese. Dadurch werden aus den Mitochondrien Apoptose-Mediatoren freigesetzt, welche zusammen mit weiteren Faktoren das Apoptosom bilden. Das Apoptosom aktiviert die Caspase-9, welche wiederum die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktiviert, die analog zum extrinsischen Weg zum Abbau der Zellen führen. Der intrinsische ist mit dem extrinsischen Apoptoseweg gekoppelt, da die über den extrinsischen Weg aktivierte Caspase-8 das proapoptotische Protein Bid spalten kann, welches sich daraufhin in die Mitochondrienmembran einlagert und so den intrinsischen Weg einleiten kann. [10-12] Abbildung 5 zeigt die beiden Apoptosewege.

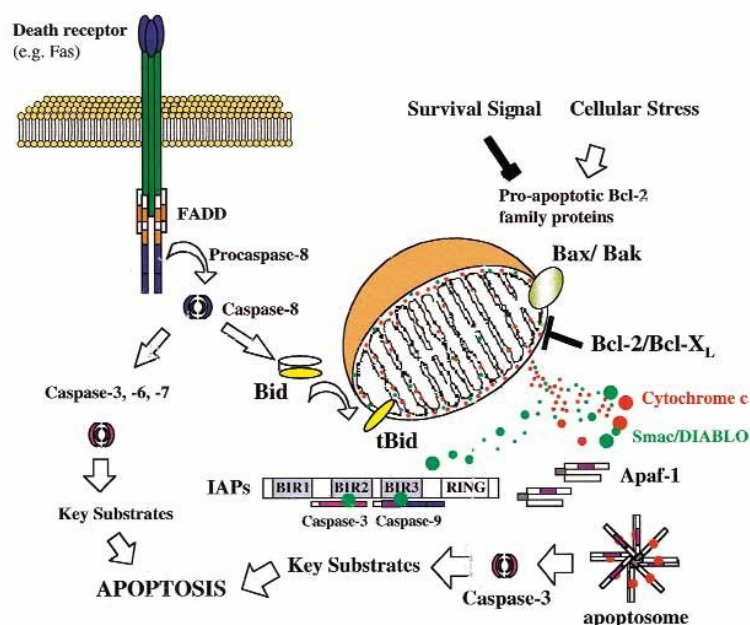


Abbildung 5: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose [15]

1.3 Strahlenwirkung auf Tumorzellen

Trifft ionisierende Strahlung auf lebendes Gewebe, kommt es zu Schäden an der Zelle. Eine Strahlenbehandlung bewirkt die Ionisation von Atomen und Molekülen, deren Effekte sich von Sekundenbruchteilen bis zu Jahren ausdehnen können. Die Wirkung der Strahlenbehandlung kann entweder direkt in einem Molekül erzielt oder indirekt durch Bildung von Sauerstoffradikalen erzeugt werden, die dann erst in einem zweiten Schritt eine Reaktion an Biomolekülen (DNA) hervorrufen. Strahlung wirkt auf alle Bestandteile der Zelle, die bedeutsamsten Auswirkungen finden sich aber an der DNA. Schäden an der DNA können zum Zelltod führen oder Mutationen erzeugen, die dann an nachfolgende Zellpopulationen weitergegeben werden können. [10, 16, 17]

1.3.1 Strahlenwirkung auf die DNA

Das DNA-Molekül ist eine gegenläufig gewundene Doppelhelix, deren Stränge aus abwechselnden Zucker- und Phosphatgruppen bestehen, welche durch gepaarte Basen über Wasserstoffbrücken verbunden sind. [11]

Durch den komplexen Aufbau der DNA können unterschiedliche Strukturen angegriffen werden. Es können Basenschäden, DNA-Vernetzungen („*Crosslinks*“), Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche entstehen. Treten diese Schäden gleichzeitig und auf einem Abschnitt der DNA eng beieinander liegend auf, bezeichnet man sie als *bulky lesion* oder *locally multiply damaged sites* (LMDS). [10, 12, 16, 17] Abbildung 6 zeigt die möglichen DNA-Schäden nach Bestrahlung.

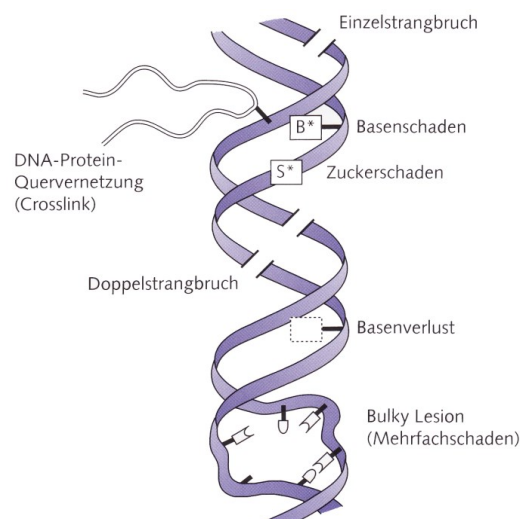


Abbildung 6: DNA-Läsionen nach Bestrahlung [16]

Nach Bestrahlung mit 1 Gy können pro Zelle etwa 4000 Schäden festgestellt werden. Dabei handelt es sich um ca. 3000 Basenschäden, ca. 1000 Einzelstrangbrüche und ca. 40 Doppelstrangbrüche. [10]

Leichtere Schäden wie Basenschäden und Einzelstrangbrüche können von der Zelle meist problemlos repariert werden. Einzelstrangbrüche werden durch eine Ligase wieder verknüpft. Bei Basenmodifikationen wird durch die Basen-Exzisions-Reparatur das fehlerhafte Nukleotid durch ein korrektes ersetzt. Bei schwereren Basenschäden werden durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur ca. 30 zusammenhängende Nukleotide des betroffenen Stranges ersetzt. Fehlgepaarte Basen werden mit der *Mismatch*-Reparatur, die analog zur Nukleotid-Exzisions-Reparatur funktioniert, korrigiert. [11, 16]

Für schwere Schäden wie Doppelstrangbrüche existieren ebenfalls Reparaturmechanismen, diese funktionieren aber weitaus nicht so fehlerfrei wie die oben beschriebenen Systeme.

Der in höheren Eukaryonten, wie z.B. Säugetieren, hauptsächlich genutzte Mechanismus ist das *Non homologous end joining* (NHEJ). Dabei werden die freien Enden des Doppelstrangbruchs stabilisiert und der DNA-Schaden an die Zelle gemeldet. Geschädigte Nukleotide werden entfernt und können teilweise durch neue ersetzt werden. Dann wird der Strangbruch durch eine Ligase wiederverknüpft.

Da beim NHEJ geschädigte DNA-Sequenzen zwar entfernt, wegen fehlender Matrize aber nicht korrekt nachsynthetisiert werden, entsteht nach Reparatur des Doppelstrangbruchs oft eine neue Basenfolge und damit eine Mutation des Genoms.

Eine weitere, in höheren Eukaryonten aber wesentlich seltener benutzte Methode der Doppelstrangbruch-Reparatur ist die *Homologous recombination repair* (HRR). Sie macht sich den Mechanismus des *Crossing over* in der Meiose zunutze, der dem Austausch von Chromosomenstücken dient. Zunächst werden geschädigte Nukleotide entfernt. Dann lagert sich an den Bereich des Doppelstrangbruchs der entsprechende Abschnitt des homologen, unbeschädigten Chromosoms an. Anhand dieser Matrize können die fehlenden Bereiche nachsynthetisiert werden. Beim Auflösen des entstandenen Komplexes aus zwei DNA-Doppelsträngen werden entweder nur kleine DNA-Abschnitte oder ganze Chromosomenstücke zwischen den beiden Chromosomen ausgetauscht. [12, 16]

Warum höhere Eukaryonten mehr das fehlerhafte NHEJ und niedrigere Eukaryonten und Bakterien mehr die sicherere HRR benutzen, ist noch unklar. Beide Systeme sind in beiden Organismen vorhanden. Trotzdem wird davon ausgegangen, dass die HRR auch in höheren Eukaryonten eine wichtige Rolle spielt, da Mutationen der HRR zu erhöhter Strahlensensibilität führen. [12] Abbildung 7 zeigt die beiden Mechanismen der Doppelstrangbruch-Reparatur.

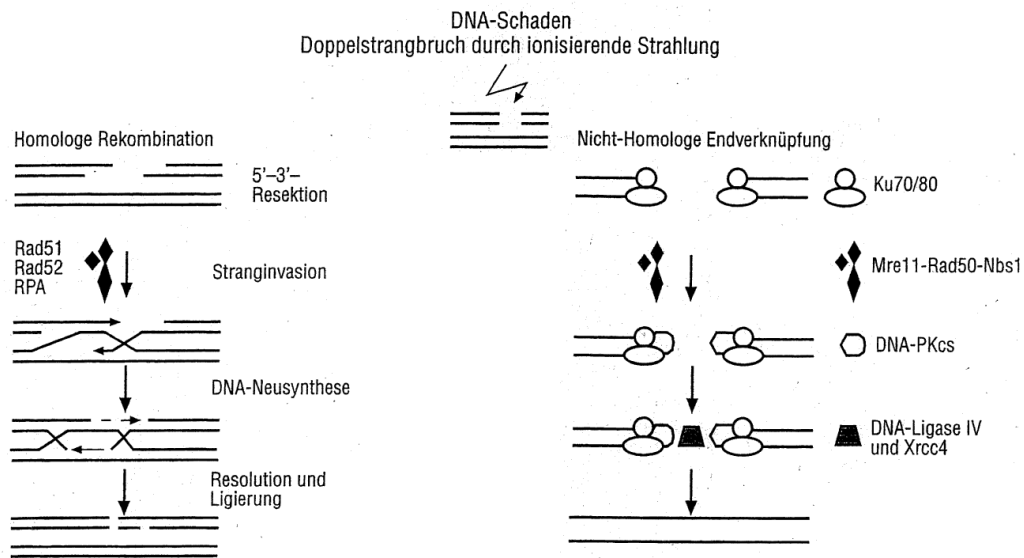


Abbildung 7: HRR und NHEJ nach Bestrahlung [12]

1.3.2 Strahlenwirkung auf den Zellzyklus

Bestrahlte Zellen weisen charakteristische Veränderungen des Zellzyklus auf. Es handelt sich dabei um eine Verlängerung der Zyklusdauer und um eine Teil-synchronisation des Zyklus.

Die nach Bestrahlung auftretenden DNA-Schäden werden an den oben beschriebenen Checkpoints registriert. Proteinkinasen wie ATM und konsekutiv die CHK2-Kinase setzen daraufhin eine Signalkaskade in Gang, die den Checkpoint aktiviert. Dies hat den Arrest und damit die Verlängerung des Zellzyklus zur Folge.

Die Aktivierung des G1-Checkpoints wird hauptsächlich über das Tumorsuppressorgen p53 vermittelt. p53 führt zur Expression von p21, einem zur CIP/KIP-Familie gehörenden Inhibitor der CDK 4- und 6-Familie. Durch die Hemmung der CDKs wird der Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert.

Der S-Phasen-Checkpoint wird durch die Hemmung der Phosphatase CDC25A aktiviert. Dadurch fehlt die Aktivierung der CDK2, wodurch die Replikation der DNA aufgehalten wird.

Zur Aktivierung des G2-Checkpoints wird die Phosphatase CDC25C gehemmt, wodurch die CDK1 nicht aktiviert werden kann. Dies verhindert den Übergang von der G2- in die Mitosephase.

Die entstehenden Pausen nutzt die Zelle zur Behebung der Schäden oder, falls dies nicht möglich ist, zur Einleitung der Apoptose. Entscheidend ist, dass die Vermehrung einer Zelle mit geschädigter DNA verhindert wird. [10, 12, 17] Abbildung 8 zeigt die Aktivierung der drei Checkpoints.

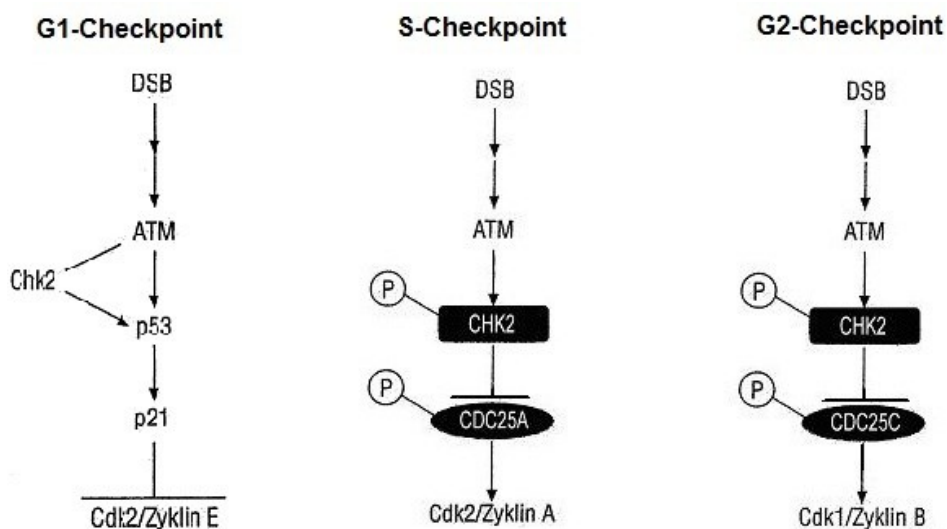


Abbildung 8: Aktivierung des G1-, S- und G2-Checkpoints [12]

Die verschiedenen Phasen des Zellzyklus sind unterschiedlich sensibel für Bestrahlung. Die G2-Phase und die Mitosephase sind am empfindlichsten, der Phasenübergang von der G1- in die S-Phase ist schon weniger sensibel, nahezu strahlenresistent sind aber Zellen die sich in der späten S-Phase und in der G1-Phase befinden. [10, 16, 17]

Zellen in Zellkultur teilen sich asynchron, das heißt, sie befinden sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Bei Bestrahlung werden die Zellen, welche sich in empfindlichen Phasen befinden, schwer geschädigt. Nur diese Zellen werden nun entweder im Zyklus gestoppt oder sterben ab, während Zellen in resistenten Phasen nahezu unbeschädigt bleiben.

Eine regelmäßige Strahlenbehandlung führt so zur Synchronisation des Zellzyklus der Zellpopulation. [10, 17]

1.3.3 Zelltod nach Bestrahlung

Der gewünschte Effekt einer Bestrahlung ist der Zelltod der Tumorzellen und der Schutz des umliegenden Normalgewebes. Der strahleninduzierte Zelltod ist zumeist die Apoptose, aber auch Nekrose kann nach ionisierender Bestrahlung im Gewebe auftreten.

Der Zelltod der Tumorzellen wird vor allem durch das Auftreten von Doppelstrangbrüchen und / oder anderen schweren multiplen DNA-Schäden ausgelöst. Proteinkinasen wie ATM werden aktiviert, die wiederum die intrazelluläre Konzentration von p53 drastisch erhöhen. p53 führt dann entweder zum beschriebenen Zellzyklusarrest oder im Falle von irreparablen DNA Schäden zum Zelltod. Dazu stimuliert es als Transkriptionsfaktor die Expression von Bax und weiteren proapoptischen Proteinen und hemmt zugleich die Bildung antiapoptischer Proteine wie Bcl-2. So wird der intrinsische Weg der Apoptose eingeleitet. [10, 11]

Das Ziel der Bestrahlung von Tumorzellen ist, dass die Zellen ihre Klonogenität, also die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung, verlieren. Der bedeutsamste Mechanismus ist hierbei der Mitosetod. Dabei gehen die bestrahlten Zellen nicht sofort in die Apoptose, sondern vollziehen eventuell noch einige Mitosen, bis die Apoptose eingeleitet wird. Ein weiterer Mechanismus ist der Interphasetod, bei dem nach Schädigung der DNA direkt die Apoptose eingeleitet wird. Wird durch die Bestrahlung die terminale Differenzierung der Zellen bewirkt, sterben die Zellen nicht ab, verlieren aber die Fähigkeit sich unkontrolliert zu teilen. Abbildung 9 zeigt die möglichen Zelltodarten bzw. die Differenzierung der Zellen nach Bestrahlung.

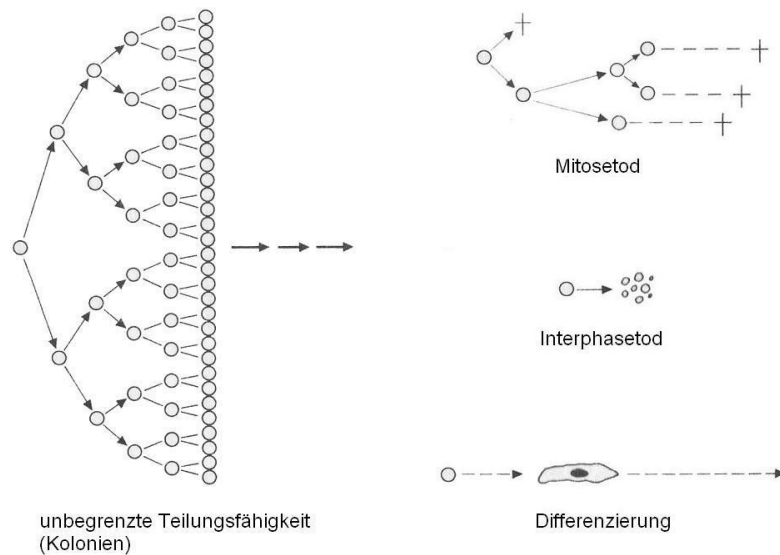


Abbildung 9: Schicksal bestrahlter Zellen [10]

Der Mitosetod zählt zu den Formen der „späten Apoptose“, während der Interphasetod als „schnelle“ oder „klassische Apoptose“ bezeichnet wird. [10, 16, 17] Bemerkenswert ist, dass proliferierende Zellen wesentlich geringere Strahlendosen benötigen als nicht proliferierende Zellen, um in die Apoptose zu gehen. [16]

1.4 Beeinflussung der Strahlenwirkung

Die Effektivität der Bestrahlung von Tumorzellen ist von einer Reihe intrinsischer und extrinsischer Faktoren abhängig.

Der genetische Hintergrund der Zelle und damit auch ihre Reparaturkapazität kann die Strahlensensitivität von Zellen beeinflussen. Darüber hinaus ist die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen für die Strahlenwirkung von großer Bedeutung. [10, 17] Durch gleichzeitige Gabe von Pharmaka lässt sich die Strahlenwirkung sowohl steigern als auch verringern. Radikalfänger wie z.B. Glutathion oder Chelatbildner wie z.B. EDTA wirken radioprotektiv, wohingegen eine Reihe von Zytostatika, Koffein oder Förderer der Radikalbildung wie Misonidazol eine radiosensitivierende Wirkung besitzen. [17] Durch Variation der zeitlichen Dosisverteilung der Bestrahlung (Hyperfraktionierung) lassen sich hohe Gesamtstrahlendosen mit größtmöglicher Schonung von Normalgewebe kombinieren. [12, 17]

1.4.1 Strahlenbiologie

In der Strahlentherapie kommt häufig das Konzept der fraktionierten Bestrahlung zum Einsatz. Bei der fraktionierten Bestrahlung wird die Tatsache ausgenutzt, dass gesunde Zellen zumeist eine bessere Reparaturfähigkeit nach Bestrahlung besitzen als Tumorzellen. Es wird mit relativ niedrigen Einzeldosen und dazwischen liegenden Pausen bestrahlt, bis die gewünschte, für den Tumor letale Gesamtdosis erreicht ist. Die Pausen müssen so gewählt werden, dass sich gesundes Gewebe regenerieren kann, im Tumorgewebe aber Schäden zurückbleiben. [10, 16, 17] Abbildung 10 zeigt das Prinzip der fraktionierten Bestrahlung.

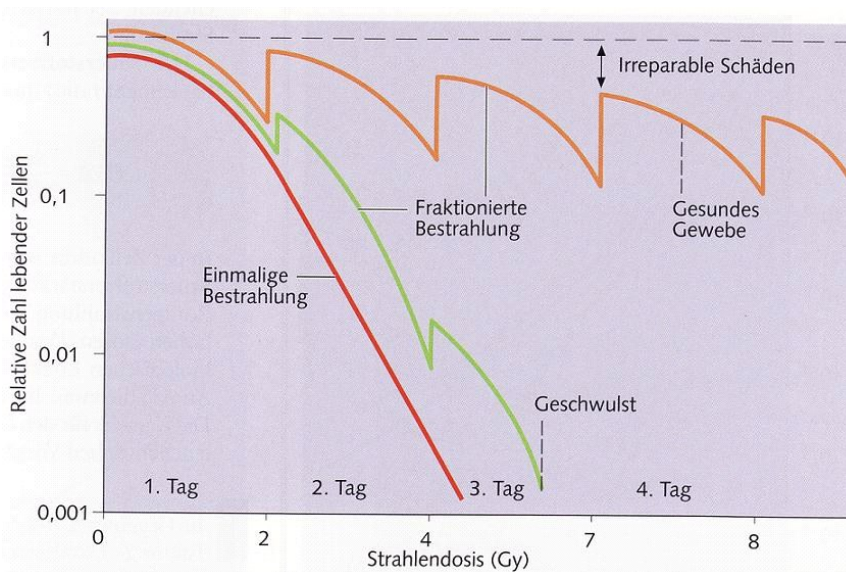


Abbildung 10: Prinzip der Dosisfraktionierung [16]

Die „Vier Rs der Strahlentherapie“ sind die wesentlichen Faktoren, von denen die Wirksamkeit der Strahlentherapie positiv oder negativ beeinflusst wird. Es handelt sich dabei um Reparatur, Repopulierung, Reoxygenierung und Redistribution.

Durch Reparatur werden DNA-Schäden behoben. Mittels Repopulierung vermehren sich die Tumorzellen in den Bestrahlungspausen. Die Reoxygenierung von hypoxischen Tumorzellen bewirkt eine vermehrte Stoffwechselaktivität und damit eine erhöhte Strahlensensitivität der Tumorzellen. Dies hängt mit der im Therapieverlauf abnehmenden Tumorgröße zusammen. Die Redistribution ist die gleichmäßige Verteilung der Tumorzellen im Zellzyklus, nachdem die Zellpopulation durch die Bestrahlung teilsynchronisiert war. Dadurch befindet sich stets ein Teil der Zellen in den sensiblen Phasen des Zyklus, wenn erneut bestrahlt wird. [12, 17] Tabelle 1 zeigt den Effekt der „Vier Rs“ auf die Wirksamkeit der Strahlentherapie.

	Einfluss auf den Effekt der Strahlentherapie
Reparatur	Abnahme
Repopulierung	Abnahme
Reoxygenierung	Zunahme
Redistribution	Zunahme

Tabelle 1: Wirkung der „Vier Rs“ auf die Strahlentherapie [12]

Teilweise wird auch die Radiosensitivität als fünftes „R“ mit in diese Liste aufgenommen. Sie besteht in der intrinsischen Veranlagung des Tumors, auf Bestrahlung mehr oder weniger gut anzusprechen. [18]

1.4.2 Chemotherapeutika

Seit Jahrzehnten wird an der Kombination von Chemotherapie und Radiotherapie geforscht. Die dabei möglichen Arten der Interaktion wurden von Steel [19, 20] wie folgt unterteilt: 1. Räumliches Zusammenspiel: Es werden Tumorzellen an verschiedenen Orten erfasst, die von einer einzigen Therapieform nicht alle erreicht würden 2. Unabhängige Toxizität: Zwei antikanzerogene Therapien wirken additiv nebeneinander 3. Protektion von Normalgewebe: Eine der Therapien wirkt nicht antikanzerogen, schützt aber das Normalgewebe und lässt somit eine höhere Toxizität der anderen Therapie zu 4. Gesteigerte Tumoransprechen: Die beiden Therapien verstärken sich gegenseitig und haben einen gemeinsamen supra-additiven Effekt. In diese Kategorie fällt das Thema der Strahlensensibilisierung.

Um in Experimenten das Ausmaß der Strahlensensibilisierung darzustellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Mit der *Sensitizer Enhancement Ratio* (SER) wird das Verhältnis der Strahlendosis mit Radiosensitizer zur Strahlendosis ohne Radiosensitizer bei gleichem Effekt angegeben. [21] Eine weitere Möglichkeit stellt der Vergleich der Strahlenempfindlichkeiten, ausgedrückt in den *Survival Fractions* bei 2 Gy (SF2), mit und ohne Radiosensitizer dar. [22] Außerdem werden Isobologramme verwendet, in welchen bei gleichem Tumoransprechen die dazu jeweils benötigten Einzeldosen und Kombinationsdosen von Bestrahlung und Radiosensitizer gegeneinander aufgetragen werden. Auf diese Weise kann grafisch Additivität, Infraadditivität oder Supraadditivität festgestellt werden [23].

Von Hennequin et al. [24] wurden die möglichen Interaktionsmechanismen zwischen Bestrahlung und Medikamenten auf eine molekulare, zelluläre und gewebliche Ebene unterteilt.

Ein wichtiger Mechanismus auf molekularer Ebene ist die medikamentöse Behinderung der Reparatur der durch Bestrahlung erzeugten DNA-Schäden. Bei den verwendeten Chemotherapeutika handelt es sich vorwiegend um Antimetabolite, welche durch den Einbau eines veränderten Nukleotids eine korrekte DNA-Reparatur verhindern. Pradier et al. [25] behandelten in einer In vitro-Studie Plattenepithelkarzinom-Zelllinien mit Fludarabin, einem Purin-Analogon, in Kombinationen mit Bestrahlung. Bei drei von sechs Zelllinien wurden mit SER-Werten von 1,5, 1,3 und 2,5 eindeutige strahlensensibilisierende Effekte festgestellt. Lawrence et al. [26] untersuchten die strahlensensibilisierende Wirkung von 5-Fluorouracil, einem Pyrimidin-Analogon, auf Colonkarzinom-Zelllinien. Auch hier konnte in allen Zelllinien Strahlensensibilisierung nachgewiesen werden.

Auf zellulärer Ebene ist die Beeinflussung des Zellzyklus der wesentliche Angriffspunkt der Strahlensensibilisierung. Zur Manipulation der Zellzyklusphasen werden Chemotherapeutika verwendet, welche die Zelle in der strahlensensibelsten Phase des Zellzyklus, der G₂-/M-Phase, arretieren. Fukuoka et al. [27] untersuchten die Effekte der Kombination von Bestrahlung mit dem Mikrotubulus-Stabilisator Vinorelbin auf eine NSCLC-Zelllinie. Nach Behandlung mit Vinorelbin wurden die Zellen im maximalen G₂-/M-Arrest bestrahlt. Unter diesen Bedingungen wurde eine eindeutige Strahlensensibilisierung mit einer SER von 1,35 erreicht.

Ein weiterer Angriffspunkt im Zellzyklus sind die Checkpoints, an denen die DNA-Integrität überprüft wird und die durch entsprechende Manipulation übergangen werden können. Danielsson et al. [28] testeten die strahlensensibilisierende Wirkung von Pentoxifyllin, einem Xanthinderivat und G₂-M-Checkpoint-Modulator, auf verschiedene Zelllinien. Mit der Kombination von Bestrahlung und Pentoxifyllin konnte in allen Zelllinien eine deutliche Strahlensensibilisierung festgestellt werden, das klonogene Überleben nahm um zwischen 25% und 50% ab.

Angriffspunkte zur Strahlensensibilisierung auf Ebene des Tumorgewebes sind die Verbesserung der Oxygenierung und die Unterdrückung der Proliferation. Zur Oxygenierung untersuchten Stewart et al. [29] die Wirkung eines Kombinations-

präparates aus einem Stickoxid-Donator und einem NSAID, NO-Sulindac auf normoxische (21% O₂) und hypoxische (0,2% O₂) Prostatakarzinomzellen (maligne) und Prostatastromazellen (Normalgewebe) in Kombination mit Bestrahlung. Dabei wurde mit der Kombination von NO-Sulindac und Bestrahlung eine klare Strahlensensibilisierung der Prostatakarzinom-Zelllinie unter normoxischen (SER 1,22) und noch deutlicher unter hypoxischen (SER 1,42) Bedingungen beobachtet. Die Prostatastroma-Zelllinie hingegen blieb wie erwünscht unter sowohl normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen unbeeinflusst (SER 0,93 und 1,04).

Mechanismen zur Inhibition der Tumorzellproliferation in Zusammenhang mit der Strahlentherapie wurde von Maddineni et al. [30] anhand des EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors Iressa untersucht. Eine strahlenresistente und eine strahlensensible Blasenkarzinom-Zelllinie wurden mit Iressa und verschiedenen Bestrahlungsdosen behandelt. Die SF2 betrug für die resistente Zelllinie 0,88 ohne und 0,83 mit Iressa, und für die sensible Zelllinie 0,66 ohne und 0,42 mit Iressa. Es konnte also eine deutliche Strahlensensibilisierung festgestellt werden, die wie zu erwarten bei der sensiblen Zelllinie höher ausfiel.

Weiter existieren auch Substanzen, welche die Eigenschaft haben, über mehrere der oben beschriebenen Mechanismen strahlensensibilisierend zu wirken. Kim et al. [31] und Milas et al. [32] erreichten mit Taxanen, bei denen es sich um Mikrotubulus-stabilisatoren handelt, eine Strahlensensibilisierung von Tumorzellen. Dies beruhte auf der Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus sowie der Reoxygenierung des Tumors, hervorgerufen durch apoptotischen Zellverlust. Pauwels et al. [33] und Mason et al. [34] zeigten die strahlensensibilisierende Wirkung von Gemcitabin, einem Cytosin-Analogon und damit Antimetabolit. Dem lagen eine S-Phasen-Synchronisation sowie verbesserte Oxygenierung der Tumorzellen zugrunde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Strahlensensibilisierung mit verschiedenen Chemotherapeutika und über verschiedenen Wirkmechanismen möglich ist. Die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der Ergebnisse ist jedoch aufgrund variabler Untersuchungsbedingungen eingeschränkt.

1.4.3 Koffein

Das Methylxanthin Koffein zählt zu den oben erwähnten Pharmaka, welche die Wirkung von ionisierender Strahlung auf Zellen erhöhen können. [10, 35-38]

Es kommt als wirksamer Inhaltsstoff in einigen Pflanzen vor, darunter Kaffee-, Kakao- und Colabaum sowie Teestrauch [36, 39, 40].

Koffein wird bei oraler Aufnahme nahezu vollständig resorbiert und erreicht eine maximale Plasmakonzentration nach ein bis zwei Stunden. Es wird zu etwa 80 % in der Leber metabolisiert, die hauptsächlich entstehenden Metabolite sind Theobromin, Theophyllin und Methylharnsäure. Diese werden zusammen mit 10 – 20 % unverändertem Koffein renal ausgeschieden, wobei die Eliminationshalbwertszeit etwa sieben Stunden beträgt. [39, 40]

Therapeutische Plasmakonzentrationen von Koffein liegen zwischen 5 – 20 μM [41], schwere Intoxikationen sind ab etwa 100 μM zu erwarten. Eine Tasse Kaffee enthält etwa 80 mg Koffein, der Genuss von ein bis zwei Tassen Kaffee entspricht für eine 70 kg schwere Person damit etwa 2 mg Koffein pro kg Körpergewicht und führt zu Plasmakonzentrationen von 2 mg/l bzw. 10 μM . [39, 40, 42] Die Dosis, die in 50 % der Fälle zum Tode führt (LD50) beträgt für einen erwachsenen Menschen etwa 10 g, was etwa 100 Tassen Kaffee und einer Plasmakonzentration von etwa 1 mM entspricht. [40, 42] In vitro sind aber durchaus Experimente mit Konzentrationen im höheren millimolaren Bereich möglich, hier beginnt die zytotoxische Wirkung von Koffein bei etwa 5 mM. [36]

Die Effekte von Koffein auf den Organismus sind sehr vielseitig und kommen einerseits durch seine Wirkung als Phosphodiesterase-Hemmer und Adenosin-Antagonist und andererseits durch seine direkt zentral stimulierende Wirkung zustande.

Im ZNS wirkt Koffein in mittleren Dosen von 50 – 200 mg vor allem stimulierend auf die Großhirnrinde und führt zu erhöhter psychomotorischer Aktivität mit Verbesserung geistiger Leistungen und verminderter Müdigkeit. Höhere Dosen stimulieren auch Herz-Kreislauf- und Atemzentrum in der Medulla oblongata.

Am Herzen wirkt Koffein durch die Erhöhung von cAMP in geringem Maße positiv chronotrop und inotrop.

Die glatte Muskulatur der peripheren Blutgefäße und Bronchien hingegen wird durch erhöhtes cAMP relaxiert, was die leichte diuretische Wirkung durch erhöhte

Nierendurchblutung und die ebenfalls leichte bronchiospasmolytische Wirkung erklärt.

Im Gegensatz dazu werden die Gefäße des ZNS durch den Adenosin-Antagonismus konstringiert, weshalb sich Koffein zur Verwendung in analgetischen Mischpräparaten bei Kopfschmerzen eignet.

Die vermehrte Bildung von Magensäure ist eine weitere Wirkung des Koffeins. [39, 40, 43]

Aus diesen Wirkungen ergibt sich auch ein Großteil der Symptomatik bei einer Intoxikation mit Koffein; Übelkeit mit Erbrechen, Schlafstörungen, Tachypnoe, Tachykardie und Arrhythmie, Fieber, Krämpfe und Agitiertheit bis hin zu leichtem Delir. [39, 40, 42]

Neben diesen Effekten beeinflusst Koffein aber auch die Checkpoints des Zellzyklus, die Apoptose und die DNA-Reparatur, worauf die strahlensensibilisierende Wirkung zu beruhen scheint (zusammengefasst von Bode et al. [36]).

Ein Großteil der aktuellen Literatur spricht für eine Wirkung des Koffeins hauptsächlich auf den Zellzyklus. Koffein verhindert hierbei den Arrest des G2-/M-Checkpoints nach strahlenbedingter DNA-Schädigung und damit Reparatur- und Überlebensfähigkeit der Zelle. Vieles spricht dafür, dass dem eine Hemmung der Proteinkinasen ATM und ATR als entscheidender Mechanismus zugrunde liegt. Häufig wurde in p53-defizienten Zellen eine stärkere strahlensensibilisierende Wirkung als in p53-kompetenten Zellen beobachtet. Dies wurde damit erklärt, dass in p53-defizienten Zellen eine Beeinträchtigung der G1-Checkpoint-Aktivierung besteht, wodurch die Wirkung von Koffein auf den G2-/M-Checkpoint deutlicher zum Tragen kommt. Abbildung 11 zeigt die Wirkung des Koffeins auf den Zellzyklus.

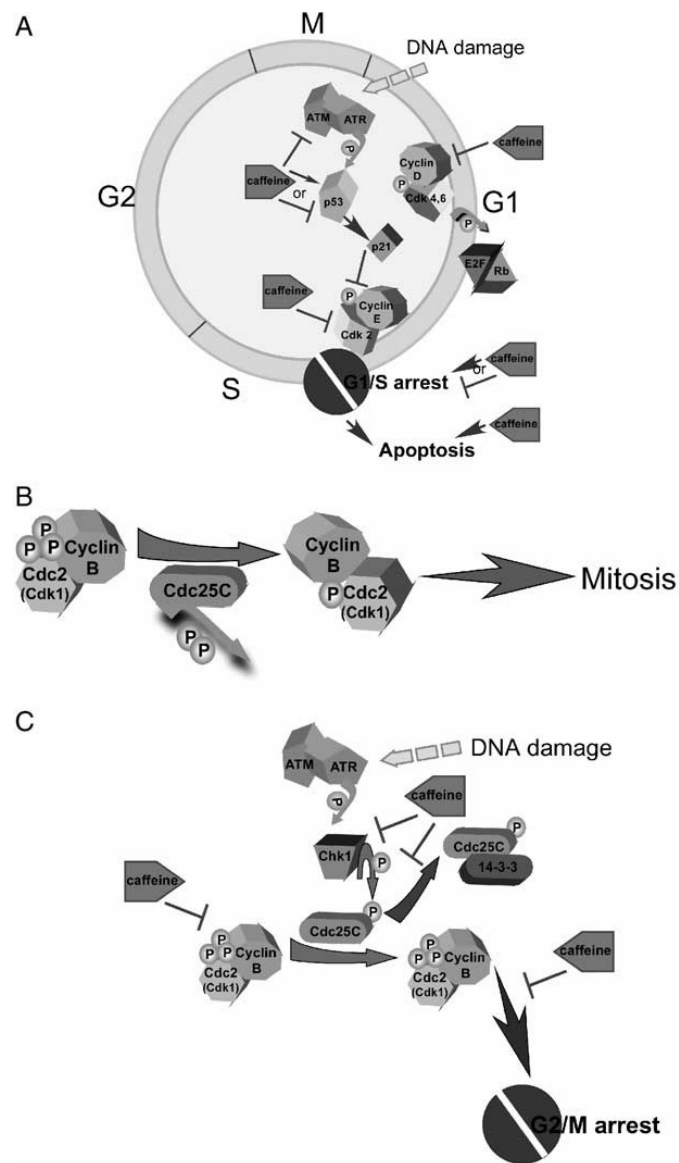


Abbildung 11: Koffeinwirkung auf den Zellzyklus [36]

Die Effekte von Koffein auf die Apoptose scheinen sehr variabel zu sein und sind schwer zu vereinheitlichen. So wurden p53-abhängige und unabhängige Apoptose, Apoptose als Folge von fehlender DNA-Reparatur sowie durch Koffein direkt induzierte Apoptose, aber auch völliges Fehlen von Apoptose beschrieben. [36]

Higuchi et al. [37] untersuchten die Wirkung von Koffein und Bestrahlung auf Zellzyklus, Zellüberleben und Apoptose. Sie kombinierten verschiedene Koffein- und Bestrahlungsdosen und verwendeten eine strahlensensible Zelllinie mit p53-Wildtyp und eine strahlenresistente mit p53-Mutation. Nach Bestrahlung alleine wurde ein G2-/M-Arrest festgestellt, welcher sich durch Zugabe von Koffein vollständig aufheben ließ. Das Zellüberleben ließ sich in beiden Zelllinien durch Kombination von

Koffein und Bestrahlung deutlich mindern, Strahlensensibilisierung konnte jedoch nur in der strahlenresistenten / p53-defizienten Zelllinie festgestellt werden. Es handelte sich dabei um einen apoptotischen Zelluntergang. Dieser trat unabhängig von p53 auf, da es sich um eine p53-mutierte Zelllinie handelte und keine erhöhte p53-Expressionierung nachgewiesen werden konnte.

Die gleiche Arbeitsgruppe [44] untersuchte außerdem an den selben Zelllinien deren Fähigkeit zur Reparatur potenziell tödlicher Schäden, PDLR (*potentially lethal damage repair*), als Maß für die Strahlensensibilität der Zelllinien. Nach alleiniger Bestrahlung wies die strahlenresistente Zelllinie wie zu erwarten eine deutlich höhere Fähigkeit zur Schadensreparatur auf als die strahlensensible. Nach Zugabe von Koffein wurde diese Fähigkeit in der sensiblen Zelllinie vollständig aufgehoben, in der resistenten verblieb nur eine minimale Restaktivität der PDLR. Dies stand im Zusammenhang mit der Aufhebung des G2-/M-Arrestes durch Koffein und damit fehlender Reparaturzeit. Das Ausmaß des G2-/M-Arrestes korrelierte eng mit dem der PDLR-Inhibierung. Die Möglichkeit, dass Koffein zusätzlich direkt Reparaturvorgänge hemmt, wurde ebenfalls in Betracht gezogen.

Auch Valenzuela et al. [45] verglichen p53- positive und -negative Zelllinien im Hinblick auf Zellüberleben und Zellzyklusveränderungen durch Bestrahlung und Koffein. Nach alleiniger Bestrahlung fand sich in der p53-kompetenten Zelllinie ein deutlicher G1-Arrest, welcher durch die Zugabe von Koffein kaum beeinflusst wurde. Die p53-defizienten Zelllinien hingegen zeigten nach Bestrahlung keinerlei Akkumulation in G1, jedoch in G2, was durch die Zugabe von Koffein aufgehoben werden konnte. Strahlensensibilisierung konnte in den p53-defizienten Zelllinien, nicht jedoch in der p53-kompetenten Zelllinie beobachtet werden. Das machte einen Zusammenhang mit dem p53-Status und der Verhinderung des G2-Arrestes sehr wahrscheinlich.

Die molekularen Mechanismen, welche den Zellzykluseffekten von Koffein zugrunde liegen könnten, wurden von Kaufmann et al. [46] untersucht. So wurde eine Fibroblastenzelllinie mit der ihr entsprechenden ATM-defizienten Zelllinie verglichen, um die Rolle der Proteinkinase ATM in der Aufhebung des G2-/M-Arrestes zu betrachten. Die Kombination von Bestrahlung und Koffein reduzierte den durch alleinige Bestrahlung ausgelösten G2-/M-Arrest um 95 %, in den ATM-defizienten Zellen hingegen nur um 50 %, was ATM als einen wichtigen Angriffspunkt für Koffein wahrscheinlich macht. Die verbleibende Restaktivität von 50 % wurde der

Proteinkinase ATR zugeschrieben. Da sich jedoch im gleichen Versuch keine direkte Hemmung der ATM nachweisen ließ, gingen die Autoren davon aus, dass Koffein *downstream* von ATM, also in einem späteren Schritt, in deren Signalkaskade eingreift. Koffein alleine schien desweiteren die DNA-Synthese zu hemmen, die Aufnahme von markiertem Thymidin war nach Koffeingabe deutlich vermindert.

Die Wirkungen von Koffein auf die DNA-Reparatur wurden von Asaad et al. [35] untersucht. Sie verglichen Wildtyp Zelllinien mit verwandten mutierten Zelllinien, die Defekte der DNA-Reparatur besaßen. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Hemmung der Homologen Rekombinations-Reparatur (HRR) wichtigster Angriffspunkt zur Strahlensensibilisierung durch Koffein sei. Zellen mit Mutation der für die HRR essentiellen Rad51-Homologe XRCC2 und -3 wurden mit Bestrahlung und Koffein behandelt und es konnte keine Strahlensensibilisierung durch Koffein festgestellt werden. Wildtyp-Zellen bzw. Zellen mit Mutationen im Non-homologous-end-joining (NHEJ) hingegen konnten durch Koffein strahlensensibilisiert werden. Wurde XRCC2-defizienten Zellen das entsprechende gesunde Gen transfiziert, konnte ebenfalls ein strahlensensibilisierender Effekt beobachtet werden. Abbildung 12 zeigt Wirkung des Koffeins auf die DNA-Reparatur.

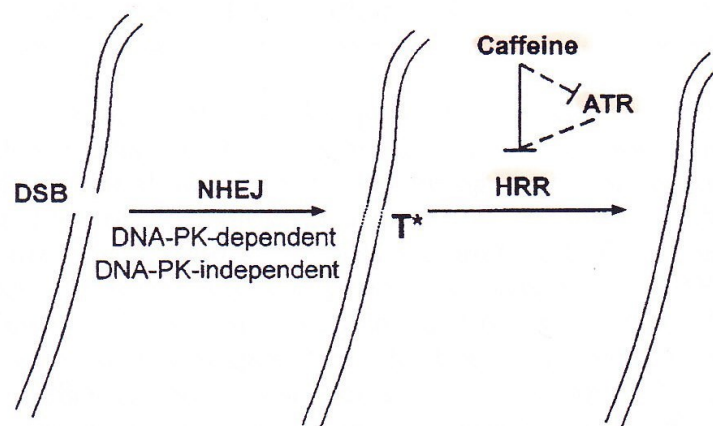


Abbildung 12: Koffeinwirkung auf die DNA-Reparatur [35]

In der parallel durchgeführten Zellzyklusanalyse konnte sowohl im Wildtyp als auch in den HRR-Mutanten ein durch Bestrahlung ausgelöster G2-/M-Arrest sowie dessen Aufhebung durch Koffein beobachtet werden. Zellzyklusveränderungen wurden deshalb nicht als ursächlich für die beobachteten Effekte angesehen. Desweiteren wurden die Versuche in ATM-defizienten Zellen durchgeführt. Auch hier ließ sich Strahlensensibilisierung durch Koffein beobachten, weshalb eine zugrunde liegende Hemmung der ATM durch Koffein ebenfalls nicht angenommen wurde. Die Autoren

schlossen vielmehr auf eine direkte Hemmung von XRCC2 bzw. -3 durch Koffein. Eine Hemmung des gesamten Reparaturkomplexes von XRCC- und Rad-Proteinen durch Koffeinbindung an die DNA wurde ebenfalls in Betracht gezogen. Auch eine Hemmung spezifischer Proteinkinasen, jedoch nicht ATM und ATR, hielten sie für möglich. Damit gehen Asaad et al. von einer zellzyklusunabhängigen Wirkungsweise von Koffein aus, was im Widerspruch zu den Annahmen der vorher genannten Arbeiten steht.

Auch Ribeiro et al. [47] erzielten zu den bereits genannten Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse. Sie untersuchten Zelllinien mit verschiedenem p53-Status auf Zellzyklusveränderungen, Apoptoseinduktion und Strahlensensibilisierung durch Koffein. Die beiden p53-kompetenten Zelllinien reagierten nicht mit einem G2-/M-Arrest oder dessen Auflösung nach Bestrahlung und Koffein, ließen sich aber strahlensensibilisieren. Die beiden p53-defizienten Zelllinien reagierten nach Bestrahlung mit einem G2-/M-Arrest, welcher sich durch Koffein verhindern ließ. Trotzdem ließ sich eine Zelllinie gar nicht und die andere nur mit sehr hohen Dosen von Koffein strahlensensibilisieren. Vermehrte Apoptose wurde in keiner der genannten Zelllinien beobachtet. Es wurde deshalb geschlossen, dass Koffein unabhängig von G2-/M-Arrest, p53-Status und Apoptoseinduktion zu wirken scheint. Die Ergebnisse von Ribeiro et al. decken sich daher mit jenen von Asaad et al. hinsichtlich einer Strahlensensibilisierung unabhängig von der G2-Arrest-Aufhebung. Sie widersprechen jedoch den beschriebenen Ergebnissen von Higuchi et al., Akimoto et al., Valenzuela et al. und Kaufmann et al., welche einen Zusammenhang zwischen Strahlensensibilisierung und Aufhebung des G2-Arrests, p53-Status, ATM-Hemmung und Apoptoseinduktion sahen.

Insgesamt besteht die Schwierigkeit der Interpretation der Ergebnisse von Untersuchungen mit Koffein darin, dass die Vergleichbarkeit der verschiedenen Untersuchungen durch extrem variable Versuchsbedingungen beeinträchtigt wird. So werden sehr unterschiedliche Koffeindosen verwendet, die untersuchten Zellen stammen von verschiedensten Tumoren und verfügen über verschiedene Mutationen und es werden unterschiedliche Applikationsschemata von Koffein und Bestrahlung angewendet. Außerdem handelt es sich häufig um in vitro-Untersuchungen, deren Koffeindosen in vivo hohe Toxizität besäßen. All dies erklärt vielleicht die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse, die in Versuchen mit Koffein bisher erzielt wurden.

[36]

2 Zielsetzung

Wie bereits erwähnt gehören HNO-Tumore zu den Tumorentitäten, die eine vergleichsweise schlechte Prognose aufweisen. Die Therapie ist aggressiv und bedeutet deshalb eine hohe Belastung für den Patienten. Die radikale Tumorsektion führt häufig zur schweren Beeinträchtigung der betroffenen Organe oder entstellender Narbenbildung. Die Strahlentherapie kann zu chronischen lokalen funktionellen Einschränkungen wie Dysphagie und Xerostomie führen. Hochdosierte Chemotherapie hat häufig starke systemische Nebenwirkungen wie Erschöpfung, Übelkeit und Erbrechen, Schleimhautentzündungen und Myelosuppression zur Folge.

Die Therapie der HNO-Tumoren besteht häufig aus einer Kombination von Radiochemotherapie und Chirurgie. Dies führt dazu, dass der Patient mit einer Vielzahl der beschriebenen Nebenwirkungen umgehen muss. Die Lebensqualität der betroffenen Patienten wird dadurch in besonderem Maße beeinträchtigt. Eine große Rolle spielen dabei sowohl Störungen der zwischenmenschlichen Interaktion, etwa durch Beeinträchtigungen beim Sprechen oder durch Veränderungen kosmetischer Art im Gesicht, als auch die Einschränkung grundlegender physischer Funktionen wie der Nahrungsaufnahme. Die psychosoziale Komponente der Therapie von HNO-Tumoren ist somit sehr bedeutsam.

Aufgrund der genannten Problematik ist es ein großes Anliegen der Forschung, nebenwirkungsärmere Therapieformen zu entwickeln, die eine gute Tumorkontrolle erlauben. In der Strahlentherapie bietet sich dabei die Untersuchung von Kombinationen aus Bestrahlung und Chemotherapie an, welche eine additive oder sogar supraadditive Wirkung auf den Tumorzelltod haben können und damit möglicherweise eine Dosisreduktion von Bestrahlung und Chemotherapie erlauben.

Koffein ist für seine strahlensensibilisierende Wirkung bekannt. Allerdings ist der strahlensensibilisierende Effekt von Koffein abhängig von der Zellart, Dosis und Applikationsform. Dies macht eine Untersuchung von verschiedenen Zelllinien mit entsprechenden gezielten Fragestellungen interessant.

Als Parameter für den Erfolg der Interaktion zwischen Bestrahlung und Koffeingabe dient nicht nur das reine Zellüberleben, sondern auch die Art des Zelluntergangs. Die Apoptose scheint die wichtigste Art des Zelltodes nach Bestrahlung zu sein. Ihre

Quantifizierung kann Aufschluss darüber geben, in welchem Maße sie tatsächlich am Zelltod beteiligt ist und ob auch andere, apoptoseunabhängige Todesarten eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Wirkung verschiedene Dosen von Koffein (0, 2 und 5 mM) und Bestrahlung (0, 5 und 10 Gy) einzeln und in Kombination auf die Apoptose zweier HNO-Tumorzelllinien haben. Es wurden zwei Zelllinien verwendet, die strahlensensible Zelllinie XF354 und die strahlenresistente Zelllinie SAS, um die erzielten Ergebnisse besser einordnen zu können. Desweiteren wurden zwei verschiedene Apoptoseparameter gemessen, Annexin-V und Caspase-3, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Parallel dazu wurde in der Arbeitsgruppe das klonogene Überleben der Zelllinien SAS und XF354 ebenfalls nach einer Kombinationsbehandlung mit Koffein und Bestrahlung bestimmt. Ergänzend zur vorliegenden Arbeit wird in der Diskussion auch auf diese Ergebnisse kurz eingegangen.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

Die beiden Zelllinien SAS und XF354 wurden bereits mehrfach verwendet und beschrieben, u.a. in Yaromina et al. 2006 und 2007 und Artman et al 2010.

SAS stammt aus einem primären Plattenepithelkarzinom der Zunge, entspricht der Stadieneinteilung G3, ist p53-mutiert und gilt mit einer TCD50 (Tumor Control Dose 50%) von 126,7 Gy als eher strahlenresistent. (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resources Bank)

XF354 stammt aus der Lymphknotenmetastase eines primären Mundbodenkarzinoms, entspricht der Stadieneinteilung G1, ist ebenfalls p53-mutiert und gilt mit einer TCD50 von 47,4 Gy als eher strahlensensibel. (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Die Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Baumann von der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden zur Verfügung gestellt.

3.2 Medium und Mediumszusätze

- Kulturmedium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Invitrogen Ltd., Carlsbad, USA)
mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 25 mM HEPES
ohne Pyruvat
- FCS (fetal calf serum) 10% (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Penicillin (100 units/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) 1% (Gibco, Invitrogen Ltd., Carlsbad, USA)
- Non-essential amino acids 1% (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

3.3 Reagenzien

- DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) (Gibco, Invitrogen Ltd., Carlsbad, USA)
ohne CaCl₂, MgCl₂

- Trypsin/EDTA 0,05 / 0,02 %ig PBS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
ohne Ca, Mg, steril gefiltert
- Färbemittel Trypanblau-Lösung 0,1% (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Koffein ReagentPlus® (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Pulver
Schmelzpunkt bei 234-236.5 C, Löslichkeit in Wasser 15 mg/mL
- Annexin-V-FLUOS (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, USA)
- Annexin-V-Pufferlösung
HEPES/NaOH 10mM pH 7,4
HEPES (Gibco, Invitrogen Ltd., Carlsbad, USA)
NaOH: Natriumhydroxid, ≥99%, Plätzchen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) + Aqua dest. (Millipore)
CaCl₂ 5mM, kristallin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) + Aqua dest.
NaCl 140mM, kristallin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) + Aqua dest.
- Propidium-Iodid (PI) (Calbiochem-Novobiochem Corporation, La Jolla, USA)
- PE Caspase-3 Active Apoptosis Kit 1 (BD Pharmingen™, BDBiosciences, San Diego, USA)
Caspase-3 Antikörper
Perm/Wash
Cytotfix/Cytoperm
- Desinfektionsmittel Ethanol 70% vergällt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
mit ca. 1% MEK
- Aqua dest. (Millipore DirectQ®)

3.4 Geräte

- Arbeitsbank Hera Safe (Thermo electron corporation, Waltham, USA)
Typ KS 18, Volume 1800*780*627 mm
- Brutschrank Heraeus (Thermo electron corporation, Waltham, USA)
Typ BBD, 230 V, 5,2 A, 1,2 kW
Einstellung 37°C, 5% CO₂, 95% rH
- Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+ (Thermo scientific)

- Bestrahlungsgerät Xstrahl RS 225 (Gulmay Medical)
- Durchflusszytometer FacsCalibur (Becton/Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
- Millipore-Anlage Millipore DirectQ® with Pump (Millipore, Billerica, USA)
- Kulturflasche Corning Flask (Corning incorporated, Arizona, USA)
T25 (Anwuchsfläche 25 cm²)
T75 (Anwuchsfläche 75 cm²)
- Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm²
- Pipettenhalter
Stripettor Costar (Corning Incorporated, Arizona, USA)
Corning Lambda (Corning Incorporated, Arizona, USA)
- Pipetten
Falcon 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml (Becton/Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
Sarstedt Pipettenspitze 200 µl (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland)
- Well-Platten
96-Well-Platte Falcon (Becton/Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
- Zentrifugenröhrchen
15 ml, gammasterilisiert, pyrogenfrei, RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei (TPP, Trasadingen, Schweiz)
50 ml Polypropylene Conical Tube (Falcon, Becton/Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
- Eppendorf-Gefäß 1,5 ml
- FACS-Röhrchen Polystyrene Rond-BottomTube (Falcon, Becton/Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
5 ml, 12x75 mm style

3.5 Software

- Durchflusszytometrie
BD CellQuest Pro (Becton/Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)

4 Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden in einem gentechnisch zugelassenen Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Den hierfür geltenden Sicherheitsstufen und -maßnahmen liegt der Paragraph 7 des Gentechnikgesetzes (GenTG) zugrunde. Der Sicherheitsstufe 2 werden gentechnische Arbeiten zugeordnet, bei denen ein geringes Risiko für Mensch und Umwelt zu erwarten ist.

4.1 Zellkultur

Die beiden Plattenepithelkarzinom-Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sie wurden in DMEM Kulturmedium, welches mit 10% FCS (*fetal calf serum*), 1% Penicillin (100 units/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) und 1% NEAA (*Non-essential amino acids*) supplementiert wurde, in T75-Kulturflaschen gehalten.

Eine Passage der Zelllinien wurde jeden dritten oder vierten Tag durchgeführt. Die Passage der Zelllinien dient dazu, die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Zur Passagierung wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gespült und anschließend trypsiniert. Die adhärenenten Zellen wurden durch Beklopfen der Flasche vom Flaschenboden und voneinander gelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Kulturmedium beendet.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch von Hand ausgezählt. Die Viabilitätsbestimmung der Zellen erfolgte durch Färbung mit Trypanblau 0,1%. Anschließend wurden $1,5 \times 10^6$ vitale Zellen in 20 ml Kulturmedium in eine neue T75-Kulturflaschen ausgesät.

4.2 Apoptoseinduktion

4.2.1 Aufbereitung des Koffeins

Koffein liegt als Lyophilisat vor. Aufgrund seiner relativ schlechten Löslichkeit in Wasser (15 mg/ml) wurde das Koffein in Kulturmedium gelöst und 10fach konzentrierte Stocklösungen von 50 mM und 20 mM hergestellt. Die gewünschten Endkonzentrationen von 2 und 5 mM Koffein wurden durch die Zugabe der

Stocklösung zu den Zellen erreicht, wobei die Stocklösung durch das vorhandene Kulturmedium entsprechend verdünnt wurde.

4.2.2 Koffeinbehandlung und Bestrahlung

Zur Apoptoseinduktion mittels Bestrahlung und Koffeinzugabe wurden die Zelllinien 24 Stunden zuvor in T25-Kulturflaschen passagiert. Der Zeitrahmen wurde so gewählt, dass die Zellen bei der Behandlung adhärent waren und sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

30 Minuten vor der Bestrahlung wurden die vorgesehenen Dosen von 2 und 5 mM Koffein zu den entsprechenden Proben hinzugefügt, dann wurden die Zellen je nach Probe mit 5 oder 10 Gy bestrahlt.

Nach der Behandlung wurden die Zellen noch für weitere 72 Stunden kultiviert.

4.3 Durchflusszytometrie

Die Apoptose der Zellen nach Bestrahlung, nach Koffeineinwirkung und nach Kombinationstherapie wurde durchflusszytometrisch mittels *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) gemessen. Die gelösten Zellen werden einzeln an Detektoren vorbeigeleitet und dabei von einem Laser angestrahlt, wodurch sie nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten auf Einzelzellebene untersucht werden können.

Die Streuung des Lichtes durch die Zellen erlaubt eine Aussage über Größe (*Forwardscatter* FSC) und Granularität (*Sidescatter* SSC) der Zellen. Die Zellen werden mit spezifischen, an bestimmte Zellbestandteile bindenden fluoreszierenden Stoffen angefärbt. Die anschließende Messung der Fluoreszenz lässt Aussagen über die entsprechenden Zelleigenschaften zu.

4.3.1 Annexin-V-Test

4.3.1.1 Grundlagen

Die Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran ist eines der frühesten Ereignisse der Apoptose [48], und findet noch vor der DNA-Fragmentierung und der Zellmembran-Permeabilisierung statt. [49, 50]

Der Annexin-V-Test macht sich diese Veränderung der Zellmembran zu Nutze um apoptotische und nekrotische Zellen zu detektieren. Annexin-V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran, und lässt sich durch Konjugation mit FITC durchflusszytometrisch nachweisen. [49-51] Da in nekrotischen Zellen die Zellmembran durchlässig wird und somit auch intrazelluläres Phosphatidylserin nachgewiesen werden kann, werden die Zellen außerdem mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt. Die Interkalierung von PI mit der DNA im Zellkern kann nur erfolgen, wenn die Zellkernmembran durchlässig ist. [50, 51] Somit ermöglicht die Färbung mit FITC-Annexin-V und PI die Unterscheidung zwischen vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen.

4.3.1.2 Annexin-V-Färbung

72 Stunden nach Bestrahlung und Koffeinzugabe wurde die Annexin-V-Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt.

Die Zellen wurden, wie bereits bei der Passagierung beschrieben, durch Trypsinierung und Beklopfen der Kulturflasche in Lösung gebracht. Die Zellen wurden anschließend mit 400 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in PBS aufgenommen. 2×10^5 Zellen wurden zur Testdurchführung weiterverwendet. Diese Zellen wurden erneut mit 400 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Annexin-Pufferlösung resuspendiert und erneut mit 400 g und bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 µl Annexin-V mit 100 µl Annexin-Pufferlösung resuspendiert und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden weitere 400 µl der Annexin-Pufferlösung zur Probe hinzugefügt. 1 Minute vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit 5 µl Propidium-Iodid gegengefärbt.

4.3.1.3 Analyse

Die durchflussszytometrische Analyse wurde mit einem FacsCalibur Durchflusszytometer gemessen. Sowohl PI als auch Annexin-V werden von einem blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. PI fluoresziert rot mit einer Wellenlänge von 617 nm. Annexin-V ist an das Molekül FITC gekoppelt, welches mit einer Wellenlänge von 519 nm grün fluoresziert.

Die für die Analyse relevanten Zellen wurden anhand der Parameter für die Zellmorphologie, FSC und SSC, mittels der Kontrolle (0 Gy Bestrahlung, 0 mM Koffein)

ausgewählt. Dies wird auch als *Gating* bezeichnet. SSC und FSC sind mit einer linearen Skala als Dotplot aufgetragen, das *Gate* wird als Linie um die gewünschten Zellen gelegt. Bei zu geringem FSC und SSC handelt es sich um Zelltrümmer, welche von der Messung ausgeschlossen werden. Abbildung 13 zeigt das *Gating* der zu verwendenden Zellen.

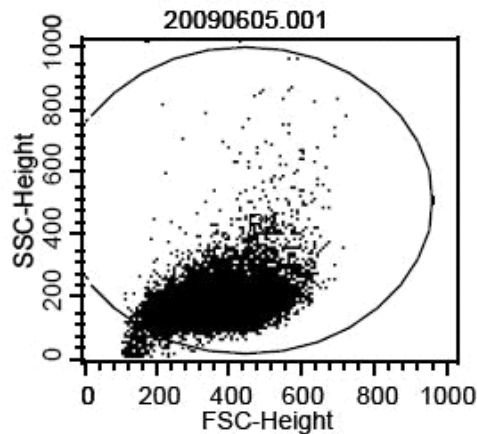


Abbildung 13: SSC-FSC-Gate

Die Zellsortierung wurde anhand der Intensität der Fluoreszenz von PI und Annexin-V vorgenommen, welche logarithmisch mit 4 Dekaden als *Dotplot* gegeneinander aufgetragen waren.

In diesem *Dotplot* wurden anhand der Kontrolle (0 Gy Bestrahlung, 0 mM Koffein) vier Quadranten festgelegt, unten links (*lower left* LL), unten rechts (*lower right* LR), oben links (*upper left* UL) und oben rechts (*upper right* UR).

Daraus ergaben sich drei Zellpopulationen: Der untere linke Quadrant (niedriges PI-, niedriges Annexin-V-Signal) definierte lebende Zellen. Der untere rechte Quadrant (niedriges PI-, hohes Annexin-V-Signal) definierte apoptotische Zellen. Die beiden oberen Quadranten (hohes PI-Signal) definierten tote Zellen. Die Menge der Zellen in jedem Quadranten wurde als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl ausgedrückt. Abbildung 14 zeigt den *Dotplot* und die Verteilung der Zellen in den Quadranten.

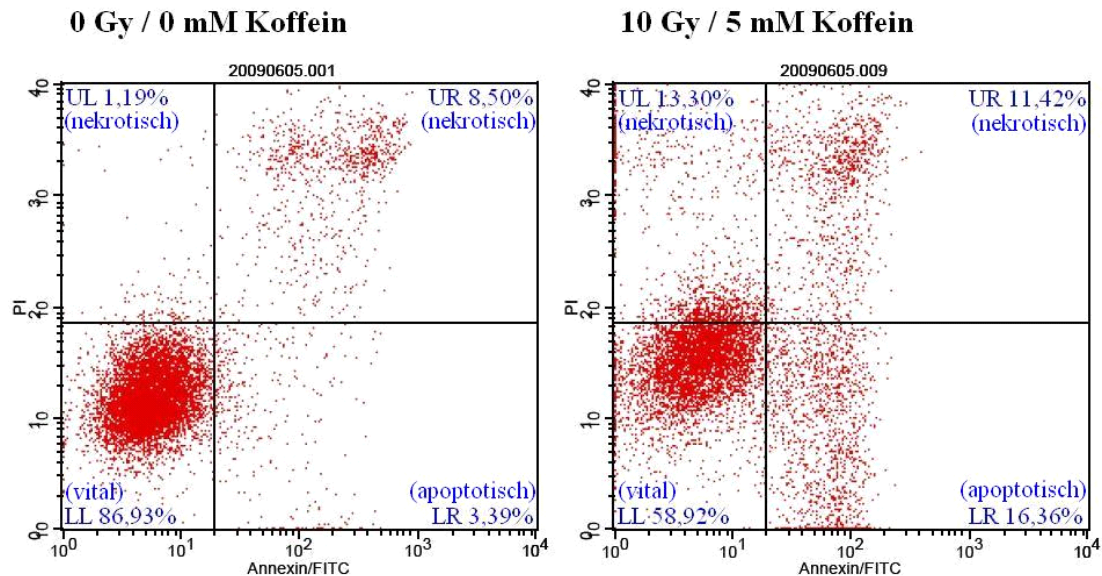


Abbildung 14: Dotplot der Annexin-V-Färbung

4.3.2 Caspase-3-Test

4.3.2.1 Grundlagen

Der Caspase-3-Test beruht auf der bereits beschriebenen Aktivierung einer Kaskade von Caspasen, welche durch gegenseitige Aktivierung und den Abbau der Zelle die Apoptose einleiten und durchführen. [10-12] Die Caspase-3 ist sowohl in frühen als auch in späteren Phasen der Apoptose nachweisbar. [48, 51, 52] Ihre Aktivierung führt irreversibel zum Tod der Zelle. [51] Bei der Caspase-3-Färbung wird ein Antikörper gegen die aktivierte Caspase-3 verwendet, welcher einen sehr spezifischen Marker für eine ablaufende Apoptose darstellt. Die Caspasen befinden sich intrazellulär, die Zellmembran ist bei apoptotischen Zellen aber noch so intakt, dass das Eindringen des Antikörpers verhindert würde. Deshalb müssen die Zellen vor der Färbung fixiert und die Zellmembran permeabilisiert werden, um ein vollständiges Binden des Antikörpers an die Caspase-3 zu ermöglichen. [48, 52]

4.3.2.2 Caspase-3-Färbung

Auch die die Caspase-3-Färbung wurde 72 Stunden nach Bestrahlung und Koffeinzugabe mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt.

Die Zellen wurden, analog zur Annexin-V-Färbung, in Lösung gebracht und 2×10^5 Zellen zur Testdurchführung weiterverwendet. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 400 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μl Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert, um

die Zellen zu fixieren und permeabilisieren. Die Zellen wurden dann erneut mit 400 g bei 4°C zentrifugiert und zwei Mal mit Perm/Wash-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4 µl Caspase-3-Antikörper und 20 µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert und 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit 400 g bei 4°C zentrifugiert und mit Perm/Wash-Lösung gewaschen. Schließlich wurde das Zellpellet für die Analyse in 500 µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert.

4.3.2.3 Analyse

Die durchflussszytometrische Analyse wurde mit einem FacsCalibur Durchflussszytometer gemessen. Der Caspase-3 Antikörper ist an das fluoreszierende Molekül PE gekoppelt. Es wird von einem blauen Laser von 488 nm Wellenlänge angeregt und emittiert gelbes Licht einer Wellenlänge von 576 nm.

Analog zum Annexin-V-Test (s.o.) wurde das *Gating* der für die Analyse relevanten Zellen anhand von FSC und SSC mittels der Kontrolle (0 Gy Bestrahlung, 0 mM Koffein) durchgeführt. Abbildung 15 zeigt das *Gating* der zu verwendenden Zellen.

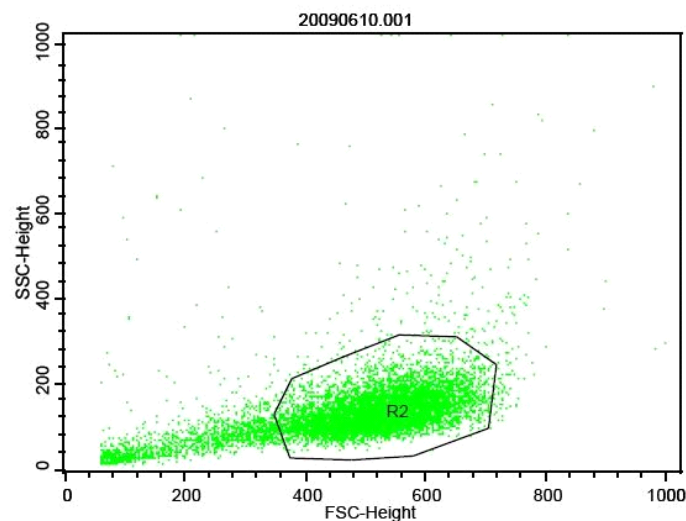


Abbildung 15: SSC-FSC-Gate im Caspase-3-Test

Die Zellsortierung wurde anhand der Intensität der Fluoreszenz von Caspase-3 vorgenommen, welche gegen die gezählten Zellen linear als Histogramm aufgetragen wurde. In diesem Histogramm wurden, wieder anhand der Kontrolle (0 Gy Bestrahlung, 0 mM Koffein), zwei Abschnitte festgelegt, M1 (rechts) und M2 (links). Der linke Abschnitt (niedriges Caspase-3-Signal) bezeichnete lebende und tote Zellen, der rechte Abschnitt (hohes Caspase-3-Signal) bezeichnete apoptotische Zellen. Die Menge der Zellen in den beiden Abschnitten wurde als prozentualer

Anteil der Gesamtzellzahl ausgedrückt. Abbildung 16 zeigt das Histogramm und die Verteilung der Zellen in den beiden Abschnitten.

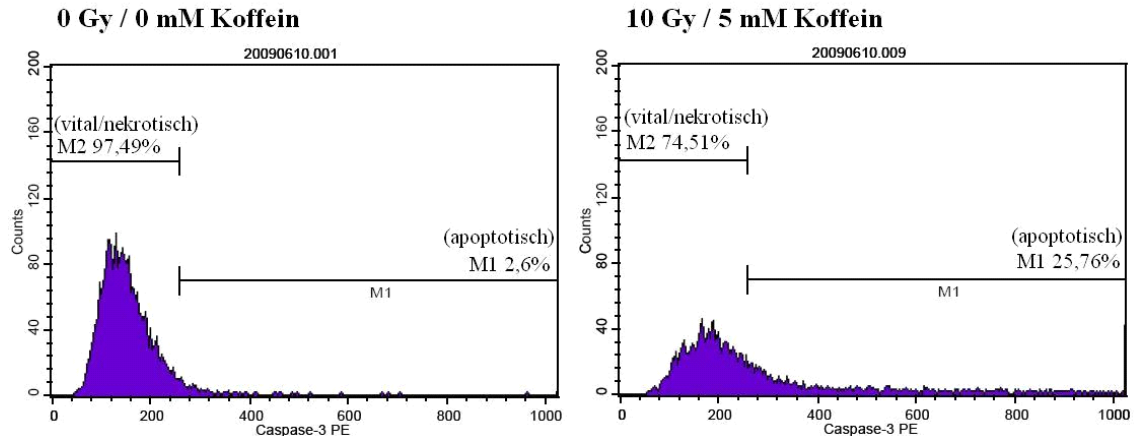


Abbildung 16: Histogramm der Gesamtzellen des Caspase-3-Tests

4.4 Statistik

Alle Versuche wurden drei bis fünf Mal durchgeführt. Es wurden sowohl im Annexin-V- als auch im Caspase-3-Test Prozentwerte apoptotischer Zellen gemessen, nach Wiederholung der Versuche wurden Mittelwerte der gemessenen Einzelwerte gebildet.

Die innerhalb einer Versuchsdurchführung gemessenen Werte verhielten sich im Bezug zueinander bei jeder Versuchswiederholung ähnlich, das Niveau der Werte variierte hingegen über die Versuchstage, weshalb der Tag des Experiments als Einflussfaktor bei den Auswertungen berücksichtigt wurde.

Für die statistische Analyse wurde als primäres Auswertverfahren die mehrfaktorielle Varianzanalyse unter Berücksichtigung potentieller Confoundervariablen (ANCOVA, *analysis of covariance*) verwendet. Im Zuge dieser Analysen wurden zunächst die Gesamteffekte der experimentell festgelegten Faktorvariablen Koffein (Faktorstufen: 0, 2 und 5 mM) und Bestrahlung (Faktorstufen: 0, 5 und 10 Gy) auf die Apoptose, definiert als prozentualer Anteil apoptotischer Zellen in Bezug auf alle Zellen, untersucht. Hierbei wurden die resultierenden marginalen Effekte hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz geprüft. Die marginalen Effekte sind konkret die Unterschiede zwischen den einzelnen Faktorstufen von Koffein gemittelt über alle Strahlungskonfigurationen, beziehungsweise die Unterschiede zwischen den einzelnen Faktorstufen der Bestrahlung gemittelt über alle Koffeindosen. Dabei

wurden als Effektgrößen die korrespondierenden Randmittelwerte (marginale Mittelwerte) mit 95% Konfidenzintervallen angegeben.

Bei diesen multiplen Paarvergleichen wurde als Post-Hoc Test Korrekturverfahren die Methode von Bonferroni verwendet.

So wurde beispielsweise für den Vergleich zwischen 5 und 10 Gy die Gruppe „5 Gy, gemittelt über alle Koffeindosen 0, 2 und 5 mM“ mit der Gruppe „10 Gy, gemittelt über alle Koffeindosen 0, 2 und 5 mM“ verglichen, woraus sich je nach Zelllinie und Messmethode für die einfließenden Messwerte $n = 3$ pro Versuchstag (also je nach Anzahl der Versuchswiederholungen insgesamt $n = 9$ bis 15) ergab.

Um zusätzlich die Kombination der beiden Behandlungen zu untersuchen wurden Einzelgruppenvergleiche aller möglichen kombinatorischen Konstellationen (Koffein x Bestrahlungsdosis: $3 \times 3 = 9$, d.h. insgesamt 36 Paarvergleiche) durchgeführt. Da hier beide Behandlungen gemeinsam betrachtet wurden, konnte bei der Untersuchung der einen Behandlung nicht über die andere gemittelt werden. Für den Vergleich zwischen 5 und 10 Gy wurde also ausschließlich der Wert „5 Gy, 0 mM Koffein“ mit dem Wert „10 Gy, 0 mM Koffein“ verglichen, wodurch sich für die einfließenden Messwerte $n = 1$ pro Versuchstag (also insgesamt $n = 3$ bis 5) ergab.

Um eine Aussage über die Interaktion der beiden Behandlungen und damit auch über eine eventuell strahlensensibilisierende Wirkung des Koffeins treffen zu können, wurde über das ANCOVA-Modell ein statistischer Test auf Interaktion zwischen Bestrahlung und Koffein vorgenommen. Basierend auf diesen Berechnungen wurden zur Veranschaulichung sogenannte *Contourplots* erstellt, in welchen die Effekte der Bestrahlungsdosen auf die Apoptose in Abhängigkeit der Koffeindosis, unterstützt durch Höhenlinien, dargestellt wurden. So kann anhand der jeweiligen Höhenlinie abgelesen werden, welche Dosen von Bestrahlung, Koffein oder deren Kombination nötig sind, um eben dieses Ausmaß an Apoptose zu erzielen. Verlaufen die Höhenlinien in Geraden, ist von einem additiven Effekt der beiden zu untersuchenden Substanzen auszugehen. Verlaufen sie linksgekrümmt, legt dies einen supraadditiven Effekt nahe. Verlaufen sie rechtsgekrümmt lässt dies auf einen subadditiven Effekt schließen.

5 Ergebnisse

In Vorversuchen wurden die effektivsten Dosen von Bestrahlung und Koffein, die Applikationsform des Koffeins, der günstigste Zeitpunkt für die Apoptosemessung und das Verhalten der Zelllinien SAS und XF354 geprüft. Die verwendeten Konzentrationen und Methoden richteten sich dabei nach bewährten Vorgehensweisen in der Literatur (siehe Kapitel 6 – „Diskussion“).

Darauf aufbauend wurden im eigentlichen Experiment Bestrahlungsdosen von 0, 5 und 10 Gy, Koffeindosen von 0, 2 und 5 mM und deren Kombinationen verwendet. Tabelle 2 zeigt den Versuchsaufbau mit allen verwendeten Kombinationen der Bestrahlungs- und Koffeindosen.

		Bestrahlung [Gy]		
		0 Gy	5 Gy	10 Gy
Koffein [mM]	0 mM	0 Gy – 0 mM	5 Gy – 0 mM	10 Gy – 0 mM
	2 mM	0 Gy – 2 mM	5 Gy – 2 mM	10 Gy – 2 mM
	5 mM	0 Gy – 5 mM	5 Gy – 5 mM	10 Gy – 5 mM

Tabelle 2: Versuchsaufbau: Dosen und Kombinationen von Bestrahlung und Koffein

24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurden diese mit Koffein behandelt und bestrahlt. Nach weiteren 72 Stunden Kultivierung fand die Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie statt. Tabelle 3 zeigt den zeitlichen Versuchsablauf.

Tag 1	Aussaat der Zellen
Tag 2	Koffeinzugabe – 30 min Inkubation – Bestrahlung
Tag 5	Apoptosemessung

Tabelle 3: Versuchsaufbau: Zeitlicher Versuchsablauf

Jeder Versuch wurde drei bis fünf Mal wiederholt um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beurteilen zu können.

5.1 Effekt von Koffein und Bestrahlung auf die Zelllinie SAS

5.1.1 Apoptosenachweis mittels Annexin-V

Der Versuch mit der Zelllinie SAS und dem Apoptostest anhand von Annexin-V wurde insgesamt $n = 5$ Mal durchgeführt, bis auf die Kombinationen mit 2 mM Koffein, welche $n = 4$ Mal durchgeführt wurden.

SAS-Zellen wurden zuerst getrennt mit Koffein oder Bestrahlung behandelt. Für die unbehandelte Kontrolle wurde ein Ausgangswert von 3,8 % apoptotischen Zellen beobachtet. Mit Bestrahlung alleine wurde eine maximale Apoptose bei 5 Gy von 5,8 % und mit Koffein alleine bei 5 mM von 9,3 % erreicht. (siehe unten, Tabelle 6) Abbildung 17 zeigt die Effekte von alleiniger Bestrahlung bzw. Koffeinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in SAS-Zellen.

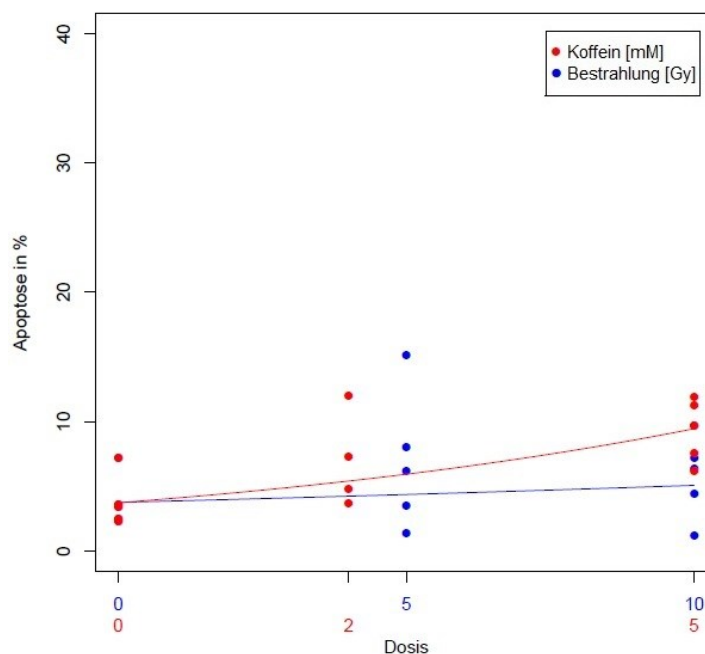


Abbildung 17: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V
Die Punkte repräsentieren die Einzelversuche, sie sind durch Trendlinien verbunden

Es wurde der paarweise Vergleich der Randmittelwerte der Effekte der einzelnen Dosen innerhalb einer Behandlung auf die Apoptose vorgenommen. Dabei wurde beobachtet, dass die Unterschiede der Apoptose zwischen 5 und 10 Gy bei Bestrahlung und 0 und 2 mM bei Koffein mit 1 % bzw. 3,1 % eher gering und nicht signifikant waren. Die restlichen Werte (0 vs. 5 bzw. 10 Gy, 5 vs. 0 bzw. 2 mM Koffein) unterschieden sich hingegen signifikant voneinander. (siehe Tabelle 4)

Für die Einzelgruppenvergleiche, denen wie bereits beschrieben geringere Fallzahlen zugrunde liegen als den Randmittelwertvergleichen, ließ sich feststellen, dass sich die Werte sowohl innerhalb der Bestrahlungs- als auch der Koffeinbehandlung bis auf eine Ausnahme bei 0 vs. 5 mM Koffein nicht signifikant unterscheiden (siehe Tabelle 5).

	n	paarweiser Vergleich (gemittelt über alle Koffein- bzw. Strahlendosen)	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	14 vs. 14	0 Gy vs. 5 Gy	3,0	[-5,7;-1,5]	0,036
	14 vs. 14	0 Gy vs. 10 Gy	2,0	[-5,7;-1,8]	0,034
	14 vs. 14	5 Gy vs. 10 Gy	1,0	[-2,8;2,8]	1,000
Koffein	15 vs. 12	0 mM vs. 2 mM	3,1	[-5,1;0,6]	0,159
	15 vs. 15	0 mM vs. 5 mM	5,5	[-9,7;-4,3]	0,001
	12 vs. 15	2 mM vs. 5 mM	2,4	[-7,6;-1,9]	0,001

Tabelle 4: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V
Statistisch nicht signifikante Werte sind in rot dargestellt

	n	paarweiser Vergleich (Einzelgruppen) Bestrahlung[Gy] + Koffein[mM]	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	5 vs. 5	0 + 0 vs. 5 + 0	3,0	[-6,8;0,8]	0,115
	5 vs. 5	0 + 0 vs. 10 + 0	2,0	[-5,8;1,8]	0,300
	5 vs. 5	5 + 0 vs. 10 + 0	1,0	[-2,8;4,9]	0,574
Koffein	5 vs. 4	0 + 0 vs. 0 + 2	3,1	[-7,2;0,9]	0,122
	5 vs. 5	0 + 0 vs. 0 + 5	5,5	[-9,3;-1,7]	0,006
	4 vs. 5	0 + 2 vs. 0 + 5	2,4	[-6,4;1,7]	0,245

Tabelle 5: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Betrachtet man nun die Kombination der beiden Behandlungen, stellt man bei maximalen Dosen von Bestrahlung und Koffein mit 14,8 % einen deutlich stärkeren Effekt auf die Apoptose fest als bei der Behandlung mit Bestrahlung (6,8 %) oder Koffein (9,3 %) alleine (siehe Tabelle 6).

n	Bestrahlung [Gy]	Koffein [mM]	Apoptose [%] Spannweite (min – max) [%]
5	0	0	3,8 (2,31 – 7,20)
5	5	0	6,8 (1,34 – 15,16)
5	10	0	5,8 (1,16 – 9,69)
4	0	2	6,9 (3,7 – 11,99)
5	0	5	9,3 (6,11 – 11,89)
4	5	2	8,3 (4,64 – 13,88)
5	5	5	13,4 (8,70 – 20,29)
4	10	2	8,0 (6,21 – 10,49)
5	10	5	14,8 (7,10 – 21,22)

Tabelle 6: Effekte von Bestrahlung und Koffein einzeln und in Kombination auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Die folgenden Abbildungen zeigen die graphische Darstellung der Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose. Im 3D-Plot in Abbildung 18 werden die Mittelwerte für die einzelnen Kombinationen im dreidimensionalen Koordinatensystem aufgetragen und zu einer Fläche verbunden. Abbildung 19 und Abbildung 1920 zeigen Liniendiagramme und *Boxplots* der Behandlungseffekte. Man sieht, dass sowohl mit steigender Koffein- als auch Strahlendosis die Apoptose zunimmt und die Kombination von beidem das größte Ausmaß an Apoptose hervorruft.

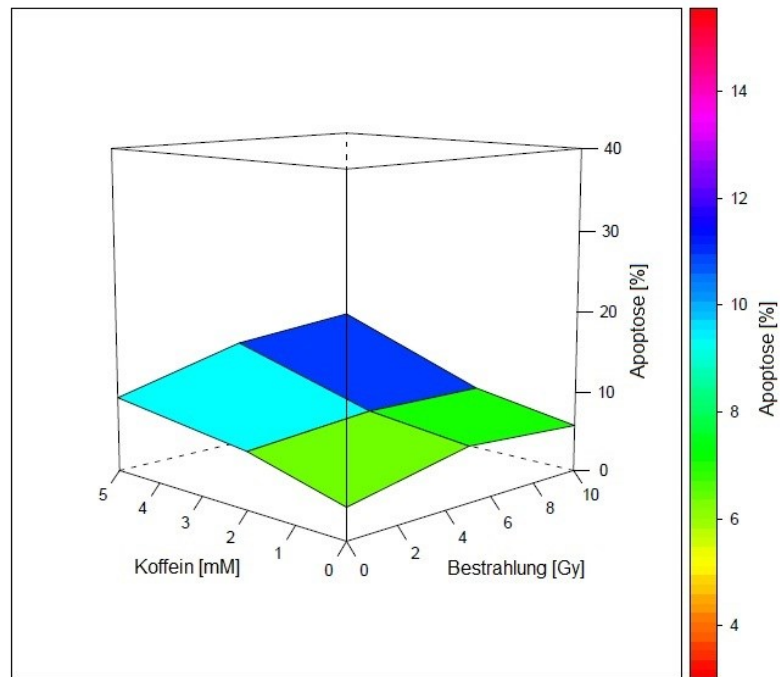


Abbildung 18: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V
Die Farbskala repräsentiert das prozentuale Ausmaß apoptotischer Zellen

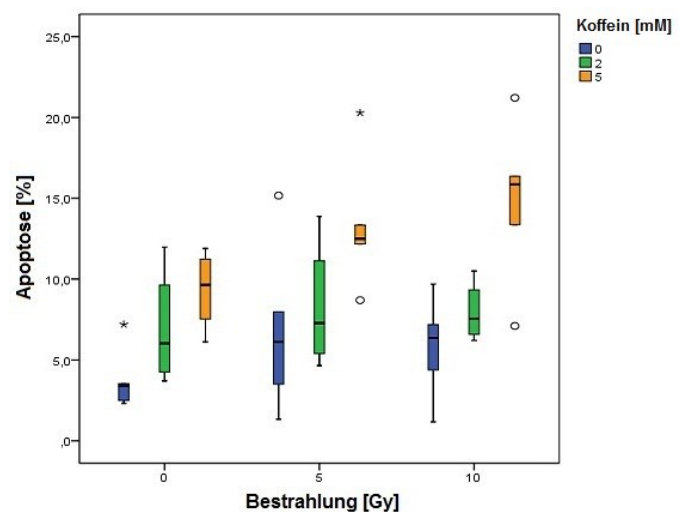
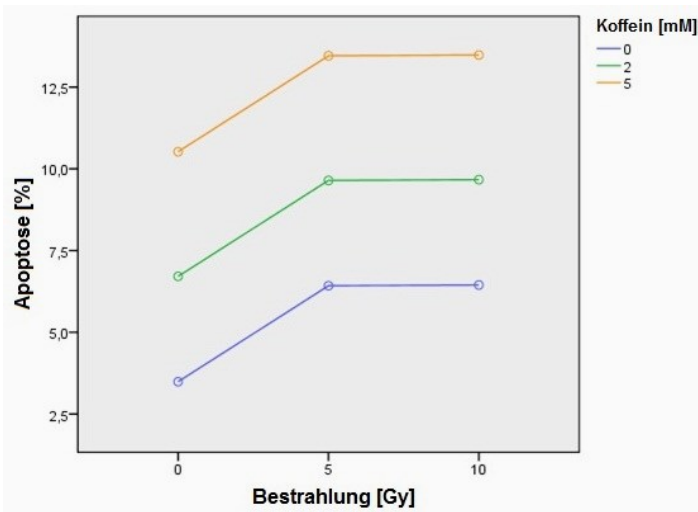


Abbildung 19: Liniendiagramm
und Abbildung 20: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Abbildung 21 zeigt die Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose unter Berücksichtigung der einzelnen Versuchstage, welche auf Grund ihrer Streuung als Confoundervariablen in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden.

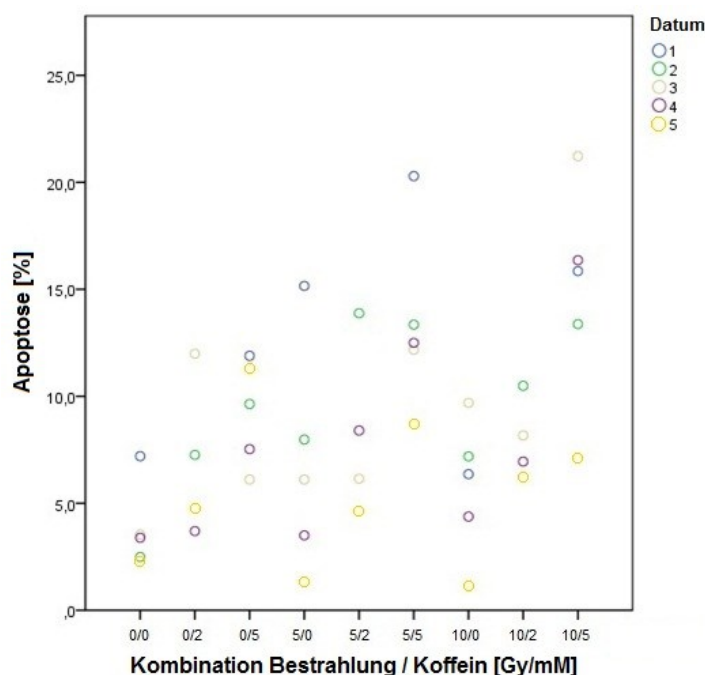


Abbildung 21: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Im paarweisen Einzelgruppenvergleich der Apoptosewerte von Zellen, die nur bestrahlt wurden mit Zellen, die zusätzlich mit Koffein behandelt wurden, ließ sich sowohl bei 5 als auch bei 10 Gy ein signifikanter Zuwachs an apoptotischen Zellen bei der Zugabe von 5 mM Koffein feststellen. Die Zugabe von 2 mM Koffein hingegen hatte sowohl bei 5 als auch bei 10 Gy Bestrahlung keinen signifikanten Zuwachs apoptotischer Zellen zur Folge. Weiter war der Unterschied zwischen 5 und 10 Gy Bestrahlung mit jeweils gleicher Koffeinzugabe nicht signifikant (siehe Tabelle 7).

n	Kombinationen von Bestrahlung [Gy] + Koffein [mM] paarweiser Vergleich	Differenz [%]	KI	p-Wert
5 vs. 4	5 + 0 vs. 5 + 2	1,5	[-5,5;2,6]	0,47
5 vs. 5	5 + 0 vs. 5 + 5	6,6	[-10,4;-2,8]	0,001
5 vs. 4	10 + 0 vs. 10 + 2	2,2	[-6,2;1,9]	0,276
5 vs. 5	10 + 0 vs. 10 + 5	9,0	[-12,8;-5,2]	< 0,001
4 vs. 4	5 + 2 vs. 10 + 2	0,3	[-4,0;4,6]	0,882
5 vs. 5	5 + 5 vs. 10 + 5	1,4	[-5,2;2,4]	0,466

Tabelle 7: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Betrachtet man die Interaktion von Bestrahlung und Koffein, ließ sich im Contourplot feststellen, dass die Höhenlinien nahezu in Geraden verlaufen. Für die Kombination

der Behandlung mit Bestrahlung und Koffein konnte hier also kein strahlensensibilisierender Effekt beobachtet werden, hingegen ist von einem additiven Effekt auszugehen (siehe Abbildung 22).

Unterstützt wurde dies von dem statistischen Test auf Interaktion, welcher mit $p = 0,527$ nicht signifikant war und somit auf eine Interaktion im Sinne von supraadditiven Effekten nicht hinwies.

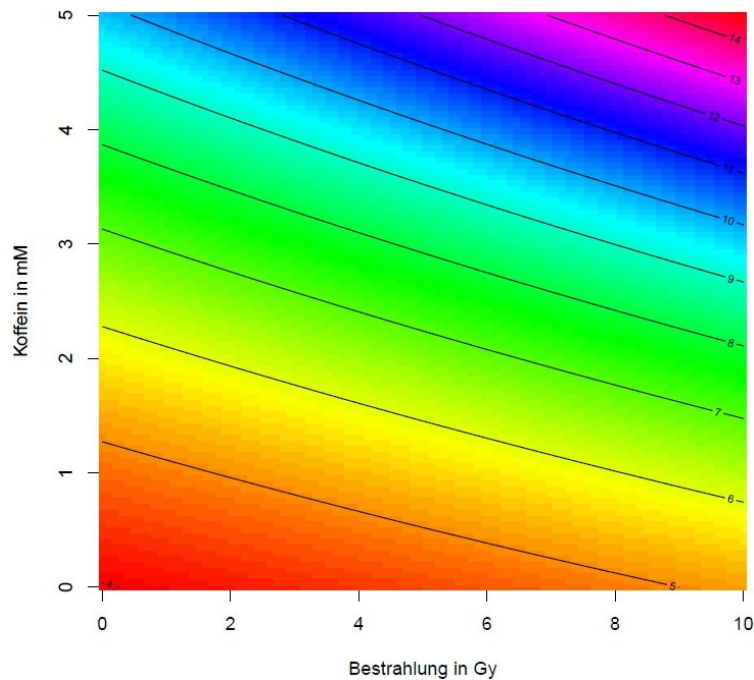


Abbildung 22: Contourplot der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

5.1.2 Apoptosenachweis mittels Caspase-3

Die Versuche mit der Zelllinie SAS und dem Apoptosetest durch die Caspase-3 wurden alle insgesamt $n = 5$ Mal durchgeführt.

Die beiden Behandlungen Bestrahlung und Koffein werden zunächst einzeln betrachtet. Die Apoptose der unbehandelten Kontrolle lag hier bei 3,4 %, maximale Apoptose bei 10,8 % nach Bestrahlung mit 10 Gy und bei 7,6 % nach Zugabe von 5 mM Koffein (siehe unten, Tabelle 10).

Abbildung 23 zeigt die Effekte von alleiniger Bestrahlung bzw. Koffeinbehandlung auf die Apoptose. Man sieht, dass die Apoptose mit zunehmenden Strahlen- und Koffeindosen zunimmt.

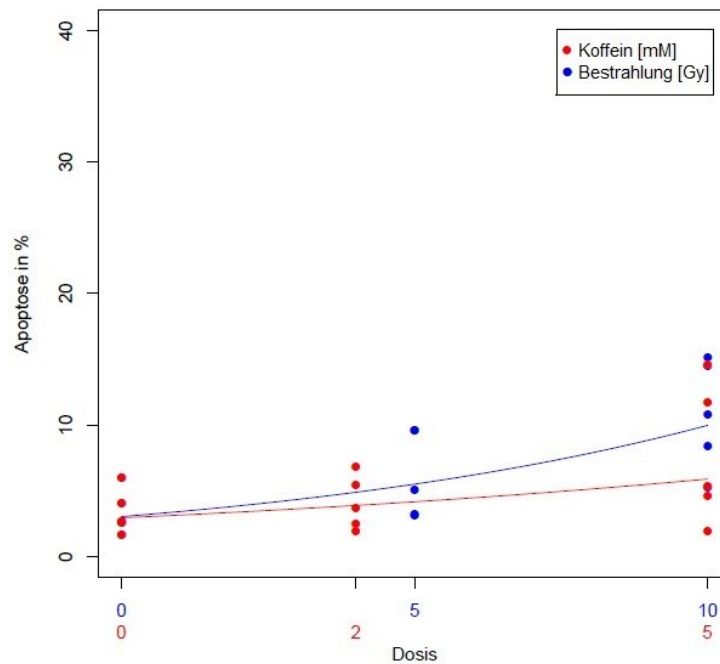


Abbildung 23: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Beim paarweisen Randmittelwertvergleich der verschiedenen Dosen und der entsprechenden Apoptose der einzelnen Behandlungen untereinander waren die Unterschiede im Effekt bei der Bestrahlung für alle Kombinationen recht deutlich und auch signifikant. Bei der Behandlung mit Koffein betrug der Unterschied zwischen 0 und 2 mM Koffein nur 0,7 % und war nicht signifikant (siehe Tabelle 8).

Mit dem Einzelgruppenvergleich konnte bis auf die Bestrahlung mit 10 Gy kein signifikanter Anstieg der Apoptose nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9).

	n	paarweiser Vergleich (gemittelt über alle Koffein- bzw. Strahlendosen)	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	15 vs. 15	0 Gy vs. 5 Gy	2,7	[-11,3;-2,0]	0,003
	15 vs. 15	0 Gy vs. 10 Gy	7,4	[-16,5;-7,2]	0,001
	15 vs. 15	5 Gy vs. 10 Gy	4,7	[-9,8;-0,5]	0,025
Koffein	15 vs. 15	0 mM vs. 2 mM	0,7	[-7,8;1,5]	0,300
	15 vs. 15	0 mM vs. 5 mM	4,2	[-14,7;-5,4]	0,001
	15 vs. 15	2 mM vs. 5 mM	3,5	[-11,6;-2,3]	0,002

Tabelle 8: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

	n	paarweiser Vergleich (Einzelgruppen) Bestrahlung[Gy] + Koffein[mM]	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	5 vs. 5	0 + 0 vs. 5 + 0	2,7	[-9,0;3,5]	0,379
	5 vs. 5	0 + 0 vs. 10 + 0	7,4	[-13,7;-1,2]	0,022
	5 vs. 5	5 + 0 vs. 10 + 0	4,7	[-10,9;1,6]	0,138
Koffein	5 vs. 5	0 + 0 vs. 0 + 2	0,7	[-6,9;5,6]	0,826
	5 vs. 5	0 + 0 vs. 0 + 5	4,2	[-10,5;2,0]	0,175
	5 vs. 5	0 + 2 vs. 0 + 5	3,5	[-9,8;2,7]	0,253

Tabelle 9: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Für die kombinierte Anwendung von Bestrahlung und Koffein war das höchste Ausmaß an Apoptose mit 22,7 % bei den jeweils maximalen Dosen von 10 Gy und 5 mM deutlich höher als für die einzelne Anwendung von Bestrahlung (10,8 %) und Koffein (7,6 %) (siehe Tabelle 10).

n	Bestrahlung [Gy]	Koffein [mM]	Apoptose [%] Spannweite (min – max) [%]
5	0	0	3,4 (1,66 – 6,01)
5	5	0	6,1 (3,12 – 9,61)
5	10	0	10,8 (5,20 – 15,09)
5	0	2	4,1 (1,87 – 6,82)
5	0	5	7,6 (1,93 – 14,57)
5	5	2	8,6 (5,46 – 16,62)
5	5	5	20,2 (7,28 – 36,72)
5	10	2	17,0 (8,8 – 29,87)
5	10	5	22,7 (15,77- 25,76)

Tabelle 10: Effekte von Bestrahlung und Koffein einzeln und in Kombination auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

In den folgenden Abbildungen zeigt die graphische Darstellung der Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose im 3D-Plot (Abbildung 24), im Liniendiagramm (

Abbildung 25) und in *Boxplots* (und Abbildung 26) dass sowohl mit steigender Koffein- als auch Strahlendosis die Apoptose zunimmt und die Kombination von beidem das größte Ausmaß an Apoptose hervorruft.

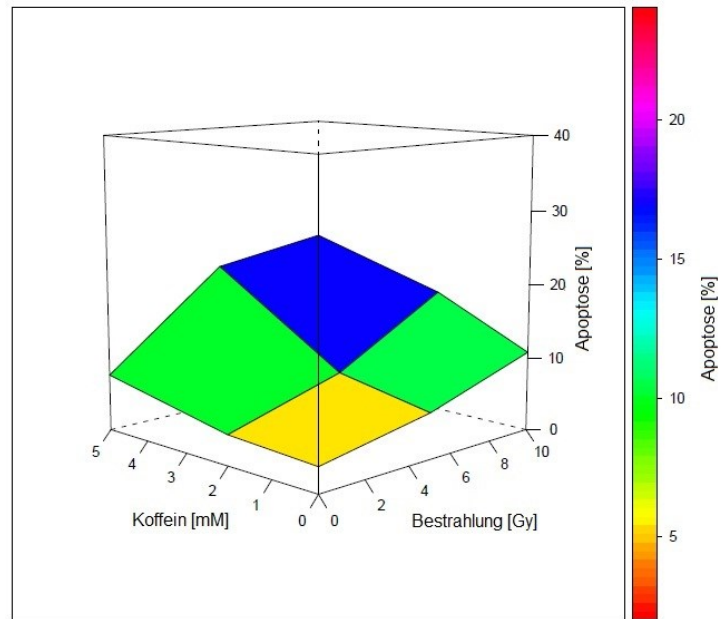


Abbildung 24: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

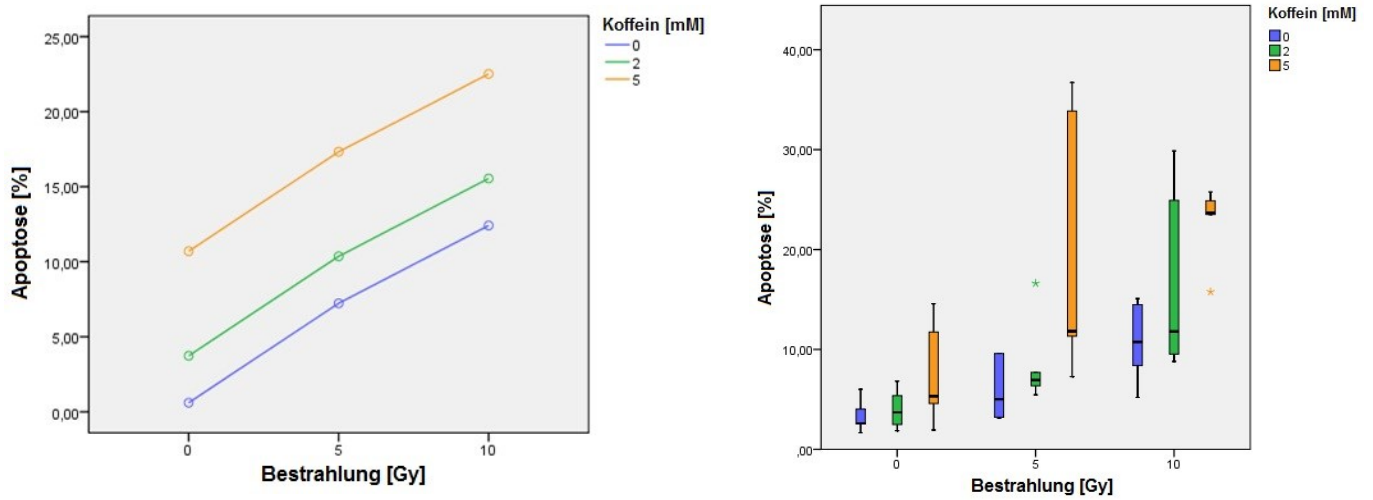


Abbildung 25: Liniendiagramm und Abbildung 26: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Abbildung 27 zeigt die Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose mit Darstellung der Streuung der einzelnen Versuchstage.

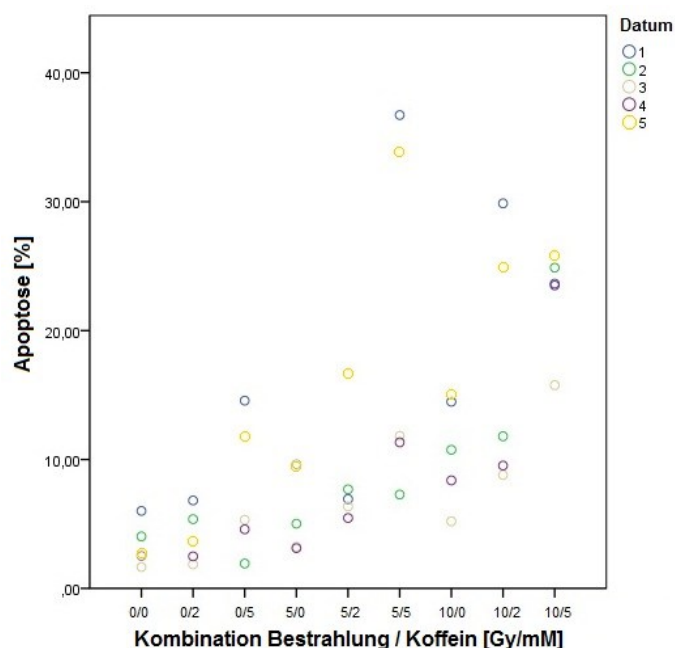


Abbildung 27: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Es wurde der paarweise Vergleich der Einzelgruppen von Zellen, welche mit alleiniger Bestrahlung behandelt wurden, mit Zellen, die mit einer Kombination aus Bestrahlung und Koffein behandelt wurden, durchgeführt. Er zeigte, dass die Zugabe von 5 mM Koffein zu mit 5 oder 10 Gy bestrahlten Zellen einen deutlichen, signifikanten Zuwachs an Apoptose im Vergleich zur alleinigen Strahlenbehandlung hervorrief. Die Zugabe von 2 mM Koffein zu mit 5 und 10 Gy bestrahlten Zellen rief jedoch im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung nur einen geringen, nicht signifikanten Apoptoseanstieg hervor. Der Vergleich von 5 und 10 Gy in Kombination mit jeweils gleicher Koffeindosis zeigte einen signifikanten Unterschied mit 2 mM Koffein, jedoch nicht mit 5 mM Koffein (siehe Tabelle 11).

n	Kombination von Bestrahlung [Gy] + Koffein [mM] paarweiser Vergleich	Differenz [%]	KI	p-Wert
5 vs. 5	5 + 0 vs. 5 + 2	2,5	[-8,8;3,8]	0,421
5 vs. 5	5 + 0 vs. 5 + 5	14,1	[-20,4;-7,8]	< 0,001
5 vs. 5	10 + 0 vs. 10 + 2	6,2	[-12,5;0,1]	0,052
5 vs. 5	10 + 0 vs. 10 + 5	11,9	[-18,2;-5,7]	< 0,001
5 vs. 5	5 + 2 vs. 10 + 2	8,4	[-14,6;-2,1]	0,010
5 vs. 5	5 + 5 vs. 10 + 5	2,5	[-8,8;3,7]	0,420

Tabelle 11: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Die Untersuchung auf Interaktion von Bestrahlung und Koffein ergab ein mit $p = 0,147$ nicht signifikantes Ergebnis. Im Contourplot sind Geraden als Höhenlinien zu sehen. Deshalb ist auch hier von additiven Effekten der beiden Behandlungen auf die Apoptoserate auszugehen. Es besteht kein Hinweis auf supraadditive Effekte (siehe Abbildung 28).

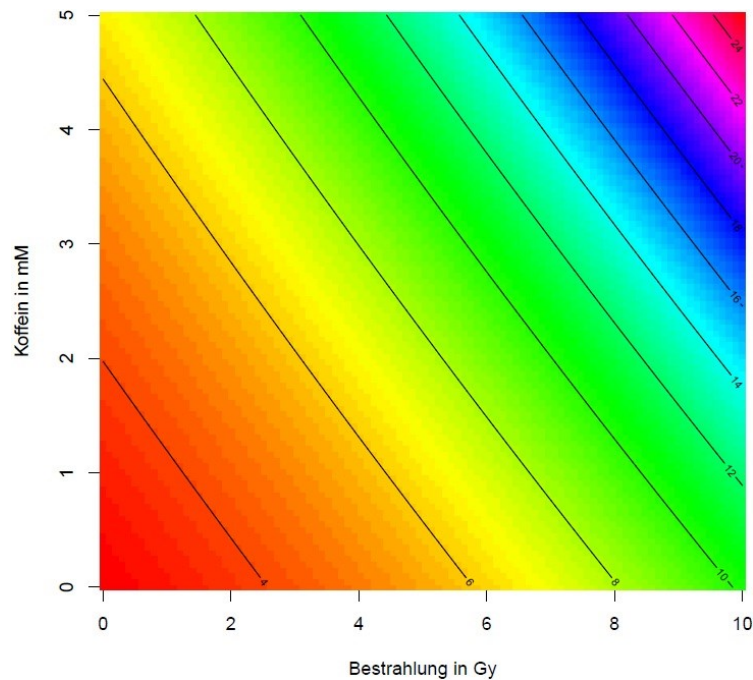


Abbildung 28: Contourplot der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

5.2 Effekt von Koffein und Bestrahlung auf die Zelllinie XF354

5.2.1 Apoptosenachweis mittels Annexin-V

Bei den Versuchen mit der Zelllinie XF354 und dem Apoptosetest mit Annexin-V handelt es sich um insgesamt $n = 4$ Versuchsdurchführungen, ausgenommen der Kombinationen mit 2 mM Koffein welche $n = 3$ Mal durchgeführt wurden.

Die XF354-Zellen wurden zunächst getrennt mit Bestrahlung und Koffein behandelt. Für die Apoptose wurde anhand der unbehandelten Kontrolle ein Ausgangswert von 5,0 % ermittelt. Maximale Apoptosewerte erreichte die alleinige Bestrahlung bei 10 Gy mit 7,4 %. Der Unterschied zu 5 Gy, womit 7,1 % Apoptose erreicht wurden, ist allerdings eher gering. Die alleinige Anwendung von Koffein erreicht maximale Apoptosewerte bei Zugabe von 5 mM mit 11,0 % (siehe unten, Tabelle 14).

Abbildung 29 zeigt die Effekte von alleiniger Bestrahlung bzw. Koffeinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in XF354-Zellen. Die Apoptose nimmt mit zunehmenden Strahlen- und Koffeindosen zu.

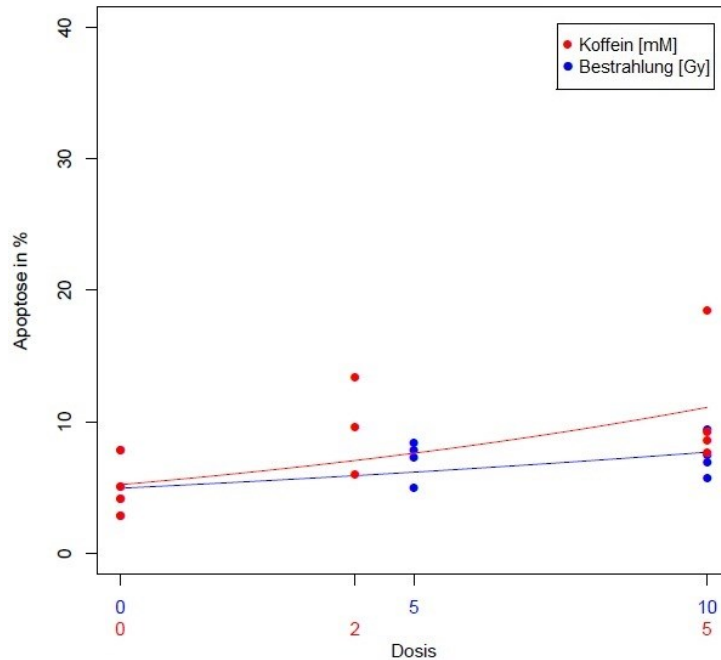


Abbildung 29: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Beim paarweisen Vergleich der Randmittelwerte der einzelnen Dosen mit entsprechender Apoptose untereinander innerhalb einer Behandlung war mit 2,1 % Unterschied die Differenz zwischen 0 und 5 Gy knapp nicht signifikant. Mit 0,3 % Unterschied deutlich nicht signifikant war die Differenz zwischen 5 und 10 Gy. Der Anstieg apoptotischer Zellen zwischen 0 und 10 Gy war jedoch signifikant erhöht. Die Effekte innerhalb der Behandlung mit Koffein waren beim Vergleich der Dosen und deren Apoptose alle signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 12).

Mit dem paarweisen Einzelgruppenvergleich ließ sich zwischen den einzelnen Bestrahlungsdosen kein signifikanter Anstieg der Apoptose feststellen. Beim Vergleich der Koffeindosen war jedoch bis auf den Vergleich zwischen 2 und 5 mM Koffein ein signifikanter Apoptoseanstieg zu erkennen (siehe Tabelle 13).

	n	paarweiser Vergleich (gemittelt über alle Koffein- bzw. Strahlendosen)	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	11 vs. 11	0 Gy vs. 5 Gy	2,1	[-5,6;0,02]	0,052
	11 vs.11	0 Gy vs. 10 Gy	2,4	[-6,3;-0,7]	0,012
	11 vs.11	5 Gy vs. 10 Gy	0,3	[-3,5;2,2]	1,000
Koffein	12 vs. 9	0 mM vs. 2 mM	4,6	[-7,3;-1,5]	0,002
	12 vs.12	0 mM vs. 5 mM	6,0	[-10,5;-5,1]	0,001
	9 vs. 12	2 mM vs. 5 mM	1,4	[-6,3;-0,5]	0,019

Tabelle 12: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

	n	paarweiser Vergleich (Einzelgruppen) Bestrahlung[Gy] + Koffein[mM]	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	4 vs. 4	0 + 0 vs. 5 + 0	2,1	[-6,1;1,8]	0,269
	4 vs. 4	0 + 0 vs. 10 + 0	2,4	[-6,4;1,5]	0,209
	4 vs. 4	5 + 0 vs. 10 + 0	0,3	[-4,2;3,6]	0,875
Koffein	4 vs. 3	0 + 0 vs. 0 + 2	4,6	[-8,9;-0,4]	0,033
	4 vs. 4	0 + 0 vs. 0 + 5	6,0	[-9,9;-2,1]	0,005
	3 vs. 4	0 + 2 vs. 0 + 5	1,4	[-5,6;2,9]	0,512

Tabelle 13: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Die Kombination von Bestrahlung und Koffeinzugabe bewirkte eine maximale Apoptose von 16,3 % unter Behandlung mit 10 Gy und 5 mM Koffein und war damit deutlich höher als die alleinige Anwendung einer der beiden Substanzen (7,4 % bzw. 11,0%) (siehe Tabelle 14).

n	Bestrahlung [Gy]	Koffein [mM]	Apoptose [%] Spannweite (min – max) [%]
4	0	0	5,0 (2,84 – 7,82)
4	5	0	7,1 (4,96 – 8,38)
4	10	0	7,4 (5,72 – 9,35)
3	0	2	9,6 (5,94 – 13,34)
4	0	5	11,0 (7,67 – 18,43)
3	5	2	11,1 (9,57 – 13,11)
4	5	5	15,5 (11,90 – 20,10)
3	10	2	11,9 (8,20 – 17,35)
4	10	5	16,3 (11,87 – 24,60)

Tabelle 14: Effekte von Bestrahlung und Koffein einzeln und in Kombination auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Die folgenden Graphiken zeigen die Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose: 3D-Plot (Abbildung 30), Liniendiagramm (Abbildung 31) und Boxplots (und Abbildung 32) zeigen, dass sowohl mit steigender Koffein- als auch Strahlendosis die Apoptose zunimmt und dass die Kombination von beidem das maximale Ausmaß an Apoptose hervorruft.

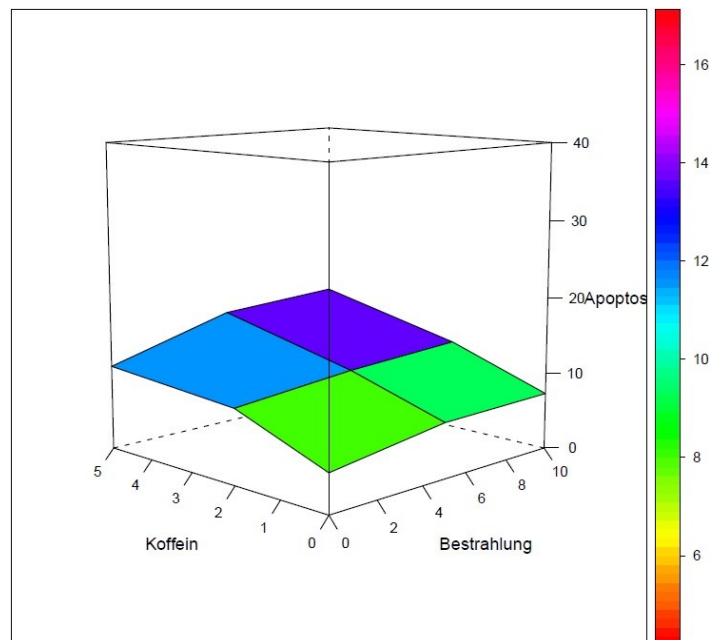


Abbildung 30: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

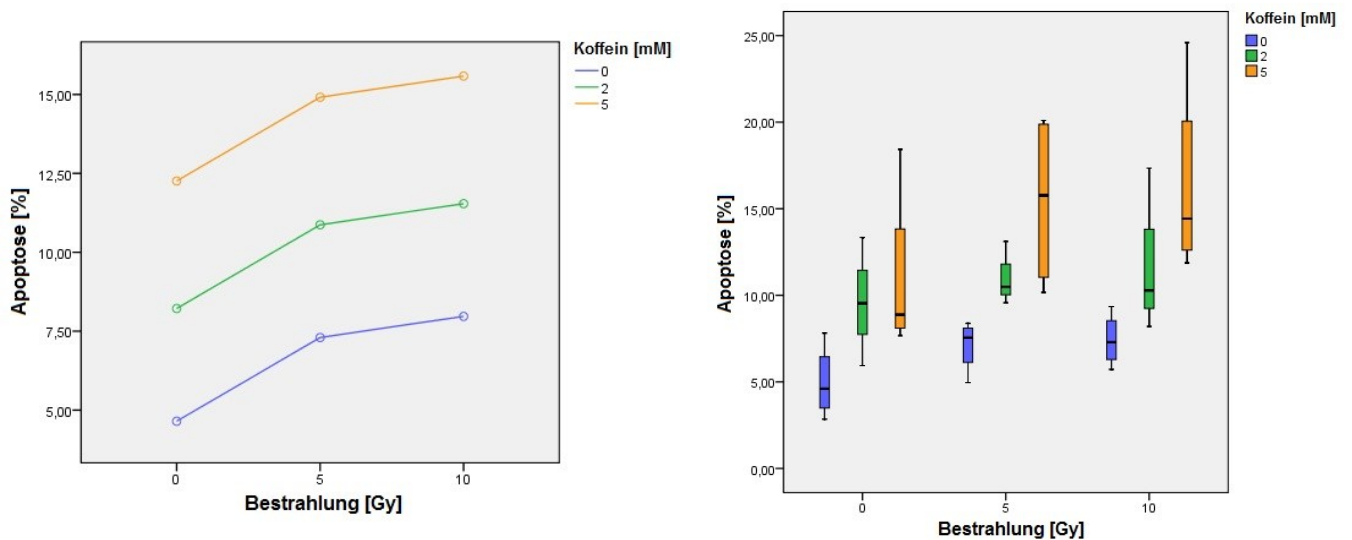


Abbildung 31: Liniendiagramm und Abbildung 32: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Abbildung 33 zeigt die Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose unter Berücksichtigung der einzelnen Versuchstage, deren Streuung dargestellt ist.

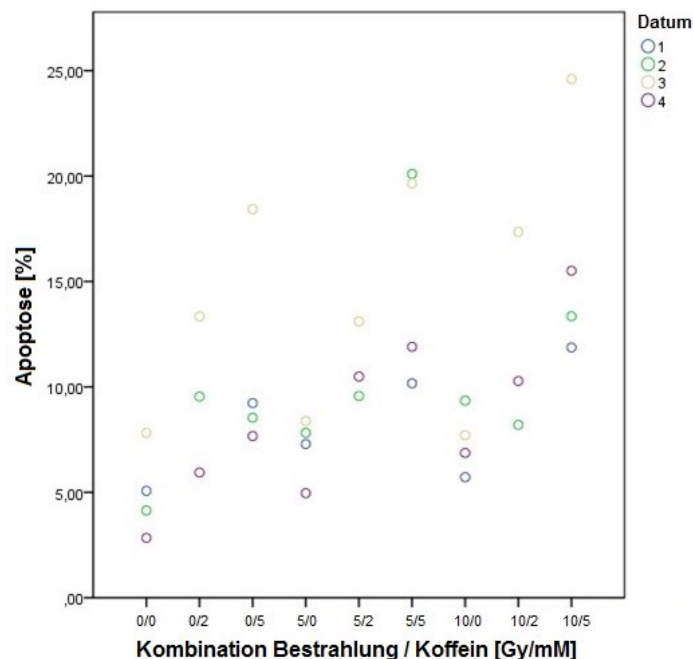


Abbildung 33: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Anhand des paarweisen Einzelgruppenvergleiches ließ sich feststellen, dass die Kombination von Bestrahlung und Koffein im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung einen signifikanten Zuwachs der Apoptose bewirkte, lediglich für die Zugabe von

2 mM Koffein zu einer Bestrahlung mit 5 Gy ließ sich im Vergleich mit der alleinigen Bestrahlung mit 5 Gy kein signifikanter Anstieg der Apoptose feststellen. Der Vergleich von 5 mit 10 Gy mit jeweils gleicher Koffeinzugabe zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der Apoptosezunahme (Tabelle 15).

n	Kombinationen von Bestrahlung [Gy] + Koffein [mM] paarweiser Vergleich	Differenz [%]	KI	p-Wert
4 vs. 3	5 + 0 vs. 5 + 2	4,0	[-8,2;0,3]	0,067
4 vs. 4	5 + 0 vs. 5 + 5	8,3	[-12,3;-4,4]	0,000
4 vs. 3	10 + 0 vs. 10 + 2	4,5	[-8,8;-0,3]	0,037
4 vs. 4	10 + 0 vs. 10 + 5	8,9	[-12,8;-5,0]	0,000
3 vs. 3	5 + 2 vs. 10 + 2	0,8	[-5,4;3,6]	0,688
4 vs. 4	5 + 5 vs. 10 + 5	0,8	[-4,8;3,0]	0,647

Tabelle 15: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

Die Betrachtung der Interaktion von Bestrahlung und Koffeinanwendung anhand des Contourplots legte einen additiven Effekt der beiden Behandlungen auf die Apoptose nahe, da es sich bei den Höhenlinien um Geraden handelt. Ein strahlensensibilisierender Effekt zeigte sich hier nicht (siehe Abbildung 34). Dies bestätigte der statistische Test auf Interaktion, welcher mit $p = 0,686$ nicht signifikant war.

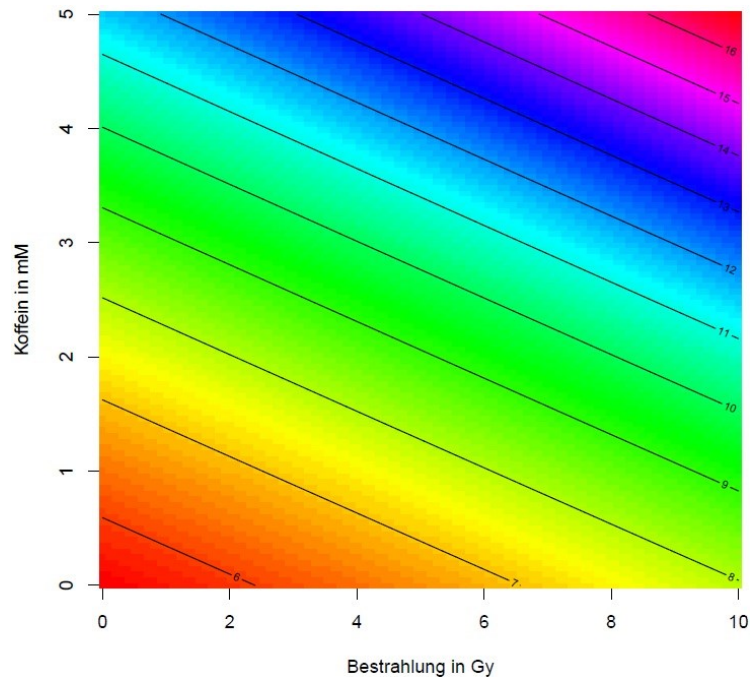


Abbildung 34: Contourplot der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V

5.2.2 Apoptosenachweis mittels Caspase-3

Die Versuche mit der Zelllinie XF354 und der Apoptosetestung anhand von Caspase-3 wurden insgesamt $n = 5$ Mal wiederholt.

Die beiden Behandlungen Bestrahlung und Koffeingabe werden zunächst getrennt betrachtet. Als Wert für vorhandene Apoptose in der unbehandelten Kontrolle wurde bei diesem Versuch 5 % beobachtet, maximale Werte wurden hier durch Bestrahlung bei 10 Gy mit 19,6 % und durch Koffeinzugabe bei 5 mM mit 15,7 % erreicht (siehe unten, Tabelle 18).

Abbildung 35 zeigt die Effekte von alleiniger Bestrahlung bzw. Koffeinbehandlung auf die Apoptose der XF354-Zellen. Man sieht, dass die Apoptose mit zunehmenden Strahlen- und Koffeindosen zunimmt.

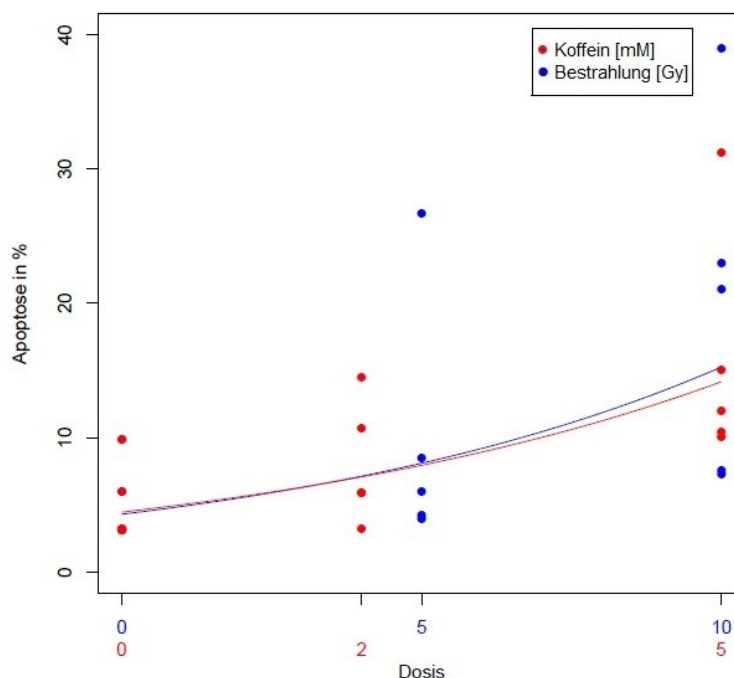


Abbildung 35: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Beim paarweisen Randmittelwertvergleich der Effekte auf die Apoptose durch verschiedene Dosen innerhalb einer Behandlungsform waren diese deutlich und signifikant unterschiedlich. Ausgenommen war die Differenz von 0 zu 2 mM Koffein, welche mit 3,9 % keine signifikante Änderung der Apoptose darstellte (siehe Tabelle 16).

Im Einzelgruppenvergleich ließ sich für die Bestrahlungsdosen nur mit 10 Gy ein signifikanter Unterschied zu 0 und 5 Gy erzielen, in der Koffeingruppe war nur der Unterschied zwischen 0 und 5 mM Koffein signifikant (siehe Tabelle 17).

	n	paarweiser Vergleich (gemittelt über alle Koffein- bzw. Strahlendosen)	Differenz Apoptose [%]	95%-KI	p-Wert
Bestrahlung	15 vs. 15	0 Gy vs. 5 Gy	4,9	[-16,3;-1,5]	0,014
	15 vs. 15	0 Gy vs. 10 Gy	14,6	[-28,3;-13,6]	0,001
	15 vs. 15	5 Gy vs. 10 Gy	9,7	[-19,4;-4,7]	0,001
Koffein	15 vs. 15	0 mM vs. 2 mM	3,9	[-13,0;1,7]	0,179
	15 vs. 15	0 mM vs. 5 mM	10,7	[-23,3;-8,5]	0,001
	15 vs. 15	2 mM vs. 5 mM	6,9	[-17,6;-2,9]	0,004

Tabelle 16: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

	n	paarweiser Vergleich (Einzelgruppen) Bestrahlung[Gy] + Koffein[mM]	Differenz Apoptose [%]	KI	p-Wert
Bestrahlung	5 vs. 5	0 + 0 vs. 5 + 0	4,9	[-14,0;4,3]	0,293
	5 vs. 5	0 + 0 vs. 10 + 0	14,6	[-23,7;-5,4]	0,003
	5 vs. 5	5 + 0 vs. 10 + 0	9,7	[-18,9;-0,6]	0,038
Koffein	5 vs. 5	0 + 0 vs. 0 + 2	3,9	[-12,1;6,2]	0,515
	5 vs. 5	0 + 0 vs. 0 + 5	10,7	[-19,8;-1,5]	0,024
	5 vs. 5	0 + 2 vs. 0 + 5	6,9	[-16,9;1,4]	0,096

Tabelle 17: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung von Bestrahlung und Koffein zeigten im Vergleich zur Einzelbehandlung (19,6 % bzw. 15,7 %) einen beträchtlichen Anstieg apoptotischer Zellen, maximal ausgeprägt unter der Kombination von 10 Gy und 5 mM Koffein mit 32,1 % (siehe Tabelle 18).

n	Bestrahlung [Gy]	Koffein [mM]	Apoptose [%] Spannweite (min – max) [%]
5	0	0	5,0 (3,13 – 9,84)
5	5	0	9,9 (3,94 – 26,66)
5	10	0	19,6 (7,25- 38,97)
5	0	2	8,9 (3,15 - 14,44)
5	0	5	15,7 (10,07 – 31,17)
5	5	2	11,4 (5,76 – 22,93)
5	5	5	28,5 (13,91 - 42,25)
5	10	2	29,5 (13,78 – 47,43)
5	10	5	32,1 (15,68 – 47,57)

Tabelle 18: Effekte von Bestrahlung und Koffein alleine und in Kombination auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Die folgenden Abbildungen zeigen die graphische Darstellung der Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose im 3D-Plot (Abbildung 36), Liniendiagramm (Abbildung 37) und in Boxplots (und Abbildung 38) der Behandlungseffekte. Sowohl steigende Koffein- als auch Strahlendosen bewirken

eine Zunahme der Apoptose, die Kombination von beidem rufen das größte Ausmaß an Apoptose hervor.

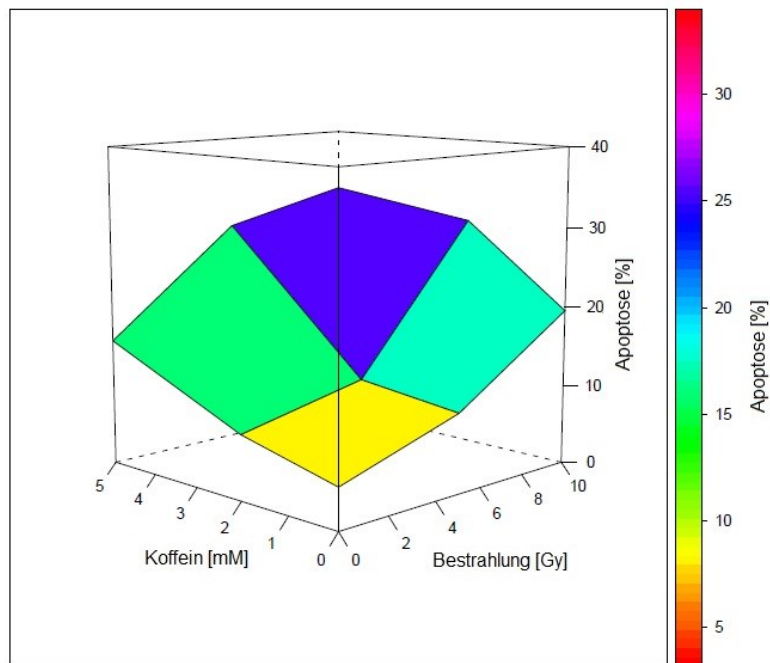


Abbildung 36: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

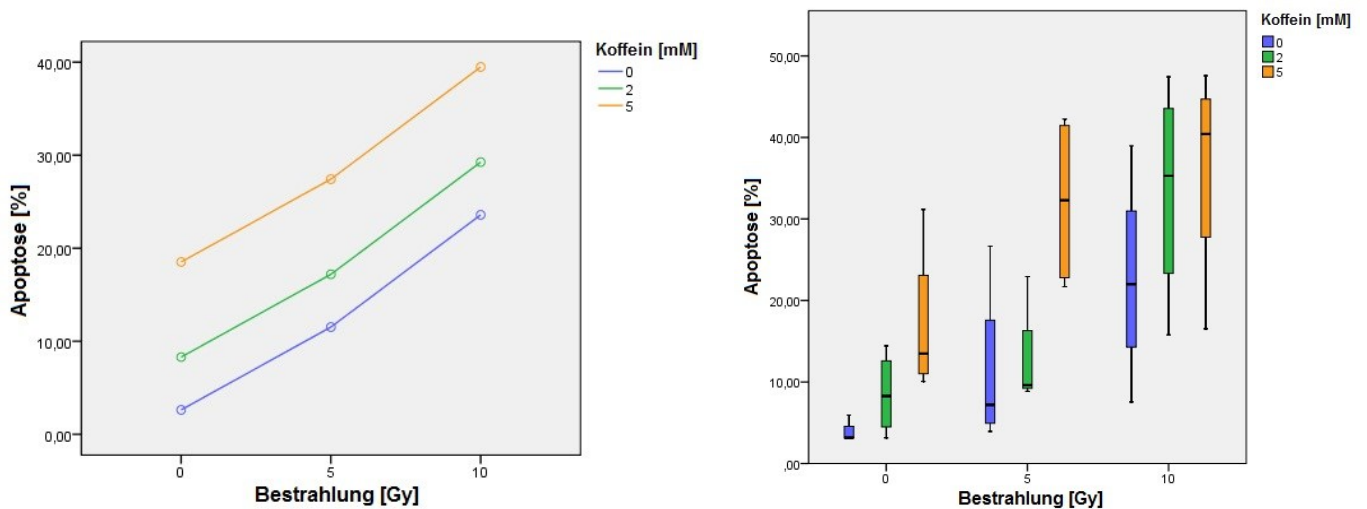


Abbildung 37: Liniendiagramm und Abbildung 38: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Abbildung 39 zeigt die Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose mit Darstellung der einzelnen Versuchstage und deren Streuung.

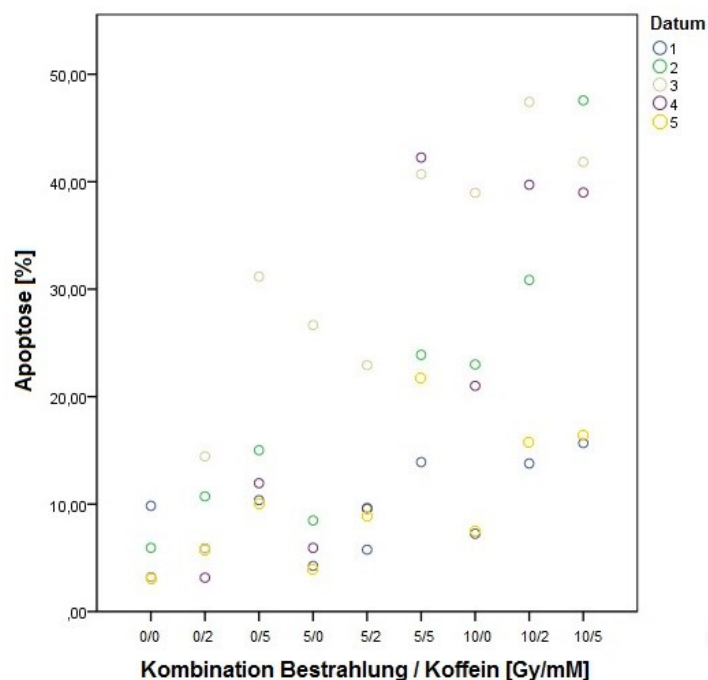


Abbildung 39: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Der Vergleich der Einzelgruppen zeigte einen signifikanten Anstieg der Apoptose zwischen der alleinigen Strahlenbehandlung und der Kombination von Bestrahlung mit Koffein. Ausgenommen hiervon war die Kombination von 5 Gy mit 2 mM Koffein, deren Apoptose sich nicht signifikant von der alleinigen Bestrahlung mit 5 Gy unterschied. Der Vergleich der Bestrahlungsdosen bei gleichen Koffeindosen zeigte einen signifikanten Unterschied bei 2 mM Koffein, jedoch nicht bei 5 mM Koffein (siehe Tabelle 19).

n	Kombination von Bestrahlung [Gy] + Koffein [mM] paarweiser Vergleich	Differenz [%]	95%-KI	p-Wert
5 vs. 5	5 + 0 vs. 5 + 2	1,5	[-10,7;7,6]	0,740
5 vs. 5	5 + 0 vs. 5 + 5	18,6	[-27,8;-9,5]	0,000
5 vs. 5	10 + 0 vs. 10 + 2	10,0	[-19,1;-0,8]	0,034
5 vs. 5	10 + 0 vs. 10 + 5	12,7	[-21,7;-3,4]	0,009
5 vs. 5	5 + 2 vs. 10 + 2	18,1	[-26,3;-8,0]	0,001
5 vs. 5	5 + 5 vs. 10 + 5	3,6	[-12,8;5,5]	0,424

Tabelle 19: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

Für die Beurteilung der Interaktion von Bestrahlung und Koffein ließ der Contourplot aufgrund der geraden Höhenlinien auf additive Effekte der beiden Behandlungen schließen (siehe Abbildung 40). Der Test auf Interaktion war mit $p = 0,200$ nicht signifikant und wies somit keine supraadditiven Effekte nach.

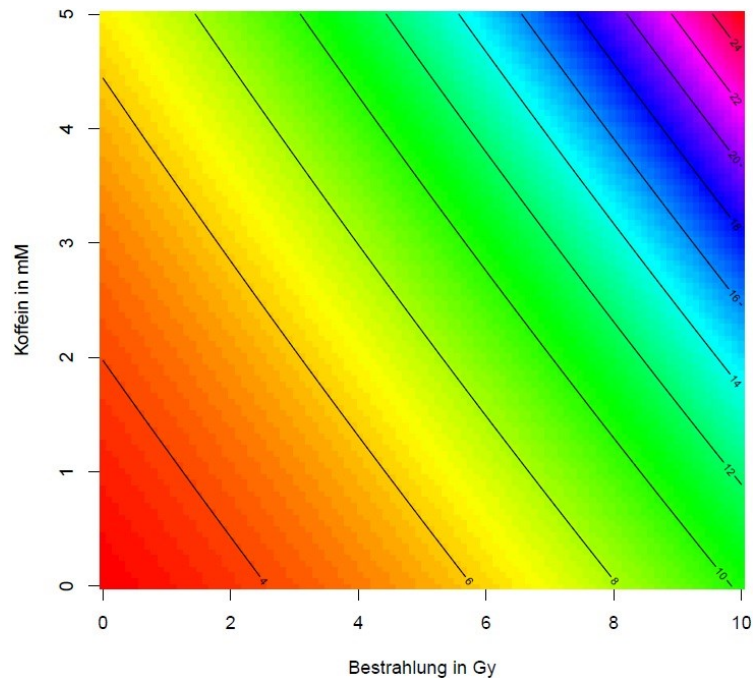


Abbildung 40: Contour-Modell der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3

5.3 Zusammenfassung

In der folgenden Übersicht (Tabelle 20) werden die maximalen Werte der Apoptoseinduktion in beiden Zelllinien sowie deren Differenz zum Kontrollwert dargestellt, so wie sie mit zwei Methoden (Annexin und Caspase 3) ermittelt wurden. Die beiden Behandlungen Bestrahlung und Koffein werden sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander betrachtet.

	SAS				XF354			
	Annexin-V		Caspase-3		Annexin-V		Caspase-3	
	Max. Apoptose [%]	Differenz zur Kontrolle	Max. Apoptose [%]	Differenz zur Kontrolle	Max. Apoptose [%]	Differenz zur Kontrolle	Max. Apoptose [%]	Differenz zur Kontrolle
Kontrolle	3,8	-	3,4	-	5,0	-	5,0	-
Bestrahlung	5,8	2,0	10,8	7,4	7,4	2,4	19,6	14,6
Koffein	9,3	5,5	7,6	4,2	11,0	6	15,7	10,7
Kombination	14,8	11,0	22,7	19,3	16,3	11,3	32,1	27,1

Tabelle 20: Übersicht über die maximale Apoptose der einzelnen und kombinierten Behandlungen

Für beide Zelllinien und für beide Behandlungen war der Anteil apoptotischer Zellen insgesamt im Caspase-3-Test tendenziell höher als im Annexin-V-Test (Differenzen zwischen 5 und 12,2%).

In der getrennten Betrachtung der beiden Behandlungen Bestrahlung bzw. Koffeingabe fällt auf, dass bei beiden Zelllinien im Annexin-V-Test die alleinige Koffeinzugabe mehr Apoptose hervorrief als die alleinige Bestrahlung (Differenz von 3,5% bzw. 3,6%), im Caspase-3-Test hingegen war es umgekehrt und die alleinige Bestrahlung bewirkte eine höhere Apoptose als die alleinige Koffeinzugabe (Differenz von 3,2% bzw. 3,9%).

Für die Kombination von Bestrahlung und Koffeinbehandlung fällt in der Übersicht über die maximalen Apoptose und die Differenzen zur Kontrolle ebenfalls auf, dass in beiden Zelllinien im Caspase-3-Test mehr Apoptose als im Annexin-V-Test erreicht wurde (Differenz von 7,9% bzw. 15,8%).

Die Apoptose in der Zelllinie XF354 war sowohl nach getrennter als auch nach kombinierter Behandlung mit Bestrahlung und Koffein höher als in der Zelllinie SAS (Differenzen zwischen 1,5% und 15,8 %). Im Caspase-3-Test zeigte sich das besonders deutlich.

Die Ergebnisse der beiden Apoptosetests bestätigen sich gegenseitig gut. Beide zeigen einen Anstieg der Apoptose bei Dosissteigerung von Bestrahlung und Koffein. Beide Tests zeigen, in unterschiedlichem Ausmaß, mehr Apoptose in der Zelllinie XF354, und in beiden Tests ist von einer additiven Wirkung von Bestrahlung und Koffein auszugehen.

Für den anhand der Randmittelwerte erhobenen paarweisen Vergleich der Apoptosedifferenzen im Bezug auf wechselnde Dosen innerhalb einer Behandlung lässt sich in der Übersicht feststellen, dass innerhalb der Bestrahlung tendenziell der Unterschied zwischen 5 und 10 Gy gering und nicht signifikant war. Innerhalb der Koffeinbehandlung war der Unterschied zwischen 0 und 2 mM eher gering und somit ebenfalls nicht signifikant. Die Paarvergleiche zwischen 0 und 5 Gy (Ausnahme: XF354, Annexin-V) und 0 und 10 Gy sowie zwischen 0 und 5 mM Koffein und 2 und 5 mM Koffein unterschieden sich hingegen stets signifikant voneinander (siehe Tabelle 21).

	Paarweiser Vergleich	SAS		XF354	
		Annexin-V Differenz [%] und p-Wert	Caspase-3 Differenz [%] und p-Wert	Annexin-V Differenz [%] und p-Wert	Caspase-3 Differenz [%] und p-Wert
Bestrahlung	0 Gy vs. 5 Gy	3,0 p = 0,036	2,7 p = 0,003	2,1 p = 0,052	4,9 p = 0,014
	0 Gy vs. 10 Gy	2,0 p = 0,034	7,4 p < 0,001	2,4 p = 0,012	14,6 p < 0,001
	5 Gy vs. 10 Gy	1,0 p = 1,000	4,7 p = 0,025	0,3 p = 1,000	9,7 p = 0,001
Koffein	0 mM vs. 2 mM	3,1 p = 0,159	0,7 p = 0,300	4,6 p = 0,002	3,9 p = 0,179
	0 mM vs. 5 mM	5,5 p < 0,001	4,2 p < 0,001	6,0 p < 0,001	10,7 p < 0,001
	2 mM vs. 5 mM	2,4 p = 0,001	3,5 p = 0,002	1,4 p = 0,019	6,9 p = 0,004

Tabelle 21: paarweiser Vergleich der Randmittelwerte aller Zelllinien, Messmethoden und Behandlungen

In der Auswertung anhand des paarweisen Vergleichs der Einzelgruppen fällt hingegen auf, dass die Apoptosedifferenzen zwischen den Dosen der einzelnen Behandlungen überwiegend als nicht signifikant bewertet wurden, wobei es Ausnahmen in den höheren Dosisbereichen gab (siehe Tabelle 22).

Die geringere Signifikanz im Vergleich zur oben vorgestellten Auswertung ist auf das statistische Verfahren mit entsprechend niedrigeren Fallzahlen zurückzuführen.

Mit der Kombination von Bestrahlung und Koffein, also den paarweisen Einzelgruppenvergleichen von ausschließlich bestrahlten Zellen mit Zellen, welche zusätzlich mit Koffein behandelt wurden, zeigten beide Zelllinien und beide

Messmethoden einen signifikanten Apoptoseanstieg bei der Zugabe von 5 mM Koffein zu mit 5 oder 10 Gy bestrahlten Zellen. Die Zugabe von 2 mM Koffein zusätzlich zur Bestrahlung bewirkte tendenziell keinen signifikanten Apoptosezuwachs. Eine Ausnahme stellte die Kombination mit 10 Gy in der Zelllinie XF354 dar (siehe Tabelle 22).

Vergleicht man die beiden Bestrahlungsdosen in Kombination mit jeweils gleichen Koffeindosen lässt sich feststellen, dass sich die Apoptose zwischen 5 und 10 Gy mit jeweils 2 oder 5 mM Koffein tendenziell nicht signifikant unterschied. Eine Ausnahme stellte der Vergleich von 5 und 10 Gy mit jeweils 2 mM Koffein in der Caspase-3-Messung dar, welcher einen signifikanten Apoptoseanstieg zeigte. Das Koffein hatte hierbei, wie oben dargestellt, jedoch keinen eigenen Einfluss auf die Apoptose (siehe Tabelle 22).

	Paarweiser Vergleich Bestrahlung[Gy]+ Koffein[mM]	SAS		XF354	
		Annexin-V Differenz [%] und p-Wert	Caspase-3 Differenz [%] und p-Wert	Annexin-V Differenz [%] und p-Wert	Caspase-3 Differenz [%] und p-Wert
Bestrahlung	0 + 0 vs. 5 + 0	3,0 p = 0,115	2,7 p = 0,379	2,1 p = 0,269	4,9 p = 0,293
	0 + 0 vs. 10 + 0	2,0 p = 0,300	7,4 p = 0,022	2,4 p = 0,209	14,6 p = 0,003
	5 + 0 vs. 10 + 0	1,0 p = 0,574	4,7 p = 0,138	0,3 p = 0,875	9,7 p = 0,038
Koffein	0 + 0 vs. 0 + 2	3,1 p = 0,122	0,7 p = 0,826	4,6 p = 0,033	3,9 p = 0,515
	0 + 0 vs. 0 + 5	5,5 p = 0,006	4,2 p = 0,175	6,0 p = 0,005	10,7 p = 0,024
	0 + 2 vs. 0 + 5	2,4 p = 0,245	3,5 p = 0,253	1,4 p = 0,512	6,9 p = 0,096
Kombi- nation	5 + 0 vs. 5 + 2	1,46 p = 0,47	2,5 p = 0,421	4,0 p = 0,067	1,5 p = 0,740
	5 + 0 vs. 5 + 5	6,59 p < 0,001	14,1 p < 0,001	8,3 p < 0,001	18,6 p < 0,001
	10 vs. 10 + 2	2,20 p = 0,276	6,2 p = 0,052	4,5 p = 0,037	10,0 p = 0,034
	10 + 0 vs. 10 + 5	9,02 p < 0,001	11,9 p < 0,001	8,9 p < 0,001	12,7 p = 0,009
	5 + 2 vs. 10 + 2	0,3 p = 0,882	8,4 p = 0,010	0,8 p = 0,688	18,1 p = 0,001
	5 + 5 vs. 10 + 5	1,4 p = 0,466	2,5 p = 0,420	0,8 p = 0,647	3,6 p = 0,424

Tabelle 22: paarweiser Vergleich der Einzelgruppen aller Zelllinien, Messmethoden und Behandlungen einzeln und in Kombination

Im Bezug auf die Interaktion zwischen Bestrahlung und Koffein und damit eine mögliche strahlensensibilisierende Wirkung von Koffein zeigten beide Zelllinien und Messmethoden identische Ergebnisse, der statistische Test auf Interaktion war nicht signifikant und wies damit keine Supraadditivität und Strahlensensibilisierung nach (siehe Tabelle 23). Die graphische Darstellung anhand der Contourplots ließ anhand des Verlaufes der Höhenlinien auf Additivität schließen.

	SAS		XF354	
	Annexin-V	Caspase-3	Annexin-V	Caspase-3
Interaktion Bestrahlung+Koffein	p = 0,527	p = 0,147	p = 0,686	p = 0,200

Tabelle 23: Test auf Interaktion zwischen Bestrahlung und Koffein

6 Diskussion

Die verschiedenen Wirkungsweisen und Anwendungsmöglichkeiten von Chemotherapeutika im Allgemeinen und Koffein im Besonderen in Kombination mit Bestrahlung wurden bereits besprochen. Deren potentiell strahlensensibilisierende Wirkung wurde ebenfalls betrachtet. (siehe Kapitel 1.4 Beeinflussung der Strahlenwirkung).

In den hier vorgestellten Versuchen wurden eine strahlenresistente (SAS) und eine strahlensensible (XF354) HNO-Tumorzelllinie, beide p53-mutiert, mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Bestrahlung (0, 5, 10 Gy) und Koffein (0, 2 und 5 mM) behandelt. Koffein wurde 30 Minuten vor Bestrahlung zu den Zellkulturen gegeben. 72 Stunden nach Bestrahlung wurde die Apoptoseinduktion anhand eines Annexin-V- und eines Caspase-3-Testes bestimmt. Es konnte dabei für beide Zelllinien mit beiden Messmethoden eine deutliche Apoptoseinduktion durch Bestrahlung und Koffein sowie der Kombination aus beiden Behandlungsmodalitäten festgestellt werden. Maximale Apoptose wurden nach einer Behandlung mit 5 mM Koffein und 10 Gy in der Zelllinie XF354 im Caspase-3-Test mit einem Apoptosezuwachs von 27,1 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Im Vergleich dazu konnten die einzelnen Behandlungen einen Apoptosezuwachs von 14,6 % (10 Gy Bestrahlung) beziehungsweise 10,7 % (5 mM Koffein) erzielen. Für die Zelllinie SAS lag die Apoptose insgesamt niedriger. Der maximale Apoptosezuwachs war hier durch kombinierte Behandlung mit 10 Gy und 5 mM Koffein 19,3 % im Caspase-3-Test, einzeln wurden 7,4 % (10 Gy Bestrahlung) beziehungsweise 5,9 % (5 mM Koffein) Zuwachs an Apoptose beobachtet.

Betrachtet man dabei die Effekte, die mit den jeweiligen einzelnen Dosen innerhalb einer Behandlung erzielt wurden, so zeigte sich, dass für die Koffeinbehandlung tendenziell die Differenzen zwischen der Kontrolle und 2 mM Koffein gering und nicht signifikant waren. Für die Bestrahlung hingegen war der Unterschied zwischen 5 und 10 Gy nicht ausreichend, um signifikant zu sein. Dies legt nahe, dass mehr als 2 mM Koffein notwendig sind, um einen signifikanten Effekt zu erzielen. Diese Konzentration geht aber auch mit einer erhöhten Toxizität einher. 5 Gy Bestrahlung hingegen erzeugten signifikante Effekte an beiden Zelllinien. Eine Verdoppelung der Strahlendosis auf 10 Gy erhöhte die Apoptose zwar weiter, jedoch nicht in einem signifikanten Ausmaß.

Diese Annahmen wurden durch die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung unterstützt. Die Behandlung der Zellen mit 2 mM Koffein in Kombination mit 5 und 10 Gy Bestrahlung war bis auf wenige Ausnahmen nicht ausreichend, um einen signifikanten Apoptoseanstieg im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung hervorzurufen. Die Behandlung mit 5 mM Koffein in Kombination mit sowohl 5 als auch 10 Gy Bestrahlung erzielte jedoch stets ein signifikanter Apoptosezuwachs. Allerdings unterschieden sich die Apoptosewerte zwischen 5 und 10 Gy nicht signifikant.

Bezüglich des Zusammenwirkens von Bestrahlung und Koffein zeigte sich eine ausgeprägte additive Wirkung der beiden Behandlungen auf die Zunahme der Apoptose. Supraadditive Effekte auf die Apoptosezunahme konnten dabei nicht festgestellt werden.

Die Wirkung von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose zweier hinsichtlich p53-mutierter Lymphom-Zelllinien, die sich in ihrer Strahlensensitivität signifikant unterschieden (defizient in der NHEJ-Reparatur), wurde auch von Szumiel et al. [53] untersucht. Es wurde eine Strahlendosis von 2 beziehungsweise 5 Gy und eine Koffeinkonzentration von 2 mM verwendet, welches vor der Bestrahlung appliziert wurde. Die Apoptose wurde 24 Stunden nach Bestrahlung anhand von DNA-Fragmentierung elektrophoretisch gemessen. Es zeigte sich, dass eine relevante Apoptoseinduktion nur in der sensiblen Zelllinie und zum Messzeitpunkt nur in Kombination mit Koffein ausgelöst werden konnte. Durch Bestrahlung allein war kein Effekt messbar. Wie auch in unseren Versuchen war der Effekt in der Kombinationsbehandlung größer als in der Einzelbehandlung. Darüber hinaus zeigte sich, dass der Effekt in der sensiblen Zelllinie auch deutlich stärker ausgeprägt war. Szumiel et al. erklärten sich diesen Befund mit der Hemmung des G2-M-Arrests und der HRR durch Koffein.

Während die resistente Zelllinie trotz fehlendes Zellzyklusarrestes und gehemmter HRR noch über den alternativen Reparaturmechanismus NHEJ verfügt, fehlen der NHEJ-defizienten sensiblen Zelllinie sowohl die Reparaturzeit als auch beide möglichen Reparaturmechanismen. Dies macht sie in höherem Maße anfällig für die Behandlung mit Bestrahlung und Koffein.

Auch Vavrova et al. [54] untersuchten die Apoptoseinduktion durch Kombination von Bestrahlung und Koffein in p53-defizienten, maligne entarteten Zelllinien. In ihren Versuchen wurden humane Promyelozyten-Leukämie-Zellen verwendet. Die

Apoptose wurde anhand dreier verschiedener Apoptosetests ermittelt. Einmal durch den Nachweis des nukleären Intermediärfilaments Lamin-B anhand einer Western Blot Analyse, weiterhin durch die Identifizierung des apoptotischen DNA-Verlustes anhand des *Sub-G1-Peaks* im DNA-Histogramm und desweiteren mithilfe des mitochondrialen Apoptosemarkers Apo2.7 in der Durchflusszytometrie. In diesem Versuchsaufbau wurden 2 mM Koffein 30 Minuten vor Bestrahlung mit 6 Gy zu den Zellen hinzugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 1 und 10 Tagen analysiert. Der Sub-G1-Peak war dabei mit einem ersten Maximum nach 2 – 3 Tagen sowohl nach alleiniger Bestrahlung als auch nach Kombination von Bestrahlung und Koffein nachweisbar. Nach der Kombinationsbehandlung war er etwas ausgeprägter. Interessanterweise war jedoch ein zweites Maximum nach 4 – 7 Tagen nur nach Kombination von Bestrahlung und Koffein nachweisbar, welches die Autoren als „*Second Wave*“ von Apoptose bezeichneten. Auch der Nachweis von Apo2.7 zeigte maximale Apoptose 5, 6 und 10 Tage nach Bestrahlung und Koffein, welche signifikant höher waren als nach Bestrahlung alleine. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen bewegte sich der Apoptosezuwachs in beiden Tests um ein Niveau von 30% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch der Lamin-B-Nachweis zeigte maximale Apoptose erst nach 6, 7, und 10 Tagen. Der Lamin-B-Anteil war im Vergleich zu nur bestrahlten Zellen deutlich höher bei Zellen, die mit der Kombination von Koffein und Bestrahlung behandelt worden waren. Vavrova et al. hielten eine durch Koffein ausgelöste ungeplante DNA-Replikation und einen ungeplanten Zellzyklus-Progress als ursächlich für die zweite beziehungsweise späte Welle der Apoptose. Sie wiesen darauf hin, dass in Versuchen mit Bestrahlung und Koffein häufig nur zu früheren Zeitpunkten nach Behandlung Apoptose gemessen worden war, und somit das beschriebene Phänomen möglicherweise nicht erfasst wurde. Auch in unseren Versuchen lag der Messzeitpunkt drei Tage nach der Behandlung, in Vorversuchen maximal vier Tage nach der Behandlung. Ein zweites Apoptosemaximum konnte damit nicht festgestellt werden. Eine Aufhebung des G2-M-Arrestes und der strahlensensibilisierende Effekt von Koffein wurden von Vavrova et al. als ursächlich für ihre Ergebnisse angesehen. Beide Mechanismen waren in der gleichen Versuchsreihe festgestellt worden.

Eben jene Effekte, Strahlensensibilisierung und G2-M-Arrest-Aufhebung durch Koffein, beobachteten auch Bache et al. [55]. Sie sahen dabei jedoch keine direkte

Korrelation mit einer Apoptoseinduktion. Sie behandelten ebenfalls zwei p53-mutierte Sarkom-Zelllinien, mit Dosen von 1 – 4 mM Koffein welche vor der Bestrahlung mit 2 – 12 Gy zu den Zellen gegeben wurden. Die Apoptose wurde nach 24 und 48 Stunden anhand apoptotischer Zellkernveränderungen mit einer DAPI-Färbung nachgewiesen. Die Anzahl apoptotischer Zellen stieg nach Bestrahlung und Koffeingabe deutlich an. Allerdings war der Apoptoseanstieg durch die Kombination von Bestrahlung und Koffein nur um 4 – 6 % höher als durch die ausschließliche Bestrahlung. Ebenso konnte kein direktes Korrelat zwischen dem Ausmaß der beobachteten Apoptose und dem Ausmaß der Verhinderung des G2-M-Arrestes, des geminderten Zellüberlebens und der Strahlensensibilisierung durch Koffein festgestellt werden. Bache et al. folgerten, dass zelltypspezifische, angeborene Unterschiede in der Apoptoseinduktion bestehen. Damit erklärt sich möglicherweise, dass je nach Zelllinie ein unterschiedlich vermindertes Zellüberleben und daraus resultierend ein unterschiedliches Ausmaß an Strahlensensibilisierung durch Koffein festgestellt werden kann. In der entsprechenden Literatur sind diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse beschrieben worden. Für die untersuchten Sarkomzelllinien wurde die Rolle der Apoptoseinduktion im Bezug auf die Strahlensensibilisierung gering eingeschätzt. Dagegen wurde der G2-M-Regulation sowie der Fähigkeit der Zellen zur DNA-Reparatur größere Bedeutung zugemessen. Hier hatten genetische Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auch zu Unterschieden in der Strahlensensibilisierbarkeit geführt. Die Ergebnisse von Bache et al. stimmen insofern mit unseren überein, als dass nicht zwangsläufig ein Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und Strahlensensibilisierung zu bestehen scheint. Allerdings konnte in unseren Ergebnissen der gegensätzliche Fall, nämlich eine deutliche Apoptoseinduktion, jedoch keine Strahlensensibilisierung festgestellt werden.

Bracey et al. [56] kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die G2-M-Arrest-Aufhebung, das verminderte Zellüberleben und die Strahlensensibilisierung durch Koffein nicht zwangsläufig mit einer Apoptoseinduktion korrelieren müssen. Sie behandelten Colonadenom- und Colonkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status mit 1,5 mM Koffein, welches direkt nach Bestrahlung mit 5 Gy zu den Zellen hinzugegeben wurde. Die Apoptosemessung wurde 24 Stunden und sieben Tage nach der Behandlung anhand einer Zellkernmorphologie-Darstellung mit Acridin-Orange und PI durchgeführt. In zwei der Zelllinien ohne funktionierendes p53 wurde ein deutlicher Apoptoseanstieg um das 1,5- beziehungsweise 1,6-fache des

Ausgangswertes beobachtet. Die erhöhte Apoptose konnte selbst noch nach 7 Tagen nachgewiesen werden. Bracey et al. führten dies auf späte Effekte des Koffeins auf die bereits geschädigten Zellen zurück. Diese Zellen überlebten zwar die ersten Teilungen nach der Bestrahlung, starben aber schließlich doch ab. Diese Ergebnisse sind kongruent mit jenen von Vavrova et al. (s.o.), die ebenfalls zu sehr späten Zeitpunkten die Induktion von Apoptose beobachteten. Um die Rolle von p53 zu untersuchen verwendeten Bracey et al. desweiteren auch eine Zelllinie mit p53-Wildtyp sowie deren p53-defiziente Mutante. Hier zeigte sich, dass sich die p53-Wildtyp Zelllinie weder als strahlensensibel erwies noch eine erhöhte Apoptose aufweisen konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit in der Literatur beschriebenen Daten überein. (siehe auch Kapitel 1.4 Beeinflussung der Strahlenwirkung). Interessanterweise ließ sich die entsprechende p53-mutierte Zelllinie zwar strahlen-sensibilisieren, konnte jedoch ebenfalls keine nennenswerte Apoptoseinduktion aufweisen. Daraufhin wurden in dieser Zelllinie alternative Zelltodesarten untersucht. Mikroskopisch zeigte sich die Bildung von Riesenzellen, bei denen es sich um Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt handelte, die sich anschließend nicht mehr teilen konnten. Bracey et al. schlossen somit, dass vermindertes Zellüberleben, G2-M-Arrest-Aufhebung und Strahlensensibilisierung nicht immer mit einer erhöhten Apoptose einhergehen. Dieser Befund wird von der Arbeitsgruppe von Bache et al. (s.o.) unterstützt. Sie konnten zeigen, dass der p53-Status eine entscheidende Rolle in der Fähigkeit zur Strahlensensibilisierung spielt. Weiter stellten sie fest, dass neben der Apoptose alternative Zelltodmechanismen eine wichtige Rolle spielen. Auch dies lässt sich gut mit den Ergebnissen unserer Arbeit vereinbaren. Die Messung weiterer Zelltodarten in unseren Zelllinien könnte zusätzliche Ergebnisse in Bezug auf einen strahlensensibilisierenden Effekt liefern. Allerdings könnten die Ergebnisse von Bracey et al. wie auch schon jene von Bache et al. zeigen, dass nicht immer ein Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und Strahlensensibilisierung durch Koffein bestehen muss.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Ergebnisse meiner Arbeit gut in die aktuelle Forschungslage zu Koffein in Kombination mit Bestrahlung einordnen lassen. Die diesbezügliche Literatur zeigt, dass die spezifische Tumorgenetik mit Defekten in entscheidenden Genen, wie beispielsweise in der DNA-Reparatur, eine große Rolle spielt. Die Ergebnisse können dementsprechend variieren. Weiter

scheint der Zeitpunkt der Apoptosemessung entscheidend zu sein und kann eventuell, wenn zu früh gemessen oder das Intervall zu kurz gewählt wird, zu irreführenden Ergebnissen führen. Ob ein Zusammenhang zwischen Strahlensensibilisierung und Apoptoseinduktion durch Koffein besteht scheint variabel und von der Zelllinie und deren Genetik abhängig zu sein. Schließlich scheinen weitere Zelltodarten neben der Apoptose zu existieren, welche zu vermindertem Zellüberleben und Strahlensensibilisierung führen können und mit entsprechenden alternativen Tests nachgewiesen werden müssen.

Durch die zwischen den verschiedenen Arbeiten variierenden Versuchsbedingungen ist die direkte Vergleichbarkeit zum Teil nur eingeschränkt zu beurteilen. Die Verwendung unterschiedlicher Tumorzelllinien mit entsprechend unterschiedlicher Genetik dürfte jedoch die größte Rolle spielen. Auch die direkte Gegenüberstellung unterschiedlicher Verfahren zur Apoptosemessung muss kritisch betrachtet werden. Dennoch werden generell ähnliche Anwendungsschemata und Fragestellungen untersucht. Daraus kann man schließen, dass Koffein in Kombination mit Bestrahlung deutliche Effekte auf Zellüberleben, Zellzyklus und Apoptose von Tumorzellen hat. Eine Strahlensensibilisierung ist dabei potenziell ebenfalls möglich. Die dabei entscheidenden Mechanismen sind wenig eindeutig und müssen weiter untersucht werden. Selbst wenn eine Strahlensensibilisierung in meiner Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, schließt dies nicht aus, dass sie im Rahmen dieser Versuche möglich ist.

Die beiden Zelllinien SAS und XF354 wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Radiosensitivität für die Versuche ausgewählt. Die Zelllinien wurden bereits mehrfach zum Vergleich verschiedener Radiosensitivitäten von HNO-Tumorzelllinien verwendet, unter anderem von Artman et. al [57] und Yaromina et al. [58]. SAS erwies sich im Vergleich zu XF354 als die strahlenresistentere Zelllinie.

Dies wurde in unseren Versuchen bestätigt, wo auffiel, dass in der strahlensensibleren Zelllinie XF354 insgesamt eine höhere Apoptose erzielt werden konnte als in strahlenresistentere Zelllinie SAS.

Dabei ist der mit dem Annexin-V-Test gemessene maximale Zuwachs an Apoptose durch die jeweils einzelnen Behandlungen (Bestrahlung und Koffein) in beiden Zelllinien SAS und XF354 vergleichbar (2,0 bzw. 2,2 % für Bestrahlung, 5,5 bzw. 6 % für Koffein). Das Koffein hatte einen leicht stärkeren Effekt als die Bestrahlung. Die

Kombination von Bestrahlung und Koffein ergab eine höhere Apoptose, aber es bestand ebenfalls kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien (11,0 bzw. 11,3 % maximaler Apoptosezuwachs).

Im Caspase-3-Test hingegen ließ sich ein deutlicher Unterschied des Apoptosezuwachses zwischen den beiden Zelllinien feststellen (SAS 7,4 und XF354 14,6 % für Bestrahlung und SAS 4,2 und XF354 10,7 % für Koffein), womit hier die Bestrahlung den größeren Effekt zu haben schien. Die Kombination zeigte einen weiteren Zuwachs der Apoptose sowie ebenfalls Unterschiede zwischen den Zelllinien (SAS 19,3 und XF354 27,1 %).

Es zeigte sich hier für die Zelllinie XF354 nicht nur eine erhöhte Strahlensensitivität, sondern außerdem auch eine erhöhte Sensibilität gegenüber dem Koffein. Das könnte dafür sprechen, dass diese Zelllinie nicht nur gegenüber der Bestrahlung, sondern auch gegenüber anderen zelltoxischen Behandlungen weniger effiziente Abwehrmechanismen als die resistenterere Zelllinie SAS besitzt.

Dabei kommt der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien bezüglich ihrer Strahlensensibilität vor allem im Caspase-3-Test zum Ausdruck. Dies mag auf den unterschiedlichen molekularen Mechanismen beruhen, mit welchen die beiden Tests Apoptose nachweisen.

In den hier vorgestellten Versuchen wurde die Messung der Apoptose parallel anhand der beiden Marker Phosphatidylserin und Caspase-3 durchgeführt. Dafür wurden der Annexin-V- und der Caspase-3-Tests verwendet. Diese beiden Tests wurden auch in anderen Arbeiten parallel angewendet. So untersuchten Sutton et al. [59] Quecksilber-induzierte frühe und spätere Apoptose in Leberzellkarzinom-Zellen anhand des Annexin-V- und Caspase-3-Tests. Sie behandelten die Zellen mit steigenden Dosen von Quecksilber und inkubierten sie für den Nachweis der frühen Apoptose mit dem Annexin-V-Test für 10 Stunden. Für den Nachweis der späteren Apoptose mit dem Caspase-3-Test wurden die Zellen 48 Stunden inkubiert. Dass die Tests zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden unterscheidet sie von der Methodik in unserer Arbeit, wo beide Tests nach 72 Stunden durchgeführt wurden. Die Durchführung der eigentlichen Messung ist jedoch mit unseren Methoden identisch. Bei Sutton et al. konnte anhand beider Tests gezeigt werden, dass die Apoptose graduell mit der Quecksilberdosis anstieg, im Annexin-V-Test auf maximal 8,84 %, im Caspase-3-Test auf maximal 34,51 %. Damit konnte in letzterem

Test zwar ein stärkeres Ausmaß an Apoptose gemessen werden, in ihrer verhältnismäßigen Zunahme der Apoptose bestätigten sich die beiden Messmethoden jedoch gegenseitig. Auch in unseren Versuchen stieg in beiden Tests die Apoptose mit steigenden Dosen von Koffein und Bestrahlung graduell an und war im Caspase-3-Test mit 32,10 % höher als im Annexin-V-Test mit 22,70 %. Die beiden Tests bestätigten sich also ebenfalls gegenseitig. Trotz der unterschiedlichen Messzeitpunkte ihrer beiden Tests erzielten somit Sutton et al. und wir sehr ähnliche Ergebnisse; die beiden Messmethoden bestätigten sich gegenseitig und im Caspase-3 Test war ein höheres Ausmaß an Apoptose nachweisbar als im Annexin-V-Test.

Yedjou et al. [52] testeten durch Arsen-Trioxid ausgelöste Apoptosemechanismen in Promyelozytenleukämie-Zellen anhand von Annexin-V-, Caspase-3- und DNA-Fragmentations-Nachweisen. Für alle drei Verfahren behandelten sie die Zellen für 24 Stunden mit steigenden Dosen von Arsen-Trioxid und führten anschließend zeitgleich, wie auch in unseren Versuchen, die Apoptosemessungen durch. Wiederum stieg sowohl im Annexin-V- als auch im Caspase-3-Test die Apoptose graduell mit steigenden Arsendosen und es wurde vermehrte DNA-Fragmentation festgestellt. Dabei war erneut wie auch in unseren Ergebnissen mit 35,8 % im Annexin-V-Test und 63,1 % im Caspase-3-Test die maximale Apoptose im Caspase-3-Test ausgeprägter. In dieser Arbeit wurden sowohl die gleichen Versuchsbedingungen wie bei uns angewandt als auch die gleichen Ergebnisse mit der gegenseitigen Bestätigung der Tests und der höheren Apoptose im Caspase-3-Test erzielt.

Im Vergleich der beiden Methoden lässt sich damit feststellen, dass der Caspase-3-Test mit höherer Sensitivität Apoptose nachzuweisen scheint, aber beide Tests gut zur Apoptosemessung geeignet sind. In Versuchsreihen zeigen sie die selben Trends der Apoptoseentwicklung und bestätigen sich damit gut gegenseitig. Dem ist hinzuzufügen, dass der Annexin-V-Test einfacher und zeitlich weniger aufwändig durchzuführen ist als der Caspase-3-Test. [49, 60] Außerdem lassen sich anhand des Annexin-V-Tests apoptotische von gesunden und nekrotischen Zellen unterscheiden, während im Caspase-3-Test vitale und nekrotische Zellen gemeinsam betrachtet werden. Der Annexin-V-Test lässt sich auf lebende Zellen anwenden, während für den Caspase-3-Test die Zellen fixiert werden müssen. Annexin-V scheint tendenziell in einer früheren Apoptosephase nachweisbar zu sein als Caspase-3

(siehe Kapitel 4.5.1 Messmethoden) Desweiteren ist der Annexin-V-Test um ca. 60% kostengünstiger als der Caspase-3-Test. [61]

Der Vorteil des Caspase-3-Tests besteht hingegen in einer eventuell sichereren Aussagekraft, da die Phosphatidylserin-Externalisierung potentiell reversibel ist, während die Caspase-3-Aktivierung irreversibel zur Apoptose führt. [51, 62]

In den hier vorgestellten Versuchen bestätigten sich die beiden Methoden ebenfalls. In beiden Fällen wurde für beide Zelllinien eine Koffein- und Bestrahlungs-abhängige Apoptosezunahme festgestellt. Dabei wurde im Caspase-3-Test insgesamt eine höhere Apoptose erreicht. Das kann damit zusammenhängen, dass dieser Test tendenziell eine spätere Apoptosephase zu messen scheint als der Annexin-V-Test. Diese Phase war zum Messzeitpunkt 72 Stunden nach Koffeinbehandlung und Bestrahlung möglicherweise maximal ausgeprägt, während die von Annexin-V gemessene Phase bereits etwas früher ihr Maximum erreicht hatte. Möglich wäre hingegen auch, dass Apoptose im Caspase-3-Test sensitiver nachgewiesen wird.

Außerdem fiel auf, dass bei getrennter Betrachtung der beiden Behandlungen Koffeinzugabe und Bestrahlung im Annexin-V-Test durch das Koffein eine höhere Apoptose erzielt wurden, während im Caspase-3-Test die Bestrahlung mehr Apoptose hervorrief. Geht man also von den zeitlich versetzten maximalen Apoptosephasen aus, die mit den beiden Tests gemessen werden können, ließe sich möglicherweise schlussfolgern, dass das Koffein etwas rascher zur Apoptose führt und deshalb im frühen Test dominiert, während die Bestrahlung etwas später Apoptose auslöst und damit im späteren Test dominiert.

Betrachtet man die Arbeit auf ihre Stärken und Schwächen hin sind einige Verbesserungen denkbar. Durch die relativ niedrigen Fallzahlen von $n = 3$ bis $n = 5$ ließ sich nicht vermeiden, dass die statistische Varianz relativ hoch war. Es bedürfte größer angelegter Studien, um diesen Faktor zu verringern. Sieht man die Untersuchungen als mögliche Vorversuche für spätere klinische Anwendungen an muss bedacht werden, dass für die hier angewendeten Dosen in vivo mit ausgeprägten Nebenwirkungen zu rechnen ist. Eine noch zu untersuchende schonende Applikationsweise oder Maßnahmen zur Dosisminderung wären also notwendig.

Stärken der Arbeit sind die gute Reproduzierbarkeit und Eindeutigkeit der Ergebnisse. Die beiden Apoptose-Tests ließen sich wie in der Literatur beschrieben

anwenden und bestätigten sich gegenseitig. Auch die beiden Zelllinien reagierten auf die Behandlung, wie es nach Beschreibungen aus der Literatur zu erwarten war.

Die vorliegende Arbeit liefert ein anschauliches Beispiel für eine Kombinationsbehandlung aus Radiotherapie und Pharmakon *in vitro*, wobei beide Behandlungen in vergleichbarem Ausmaß zum apoptotischen Zelltod der Tumorzellen führten und damit einen additiven Effekt bewirkten.

Wie bereits erwähnt entstand in der gleichen Arbeitsgruppe parallel eine Arbeit, in welcher die Zelllinien SAS und XF354 ebenfalls mit Koffein und Bestrahlung behandelt wurden und anschließend das Zellüberleben anhand eines Kolonie-Bildungs-Tests (*Colony forming assay* – CFA) ausgewertet wurde. Es wurde pro Zelllinie jeweils eine Versuchsreihe mit hohen Koffeindosen (0,5; 1 und 2 mM) und niedrigen Koffeindosen (0,05; 0,1 und 0,2 mM) durchgeführt. Die Zelllinie SAS wurde mit 2 und 8 Gy bestrahlt, die Zelllinie XF354 mit 4 und 6 Gy. Auch hier fand die Koffeinzugabe zu den Zellen 30 Minuten vor der Bestrahlung statt, jedoch wurde nach 4 Tagen das Kulturmedium gewechselt und nach 8 Tagen wurden die Zellen fixiert, gefärbt und ausgewertet.

Auch in dieser Arbeit konnte ein additiver Effekt von Bestrahlung und Koffein auf die Verminderung des Zellüberlebens der beiden HNO-Tumorzelllinien SAS und XF354 festgestellt werden. Dabei war der Effekt in der Versuchsreihe mit hohen (0,5; 1 und 2 mM) Koffeindosen in der Zelllinie SAS so ausgeprägt, dass er statistisch als grenzwertig supraadditiv zu bewerten war.

Im Allgemeinen lässt sich aber feststellen, dass sich diese beiden Arbeiten gegenseitig in ihren Ergebnissen bestätigen und ergänzen und eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen der Interaktion von Koffeingabe und Bestrahlung von malignen Zellen darstellen können.

7 Zusammenfassung und Ausblick

HNO-Tumore gehören zu den häufigen Tumorentitäten und haben dabei eine vergleichsweise schlechte Prognose. Die Therapie ist meist interdisziplinär und aggressiv und birgt somit oft ausgeprägte Nebenwirkungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Methode zur Kombination von Bestrahlung und Medikamentengabe untersucht, deren Interaktion unter Umständen eine Verminderung der Strahlen- und Medikamentendosen bei gleichbleibender Wirkung gegen den Tumor erlaubt.

Dazu wurden die zwei HNO-Tumorzelllinien SAS und XF354 mit verschiedenen Dosen und Kombinationen von Bestrahlung und dem als möglicherweise strahlensensibilisierend bekannten Koffein behandelt und anschließend anhand zweier verschiedener durchflusszytometrischer Verfahren die Apoptose bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Strahlensensibilisierung durch verschiedene Medikamente über verschiedene Wirkmechanismen möglich ist. Es handelt sich dabei momentan größtenteils um in-vitro-Untersuchungen, doch auch in-vivo-Untersuchungen wurden bereits erfolgreich durchgeführt. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Klinik muss in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden. Insgesamt besteht die Problematik, dass die Ergebnisse je nach untersuchter Zelllinie und gewählten Darreichungsschemata recht variabel und damit teilweise schwer vergleichbar und übertragbar sind. Insbesondere im Falle von Koffein scheint noch nicht ganz geklärt, über welche Mechanismen und unter welchen Umständen es in Kombination mit Bestrahlung zu supraadditiven Effekten führen kann. Da jedoch bereits vielversprechende Ergebnisse mit Koffein erzielt wurden, sind weiterführende Versuche von großer Bedeutung.

In den hier vorgestellten eigenen Versuchen zeigten sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen signifikante additive Effekte der Kombination aus Koffein und Bestrahlung auf die beiden HNO-Tumorzelllinien SAS und XF354. Der Anstieg der Apoptose wurde anhand zweier durchflusszytometrischer Verfahren, dem Annexin-V- und Caspase-3-Test, 72 Stunden nach Koffein- und Strahlenbehandlung durchgeführt.

Wie aus der entsprechenden Literatur zu erwarten, konnte in der strahlensensibleren Zelllinie XF354 mehr Apoptose erzielt werden als in der strahlenresistenteren Zelllinie SAS.

Im Vergleich der beiden Messmethoden wird davon ausgegangen, dass der Annexin-V-Test prinzipiell einfacher, schneller und kostengünstiger als der Caspase-3-Test ist, außerdem erlaubt er die Anfärbung lebender Zellen sowie die Unterscheidung zwischen apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen. Der Caspase-3-Test hingegen ist zuverlässiger und stellt sicher irreversibel apoptotische Zellen dar. In den hier vorgestellten Versuchen bestätigten sich die beiden Tests jedoch sehr gut. Im Caspase-3-Test wurde dabei eine höhere Apoptose festgestellt, was auch in der Literatur so beschrieben wurde. Das kann daran liegen, dass die beiden Tests zeitlich versetzte Apoptosemaxima messen oder dass der Caspase-3-Test mit größerer Sensitivität Apoptose nachweist.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit entstehen erneute Fragestellungen, deren Untersuchung bei weitergehender Beschäftigung mit der Thematik interessant wäre. So handelt es sich bei den verwendeten Koffeindosen um einen Dosisbereich, welcher in der klinischen Anwendung eine hohe Toxizität besäße. Hierzu wurden bereits Untersuchungen durchgeführt, welche sich mit einer schonenderen Applikation von Koffein beschäftigten. Jeong et al. [38] verwendeten beispielsweise Nanomoleküle eines temperatursensitiven liposomalen Koffeinderivates. Dieses wurde in Kombination mit Bestrahlung und Hyperthermie am Tumor gezielt dort freigesetzt. Somit konnte eine strahlensensibilisierende Wirkung bei geringerer Toxizität erzielt werden. Desweiteren gelangen Tan et al. [63] anhand der Kombination von Koffein mit polymeren Mikropartikeln in Tablettenform eine kontinuierliche Abgabe von Koffein ohne hohe Initialdosen und spätere Dosischwankungen. Shakeel et al. [64] erreichten für die transdermale Anwendung von Koffein eine stark verbesserte, lokal begrenzte Aufnahme mit der Entwicklung einer Wasser-Öl-Nanoemulsion.

Wenn die Forschung an Kombinationen aus Radio- und Chemotherapie mit strahlensensibilisierender Wirkung sich auch bisher noch in einem experimentellen Stadium befindet ist das Ziel schließlich doch, diese Therapie eines Tages klinisch anzuwenden. Dass durch Koffein in den hier vorgestellten Versuchen kein strahlensensibilisierender Effekt nachgewiesen werden konnte, kann verschiedenste

Ursachen haben. Da jedoch trotzdem hier und auch in anderen Untersuchungen bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten, wären weitergehende Untersuchungen denkbar. Abgesehen von den bereits verwendeten verschiedenen Zelllinien, Dosen von Bestrahlung und Koffein, Darreichungsformen und Messzeitpunkten sind viele weitere Variationen möglich, die noch mehr Aufschluss über die Wirkungsweise von Koffein und Bestrahlung geben könnten. So könnten Versuche mit weiteren Zelllinien mit verschiedenen festgelegten genetischen Mutationen in beispielsweise den ATM-, p53- und Reparaturkomplex-Genen deren Rolle als Angriffspunkte von Koffein klären. Weitere Dosierungen von Bestrahlung und Koffein könnten verwendet werden und feinere Tendenzen zur idealen Dosierung aufzeigen. Variationen der zeitlichen Abfolge von Zellaussaat, Zugabe und Entfernung von Koffein im Kulturmedium und Bestrahlung könnten Aufschluss über den Zeitpunkt der maximalen Interaktion zwischen Bestrahlung, Koffein und dem Zellzyklus geben. Zusätzlich könnte anhand einer Zellzyklusanalyse bzw. mit einer Zellsynchronisierung der ideale Bestrahlungszeitpunkt in strahlensensiblen Zellzyklusphasen ermittelt werden.

Auch abgesehen von den Untersuchungen speziell des Koffeins ist die weitere Forschung an Mitteln, die mit Bestrahlung interagieren höchst interessant und vielversprechend. Zwar sind bisher viele Wirkungsmechanismen und Anwendungsmöglichkeiten noch unklar, doch mit Erkenntnissen aus weiterer Forschung am Thema darf man hoffen, dass diese Art der Therapie schließlich in der Klinik angewendet werden und somit die Heilungschancen und Lebensqualität vieler Patienten verbessern kann.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Michael Molls, Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München für die Überlassung des Themas in seiner Klinik.

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Gabriele Multhoff, Leiterin der experimentellen Radioonkologie und Strahlenbiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München möchte ich besonders herzlich danken, sowohl für die Überlassung des Themas, als auch dafür, dass sie mir die Durchführung der Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht und die Arbeit betreut hat.

Mein großer Dank gilt auch Dr. med. Khashayar Fakhrian, Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, für die stete Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit, die er mir bei der Mitbetreuung der Arbeit entgegen brachte.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für experimentelle Radioonkologie und Strahlenbiologie der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München, Armin Bareiß, Dr. Brigitte Doß, Dörte Michalski, Dr. Daniela Schilling, Wolfgang Sievert, Dr. Thomas Schmid und Stefan Stangl, für die herzliche Aufnahme in das Team, die hervorragende technische Einarbeitung und die konstante Begleitung bei der Durchführung der Experimente.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, Bernhard Haller und Dr. Tibor Schuster, für die große Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der Arbeit.

Schließlich gilt mein großer Dank für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen wertvollen Hinweise, die zu ihrer Vollendung notwendig waren, sowie für persönliche Unterstützung Stefanie Käck, Stefanie Sternischa und meiner Familie Johann, Regine und Simon Türck.

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus [9].....	4
Abbildung 2: Stadien des Zellzyklus [9]	4
Abbildung 3 : Zellyklusregulation durch CDKs und Zyklone [11].....	5
Abbildung 4: Morphologie von Nekrose und Apoptose [14]	7
Abbildung 5: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose [15].....	8
Abbildung 6: DNA-Läsionen nach Bestrahlung [16].....	9
Abbildung 7: HRR und NHEJ nach Bestrahlung [12].....	11
Abbildung 8: Aktivierung des G1-, S- und G2-Checkpoints [12]	12
Abbildung 9: Schicksal bestrahlter Zellen [10]	14
Abbildung 10: Prinzip der Dosisfraktionierung [16]	15
Abbildung 11: Koffeinwirkung auf den Zellzyklus [36].....	21
Abbildung 12: Koffeinwirkung auf die DNA-Reparatur [35].....	23
Abbildung 13: SSC-FSC-Gate	33
Abbildung 14: Dotplot der Annexin-V-Färbung	34
Abbildung 15: SSC-FSC-Gate im Caspase-3-Test.....	35
Abbildung 16: Histogramm der Gesamtzellen des Caspase-3-Tests	36
Abbildung 17: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	39
Abbildung 18: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V.....	42
Abbildung 19: Liniendiagramm	42
und Abbildung 20: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	42
Abbildung 21: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	43
Abbildung 22: Contourplot der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V...	44

Abbildung 23: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	45
Abbildung 24: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	47
Abbildung 25: Liniendiagramm	47
und Abbildung 26: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	47
Abbildung 27: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	48
Abbildung 28: Contourplot der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V...	49
Abbildung 29: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	50
Abbildung 30: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	52
Abbildung 31: Liniendiagramm	53
und Abbildung 32: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	53
Abbildung 33: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	53
Abbildung 34: Contourplot der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	55
Abbildung 35: Effekte von alleiniger Bestrahlung und alleiniger Koffeinbehandlung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	56
Abbildung 36: 3D-Plot der beobachteten Effekte von Bestrahlung und Koffein auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	58
Abbildung 37: Liniendiagramm	58
und Abbildung 38: Boxplot der Abhängigkeit der Apoptose von kombinierter Behandlung mit Koffein und Bestrahlung in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	58

Abbildung 39: Effekte von Bestrahlung und Koffein in Kombination auf die Apoptose mit Darstellung der Versuchstage in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	59
Abbildung 40: Contour-Modell der Interaktion von Bestrahlung und Koffein und deren Auswirkung auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-360	

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkung der „Vier Rs“ auf die Strahlentherapie [12].....	16
Tabelle 2: Versuchsaufbau: Dosen und Kombinationen von Bestrahlung und Koffein	38
Tabelle 3: Versuchsaufbau: Zeitlicher Versuchsablauf.....	38
Tabelle 4: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	40
Tabelle 5: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	40
Tabelle 6: Effekte von Bestrahlung und Koffein einzeln und in Kombination auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V.....	41
Tabelle 7: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	43
Tabelle 8: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	45
Tabelle 9: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	46
Tabelle 10: Effekte von Bestrahlung und Koffein einzeln und in Kombination auf die Apoptose in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3.....	46
Tabelle 11: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in SAS-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	48
Tabelle 12: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V.....	51
Tabelle 13: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V.....	51

Tabelle 14: Effekte von Bestrahlung und Koffein einzeln und in Kombination auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	52
Tabelle 15: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Annexin-V	54
Tabelle 16: Paarweiser Vergleich der Randmittelwerte von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3.....	56
Tabelle 17: Paarweiser Vergleich der Einzelgruppen von Bestrahlung und Koffein jeweils untereinander in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3.....	57
Tabelle 18: Effekte von Bestrahlung und Koffein alleine und in Kombination auf die Apoptose in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3.....	57
Tabelle 19: Paarweiser Einzelgruppenvergleich der Bestrahlungsdosen mit und ohne Koffein sowie der Kombinationen in XF354-Zellen, Apoptose gemessen mit Caspase-3	59
Tabelle 20: Übersicht über die maximale Apoptose der einzelnen und kombinierten Behandlungen	61
Tabelle 21: paarweiser Vergleich der Randmittelwerte aller Zelllinien, Messmethoden und Behandlungen	62
Tabelle 22: paarweiser Vergleich der Einzelgruppen aller Zelllinien, Messmethoden und Behandlungen einzeln und in Kombination.....	64
Tabelle 23: Test auf Interaktion zwischen Bestrahlung und Koffein	65

9.3 Literaturverzeichnis

1. Argiris, A., M.V. Karamouzis, D. Raben, and R.L. Ferris, *Head and neck cancer*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-709.
2. Parkin, D.M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
3. Mast, G., ed. *Manual Kopf-Hals-Malignome*. 4 ed., ed. TumorzentrumMünchen. 2009, Zuckschwerdt.
4. Sankaranarayanan, R., E. Masuyer, R. Swaminathan, J. Ferlay, and S. Whelan, *Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis*. Anticancer Res, 1998. **18**(6B): p. 4779-86.

5. Stenson, K. and B. Brockstein. *Overview of head and neck cancer*. UpToDate 2011; Available from: www.uptodateonline.com.
6. Carneiro, B., B. Brockstein, K. Stenson, and S. Song. *Overview of treatment for head and neck squamous cell cancer*. UpToDate 2011; Available from: www.uptodateonline.com.
7. List, M. *Quality of life in head and neck cancer*. UpToDate 2010; Available from: www.uptodateonline.com.
8. Murphy, B.A., S. Ridner, N. Wells, and M. Dietrich, *Quality of life research in head and neck cancer: a review of the current state of the science*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **62**(3): p. 251-67.
9. Welsch, U., ed. *Lehrbuch Histologie*. 2 ed. 2005, Urban&Fischer.
10. Herrmann, T., M. Baumann, and W. Dörr, eds. *Klinische Strahlenbiologie*. 4 ed. 2006, Urban&Fischer.
11. Rassow, J., K. Hauser, and R. Netzker, eds. *Biochemie*. 1 ed. 2006, Thieme.
12. Bamberg, M., M. Molls, and H. Sack, eds. *Radioonkologie, Grundlagen und Klinik*. 2 ed. 2009, Zuckschwerdt.
13. Böcker, W., H. Denk, and P. Heitz, eds. *Pathologie*. 2 ed. 1997, Urban&Fischer.
14. Schiebler, T., ed. *Anatomie*. 9 ed. 2004, Springer.
15. Zimmermann, K.C. and D.R. Green, *How cells die: apoptosis pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4 Suppl): p. S99-103.
16. Kauffmann, G., E. Moser, and R. Sauer, eds. *Radiologie*. 3 ed. 2006, Urban&Fischer.
17. Reiser, M., F.-P. Kuhn, and J. Debus, eds. *Radiologie*. 2 ed. 2006, Thieme.
18. Harrington, K., P. Jankowska, and M. Hingorani, *Molecular biology for the radiation oncologist: the 5Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007. **19**(8): p. 561-71.
19. Steel, G.G., *Terminology in the description of drug-radiation interactions*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1979. **5**(8): p. 1145-50.
20. Steel, G.G., *The search for therapeutic gain in the combination of radiotherapy and chemotherapy*. Radiother Oncol, 1988. **11**(1): p. 31-53.
21. Schmoll, H.-J., K. Höffken, and K. Possinger, eds. *Kompendium internistische Onkologie*. 4 ed. 2005, Springer.

22. Bjork-Eriksson, T., C. West, E. Karlsson, and C. Mercke, *Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **46**(1): p. 13-9.
23. Tallarida, R.J., *Drug synergism: its detection and applications*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 865-72.
24. Hennequin, C. and V. Favaudon, *Biological basis for chemo-radiotherapy interactions*. Eur J Cancer, 2002. **38**(2): p. 223-30.
25. Pradier, O., *The relationship between Fludarabine-induced radiosensitisation and apoptosis in six human squamous cell carcinoma lines*. European Journal of Cancer, 2001. **37**(6): p. 206.
26. Lawrence, T.S., M.A. Davis, and J. Maybaum, *Dependence of 5-fluorouracil-mediated radiosensitization on DNA-directed effects*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **29**(3): p. 519-23.
27. Fukuoka, K., H. Arioka, Y. Iwamoto, H. Fukumoto, H. Kurokawa, T. Ishida, A. Tomonari, T. Suzuki, J. Usuda, F. Kanzawa, N. Saijo, and K. Nishio, *Mechanism of the radiosensitization induced by vinorelbine in human non-small cell lung cancer cells*. Lung Cancer, 2001. **34**(3): p. 451-60.
28. Danielsson, A., E. Karlson, and C. Mercke, *The radiosensitising effect of pentoxifylline: In vitro testing of colony forming ability, growth kinetics and cell cycle delay*. Radiotherapy and Oncology, 2001. **60**: p. S7.
29. Stewart, G.D., J. Nanda, E. Katz, K.J. Bowman, J.G. Christie, D.J. Brown, D.B. McLaren, A.C. Riddick, J.A. Ross, G.D. Jones, and F.K. Habib, *DNA strand breaks and hypoxia response inhibition mediate the radiosensitisation effect of nitric oxide donors on prostate cancer under varying oxygen conditions*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(2): p. 203-10.
30. Maddineni, S., V. Sangar, J. Hendry, C. Betts, K. O'Flynn, and N. Clarke, *The radiosensitising effects of Iressa (ZD 1839), an EGFR tyrosine kinase inhibitor, on related bladder cancer cell lines in vitro*. European Urology Supplements, 2003. **2**(1): p. 45.
31. Kim, J.S., G.P. Amorino, H. Pyo, Q. Cao, J.O. Price, and H. Choy, *The novel taxane analogs, BMS-184476 and BMS-188797, potentiate the effects of radiation therapy in vitro and in vivo against human lung cancer cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(2): p. 525-34.

32. Milas, L., N.R. Hunter, K.A. Mason, C.G. Milross, Y. Saito, and L.J. Peters, *Role of reoxygenation in induction of enhancement of tumor radioresponse by paclitaxel*. *Cancer Res*, 1995. **55**(16): p. 3564-8.
33. Pauwels, B., A.E. Korst, G.G. Pattyn, H.A. Lambrechts, D.R. Van Bockstaele, K. Vermeulen, M. Lenjou, C.M. de Pooter, J.B. Vermorken, and F. Lardon, *Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003. **57**(4): p. 1075-83.
34. Mason, K.A., L. Milas, N.R. Hunter, M. Elshaikh, L. Buchmiller, K. Kishi, K. Hittelman, and K.K. Ang, *Maximizing therapeutic gain with gemcitabine and fractionated radiation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999. **44**(5): p. 1125-35.
35. Asaad, N.A., Z.C. Zeng, J. Guan, J. Thacker, and G. Iliakis, *Homologous recombination as a potential target for caffeine radiosensitization in mammalian cells: reduced caffeine radiosensitization in XRCC2 and XRCC3 mutants*. *Oncogene*, 2000. **19**(50): p. 5788-800.
36. Bode, A.M. and Z. Dong, *The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer*. *Cancer Lett*, 2007. **247**(1): p. 26-39.
37. Higuchi, K., N. Mitsuhashi, J. Saitoh, K. Maebayashi, H. Sakurai, T. Akimoto, and H. Niibe, *Caffeine enhanced radiosensitivity of rat tumor cells with a mutant-type p53 by inducing apoptosis in a p53-independent manner*. *Cancer Lett*, 2000. **152**(2): p. 157-62.
38. Jeong, S.Y., S.L. Yi, S.K. Lim, S.J. Park, J. Jung, H.N. Woo, S.Y. Song, J.S. Kim, J.S. Lee, H.J. Park, and E.K. Choi, *Enhancement of radiotherapeutic effectiveness by temperature-sensitive liposomal 1-methylxanthine*. *Int J Pharm*, 2009. **372**(1-2): p. 132-9.
39. Oberdisse, E., E. Hackenthal, and K. Kuschinsky, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. 1 ed. 1997, Springer.
40. CliniPharmCliniTox. *Coffein*. Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie Zürich 2011; Available from: <http://www.vetpharm.uzh.ch/indexcpt>.
41. Gokulakrishnan, S., K. Chandraraj, and S.N. Gummadi, *Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005. **37**(2): p. 225-32
42. Stavric, B., *Methylxanthines: toxicity to humans. 2. Caffeine*. *Food Chem Toxicol*, 1988. **26**(7): p. 645-62.

43. SigmaAldrich. *Caffeine C0750 ReagentPlus, Powder (Product information)*. 2009; Available from: www.sigmaaldrich.com.
44. Akimoto, T., N. Mitsuhashi, H. Matsumoto, H. Sakurai, K. Maebayashi, K. Higuchi, M. Nozaki, and H. Niibe, *Potentially lethal damage repair and its inhibitory effect of caffeine in two yolk sac tumor cell lines with different radiosensitivities*. *Cancer Lett*, 1999. **147**(1-2): p. 199-206.
45. Valenzuela, M.T., S. Mateos, J.M. Ruiz de Almodovar, and T.J. McMillan, *Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation*. *Radiother Oncol*, 2000. **54**(3): p. 261-71.
46. Kaufmann, W.K., T.P. Heffernan, L.M. Beaulieu, S. Doherty, A.R. Frank, Y. Zhou, M.F. Bryant, T. Zhou, D.D. Luche, N. Nikolaishvili-Feinberg, D.A. Simpson, and M. Cordeiro-Stone, *Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery*. *Mutat Res*, 2003. **532**(1-2): p. 85-102.
47. Ribeiro, J.C., A.R. Barnetson, P. Jackson, K. Ow, M. Links, and P.J. Russell, *Caffeine-increased radiosensitivity is not dependent on a loss of G2/M arrest or apoptosis in bladder cancer cell lines*. *Int J Radiat Biol*, 1999. **75**(4): p. 481-92.
48. Rode, H.-J., D. Eisel, and I. Frost. *Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation*. 3rd edition; Available from: www.roche-applied-science.com.
49. Shounan, Y., X. Feng, and P.J. O'Connell, *Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity*. *J Immunol Methods*, 1998. **217**(1-2): p. 61-70.
50. Schutte, B., R. Nuydens, H. Geerts, and F. Ramaekers, *Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells*. *J Neurosci Methods*, 1998. **86**(1): p. 63-9.
51. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
52. Yedjou, C., P. Tchounwou, J. Jenkins, and R. McMurray, *Basic mechanisms of arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in human leukemia (HL-60) cells*. *J Hematol Oncol*, 2010. **3**: p. 28.
53. Szumiel, I., M. Kapiszewska, A. John, I. Gradzka, D. Kowalczyk, and P. Janik, *Caffeine-inhibitable control of the radiation-induced G2 arrest in L5178Y-S cells deficient in non-homologous end-joining*. *Radiat Environ Biophys*, 2001. **40**(2): p. 137-43.

54. Vavrova, J., M. Marekova-Rezacova, D. Vokurkova, S. Szkanderova, and J. Psutka, *Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells*. *Radiat Environ Biophys*, 2003. **42**(3): p. 193-9.
55. Bache, M., S. Pigorsch, J. Dunst, P. Wurl, A. Meye, F. Bartel, H. Schmidt, F.W. Rath, and H. Taubert, *Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53*. *Int J Cancer*, 2001. **96**(2): p. 110-7.
56. Bracey, T.S., A.C. Williams, and C. Paraskeva, *Inhibition of radiation-induced G2 delay potentiates cell death by apoptosis and/or the induction of giant cells in colorectal tumor cells with disrupted p53 function*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(8): p. 1371-81.
57. Artman, T., D. Schilling, J. Gnann, M. Molls, G. Multhoff, and C. Bayer, *Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010. **76**(2): p. 574-82.
58. Yaromina, A., M. Krause, H. Thames, A. Rosner, F. Hessel, R. Grenman, D. Zips, and M. Baumann, *Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation*. *Radiother Oncol*, 2007. **83**(3): p. 304-10.
59. Sutton, D.J. and P.B. Tchounwou, *Mercury-induced externalization of phosphatidylserine and caspase 3 activation in human liver carcinoma (HepG2) cells*. *Int J Environ Res Public Health*, 2006. **3**(1): p. 38-42.
60. Kylarova, D., J. Prochazkova, J. Mad'arova, J. Bartos, and V. Lichnovsky, *Comparison of the TUNEL, lamin B and annexin V methods for the detection of apoptosis by flow cytometry*. *Acta Histochem*, 2002. **104**(4): p. 367-70.
61. Roche. *Product pages Caspase 3 Activity Assay, Annexin-V-FLUOS Staining Kit*. 2011; Available from: www.roche-applied-science.com.
62. Comfurius, P., J.M. Senden, R.H. Tilly, A.J. Schroit, E.M. Bevers, and R.F. Zwaal, *Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1026**(2): p. 153-60.

63. Tan, D., B. Zhao, S. Mochhala, and Y.-Y. Yang, *Sustained-release of caffeine from a polymeric tablet matrix: An in vitro and pharmacokinetic study*. Materials Science and Engineering: B, 2006. **132**(1-2): p. 143-146.
64. Shakeel, F. and W. Ramadan, *Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 356-62.