

Aus dem Institut für Strahlenbiologie in der Klinik für Strahlentherapie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Strahlensensitivität und Strahlensensibilisierbarkeit nach der Einwirkung
ionisierender Strahlen und Coffein auf Bronchialkarzinomzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Jörn Schulze
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Budach
 2. Prof. Dr. med. M. Molls
 3. Prof. Dr. med. G. G. Grabenbauer

Datum der Promotion: 12. November 2007

In Gedenken an den für die chemische Industrie bedeutenden Wissenschaftler aus
Oranienburg



Friedlieb Ferdinand Runge (1794–1867),
Apotheker, Doktor der Medizin und Philosophie, Professor für Chemie,
Wegbereiter der modernen Teerfarbchemie und Entdecker des Coffeins (1819).

„Die Natur ist ein Ganzes und kann nicht stückweise, sondern ganz erkannt werden. Das „Stückweise-der-Natur-erkennen“ ist kein Erkennen.“ – „Wer mit seinem Geiste nicht die ganze Natur umfasst und die in seinem Innern lebendig werdende Idee der ganzen Natur nicht auch in jedem speziellen Gegenstande wieder zu finden vermag, der hat die Natur weder begriffen noch erkannt.“ [Runge, 1821]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Bronchialkarzinome	11
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie der Bronchialkarzinome	11
1.1.2	Klassifizierung der Bronchialkarzinome	12
1.1.3	Therapie der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome	12
1.2	Regulation von Zellzyklus und Apoptose	15
1.2.1	Zellzyklusprogression und -kontrolle	15
1.2.2	Apoptose	18
1.3	Coffein	19
1.3.1	Charakterisierung von Coffein	19
1.3.2	Einflussnahme von Coffein auf den Zellmechanismus	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Materialien und Geräte	24
2.1	Chemikalien	24
2.2	Stammlösungen und Reagenzien	25
2.3	Färbelösungen und Gele	27
2.3.1	Stammlösungen	27
2.3.2	Gebrauchslösungen und Gele	27
2.4	Zellkulturmedien und Zusätze	28
2.5	Enzyme	29
2.6	Einwegmaterialien	29
2.7	Kits	30
2.8	Geräte	30
2.9	Software	31
3	Methoden	32
3.1	Zellkultur	32
3.1.1	Zelllinien	32
3.1.2	Zellkultivierung	32
3.2	Allgemeine Versuchsdurchführung	33
3.3	Koloniebildungstest	34
3.3.1	Koloniebildung	34

3.3.2	Linear-quadratisches Modell	35
3.4	Zellzyklusanalyse	37
3.5	Apoptoseanalyse	39
3.6	p53- und p21-Proteinanalyse	40
3.7	Gen-Analyse	41
3.8	Migrationsanalyse	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Koloniebildungstest	44
4.2	Zellzyklusanalyse	46
4.3	Apoptoseanalyse	54
4.4	p53- und p21-Proteinanalyse	60
4.5	Gen-Analyse	62
4.6	Migrationsanalyse	64
5	Diskussion	65
6	Zusammenfassung	76

Abkürzungsverzeichnis

A549	humanes Bronchialkarzinom (Plattenepithelkarzinom)
Aif	<i>allograft inflammatory factor (ionized calcium-binding adapter molecule)</i>
Apaf	<i>apoptotic protease activating factor</i>
Apo	<i>apolipoprotein</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
Bad	<i>Bcl-2-antagonist of cell death (Bcl-2 binding component)</i>
Bag	<i>Bcl-2 associated athanogene</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein (apoptosis regulator)</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma encoded protein</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11 (Bcl-2 interacting mediator of cell death)</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cdc	<i>cell division control</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
Chk	<i>cyclin inhibiting kinase</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor (stromal cell-derived factor (SDF) receptor)</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA-protein kinase</i>
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline (Pufferlösung)</i>
DTT	Dithiothreitol
E2F	<i>retinoblastoma-associated protein</i>
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	<i>enzyme immunoassay</i>

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fadd	<i>Fas-associated death domain containing protein (mediator of receptor induced toxicity)</i>
Fap	<i>Fas-associated protein</i>
Fas	<i>factor activating exoenzyme S</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Fluorescein)
FKS	fötales Rinderserum
FOA	Fokus-Oberflächen-Abstand
Gadd	<i>growth arrest and damage dependent</i>
Gy	Gray
H460	humanes Bronchialkarzinom (Plattenepithelkarzinom)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> (Pufferlösung)
HDR	<i>homology-directed repair</i>
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HR	<i>homologous recombination</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
LQ-Modell	linear-quadratisches Modell
Mdm	<i>mouse double minute (human p53-binding protein)</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NfκB	<i>nuclear factor NF-κ-B P105 subunit (DNA-binding factor KBF1)</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (Cdk-interacting protein 1)</i>
p53	<i>cellular tumor antigen (tumor suppressor, phosphoprotein)</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Pufferlösung)
PDE	Phosphodiesterase
PE	<i>plating efficiency</i>
PI	Propidiumiodid
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase related kinase</i>

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Rb	<i>retinoblastoma related protein</i>
Rad	<i>Ras associated with diabetes</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	<i>ribonuclease</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-medium</i>
SCLC	<i>small-cell lung cancer</i>
SDF	<i>stromal cell-derived factor precursor (pre-B cell growth stimulating factor)</i>
SF (SF_D)	<i>surviving fraction</i>
SF₂	Überlebensfraktion bei 2 Gy
SF₁	Überlebensfraktion letal geschädigter Zellen
SF_n	Überlebensfraktion subletal geschädigter Zellen
SMAC	<i>pro-apoptotic SMAC precursor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tnf	<i>tumor necrosis factor precursor</i>
Tnf-R	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TNM	<i>tumor, nodes, metastases</i>
Tradd	<i>tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein (Tnf-R1-associated death domain protein)</i>
Traf	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
UICC	<i>Union International Contre Cancer</i>
UV	ultraviolettes Licht
WHO	<i>World Health Organization</i>

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn OA Dr. med. R. Wurm sowohl für die Themenstellung als auch die zahlreichen Anregungen bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. V. Budach für seine Bereitschaft, diese Promotionsarbeit an der Universität zu vertreten und dessen Klinik für Strahlentherapie die Durchführung des Projektes am Institut für Strahlenbiologie am Campus Mitte der Charité ermöglichte.

So möchte ich mich auch ganz besonders bei der Berliner Krebsgesellschaft e. V. für das neunmonatige Promotionsstipendium und bei der Charité für das dreimonatige Forschungsstipendium bedanken. Mit dieser Unterstützung konnte mein experimentell orientiertes Forschungsjahr konzentriert durchgeführt und damit ein reges Interesse an der Wissenschaft ausgebaut werden.

Ein ganz herzlicher Dank gilt vor allem Frau Dipl.-Ing. (FH) B. Sinn, aber auch Frau Dr. rer. nat. G. Wolf und den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe. Ich erinnere mich gerne an die Zeit der Einarbeitung und des Erlernens faszinierender Methoden und freue mich stets erneut über die von Beginn an anhaltende harmonische Arbeitsatmosphäre, in der ausdauernd diskutiert werden konnte und konstruktive Ideen aber auch Kritiken die wissenschaftliche Arbeit um ein Unschätzbares angeregt und bereichert haben.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei meiner Familie, allen voran bei meiner Freundin, für die Unterstützung im Studium als auch während des Projektes bedanken.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Jörn Schulze, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Strahlensensitivität und Strahlensensibilisierbarkeit nach der Einwirkung ionisierender Strahlen und Coffein auf Bronchialkarzinomzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.