

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES), 1M; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2'-Deoxycytidin; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2-Propanol, Isopropylalkohol; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS); Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU); Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Agarose; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Albumin bovine (BSA); Serva, Heidelberg, Deutschland

Ampuwa, destilliertes Wasser; Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg, Deutschland

CaCl₂; Merck, Darmstadt, Deutschland

Chloroform, Trichlormethan; J. T. Baker B. V., Deventer, Niederlande

Coffein, wasserfrei; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Diethylpyrocarbonat (DEPC), Diethyldicarbonat; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥99,5%; Roth, Karlsruhe, Deutschland

Dithiothreitol (DTT), 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol; Boehringer Bioproducts, Heidelberg, Deutschland

Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS), ohne Kalzium, Magnesium; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Ethanol, absolut; J. T. Baker B. V., Deventer, Niederlande

Ethidiumbromid (EB), 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid, Homidiumbromid, reinst; Serva, Heidelberg, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Formaldehyd, 36,5 bis 38% in wässriger Lösung; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Formamid, entsalzt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Giemsa-Hollborn-Original-Stammlösung; Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland

Glycerin, 99+%; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS), ohne Kalzium, Magnesium, Phenolrot; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Hoechst 33258, Bisbenzimid; Riedel-de Haën AG, Seelze, Deutschland

Hoechst 33342, Bisbenzimid; Serva, Heidelberg, Deutschland

MgCl₂; Merck, Darmstadt, Deutschland

NaCl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Natriumacetat; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Nonidet P40, Octylphenolpolyethylenglycolether; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Orange G; ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, USA

Phalloidin, Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiert (FITC-Konjugat); Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF); Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Propidiumiodid (PI); Serva, Heidelberg, Deutschland

SYBR Green I, Cyaninfloureszenzfarbstoff; Applied Biosystems, Foster City, USA

Tris-HCl; Merck, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.2 Stammlösungen und Reagenzien

10x Formaldehydgel-Ladepuffer

– 50% Glycerin

	<ul style="list-style-type: none"> – 10 mM EDTA (pH 8,0) – 2 mg/100 ml Orange G – in DEPC-behandeltem Ampuwa
10x MOPS-Elektrophoresepuffer	<ul style="list-style-type: none"> – 200 mM MOPS (pH 7,0) – 20 mM Natriumacetat – 10 mM EDTA (pH 8,0)
BrdU-Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> – 6 mM 2'-Deoxycytidin – 6 mM 5-Bromo-2'-Deoxyuridin – in D-PBS
Coffein-Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> – 100 mM Coffein – in D-PBS
DEPC-behandeltes Wasser	<ul style="list-style-type: none"> – 0,1% DEPC – in Ampuwa – 24 h Inkubation – Autoklavierung (121°C, 1 bar, 15 min)
Formaldehyd-Fixativ	<ul style="list-style-type: none"> – 1% Formaldehyd – in D-PBS
Kernlysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> – s. Zelllysepuffer – 500 mM NaCl
Tris-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> – 100 mM Tris-HCl – 154 mM NaCl – 0,5 mM MgCl₂ – 1 mM CaCl₂ – 0,1% Nonidet P40 – 0,2% BSA – in Ampuwa
Triton-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> – 0,1% Triton X-100 – in D-PBS
Zelllysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> – 20 mM HEPES – 10 mM NaCl – 1,5 mM MgCl₂ – 0,2 mM EDTA – 1 mM DTT – 1 mM PMSF – 20% Glycerin – 0,1% Triton X-100

	– in Ampuwa
PMSF-Stammlösung	– 100 mM PMSF – in 2-Propanol
DTT-Stammlösung	– 1 M DTT – in Ampuwa

Alle Stammlösungen werden bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.3 Färbelösungen und Gele

2.3.1 Stammlösungen

Ethidiumbromid-Stammlösung	– 150 µg/ml Ethidiumbromid – in Ampuwa
Hoechst 33258-Stammlösung	– 2 mg/ml Hoechst 33258 – in Ampuwa
Hoechst 33342-Stammlösung	– 500 µg/ml Hoechst 33342 – in Ampuwa
Phalloidin-Stammlösung	– 100 µg/ml Phalloidin – in PBS
Propidiumiodid-Stammlösung	– 50 µg/ml Propidiumiodid – in Tris-Puffer

Alle Färbelösungen werden bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.3.2 Gebrauchslösungen und Gele

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (3 µg/ml)	– 2% Ethidiumbromid-Stammlösung – in Tris-Puffer
Giemsa-Gebrauchslösung	– 10% Giemsa-Hollborn-Original-Stammlösung – in Ampuwa
Hoechst 33258-Gebrauchslösung (1,2 µg/ml)	– 0,06% Hoechst 33258-Stammlösung – in Tris-Puffer
Hoechst 33342-Gebrauchslösung (5 µg/ml)	– 1% Hoechst 33342-Stammlösung – in Zellkulturmedium
Phalloidin-Gebrauchslösung (10 µg/ml)	– 10% Phalloidin-Stammlösung – in PBS

Propidiumiodid-Gebrauchslösung (5 µg/ml)	<ul style="list-style-type: none"> – 10% Propidiumiodid-Stammlösung – 200 µg/ml RNase – in Tris-Puffer
Formaldehydgel	<ul style="list-style-type: none"> – 1,5% Agarose – 10% 10x MOPS-Elektrophoresepuffer – 18% Formaldehyd – in DEPC-behandeltem Ampuwa

Alle Färbelösungen werden bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Antibiotika/Antimykotika-Lösung, 100x, 10000 U/l Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B, in 0,85% Kochsalzlösung; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

fötale Rinderserum (FKS); Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Fungizone Antimykotika, 250 µg/ml Amphotericin B, in Wasser; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Minimum Essential Medium (MEM), 100x, ohne L-Glutamin; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Minimum Essential Medium (MEM), mit Earles Salzen, L-Glutamine; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

RPMI 1640, mit L-Glutamin; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Zellkulturmedium für A549:	<ul style="list-style-type: none"> – 1% 100x MEM – 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung – 1% Fungizone-Antimykotika – 15% FKS – in MEM
Zellkulturmedium für H460:	<ul style="list-style-type: none"> – 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung – 1% Fungizone-Antimykotika – 10% FKS – in RPMI 1640
Einfriermedium:	<ul style="list-style-type: none"> – 10% DMSO – in RPMI 1640

Die Medien sind für die Arbeit mit den Zellkulturen auf 37°C vorgewärmt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C lichtgeschützt.

2.5 Enzyme

Trypsin-EDTA, 1x, 0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA·4Na; Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK

Ribonuclease 2.7.7.16, RNase, aus Pankreas; Serva, Heidelberg, Deutschland

2.6 Einwegmaterialien

0,5 ml Safe-lock tubes; Eppendorf, Hamburg, Deutschland

1,5 ml Safe-lock tubes; Eppendorf, Hamburg, Deutschland

12 ml Reagenzröhren; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

5 ml Reagenzröhren; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

15 ml Falcon, Blue Max, Polypropylenröhrchen; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

5 ml Falcon, Polypropylenröhrchen; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

50 ml Falcon, Blue Max, Polypropylenröhrchen; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Cell scraper, steril; Corning Inc. Life Sciences, Corning, USA

Cellstar, Zellkulturflasche, 75 cm² (T75), 250 ml; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Celltrics, 20 µm-Filter; Partec, Münster, Deutschland

Multiwell 12 well Falcon, Zellkulturplatte; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Multiwell 6 well Falcon, Zellkulturplatte; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Nunclon Surface, Zellkulturflasche, 25 cm² (T25), 50 ml; Nunc A/S, Roskilde,

Dänemark

Transwell, Membranplatten, Polycarbonat, 8,0 µm Poren; Corning Inc. Life Sciences, Corning, USA

2.7 Kits

p21 human EIA, TiterZyme Kit; Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA

p53 pan ELISA; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

peqGOLD RNAPure; peqLab, Erlangen, Deutschland

2.8 Geräte

3K 30, Kühlzentrifuge; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Anthos ELISA reader 2100, Fotometer; Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Österreich

BSK 6, Sicherheitswerkbank; Anthos Mikrosysteme, Köln, Deutschland

BB 16, Begasungsbrutschrank; Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

HI 9017 Microprocessor, pH-Meter; Hanna Instruments Deutschland, Kehl am Rhein, Deutschland

Instant Camera System, MP 4+, 44-16, Fotodokumentationsanlage; Polaroid, Bedfordshire, UK

Leitz DMR, Licht- und Fluoreszenzmikroskop; Leica Camera, Solms, Deutschland

Leitz Fotoautomat WILD MPS 28/32, für Licht- und Fluoreszenzmikroskop; Leica Camera, Solms, Deutschland

Leitz Filterblock, für	Filterblock	Anregung	Teilung	Sperrung
Licht- und	A (UV)	340-380 nm	400 nm	430 nm
Fluoreszenzmikroskop;	N 2.1 (Grün)	515-560 nm	580 nm	580 nm
Leica Camera, Solms,	L 3 (Blau)	420-490 nm	510 nm	515 nm

Deutschland

Neubauer-Zählkammer; Fein-Optik, Blankenburg, Deutschland

PAS III, Durchflusszytometer; Partec, Münster, Deutschland

REAX top, Vartexer; Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

SW 21, Wasserbad; Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland

Umkehrmikroskop, 6,3x, 10x Objektiv, 10x Okular; Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland

Universal 30 RF, Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor; Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

UV-Flächenstrahler, 254 nm; Konrad Benda, Wiesloch, Deutschland

Gammatron S, Bestrahlungseinheit; Siemens, Mannheim, Deutschland

2.9 Software

FlowMax, Version 2.3, Cytometry software; Partec, Münster, Deutschland

GraphPad Prism, Version 4.00; GraphPad Software, San Diego, USA

MikroCOM, Reader software; Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland

MikroFIT, Reader software; Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland

WinMDI, Version 2.8; Joseph Trotter, Salk institute, La Jolla, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Die Untersuchungen erfolgen am in vitro-Modell. Es werden die nicht-kleinzelligen, epithelialen Bronchialkarzinomzelllinien A549 und H460 verwendet. Beide Zelllinien sind Permanentkulturen und wachsen adhärent als Monolayer. A549 stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Deutschland. Sie wurde aus einem explantierten Lungentumor im Jahr 1972 etabliert [Lieber et al., 1976]. H460 wurde 1982 aus der Pleuraflüssigkeit eines Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom gewonnen und ist von der American Type Culture Collection, ATCC, USA, bezogen worden. A549 und H460 sind sowohl durch eigene Analysen als auch durch die Literatur als p53-Wildtyp charakterisiert [Stuschke et al., 2002]. Der virologische Status für HCV und HIV1 ist für beide Zelllinien negativ.

3.1.2 Zellkultivierung

Die Zelllinien wachsen unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte im Begasungsbrutschrank. Zur standardisierten Kultivierung wird für beide Zellarten eine konstante Einsaat von 5×10^6 Zellen pro Zellkulturflasche vorgenommen. Die Flaschenoberfläche beträgt 75 cm². Es werden gemäß dem Standardprotokoll der DSMZ und ATCC die Nährmedien Minimum Essential Medium (MEM) für A549 und RPMI 1640 für H460 und die Pufferlösungen D-PBS und HBSS für A549 und H460 verwendet. Die Nährmedien sind mit 2,75 µg/ml Amphotericin B, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/l Penicillin angereichert. Der FKS-Gehalt beträgt 15% bzw. 10% für A549 und H460. Das Nährmedium der A549 enthält zusätzlich 1% 100x MEM. Ein Mediumwechsel erfolgt drei Tage nach der Einsaat zur Stimulierung des Wachstums und für eine maximale Zellausbeute und -qualität. Eine Woche nach der Einsaat wird die Passagierung mittels Trypsinierung durchgeführt. Für eine maximale Trypsinwirkung bei möglichst kurzer Einwirkzeit zur Vermeidung von Zellschäden werden die Kulturen in ihren Flaschen zweimal mit entsprechender Pufferlösung zur Entfernung des FKS-haltigen Mediums gespült. Zur Trypsinierung wird 1x Trypsin-EDTA für 3 min bei Brutschrankbedingungen verwendet. Im Anschluss wird die

Trypsinlösung mit D-PBS bzw. HBSS im Verhältnis 1:1 zur Einzelzellsuspension verdünnt und die Trypsinierung mit FKS-haltigem Nährmedium gestoppt. Die Zellausbeute der Passage wird zur Kontrolle des Wachstums und zur Beurteilung der Proliferationsfähigkeit mittels Neubauer-Zählkammer im Umkehrmikroskop bestimmt. Die absolute Zellausbeute beträgt im Durchschnitt für die Zelllinie A549 $2,0 \times 10^5$ Zellen/cm² und für H460 $3,4 \times 10^5$ Zellen/cm². Eine Teilsynchronisation der Zellen von über 80% in der G₀/G₁-Phase wird durch Kontaktinhibition und Serumverarmung erreicht. Der G₂-Anteil beträgt dabei unter 10%. Diese Synchronisation in der stationären Phase stellt die Ausgangsbedingung für alle Experimente dar. [Lindl, Bauer, 1994; Stuschke et al., 2002; modifiziert nach ATCC und DSMZ]

3.2 Allgemeine Versuchsdurchführung

Alle Experimente werden mit Zellen in maximaler G₁-Synchronisation durchgeführt. Die Subkultivierung für die Versuchsansätze findet mit einer definierten Zelleinsaat in entsprechenden Kulturgefäßen statt. Nach erfolgter Adhärenz der Zellen nach 4 h unter Brutschrankbedingungen erfolgt die Zugabe der Coffeinlösung. Es wird eine nicht- bzw. subtoxische Coffeinkonzentration von 2 mM und für die Untersuchung der Apoptose eine 5 mM Konzentration verwendet, die sich an der aktuellen Literatur orientiert [Sarkaria et al., 1999; Qi et al., 2002; Vávrová et al., 2003]. In Anlehnung an Vávrová et al., 2003 wird nach einer Inkubationszeit von 30 min mit ⁶⁰Co-Strahlen an dem Gammatron S der Firma Siemens bei Raumtemperatur bestrahlt. Es wird eine hohe Dosisleistung verwendet, die im Zeitraum der Versuche 1,15 bis 1,05 Gy/min betrug. Der Fokus-Oberflächen-Abstand (FOA) misst 65 cm. Das Bestrahlungsfeld hat eine Größe von 40 x 40 cm². Der Bestrahlungsaufbau ist normiert und dosimetrisch kontrolliert. Die Schwankungsbreite der Strahlendosis liegt unter 5%. Die Dosis der Bestrahlung ist von der Zielsetzung der einzelnen Versuche abhängig. Für den Koloniebildungstest wird eine Dosisreihe von 0 bis 8 Gy mit Inkrementen von 1 Gy erstellt. Die Beurteilung des Zellzyklus wird unter isoeffektiver Bestrahlung durchgeführt. Mit einer aus dem Zellüberleben ermittelten Strahlendosis von 6 Gy für A549 und 3 Gy für H460 wird die unterschiedliche Strahlensensibilität beider Zelllinien berücksichtigt und eine vergleichende Darstellung der Proliferationskinetik unter

annähernd identischem klonogenen Zellüberleben bei isoeffektiver Bestrahlung gewährleistet. Die Apoptose wird provokativ bei einer proliferationshemmenden Dosis von 10 Gy untersucht [Qi et al., 2002]. Für alle weiteren Versuche wird eine Strahlendosis von 6 Gy verwendet. Den Experimenten dienen jeweils unbehandelte Proben zur Kontrolle, coffeininkubierte, bestrahlte und Proben mit der Kombination beider Modulatoren.

3.3 Koloniebildungstest

Zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit und zur Beurteilung der Coffeinwirkung bezüglich dieser wird der Koloniebildungstest verwendet. Er gibt Aufschluss über die proliferative Kapazität der Zellen unter ionisierender Bestrahlung. Es werden strahlenbiologische Parameter, wie die Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF2) und die Plattiereffizienz (PE) ermittelt. Eine Dosisreihe von 0 bis 8 Gy ermöglicht die Darstellung einer Zellüberlebenskurve. Mit Hilfe des linear-quadratischen Modells können anhand der Zellüberlebenskurve weitere Parameter zur Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit aufgezeigt werden.

3.3.1 Koloniebildung

Die Grundlage des Experimentes ist das Auswachsen von Zellkolonien. Dabei wird nach Steel, 1993 eine Kolonie mit mindestens 50 Zellen definiert. Für eine optimale quantitative Beurteilung werden etwa 60 bis 100 Kolonien je Dosis angestrebt. Die dafür erforderlichen Zelleinsaat sind in Vorversuchen ermittelt. Die definierten Zellzahlen für die Volumeneinsaat werden in mehreren Verdünnungsschritten hergestellt. Es werden zur Bestimmung des akuten Überlebens und nach Modulation mit Coffein bei einer Bestrahlung von 0 bis 8 Gy T25-Flaschen dreifach angesetzt. Eine Pufferung des pH-Wertes des Nährmediums mit 2% HEPES ist aufgrund der relativ geringen Zellzahl nötig. Die Einwirkung von Coffein wird 72 h nach Einsaat durch Mediumwechsel beendet. Damit stehen zum einen mehrere Zellzyklen und Zellgenerationen unter dem Einfluss von Coffein und zum anderen wird der toxische Einfluss der Substanz auf ein Minimum reduziert. Die Kolonien wachsen unter Kulturbedingungen aus. Das Koloniewachstum wird nach 14 Tagen beendet.

Die Kolonien werden zur mengenmäßigen Bestimmung in den Kulturflaschen angefärbt. Überschüssige Proteine werden durch zweimaliges Waschen mit D-PBS entfernt. Die Zellen werden zur Fixierung 15 min in Ethanol inkubiert. Die Färbung der Kolonien erfolgt mit der Giemsa-Gebrauchslösung für 45 min. Restliche Färbelösung wird mit Ampuwa ausgespült.

3.3.2 Linear-quadratisches Modell

Zur Beurteilung der Strahlensensibilität der Zellen kann die mathematische Analyse von Zellüberlebenskurven mit Hilfe des linear-quadratischen Modells (linear-quadratic model, LQ-Modell) erfolgen. Das LQ-Modell dient der Beschreibung der Bestrahlungsreaktion im Niedrigdosisbereich von 0 bis 3 Gy. Das Modell ermöglicht daneben die Analyse fraktionierter Bestrahlung und wird seit 1980 nach dem National Council on Radiation Protection and Measurements insbesondere zum Erstellen von Therapiekonzepten eingesetzt.

Die Grundlage des Modells ist die molekulare Theorie von der Strahlenletalität durch unreparierte Doppelstrangbrüche. Es wird zwischen subletalen und letalen Strahlenschäden unterschieden. Die für die Zellinaktivierung ursächlichen Doppelstrangbrüche können sowohl aus einer als auch aus mehreren Strahlungsbahnen von Sekundärelektronen resultieren. Die Wahrscheinlichkeit P_1 eines Doppelstrangbruches durch die Strahlungsbahn eines einzelnen Sekundärelektrons, ein Ein-Spur-Ereignis, ergibt sich aus der Strahlendosis D und der zellspezifischen Konstante α mit der Einheit $[\text{Gy}^{-1}]$ (I). Sie steigt linear mit der Strahlendosis an. Demgegenüber besteht die Wahrscheinlichkeit P_n einer Letalität durch Wechselwirkung einzelner, subletaler Einzelstrangbrüche, die durch mindestens zwei Sekundärelektronen bedingt sind. P_n ermittelt sich aus der Strahlendosis D und der zellspezifischen Konstante β mit der Einheit $[\text{Gy}^{-2}]$ (II). Die subletalen Strahlenschäden steigen ebenfalls linear mit der Dosis an. Die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung subletaler Strahlenschäden nimmt proportional zum Quadrat der Dosis zu. Die Gesamtwahrscheinlichkeit P einer Letalität leitet sich von der linearen Komponente P_1 und der quadratischen Komponente P_n ab (III).

$$P_1 = \alpha D \quad (I)$$

$$P_n = \beta D^2 \quad (II)$$

$$P = \alpha D + \beta D^2 \quad (III)$$

Die Gesamtfraction SF_D überlebender, mit der Dosis D bestrahlter Zellen ergibt sich aus den obigen Wahrscheinlichkeiten (VI). Sie wird aus der Fraktion letal (SF_1 ; IV) und subletal (SF_n ; V) geschädigter Zellen ermittelt und mit Hilfe des natürlichen Logarithmus dargestellt. Das Zellüberleben nimmt in der linearen Komponente linear zur Dosis ab und in der quadratischen Komponente zum Quadrat der Dosis ab.

$$\ln SF_1 = -\alpha D \quad (IV)$$

$$\ln SF_n = -\beta D^2 \quad (V)$$

$$\begin{aligned} \ln SF_D &= -\alpha D - \beta D^2 \\ SF_D &= e^{-\alpha D - \beta D^2} \end{aligned} \quad (VI)$$

Die graphische Darstellung der Überlebenskurve erfolgt unter Anwendung der Poisson'schen Verteilung und ergibt durch die Logarithmierung eine Streckung des unteren Abschnittes der Kurve (Abb. 3-1). Die Konstante $-\alpha$ bestimmt die Anfangsneigung des Kurvenverlaufs ab 0 Gy mit der linearen Komponente und stellt den Anstieg der anfänglichen Tangente dar. Die Strahlensensibilität bei geringer Dosis wird durch α beschrieben und korreliert am stärksten mit der Strahlenreaktion des Tumors in vivo. Die Konstante $-\beta$ gibt die Krümmung der Kurve im weiteren Verlauf an. Der Quotient α/β grenzt die lineare von der quadratischen Komponente ab. Das Verhältnis ist für die Ausprägung der Schulter der Kurve verantwortlich und gibt die Strahlendosis D an, bei dem $-\alpha D$ und $-\beta D^2$ bzw. der subletale und letale Strahlenschaden den gleichen Anteil an der Zellabtötung haben. Ein weiteres zellcharakteristisches Kriterium stellt die Überlebensrate bei 2 Gy (SF_2) dar und gibt Auskunft über die Strahlensensibilität. [Chadwick, Leenhouts, 1975; Gallert, 1979; Malaise et al., 1987; Steel, 1993]

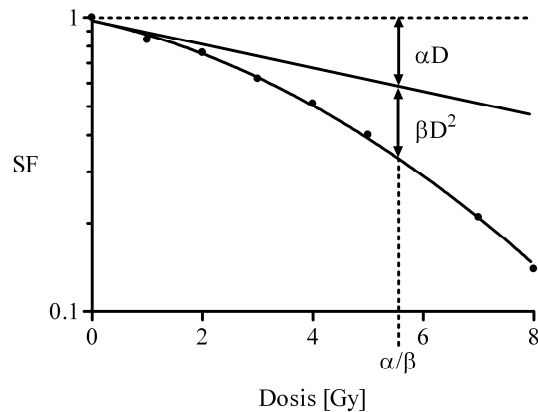


Abb. 3-1: LQ-Modell. Darstellung der Anfangstangente der Überlebenskurve mit der Steigung $-\alpha$. (Exemplarisch für die Zelllinie A549 bei Bestrahlung nach maximaler G_1 -Synchronisation)

3.4 Zellzyklusanalyse

Zur Beurteilung der Proliferationskinetik unter den einzelnen Behandlungen werden aufeinander folgende Zellzyklen dargestellt. Die BrdU/Hoechst-Ethidiumbromid-Methode ermöglicht dazu die Darstellung aufeinander folgender Zellzyklen in ihrer Kinetik mit den einzelnen Phasen G_0/G_1 , S und G_2/M [Ormerod, Kubbies, 1992; Schmitz, Rothe, 1994; Gilligan et al., 1996]. Die Zellen werden mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) und 2'-Deoxycytidin in equimolarer Konzentration permanent inkubiert. BrdU wird in der Synthesephase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut [Latt, 1973; Latt, 1974]. Somit ist durch den Einbau des Thymidin-Analogons BrdU bei der DNA-Replikation die neu synthetisierte DNA von der elterlichen zu unterscheiden. 2'-Deoxycytidin dient dem optimalen Nukleotidstoffwechsel. Die alleinige Gabe von BrdU beeinflusst diesen sowie die Chromatinstruktur und -stabilität [Latt, 1973; Latt, 1974]. Die Kombination beider Substanzen in einer Konzentration von je $60 \mu\text{M}$ beeinflusst den Zellzyklus nicht und ermöglicht eine scharfe Trennung der einzelnen Zellzyklusphasen in der Durchflusszytometrie.

Die Zellkulturen werden nach dem Ernten zu definierten Zeitpunkten mit den DNA-Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33258 und Ethidiumbromid (EB) angefärbt. Das Bisbenzimid Hoechst 33258 mit einer Konzentration von $1,2 \mu\text{g/ml}$ dient der DNA-Fluoro-Chromierung und bindet überwiegend an das Basenpaar Adenin-Thymin. Die Bindungsstellen und damit die blaue Fluoreszenz des Hoechst-Farbstoffs mit einer

Emission von 478 nm wird durch den verstärkten Einbau des Thymidin-Analogons BrdU in jedem Zellzyklus zunehmend vermindert (Quenching-Effekt). EB in einer Konzentration von 3 µg/ml erlaubt die Darstellung der einzelnen Subpopulationen des Zellzyklus. Es färbt die DNA infolge Interkalation in die Doppelhelix und wird nicht durch BrdU beeinflusst. EB besitzt eine rot-orange Fluoreszenz mit einer Emission von 620 nm. Mit beiden Färbungen ist es möglich, in einer zweidimensionalen Durchflusszytometrie eine Auftrennung der proliferierenden Zellen in mindestens drei aufeinander folgenden Zellzyklen mit einer quantitativen Analyse der jeweiligen G₁-, S- und G₂/M-Phase sowie der nicht proliferierenden G₀/G₁-Fraktion zu erzielen. [Ormerod, Kubbies, 1992; Schmitz, Rothe, 1994; Römpf, 1995; Gilligan et al., 1996]

Die Proliferationskinetik wird nach isoeffektiver Bestrahlung sowohl mit als auch ohne Einfluss von Coffein beobachtet. Es werden für den Versuchsansatz 1 x 10⁵ Zellen/ml in 12-Well-Zellkulturplatten eingesät. Die BrdU-2'-Deoxycytidin-Gabe erfolgt unmittelbar nach der Bestrahlung. Die Kultivierung findet bei Brutschrankbedingungen statt. Die Zellzyklen werden in einem Zeitfenster von 0 bis 72 h mit einem Intervall von 4 h analysiert. Die Zellernte erfolgt zum Schutz der DNA lichtgeschützt. Die Zellen werden zur Entfernung überschüssiger Proteine zweimal mit D-PBS gespült und anschließend zur Dissoziation trypsinisiert. Die Probe wird zellschonend in 12 ml Reagenzröhren zentrifugiert (303 g, 4°C, 7 min) und erneut zweimal mit D-PBS gewaschen. Das Zentrifugat wird anschließend in 1 ml 4°C gekühlten Einfriermedium in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aufgenommen und bis zur Durchflusszytometrie bei -80°C aufbewahrt.

Die Färbung zur durchflusszytometrischen Messung wird lichtgeschützt durchgeführt. Die bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetauten Zellproben werden in 12 ml Reagenzröhren überführt und zentrifugiert (303 g, 4°C, 7 min). Der Überstand wird verworfen. Im ersten Färbeschritt wird das Pellet in 1 ml 4°C temperierter Hoechst 33258-Gebrauchslösung suspendiert und 15 min unter regelmäßigem Schütteln zur Wahrung der Einzelzellsuspension inkubiert. Die zweite Färbung erfolgt mit 1 ml 4°C gekühlter Ethidiumbromid-Gebrauchslösung. Die Inkubationszeit beträgt ebenfalls 15 min bei gleichen Bedingungen.

Die Quantifizierung der Zellzyklen mit den einzelnen Subpopulationen erfolgt mit dem Durchflusszytometer PAS III von Partec in einer zweiparametrischen Darstellung der

beiden Substanzen Hoechst 33258 und Ethidiumbromid. Zur Anregung beider Fluorochrome wird eine Quecksilberhochdrucklampe HBO, 100 W als UV-Quelle mit einer Extinktion von 365 nm verwendet. Es werden je Probe und Messzeitpunkt 10.000 Zellen mit der Software WinMDI analysiert.

3.5 Apoptoseanalyse

Die Apoptose wird morphologisch anhand der DNA definiert. Zusätzlich können neben den eintretenden DNA-Schädigungen apoptotische Schäden anhand von Membranveränderungen mittels F-Actin, einem Bestandteil der Pseudopodien und Mikrovilli nachgewiesen werden. Dieses Protein vermindert sich im Prozess der Apoptose. Die Analyse der Apoptose findet zum Zeitpunkt $T = 240$ h nach der Bestrahlung statt. [Endresen et al., 1995; Mangoldt et al., 2002]

Die DNA-Schädigung wird mit zwei Färbetechniken beurteilt. Mit Hilfe des Supravitalfarbstoffes Hoechst 33342, der reversibel an die DNA bindet, wird die Zellmorphologie mikroskopisch bewertet. Dazu werden die Kulturen in ihren 6-Well-Zellkulturplatten mit dem Bisbenzimid mit einer Blaufluoreszenz bei 483 nm in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ für 20 min unter Brutschrankbedingungen gefärbt. Anschließend werden die Proben zum Entfernen des Nährmediums und überschüssiger Färbelösung zweimal mit D-PBS gespült und in einer nicht toxischen 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konzentrierten Färbelösung bei 4°C aufbewahrt. Die Morphologie der adhärenen Zellen wird mit einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Ein UV-Filter mit einer Anregung bei 340 bis 380 nm zusammen mit einer Quecksilber-Bogenlampe HBO, 50 W dient der Fluoreszenzmikroskopie. [Römpf, 1995; Amirlak, Couldwell, 2003]

Des Weiteren wird die DNA mit dem interkalierenden Fluorochrom Propidiumiodid (PI) mit einer Rotorangefluoreszenz bei 617 nm gefärbt. Damit werden durchflusszytometrisch die Zellzyklusphasen und die DNA-Schädigung unter Apoptose dargestellt. Es werden dazu sowohl adhärenente als auch im Überstand befindliche Zellen verwendet. Die durch Trypsinierung gewonnenen Zellen werden in 15 ml-Röhrchen mit D-PBS zum Entfernen von restlichem Nährmedium und FKS gewaschen und schonend zentrifugiert (303 g, 4°C, 7 min). Zur Fixierung werden die Zellen mit 1% Formaldehyd bei 4°C für 12 h inkubiert. Das Formaldehyd wird mit 0,1% Triton-Lösung als Detergenz und D-PBS in mehreren Waschrufen entfernt. Es folgt die Färbung der

DNA mit 5 µg/ml PI. Die Inkubation der Einzelzellsuspension erfolgt für mindestens 1 h bei 4°C. Der durchflusszytometrischen Darstellung der angefärbten DNA dient ein Argon-Laser mit einer Emission von 488 nm. Es werden pro Probe 30.000 Zellen mit dem PAS III-Durchflusszytometer gemessen. Zusätzlich werden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop charakterisiert und fotodokumentiert. Die PI-Färbung wird dazu mit einem Grün-Filter bei einer Anregung von 515 nm bis 560 nm dargestellt. Als Lichtquelle wird eine Quecksilber-Bogenlampe HBO mit 50 W verwendet. [Amirlak, Couldwell, 2003]

Die Färbung des Membranproteins F-Actin erfolgt mit einem Phalloidin-Fluorescein-Konjugat in einer Konzentration von 10 µg/ml. Phalloidin bindet an das Protein und markiert es durch das FITC. Das Fluorochrom besitzt eine Emission von 519 nm. Vermindertes F-Actin führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Die zu untersuchenden Zellen stammen aus dem gleichen Ansatz für die Propidiumiodid-Färbung. Die Färbung erfolgt vor der PI-Gabe. Die Einzelzellsuspension wird mit der Phalloidin-Färbelösung 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Überschüssige Färbelösung wird anschließend mit D-PBS herausgewaschen. Die Bestimmung des F-Actin-Gehaltes wird zusammen mit der PI-Gegenfärbung zur Sicherung der Detektion von Zellen mit Zellkern durchflusszytometrisch durchgeführt. Außerdem wird auch die Zellmembran mit der FITC-Färbung mit einem Blau-Filter bei einer Anregung von 450 nm bis 490 nm mikroskopisch dargestellt. [Amirlak, Couldwell, 2003]

3.6 p53- und p21-Proteinanalyse

Die Proteine p53 und p21 werden hinsichtlich ihrer Beeinflussung durch Coffein unmittelbar nach genotoxischem Stress untersucht. In einem Zeitraum von 0 bis 8 h nach Bestrahlung wird die quantitative Bestimmung beider Proteine im 2 h-Intervall vorgenommen.

Zur Präparation der Kernextrakte mit den darin befindlichen Proteinen werden die Zellen zunächst zur Dissoziation trypsiniert und zum Entfernen von Nährmedium und Trypsin mit D-PBS gewaschen. Zur Zellyse wird die Probe mit 2,5 ml hypotonischem Zellysepuffer für 5 min auf Eiswasser inkubiert. Nach Zentrifugation (800 g, 4°C, 4 min) des Zellysates folgt die Kernlyse. Dazu werden 100 µl Kernlysepuffer pro 1×10^6 Zellen dem Pellet hinzugegeben. Das Lysat wird nach 30 min Inkubation auf

Eiswasser zentrifugiert (35.000 g, 4°C, 10 min). Der p53- und p21-enhaltende Überstand wird bis zur Proteinbestimmung aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. [Tishler et al., 1993]

Zur quantitativen Bestimmung des p53-Gehaltes dient der p53-pan-ELISA-Kit nach der vom Hersteller angegebenen Arbeitsvorschrift. In die Streptavidin-beschichtete und mit Biotin konjugierte Microtiter-Platte werden 100 µl der p53-Standards zur Erstellung einer Eichkurve und 100 µl der aufgearbeiteten Proteinproben pipettiert. Es werden anschließend zur Markierung des Proteins 100 µl des an Peroxidase gebundenen p53-Antikörpers (Anti-p53-POD) hinzugegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem fünfmaligen Waschen mit entsprechendem Waschpuffer zum Entfernen nicht gebundener Substanz wird TMB zum Nachweis der Peroxidasereaktion dazupipettiert. Die Farbreaktion wird nach etwa 15 min Inkubationszeit mit 50 µl TMB-Stopplösung angehalten. Die Farbintensität ist äquivalent dem Proteingehalt und wird fotometrisch bei einer Emission von 450 nm gemessen.

Die p21-Proteinquantifizierung wird mit dem human p21-EIA-Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Eichkurve für die Ermittlung der Proteinkonzentration wird durch eine Verdünnungsreihe des mitgelieferten p21-Standards erstellt. In die Microtiter-Platte, die mit monoklonalem humanen p21-Antikörper beschichtet ist, werden 100 µl der p21-Standards und der aufgearbeiteten Proteinpräparate gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen werden 100 µl des polyklonalen humanen p21-Antikörpers (Kaninchen) zupipettiert und 1 h inkubiert. Es folgt nach erneutem Waschen die Zugabe von 100 µl des p21-Peroxidase-Konjugates (Ziege/Anti-Kaninchen-IgG, Meerretich-POD) für 30 min. Nach nochmaligem Waschen, 100 µl TMB-Zugabe für 30 min und anschließender Zugabe von 100 µl TMB-Stopplösung erfolgt ebenfalls die fotometrische Emissionsmessung der Proben bei 450 nm zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

3.7 Gen-Analyse

Der Einfluss von Coffein und Bestrahlung auf die Genexpression wird anhand der mRNA untersucht. Sie repräsentiert die Gesamtheit aller zu einem gegebenen Zeitpunkt exprimierten Gene, die Proteine codieren [Löffler, Petrides, 1998]. Es werden mit einem

kommerziell erworbenen immuno-onkologischen Microarray der Firma Memorec Biotec, Deutschland, überwiegend Gene mit Funktionen für die Proliferation und Zellzykluskontrolle in einem breiten Spektrum betrachtet.

Die Isolierung der Gesamt-RNA mit der darin enthaltenen mRNA wird 4 h nach Bestrahlung durchgeführt. Dieser Zeitpunkt orientiert sich an der p53-Regulierung mit einem Maximum des Proteingehaltes unter genotoxischem Stress. Zur Präparation werden die Zellen durch Abschaben mittels Gummischaber im Nährmedium dissoziiert. Zur Vermeidung von Zellverklumpungen wird die Zellsuspension mehrmals pipettiert und anschließend zentrifugiert (303 g, 4°C, 7 min). Der Überstand wird verworfen. In dem geringen Rücklauf des noch verbleibenden Überstandes wird das Zellpellet mit 750 µl RNAPure zur Zellyse in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen inkubiert und zur Scherung der Zellen resuspendiert. Das Lysat wird zur Kernlyse mit 100 µl Chloroform unter Schütteln 30 min auf Eiswasser inkubiert. Die Trennung der RNA von der DNA und Zelltrümmern erfolgt durch Zentrifugieren (22.136 g, 4°C, 30 min). In der oberen, wässrigen Phase befindet sich die RNA. Zur Präzipitation der RNA wird diese Fraktion mit 2-Propanol mit einem Volumenanteil von 1:1 versetzt. Die Ausfällung der RNA erfolgt bei -20°C für mindestens 12 h. Das zentrifugierte (22.136 g, 4°C, 30 min) RNA-Pellet wird zum Reinigen von 2-Propanol mit 70% Ethanol sorgfältig gespült und für etwa 45 min auf Eiswasser an der Luft getrocknet. Das Pellet wird in 20 µl DEPC-behandeltem und damit RNase-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung zu 2 µl und 18 µl aliquotiert bei -80°C gelagert. [Sambrock, Russell, 2001].

Die Integrität der extrahierten RNA wird mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu werden die auf Eis aufgetauten 2 µl-RNA-Proben mit 2 µl 10x MOPS-Elektrophoresepuffer, 4 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid bei 55°C im Wasserbad 60 min und anschließend 10 min im Eiswasser inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl 10x Formaldehydgel-Ladepuffer mit dem enthaltenden Orange G zur Markierung der RNA im Gel wird die Probe auf das vorbereitete 1,5%ige Agaroseformaldehydgel aufgetragen. An die mit 1x MOPS-Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer wird eine Spannung von 120 V für 45 min zur Trennung der RNA-Untereinheiten als Nachweis der RNA angelegt. Die RNA im Gel wird anschließend 30 min mit 40 µl/100 ml SYBR Green in 1x MOPS-Elektrophoresepuffer bei Raumtemperatur lichtgeschützt angefärbt. SYBR Green ist ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff und bindet unspezifisch an die RNA. Durch die Bindung steigt das Fluoreszenzsignal des SYBR

Greens stark an. Die für die RNA charakteristischen 28S- und 18S-Untereinheiten werden in Form von Banden unter UV-Licht nachgewiesen. Zusätzliche Banden stellen Verunreinigungen durch genomische DNA dar. Schlieren weisen auf eine Degradation der RNA hin. [Sambrock, Russell, 2001].

3.8 Migrationsanalyse

Der Nachweis der Migrationsfähigkeit ist unter Verwendung von Transwell-Membranen möglich. Die Einsätze aus einem Polycarbonat haben einen Porendurchmesser von 8 μm . Sie teilen die 6-Well-Zellkulturplatten in ein oberes und ein unteres Kompartiment. Mindestens 2 h vor der Zelleinsaat werden die Membran mit FKS-freiem und die Platte mit FKS-haltigem Nährmedium für den Aufbau eines Konzentrationsgradienten äquilibriert. Die Zellen werden nach erneutem Mediumwechsel in das obere Kompartiment eingesät. Für die Analyse werden jeweils Triplikate angesetzt. Die Detektion migrierter Zellen erfolgt im unteren Kompartiment. Dazu werden vergleichend beide Fraktionen sowohl mit adhärenenten als auch im Überstand befindlichen Zellen separat geerntet. Zunächst wird mit D-PBS gespült, zur Dissoziation trypsiniert und anschließend die Zellsuspension in FKS-haltigem Medium aufgenommen und in 15 ml-Röhrchen zentrifugiert (303 g, 4°C, 7 min). Die Zellzahl des Zentrifugates und damit die des Kompartimentes wird mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. [modifiziert nach Joy et al., 2003]