

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Koloniebildungstest

Die Überlebensfraktion der beiden Zelllinien A549 und H460 wurde mit Hilfe des Koloniebildungstestes für den Dosisbereich von 0 bis 8 Gy ermittelt. Die Bestrahlung erfolgte in stationärer Phase des Zellzyklus bei einem G<sub>1</sub>-Phase-Anteil von über 80%. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden drei separate Versuchsansätze mit jeweiligen Triplikaten verwendet (Abb. 4-1 und Abb. 4-2). Die Zelllinie A549 zeigte dabei eine Überlebensfraktion bei 2 Gy von  $SF_2 = 0,76 \pm 0,04$ . Die Modulation durch Coffein in einer Konzentration von 2 mM führte zu einer mit  $p = 0,0004$  signifikanten Reduzierung der Überlebensfraktion um -21,05% mit  $SF_{2C} = 0,60 \pm 0,03$ . Die Zelllinie H460 besaß eine Überlebensfraktion von  $SF_2 = 0,48 \pm 0,06$ . Die Coffeingabe führte ebenfalls zu einer mit  $p = 0,0069$  signifikanten Reduzierung um -31,25% mit  $SF_{2C} = 0,33 \pm 0,09$  (Abb. 4-3 und Abb. 4-4).

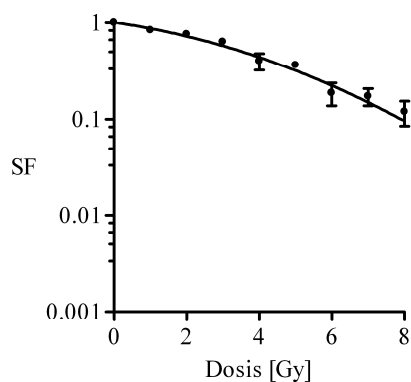


Abb. 4-1: A549.

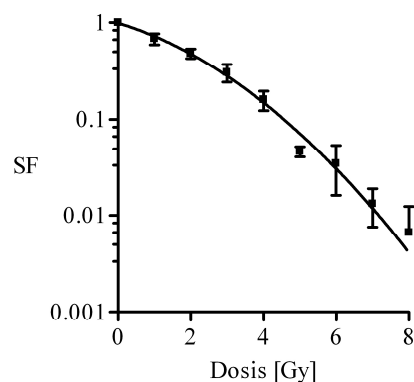


Abb. 4-2: H460.

Abb. 4-1 und Abb. 4-2: Überlebensfraktion von A549 und H460. Bestrahlung in stationärer Phase. Darstellung der Überlebenskurve mittels Poisson'scher Verteilung mit jeweiligem Mittelwert und Standardabweichung.

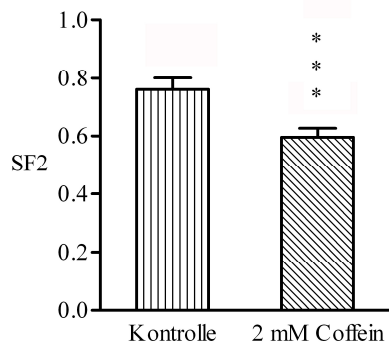


Abb. 4-3: A549.

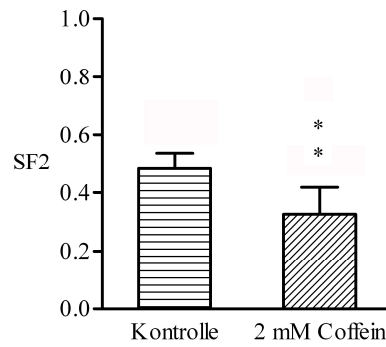


Abb. 4-4: H460.

Abb. 4-3 und Abb. 4-4: SF2 von A549 und H460. Angabe des mittleren Überlebensfaktors und der Standardabweichung bei Bestrahlung in stationärer Phase.

Ferner zeigte sich auch eine Reduzierung der Plattiereffizienz bei 0 Gy unter der Gabe von 2 mM Coffein. Für die Zelllinie A549 galt bei 0 Gy ohne Coffein eine Plattiereffizienz von  $PE = 63,17\% \pm 18,71\%$ . Die Coffeingabe führte zu einer nicht signifikanten Reduzierung um -11,75% mit  $PE_C = 55,75\% \pm 13,05\%$  ( $p = 0,54$ ). Für die Zelllinie H460 wurde dagegen eine Plattiereffizienz von  $PE = 82,17\% \pm 8,64\%$  ermittelt, die unter Coffeingabe mit  $p = 0,0044$  signifikant um -37,78% auf  $PE_C = 51,13\% \pm 11,05\%$  reduziert wurde (Abb. 4-5 und Abb. 4-6).

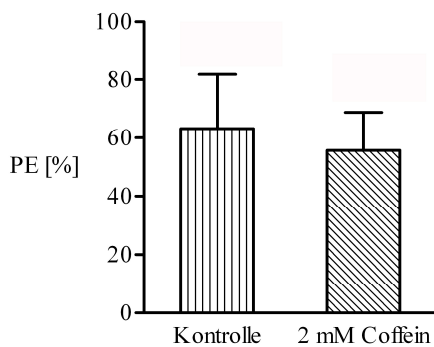


Abb. 4-5: A549.

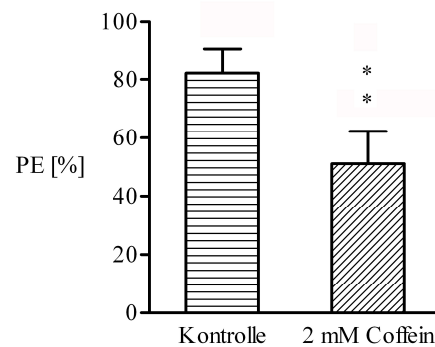


Abb. 4-6: H460.

Abb. 4-5 und Abb. 4-6: PE von A549 und H460 bei 0 Gy. Angabe der mittleren PE und der Standardabweichung.

Zur Quantifizierung der Strahlenwirkung unter Einfluss von Coffein wurden die gewebespezifischen Konstanten  $\alpha$  und  $\beta$  mit Hilfe des linear-quadratischen Modells aus

der Überlebensfraktion im Dosisbereich von 0 bis 8 Gy bestimmt (vgl. 3.3.2). Dabei zeigte sich bei A549 ein  $\alpha/\beta$ -Quotient von  $\alpha/\beta = 6,64$  Gy. Unter Coffeingabe fand eine geringe Zunahme des Quotienten mit  $\alpha/\beta_C = 7,54$  Gy statt ( $p = 0,62$ ). Die Coffeingabe bei H460 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $\alpha/\beta = 6,23$  Gy zu einer mit  $p = 0,0188$  signifikanten Zunahme des Quotienten mit  $\alpha/\beta_C = 25,22$  Gy (Abb. 4-7 und Abb. 4-8).

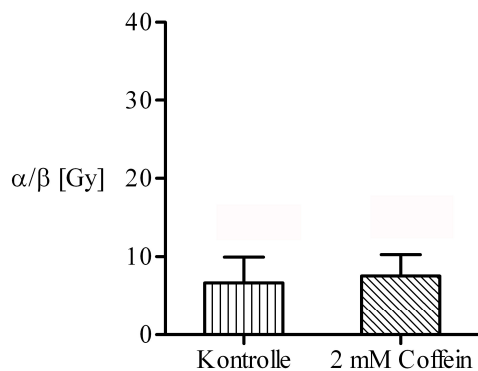


Abb. 4-7: A549.

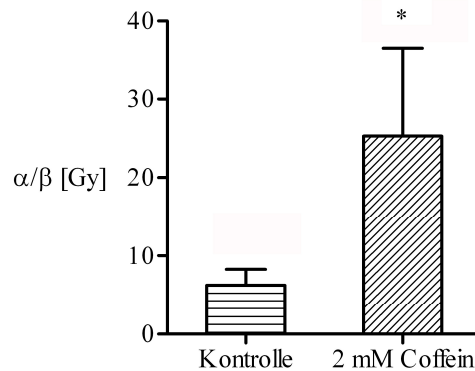


Abb. 4-8: H460.

Abb. 4-7 und Abb. 4-8:  $\alpha/\beta$ -Quotient von A549 und H460. Angabe des mittleren  $\alpha/\beta$ -Quotienten und der Standardabweichung.

## 4.2 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden je Zelllinie vier unabhängige Untersuchungen durchgeführt, die ein kongruentes Resultat zeigten. Die Ergebnisdarstellung anhand der Zellzykluskinetik erfolgt an jeweils einem stellvertretenden Experiment und basiert auf der Analyse von 10.000 Zellen.

Zur durchflusszytometrischen Messung der einzelnen Subpopulationen  $G_1$ , S,  $G_2/M$  und Sub- $G_1$  von drei aufeinander folgenden Zellzyklen wurden die Zellen der A549 und H460 in ihrer stationären Phase durch Kontaktinhibition und Serumverarmung mit einem  $G_1$ -Phase-Anteil von über 80% synchronisiert (Abb. 4-9 und Abb. 4-10). Dabei wurde für die Zelllinie A549 eine Zellzyklusdauer von etwa 24 h ermittelt. Der Anteil an Zellen in der  $G_1'$ -Phase des folgenden Zellzyklus betrug für A549 2,03% (Abb. 4-11). Bei H460 konnte bereits nach 19 h ein Anteil von 4,98% der in der  $G_1'$ -Phase befindlichen Zellen nachgewiesen werden. Die Zellzyklusdauer für H460 ergab eine

Zeitspanne von ca. 20 h (Abb. 4-12).

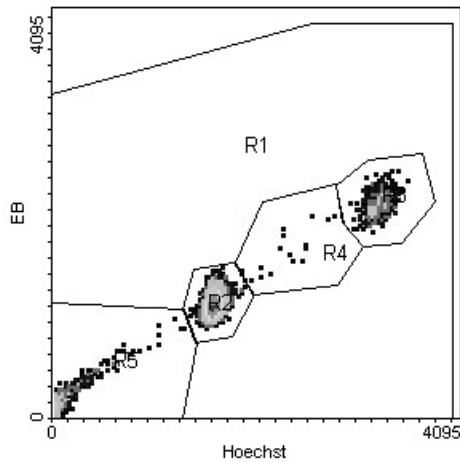


Abb. 4-9: A549. Synchronisierung: 81,28% G<sub>1</sub> (R2), 8,49% G<sub>2</sub>/M (R3), 1,36% S (R4) und 8,75% Sub-G<sub>1</sub> (R5) bei 95,88% Analysefenster (R1).

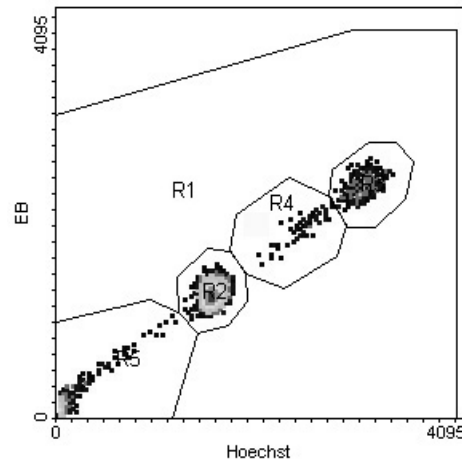


Abb. 4-10: H460. Synchronisierung: 82,89% G<sub>1</sub> (R2), 6,25% G<sub>2</sub>/M (R3), 2,50% S (R4) und 8,36% Sub-G<sub>1</sub> (R5) bei 99,69% Analysefenster (R1).

Abb. 4-9 und Abb. 4-10: Hoechst-EB-Darstellung der Subpopulationen G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M, S und Sub-G<sub>1</sub> von A549 und H460 zum Zeitpunkt T = 0 h.

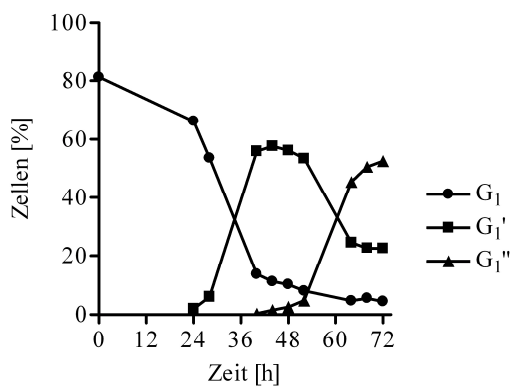


Abb. 4-11: A549.

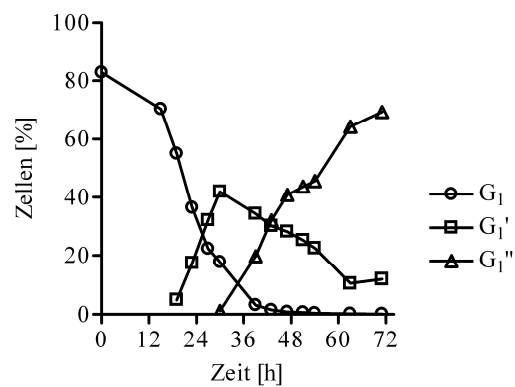


Abb. 4-12: H460.

Abb. 4-11 und Abb. 4-12: Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase nach maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation mit Differenzierung von drei aufeinander folgenden Zellzyklen.

Die Bestrahlung mit 6 Gy, aber auch die Inkubation mit 2 mM Coffein und die Kombination beider Modulatoren führten bei A549 zu einer Beeinflussung des Zellwachstums. Es zeigte sich eine temporäre Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase und eine verzögerte Zunahme sowohl der folgenden G<sub>1</sub>'- als auch der G<sub>1</sub>''-Phase der folgenden

Zellzyklen (Abb. 4-13 bis Abb. 4-15). Gemessen an dem Eintritt in die  $G_1'$ -Phase von jeweils 50% der Zellen bestand im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Verzögerung von +3 h bei 2 mM Coffein. Die Bestrahlung führte zu einer Verzögerung von +14,2 h und die Kombination aus Bestrahlung und Coffein zu einer Verzögerung von +14,8 h (Abb. 4-16). Zur Quantifizierung der Zellen in der  $G_1$ -Phase bei Modulation im Vergleich zur Kontrolle wurde der Zeitpunkt  $T = 44$  h nach Subkultivierung bzw. Bestrahlung analysiert, bei dem mit 57,59% der höchste Gehalt an Zellen im zweiten Zellzyklus in der  $G_1'$ -Phase ermittelt wurde (vgl. Abb. 4-11). Der Anteil an Zellen in der  $G_1$ -Phase betrug 11,20%. Die Coffeingabe führte zu einem 1,7-fachen Anstieg mit 19,49%  $G_1$ -Phase-Anteil. Bei Bestrahlung kam es zu einer 4,3-fachen Zunahme mit 48,55%  $G_1$ -Phase-Anteil und die Kombination aus Bestrahlung und Coffeingabe bewirkte eine 4,4-fache Zunahme mit 49,27%  $G_1$ -Phase-Anteil (Abb. 4-17). Entsprechend zeigte sich bei  $T = 44$  h ein  $G_1'$ -Anteil in der Kontrolle von 57,59% und 53,22% bei Coffeingabe. Die Bestrahlung führte zu einem reduzierten  $G_1'$ -Anteil von 22,77% und die Kombination beider Modulatoren zu einer Reduzierung mit 23,77%  $G_1'$ -Anteil (Abb. 4-18).

Die Untersuchung der S-Phase von A549 wies bei den Versuchsbedingungen Bestrahlung und Coffeingabe eine leichte verzögerte und reduzierte Syntheseleistung auf. Der Anteil an Zellen in der S-Phase zu Beginn des zweiten Zellzyklus bei  $T = 24$  h betrug in der Kontrolle 10,91%. Die Coffeingabe führte zu einem reduzierten S-Phase-Anteil von 7,75% (-3,16%). Die Bestrahlung verminderte den S-Phase-Anteil auf 2,85% (-8,06%). Die Kombination von Bestrahlung und Coffeingabe führte ebenfalls zu einer Abnahme des S-Phase-Anteils auf 2,39% (-8,52%). Im sich anschließenden Zellzyklus setzte sich die verzögerte Syntheseleistung fort (Abb. 4-19).

Die  $G_2/M$ -Phase und der Sub- $G_1$ -Anteil von A549 zeigten im gemessenen Zeitraum bei den einzelnen Versuchsbedingungen keine prozentuale Differenz von über 5% und sind damit als unbeeinflusst anzusehen (Abb. 4-20 und Abb. 4-21).

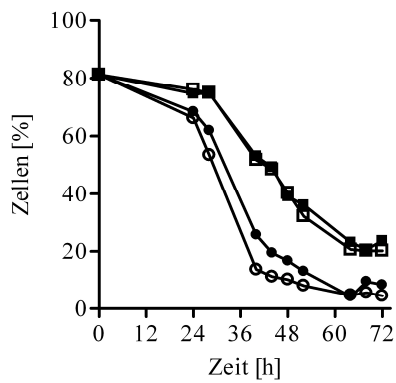


Abb. 4-13: A549. G<sub>1</sub>-Phase.

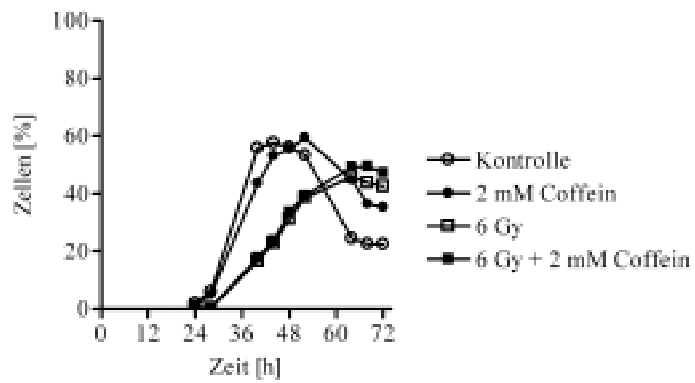


Abb. 4-14: A549. G<sub>1</sub>'-Phase.

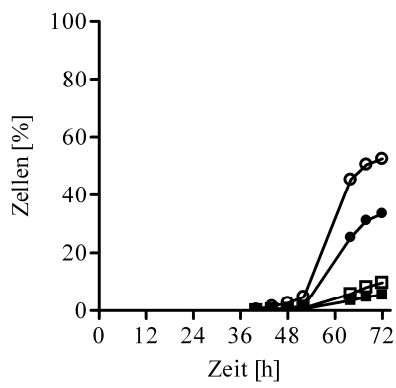


Abb. 4-15: A549. G<sub>1</sub>''-Phase.

Abb. 4-13 bis Abb. 4-15: A549. Darstellung der G<sub>1</sub>-, G<sub>1</sub>'- und G<sub>1</sub>''-Phase nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation.

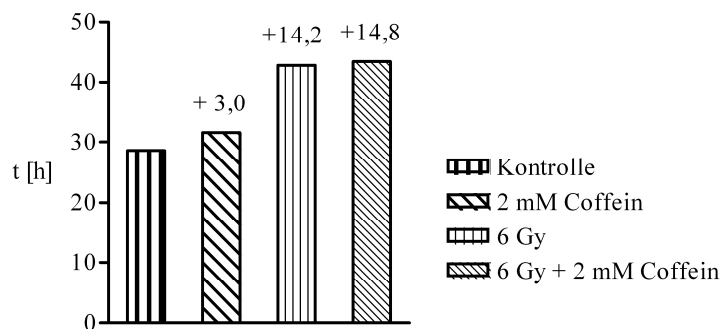


Abb. 4-16: A549. Zeitliche Arretierung von 50% in der G<sub>1</sub>-Phase befindlichen Zellen mit Angabe der Verzögerung im Vergleich zur Kontrolle.

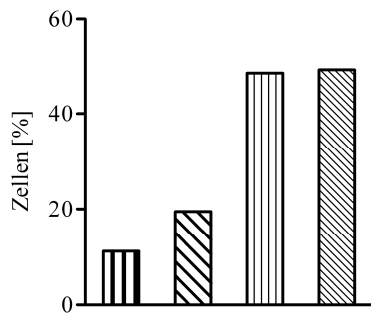


Abb. 4-17: A549. G<sub>1</sub>-Phase.

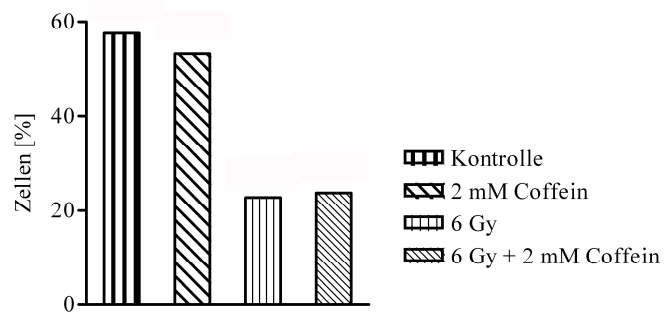


Abb. 4-18: A549. G<sub>1</sub>'-Phase.

Abb. 4-17 und Abb. 4-18: A549. Quantitative Darstellung der G<sub>1</sub>- und G<sub>1</sub>'-Phase zum Zeitpunkt T = 44 h nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation.

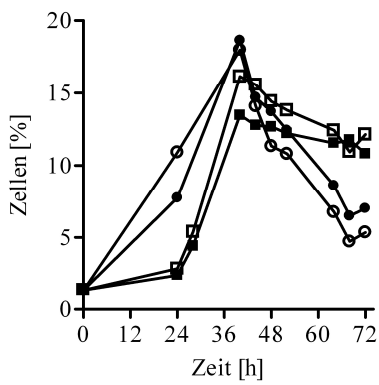


Abb. 4-19: A549. S-Phase.

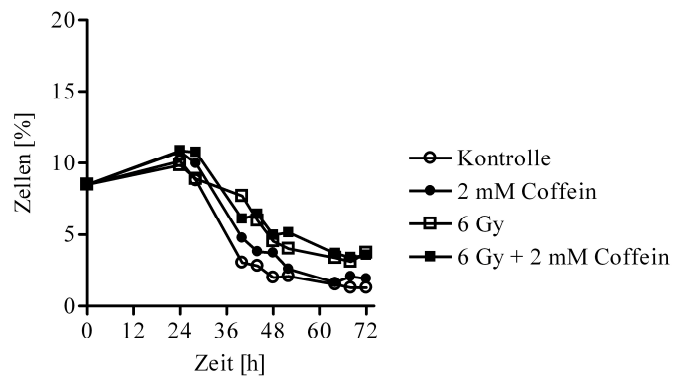


Abb. 4-20: A549. G<sub>2</sub>/M-Phase.

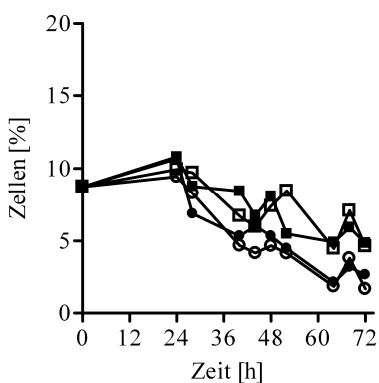


Abb. 4-21: A549. Sub-G<sub>1</sub>-Anteil.

Abb. 4-19 bis Abb. 4-21: A549. Darstellung der S-, G<sub>2</sub>/M-Phase und des Sub-G<sub>1</sub>-Anteils nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation.

Eine Strahlendosis von 6 Gy erlaubte bei H460 keine Differenzierung der Zellzyklusbeeinflussung durch Bestrahlung und Bestrahlung in Kombination mit Coffein. Zur Beurteilung des Einflusses von Coffein bei Bestrahlung erfolgte die Versuchsdurchführung im Vergleich zu A549 isoeffektiv mit 3 Gy. Dabei bewirkten die Bestrahlung mit 3 Gy sowie die Inkubation mit 2 mM Coffein und die Kombination beider Modulatoren eine Beeinflussung des Zellwachstums. Gleich der A549 konnte auch bei H460 eine Arretierung in der  $G_1$ -Phase und eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verzögerte Zunahme sowohl der folgenden  $G_1'$ - als auch der  $G_1''$ -Phase festgestellt werden (Abb. 4-22 bis Abb. 4-24). Es zeigte sich, gemessen an dem Eintritt in die  $G_1'$ -Phase von jeweils 50% der Zellen, bei 2 mM Coffeingabe eine Verzögerung von +8,1 h. Die Bestrahlung mit 3 Gy verzögerte den  $G_1'$ -Phase-Eintritt um +10,5 h und die Kombination aus Bestrahlung und Coffeingabe führte zu einer Verzögerung von +19,6 h (Abb. 4-25). Zum Zeitpunkt  $T = 30$  h nach Subkultivierung mit dem höchsten Gehalt an Zellen in der  $G_1'$ -Phase (vgl. Abb. 4-12) betrug der Anteil an unbehandelten Zellen in der  $G_1$ -Phase 17,76%. Bei 2 mM Coffein besaßen die Zellen einen 2,9-fachen  $G_1$ -Phase-Anteil von 51,56%. 3 Gy führten zu einem 3,2-fachen Anstieg des  $G_1$ -Phase-Anteils mit 57,36%. Die Kombination aus Bestrahlung und Coffein bewirkte eine 4,4-fache Zunahme des  $G_1$ -Phase-Anteils mit 77,30% (Abb. 4-26). Zu diesem Zeitpunkt betrug der  $G_1'$ -Phase-Anteil in der Kontrolle 41,99% und bei Coffeingabe 19,38%. Der Anteil der  $G_1'$ -Phase lag bei Bestrahlung bei 6,81% und bei Bestrahlung und Coffeingabe bei 4,86% (Abb. 4-27).

Auch bei H460 wurde der Anteil an Zellen in der S-Phase durch Bestrahlung und Coffeingabe im Sinne einer verzögerten und reduzierten Syntheseleistung beeinflusst. Zu Beginn des zweiten Zellzyklus bei  $T = 20$  h betrug der Anteil an Zellen in der S-Phase 25,24%. Die Coffeingabe bewirkte eine Reduzierung des S-Phase-Anteils auf 11,55% (-13,69%). Die Bestrahlung führte zu einem S-Phase-Anteil von 4,84% (-20,4%) und die Kombination aus Bestrahlung und Coffein ergab einen S-Phase-Anteil von 4,36% (-20,88%). Die Verzögerung der Syntheseleistung setzte sich in dem folgenden Zellzyklus fort (Abb. 4-28).

Die Anteile der Zellen in der  $G_2/M$ -Phase und der Sub- $G_1$ -Anteil von H460 wiesen ebenso wie die A549 bei den einzelnen Versuchsbedingungen keine Differenz von über 5% auf (Abb. 4-29 und Abb. 4-30).



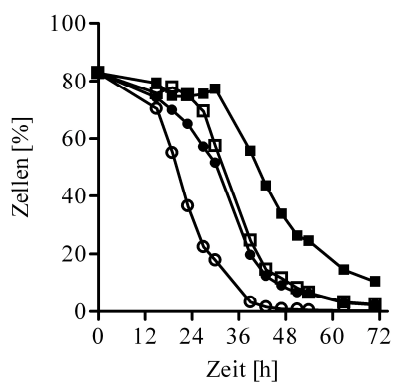


Abb. 4-22: H460. G<sub>1</sub>-Phase.

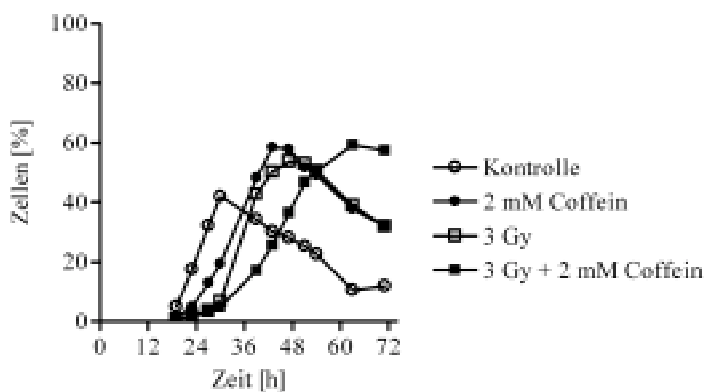


Abb. 4-23: H460. G<sub>1</sub>'-Phase.

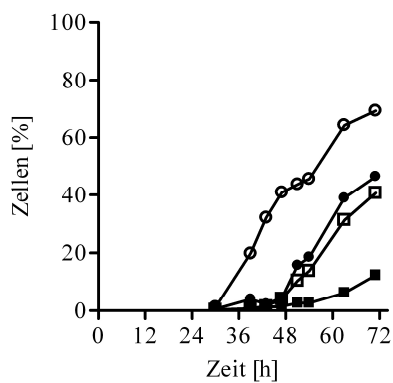


Abb. 4-24: H460. G<sub>1</sub>''-Phase.

Abb. 4-22 bis Abb. 4-24: H460. Darstellung der G<sub>1</sub>-, G<sub>1</sub>'- und G<sub>1</sub>''-Phase nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation.

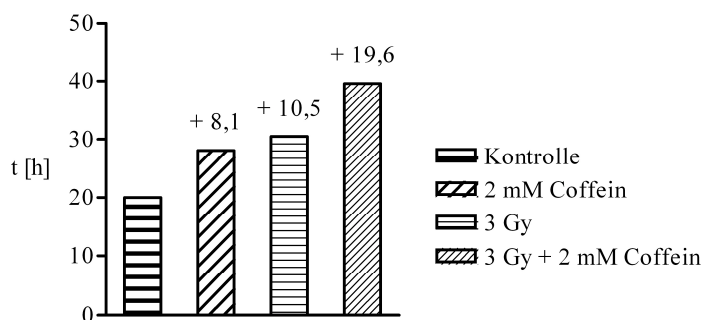


Abb. 4-25: H460. Zeitliche Arretierung von 50% in der G<sub>1</sub>-Phase befindlichen Zellen mit Angabe der Verzögerung im Vergleich zur Kontrolle.

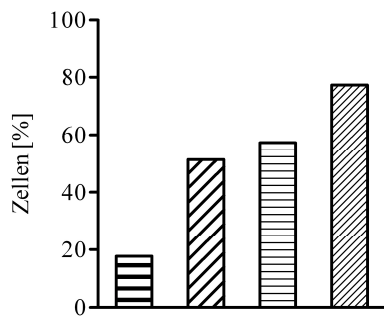


Abb. 4-26: H460. G<sub>1</sub>-Phase.

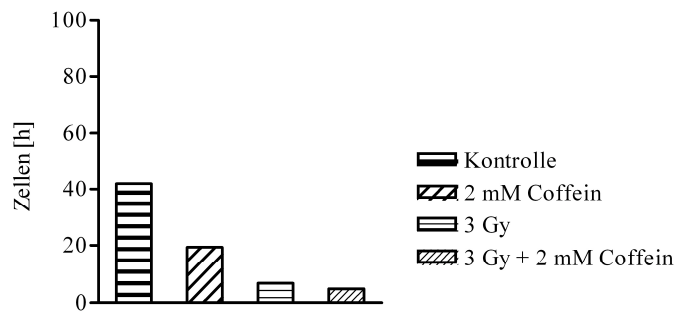


Abb. 4-27: H460. G<sub>1</sub>'-Phase.

Abb. 4-26 und Abb. 4-27: H460. Quantitative Darstellung der G<sub>1</sub>- und G<sub>1</sub>'-Phase zum Zeitpunkt T = 30 h nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation.

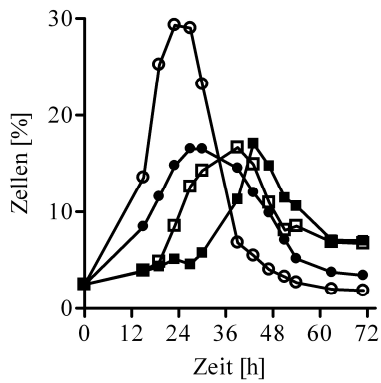


Abb. 4-28: H460. S-Phase.

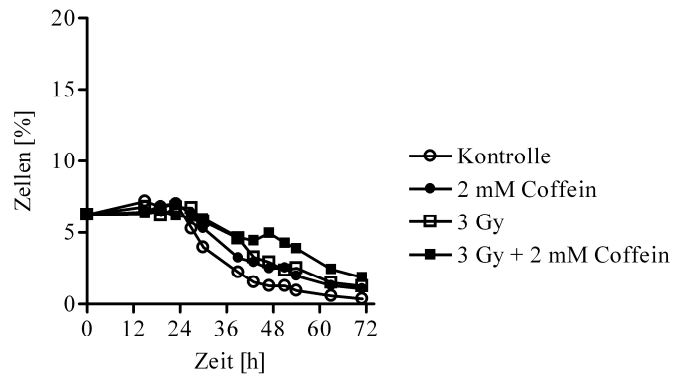


Abb. 4-29: H460. G<sub>2</sub>/M-Phase.

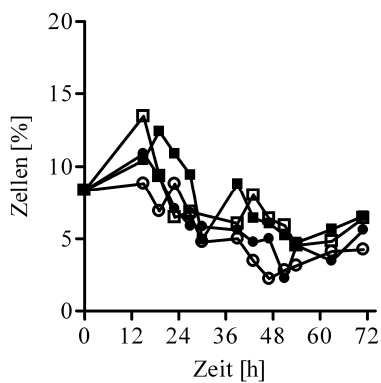


Abb. 4-30: H460. Sub-G<sub>1</sub>-Anteil.

Abb. 4-28 bis Abb. 4-30: H460. Darstellung der S-, G<sub>2</sub>/M-Phase und des Sub-G<sub>1</sub>-Anteils nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation.

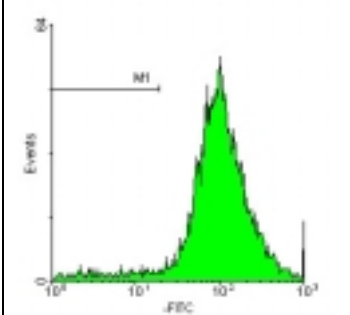
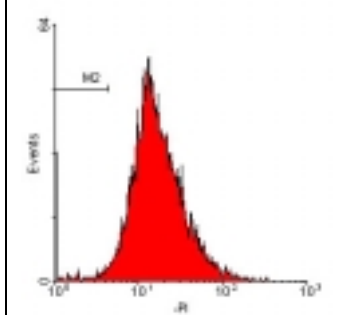
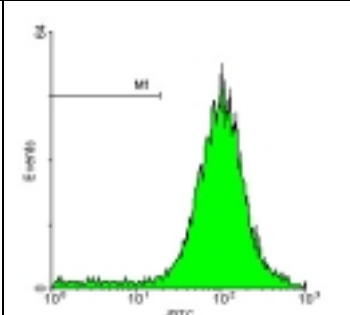
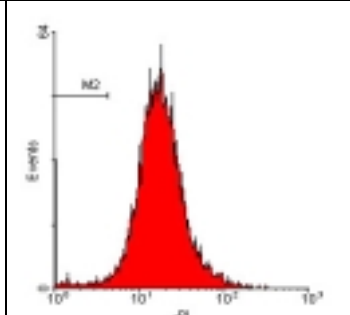
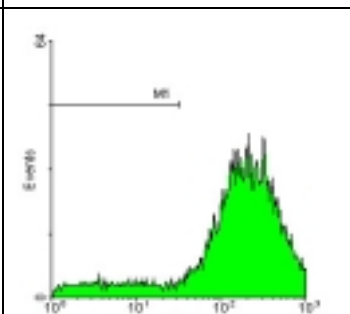
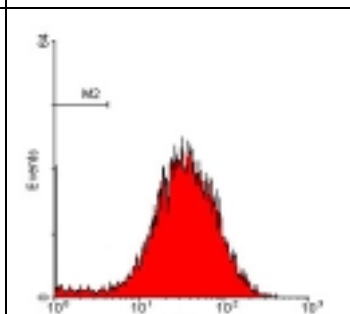
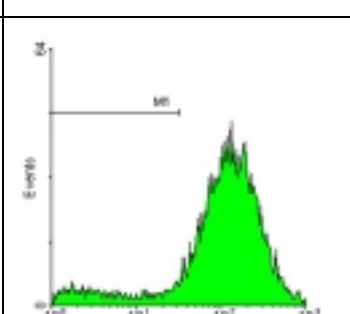
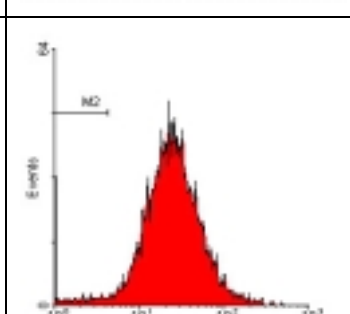
### 4.3 Apoptoseanalyse

Zur Untersuchung der späten Apoptose anhand der DNA und des Membranproteins F-Actin wurden je Zelllinie drei unabhängige Experimente durchgeführt, die auf der Beurteilung von 30.000 Zellen basierten und in ihren Ergebnissen kongruent waren. Die Ergebnisdarstellung erfolgt an jeweils einem stellvertretenden Beispiel mit Zuordnung der jeweiligen Zellmorphologie.

Die beiden Zelllinien A549 und H460 wurden unter Einfluss von 5 mM Coffein, Bestrahlung mit 10 Gy und deren Kombination im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt  $T = 240$  h nach Subkultivierung in maximaler  $G_1$ -Synchronisation analysiert (Tab. 4.3-1 und Tab. 4.3-2). Dabei zeigten sich insbesondere bei der Zelllinie H460 apoptotische Veränderungen. Zu deren Nachweis diente die Signalmessung von FITC-konjugiertem F-Actin (M1) und PI-markierter DNA (M2). Eine Reduzierung des FITC-Signals ist auf eine Schädigung der Zellmembran und Zytolyse zurückzuführen. Die Kondensierung und Verminderung des Chromatins bzw. der DNA führt zu einem verminderten PI-Signal und deutet auf eine Karyopyknose und Karyorhexis hin.

Für beide Zelllinien bestand eine Korrelation von M1 und M2 unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Bei A549 zeigte sich sowohl in der F-Actin- als auch DNA-Färbung bei Coffeingabe im Vergleich zur Kontrolle keine apoptotische Veränderung. Bei Bestrahlung ergab sich eine schwache Zunahme apoptotischer Signale. Dem gegenüber wiesen H460-Zellen bereits bei Coffeingabe Merkmale der Apoptose auf, die durch die Bestrahlung deutlich gesteigert wurden.

Tab. 4.3-1: A549. Einparametrische Darstellung von F-Actin (FITC-Färbung) und DNA (PI-Färbung) bei T = 240 h nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation. Angabe des Zellanteils mit reduziertem F-Actin (M1) und Kondensierung und Verminderung des Chromatins bzw. der DNA (M2).

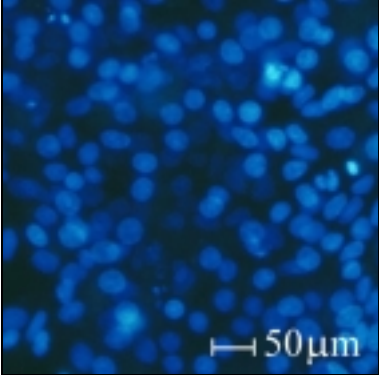
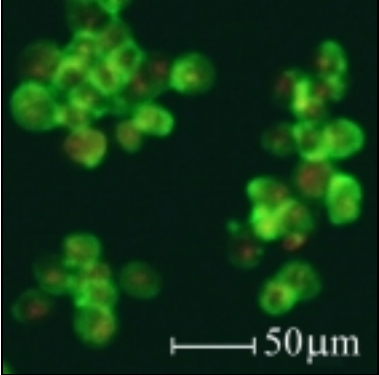
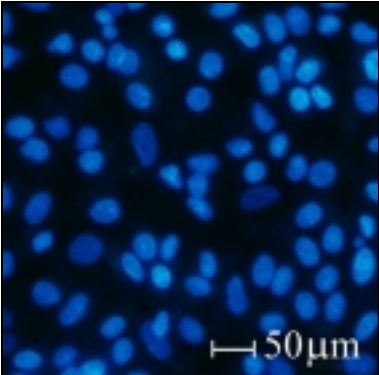
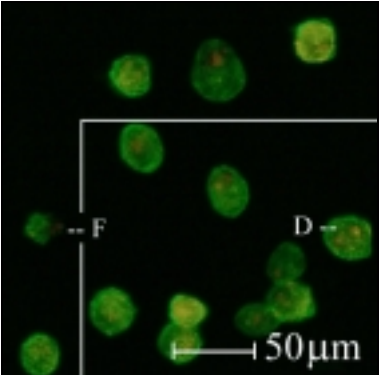
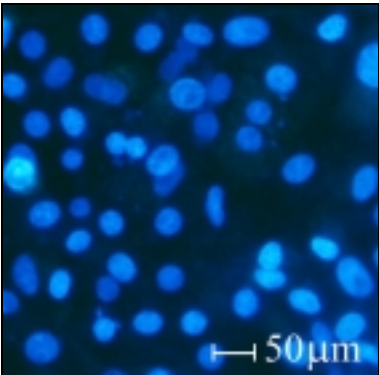
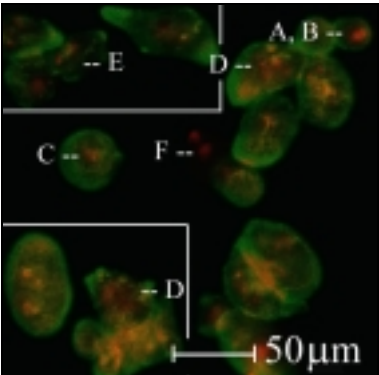
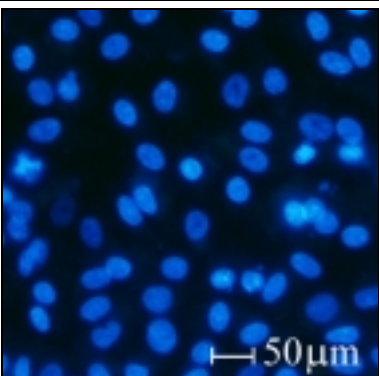
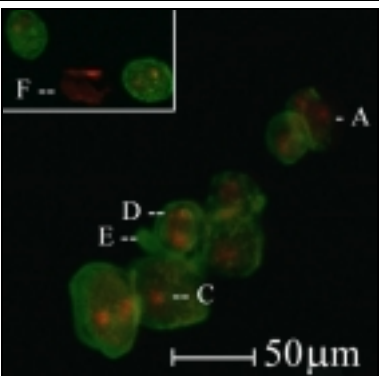
	FITC	PI	M1 [%]	M2 [%]
Kontrolle			2,83	2,40
5 mM Coffein			2,69	2,44
10 Gy			8,66	7,49
10 Gy + 5 mM Coffein			8,28	6,38

Tab. 4.3-2: H460. Einparametrische Darstellung von F-Actin (FITC-Färbung) und DNA (PI-Färbung) bei T = 240 h nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation. Angabe des Zellanteils mit reduziertem F-Actin (M1) und Kondensierung und Verminderung des Chromatins bzw. der DNA (M2).

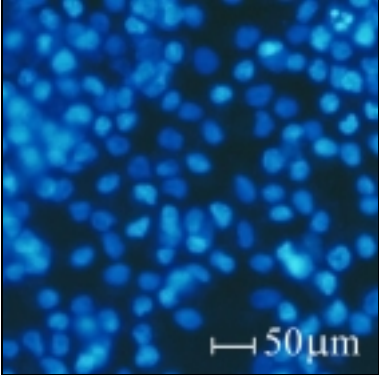
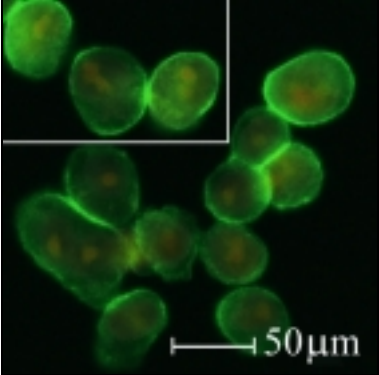
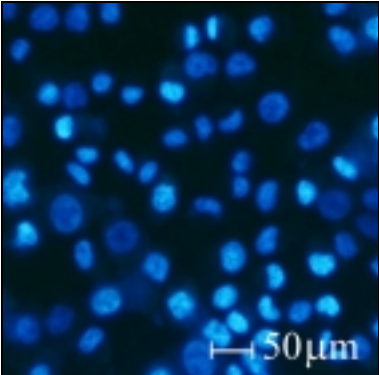
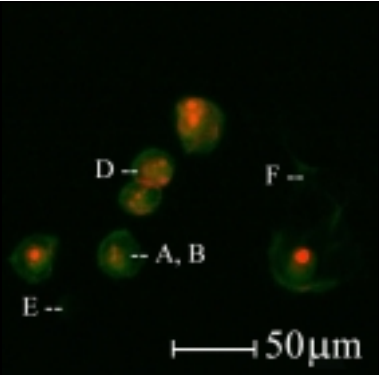
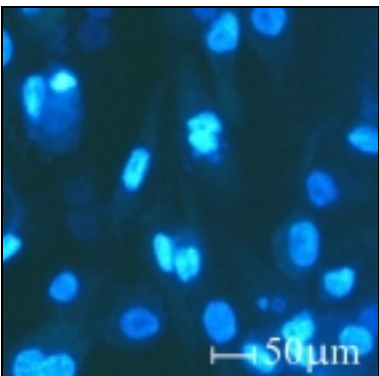
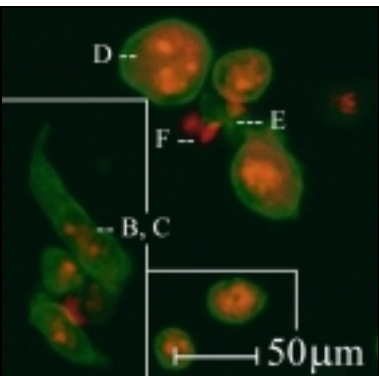
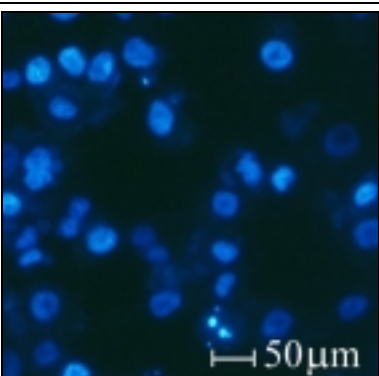
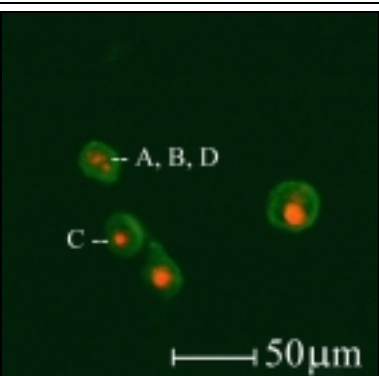
	FITC	PI	M1 [%]	M2 [%]
Kontrolle			3,61	2,21
5 mM Coffein			22,53	17,26
10 Gy			40,28	32,80
10 Gy + 5 mM Coffein			50,08	46,67

Unter dem Einfluss von 5 mM Coffein, Bestrahlung mit 10 Gy und deren Kombination zeigten sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auch morphologische Veränderungen mit den apoptotischen Merkmalen Chromatinkondensation und Chromatinabnahme, Karyopyknose, Karyorhexis mit Ausbildung von Apoptosekörpern, Karyolyse und Zytolyse (Tab.4.3-3 und Tab.4.3-4). Die Zellen der A549 wiesen entsprechend der durchflusszytometrischen Messung von F-Actin und DNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Zunahme apoptotischer Merkmale bei Coffeingabe auf. Bei Bestrahlung und zusätzlicher Coffeingabe konnte nur eine schwache Zunahme apoptotischer Merkmale beobachtet werden. Wie auch in der durchflusszytometrischen Messung von F-Actin und DNA zeigten sich bei H460 bereits bei Coffeingabe apoptotische Zellveränderungen. Die Bestrahlung führte entsprechend der Durchflusszytometrie zu einer deutlichen Zunahme der Apoptose. In beiden Zelllinien konnte zusätzlich bei Bestrahlung eine Volumenzunahme der Zellen beobachtet werden. Diese Volumenzunahme wurde durch Coffeingabe auf das Kontrollniveau reduziert.

Tab.4.3-3: A549. Zellmorphologie bei T = 240 h nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation. Darstellung der apoptotischen Merkmale Chromatinkondensation (A), Chromatinabnahme (B), Karyopyknose (C), Karyorhexis mit Apoptosekörper (D), Karyolyse (E) und Zytolyse (F).

	Hoechst 33342	FITC-PI
Kontrolle		
5 mM Coffein		
10 Gy		
10 Gy + 5 mM Coffein		

Tab.4.3-4: H460. Zellmorphologie bei T = 240 h nach Subkultivierung in maximaler G<sub>1</sub>-Synchronisation. Darstellung der apoptotischen Merkmale Chromatinkondensation (A), Chromatinabnahme (B), Karyopyknose (C), Karyorhexis mit Apoptosekörper (D), Karyolyse (E) und Zytolyse (F).

	Hoechst 33342	FITC-PI
Kontrolle		
5 mM Coffein		
10 Gy		
10 Gy + 5 mM Coffein		



#### 4.4 p53- und p21-Proteinanalyse

Die kinetische Analyse der beiden Proteine p53 und p21 bei Coffeingabe erfolgte in einem Zeitraum von 0 bis 8 h nach ionisierender Bestrahlung mit 6 Gy in mindestens drei unabhängigen Versuchen. Das Grundniveau von p53 und p21 konnte anhand des Mittelwertes der Proteinkonzentration im Zeitraum von 0 bis 8 h nach Zelleinsaat ermittelt werden. A549 besaß eine p53-Konzentration von  $413 \pm 170$  pg/ml und H460 eine Konzentration von  $288 \pm 128$  pg/ml. Der p21-Gehalt betrug bei A549  $356 \pm 110$  pg/ml und bei H460  $340 \pm 142$  pg/ml.

Bei Bestrahlung mit 6 Gy fand eine Zunahme der Proteinkonzentration sowohl von p53 als auch von p21 in beiden Zelllinien statt. Die p53-Konzentration erreichte das Maximum zum Zeitpunkt  $T = 4$  h nach Bestrahlung. Die maximale Konzentration des p21-Proteins stellte sich bei beiden Zelllinien 2 h später ein (Abb. 4-31 und Abb. 4-32).

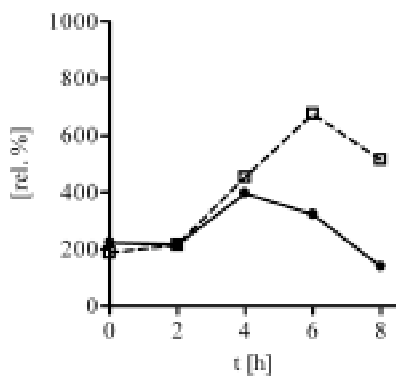


Abb. 4-31: A549.

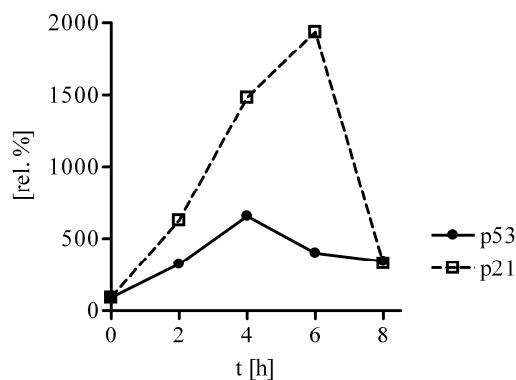


Abb. 4-32: H460.

Abb. 4-31 und Abb. 4-32: A659 und H460. Verlauf der im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe relativen Proteinkonzentrationen von p53 und p21 bei 6 Gy.

Die Gabe von Coffein in einer Konzentration von 2 mM führte sowohl bei Bestrahlung als auch in unbestrahlter Kontrolle zu einer Reduzierung des Proteingehalts von p53 und p21. Eine deutliche Verminderung des Proteinniveaus durch den Zusatz von Coffein bestand zum Zeitpunkt der höchsten Proteinkonzentration. Zu diesem Zeitpunkt  $T = 4$  h nach Subkultivierung wurde bei der Zelllinie A549 die p53-Konzentration der Kontrolle durch Coffein um -54% reduziert. Bei Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich ebenfalls eine Verminderung des Proteinniveaus um -69%. Es bestand jedoch keine Signifikanz ( $p > 0,05$ ). Eine ähnliche Tendenz stellte sich zum Zeitpunkt

T = 6 h bei der Modulierung des p21-Gehaltes durch Coffein dar. Die unbestrahlte Probe wurde bei Coffeingabe um -4% in ihrer p21-Konzentration reduziert. Bei Bestrahlung bestand eine mit  $p = 0,0047$  signifikante Senkung des p21-Gehaltes durch Coffein um -80% (Abb. 4-33 und Abb. 4-34).

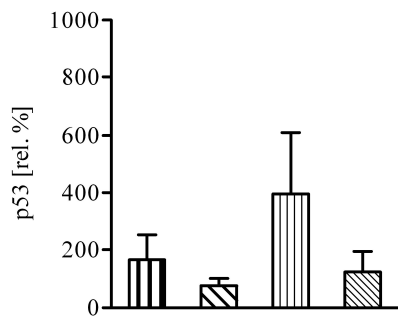


Abb. 4-33: A549. p53-Niveau

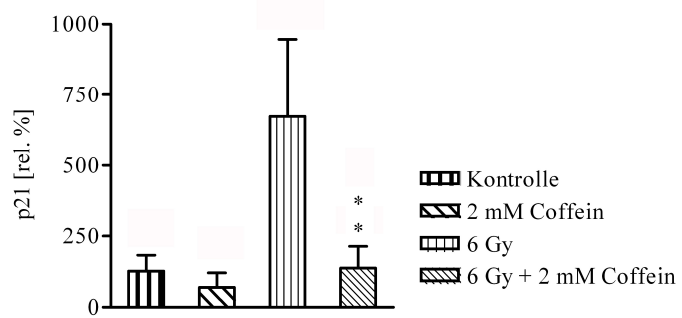


Abb. 4-34: A549. p21-Niveau.

Abb. 4-33 und Abb. 4-34: A549. Relativer Proteingehalt von p53 bei T = 4 h und p21 bei T = 6 h. Angabe der mittleren Proteinkonzentration und der Standardabweichung.

Bei der Zelllinie H460 führte die Coffeingabe bei Bestrahlung zum Zeitpunkt T = 4 h zu einer um -70%, mit  $p = 0,0298$  signifikanten Senkung des p53-Niveaus. Aber auch ohne Bestrahlung wurde das p53-Niveau durch Coffein um -55%, mit  $p = 0,0009$  signifikant reduziert. Zum Zeitpunkt T = 6 h zeigte sich eine signifikante Reduzierung des p21-Gehaltes der Zelllinie H460 bei Bestrahlung und Coffeingabe um -91% im Vergleich zur coffeinfreien, bestrahlten Fraktion ( $p = 0,0352$ ). Die alleinige Gabe von Coffein ohne Einfluss der Bestrahlung bewirkte eine Verringerung der p21-Konzentration um -23% ohne Hinweis auf Signifikanz ( $p > 0,05$ ) (Abb. 4-35 und Abb. 4-36).

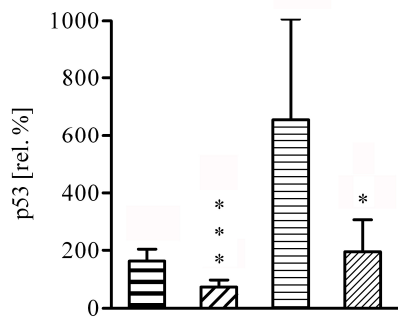


Abb. 4-35: H460. p53-Niveau.

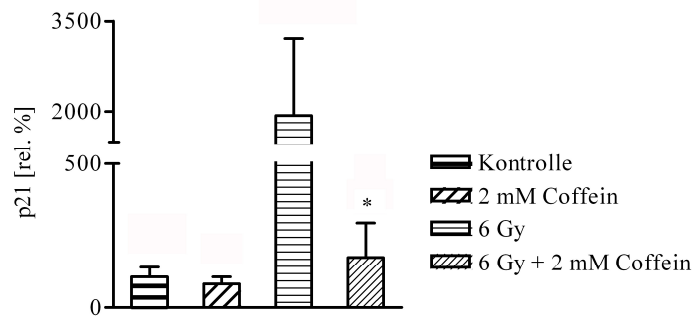


Abb. 4-36: H460. p21-Niveau.

Abb. 4-35 und Abb. 4-36: H460. Relativer Proteingehalt von p53 bei T = 4 h und p21 bei T = 6 h. Angabe der mittleren Proteinkonzentration und der Standardabweichung.

#### 4.5 Gen-Analyse

Der Einfluss von 2 mM Coffein und 6 Gy Bestrahlung auf die Genaktivität wurde anhand der mRNA zum Zeitpunkt T = 4 h nach Subkultivierung bzw. Bestrahlung untersucht. Die Analyse wurde mit Hilfe eines immuno-onkologischen Microarray-Verfahrens durchgeführt. Dabei wurde eine Vielzahl von zellregulatorischen und tumorspezifischen Genen für die beiden Zelllinien A549 und H460 erfasst. Eine Auswahl der untersuchten Genaktivität, die sich an relevanten Genen bezüglich der Zellzyklusregulation und Apoptose orientiert, ist in Tab. 4.5-1 gezeigt. Es konnte qualitativ eine gesteigerte, verminderte oder unbeeinflusste Aktivität der ausgewählten Gene bei Coffein und Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Zunahme der Genaktivität entsprach dabei einer über 1,7-fachen bzw. die Reduzierung einer unter 0,58-fachen Signalintensität der entsprechenden mRNA bei 4-facher Messung. In der Untersuchung zeigten sich sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Die mRNA der relevanten Proteine für die Zellzyklusprogression bzw. Apoptose und DNA-Reparatur ATM, ATR, Chk1, Chk2, Rb, Mdm2, Cdk4, Cdk6, Cdk1 bzw. Cdc2, Cdc25, Bmf, DNA-PK und Rad51 konnte mit diesem Testverfahren jedoch nicht analysiert werden.

Tab. 4.5-1: Beeinflussung der mRNA. Darstellung von verminderter (-), unbeeinflusster (0) bzw. gesteigerter (+) Genaktivität. Im Testverfahren technisch bedingte, nicht untersuchte Genaktivitäten mit (/) gekennzeichnet.

Gene mit zugehörigem Funktionsbereich		A549			H460		
		2 mM Coffein	6 Gy	6 Gy + 2 mM Coffein	2 mM Coffein	6 Gy	6 Gy + 2 mM Coffein
Zellzyklus	14-3-3	0	0	0	0	0	0
	cdk-2	0	/	0	0	0	0
	<i>cyclin B2</i>	0	0	+	0	0	0
	<i>cyclin C</i>	0	/	0	0	0	0
	<i>cyclin D1</i>	0	0	-	-	0	0
	<i>cyclin D3</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>cyclin E1</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>e2f-1</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>gadd45</i>	0	+	0	0	+	0
	<i>p21</i>	-	+	0	-	+	-
Zellzyklus/ Apoptose	<i>hsp-70</i>	-	0	-	-	0	-
	p53	0	0	/	0	0	0
Apoptose	aif-1	/	/	/	/	0	0
	apaf-1	/	/	/	/	0	/
	bad	0	0	0	0	0	0
	bag-1	0	0	0	0	0	0
	<i>bag-3</i>	0	0	0	-	0	0
	bak-1	0	0	0	0	0	0
	<i>bax</i>	+	0	0	0	0	0
	bax-1	0	0	0	0	0	0
	bcl-2	0	0	0	0	0	0
	bcl-3	0	0	0	0	0	0
	bcl-X	0	0	0	0	0	0
	bid	0	0	0	0	0	0
	bim	/	/	/	0	/	/
	caspase-1	0	0	0	0	0	0
	caspase-2	0	0	0	0	0	0
	caspase-3	0	0	0	0	0	0
	caspase-4	0	0	0	0	0	0
	caspase-6	0	0	0	0	0	0
	caspase-7	0	0	0	0	0	0
	caspase-8	0	0	0	0	0	0
	caspase-9	0	0	0	0	0	0
	caspase-10	/	/	/	/	/	/
	caspase-14	/	/	/	/	/	/
	fadd	0	0	0	0	0	0
	fap-1	0	0	0	0	0	0
	<i>fas-1</i>	+	/	/	0	0	-
	fas-L	/	/	/	/	/	/
nfkB-1	0	0	0	0	0	0	

	smac	0	0	0	0	0	0
	tnf	0	/	/	/	/	/
	tnf-R	0	0	0	0	0	0
	<i>tradd</i>	+	0	+	0	0	+
	traf	0	0	0	0	0	0
Migration	cxcr4	/	/	/	0	0	/
	sdf-1	0	0	0	0	0	0

#### 4.6 Migrationsanalyse

Die Migrationsrate wurde für die beiden Zelllinien A549 und H460 unter den Bedingungen 0 Gy und 6 Gy untersucht. Die Analyse erfolgte zu Beginn des zweiten Zellzyklus (vgl. 4.2). Die Untersuchung der Migrationsfähigkeit von A549 fand zum Zeitpunkt T = 24 h, die von H460 zum Zeitpunkt T = 20 h statt. Dabei zeigte sich bei beiden Zelllinien eine Migrationsrate von unter 5%. Für A549 wurde eine Migrationsrate von  $3,15\% \pm 1,91\%$  ermittelt (n = 9). Die Bestrahlung führte zu einer mit  $p = 0,16$  nicht signifikanten Reduzierung der Migration mit  $1,38\% \pm 0,86\%$  (n = 3). Die Zellen der H460 zeigten eine Migrationsrate von  $1,56\% \pm 0,81\%$  (n = 8). Die Bestrahlung bewirkte gleich der A549 eine, mit  $p = 0,66$  nicht signifikante Veränderung der Migrationsrate. Sie betrug  $1,33\% \pm 0,41\%$  (n = 3). Ebenso konnte keine Modulation der Migrationsrate durch Coffeingabe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).