Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universitätsmedizin Rostock

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Guido Hildebrandt

Zellbiologische Untersuchungen zur Wirkung von Piperin auf Tumorzellen und ihre Strahlensensibilität

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

vorgelegt von
Sascha Diehl, geb. am 14.09.1989 in Bützow
Rostock, im Juli 2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004244

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
Universitätsmedizin Rostock
Südring 75
18059 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Emmert
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Universitätsmedizin Rostock
Strempelstraße 13
18057 Rostock

3. Gutachter: PD Dr.-Ing. Dr. habil. med. Benjamin Frey M. Sc.
Strahlenklinik Universitätsklinikum Erlangen
Glückstraße 4A
91054 Erlangen

Datum der Einreichung: 07/2022
Datum der Verteidigung: 03/2023

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Diehl S, Hildebrandt G, Manda K. Pepper alkaloid piperine increases radiation sensitivity of cancer cells from glioblastoma and hypopharynx *in vitro*. Int. J. Mol. Sci. submitted.

Abkürzungsverzeichnis……III
Abbildungsverzeichnis……V
Tabellenverzeichnis……VI
1 Einleitung……1
1.1 Tumorerkrankungen……1
1.2 Einflüsse auf die Tumorentstehung……2
1.3 Tumorbehandlung……4
1.3.1 Strahlentherapie……4
1.3.2 Chemotherapie……5
1.3.3 Radiochemotherapie……6
1.4 Antitumorigene Wirkung von Piperin……6
1.5 Zielstellung……10
2 Material und Methoden……11
2.1 Zellkultur……11
2.1.1 Tumorzelllinien……11
2.1.2 Zellkulturmedium und Zusätze……12
2.1.3 Zellen ausfrieren……12
2.1.4 Subkultivierung der Zellkultur……13
2.1.5 Automatische Zellzahlbestimmung……14
2.2 Wirkstoff……15
2.2.1 Herstellen einer Piperin-Stammlösung……15
2.2.2 Herstellen von Verdünnungslösungen……15
2.3 Untersuchung des Zellwachstums mittels Wachstumskurven……16
2.4 Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger……17
2.5 Bestimmung des klonogenen Überlebens mittels Koloniebildungstest……18
2.6 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Assay……19
2.7 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels ɣ-H2AX-Assay……20
2.8 Untersuchung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR……22
2.8.1 Isolierung der RNA……22
2.8.2 RNA-Konzentrationsmessung mittels Biophotometer……23
2.8.3 Synthese der komplementären DNA (cDNA)……24
2.8.4 Amplifikation und Quantifizierung der cDNA mittels Real Time PCR……24
2.9 Statistische Auswertung……25
2.10 Materialien und Geräte……26
3 Ergebnisse……29
3.1 Wachstum……29
3.1.1 Wachstum der T98G-Zellen……29
3.1.2 Wachstum der FaDu-Zellen……33

3.2 Klonogenes Überleben 36
3.2.1 Einfluss des Piperins auf das klonogene Überleben der T98G-Zellen 36
3.2.2 Einfluss des Piperins auf das Klonogene Überleben der FaDu-Zellen 40
3.3 Zellproliferation 43
3.3.1 Zellproliferation der T98G-Zellen 43
3.3.2 Zellproliferation der FaDu-Zellen 45
3.4 Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen 47
3.4.1 Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen der T98G-Zellen 48
3.4.2 Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen der FaDu-Zellen 50
3.5 Untersuchung der Genexpression mittels qRT-PCR 52
3.5.1 Genexpression der T98G-Zellen 52
3.5.2 Genexpression der FaDu-Zellen 55
4 Diskussion 57
4.1 Zellwachstum 57
4.1.1 Natives Wachstum der T98G-Zellen und der FaDu-Zellen 57
4.1.2 Zellwachstum unter Einfluss von Piperin 58
4.2 Klonogenes Überleben 61
4.3 Zellproliferation 63
4.4 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen 66
4.5 Genexpression 69
4.5.1 Expression des RB1-Gens 69
4.5.2 Expression des CDKN1B-Gens 71
5 Zusammenfassung 744
6 Ausblick 76
7 Literaturverzeichnis 77

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated (Proteinkinase)
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (Proteinkinase)
Bax	Bcl-2 associated X protein (proapoptotisches Protein)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA-1/2	engl. Breast Cancer Gene 1 und 2 (Tumorsuppressorgene)
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdc25	Cell division cycle 25-Phosphatase
CDK	Cycline dependent kinase
CDKN1B	Cyclin-abhängiger-Kinase-Inhibitor 1B
cDNA	engl. complementary DNA
Cip/Kip	Cyclin inhibitor protein/kinase inhibitor protein-Familie
CKI	CDK-Inhibitoren
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Ct	Cycle threshold
DAPI	4´,6-diamidino-2-phenylindol
DSB	Doppelstrangbrüche
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DSB	Doppelstrangbrüche
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E2F-1	Eukaryontischer Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Wachstumsfaktorrezeptor (engl. epidermal growth factor receptor)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FBS	fetales Kälberserum (engl. fetal bovine serum)
FKHR	Transkriptionsfaktor (engl. forkhead transcription factor)
$G_0/G_1/G_2$-Phase	Phasen des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
γ-HA2X	Phosphoryliertes Histon H2AX

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HER-2	Wachstumsfaktorrezeptor (engl. human epidermal growth factor receptor 2)
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Homologe Rekombination
IC_{50}	Inhibitorische Konzentration, bei der halbmaximale Inhibition beobachtet wird
MPF	Maturation promoting Factor
M-Phase	Mitose-Phase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
NHEJ	Nicht-Homologes End-Joining (engl. non-homologous end joining)
OD	Optische Dichte
$p16^{INK4A}$	CDK-Inhibitor der INK-Familie
$p21^{Cip1}$	CDK-Inhibitor aus der Cip/Kip-Familie
$p27^{Kip1}$	CDK-Inhibitor aus der Cip/Kip-Familie
p53	Nukleäres Phosphoprotein (Tumorsuppressor)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PE	Plattiereffizienz
PFGE	Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese
RB1	Retinoblastom-Gen 1 (Tumorsupressorgen)
Rb-Protein	Retinoblastom-Protein (Tumorsuppressor)
qRT-PCR	engl. quantative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species**)**
SF	Überlebensfraktion (engl. surviving fraction)
SF_2	Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit 2 Gy
SL	Stammlösung
Smac/DIABLO	Proapoptotisches Molekül (engl. second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI)
S-Phase	Synthese-Phase
T_{25}	Zellkulturflasche mit 25 cm^2 Wachstumsfläche
T_{75}	Zellkulturflasche mit 75 cm^2 Wachstumsfläche
TP53	engl. Tumor protein 53 (Tumorsuppressor)
TRPV-1	Transient receptor potential vanilloid 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktion des Retinoblastom-Proteins (Rb)……..…….3
Abbildung 2: Syntheseweg des Piperins in Früchten des schwarzen Pfeffers……..…….7
Abbildung 3: Wirkung des Piperins auf den Übergang der G_1-Phase in die S-Phase……..8
Abbildung 4: Piperinwirkung auf den Zellzyklus, die Apoptose sowie die Migration…….9
Abbildung 5: Mikroskopische Darstellung der T98G-Zellen und der FaDu-Zellen in Kultur..…11
Abbildung 6: Kristallbildung von Piperin……..15
Abbildung 7: Oxidation des Chromogens 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin……..20
Abbildung 8: Wachstum der T98G-Zellen nativ sowie unter Einfluss von Piperin…….….29
Abbildung 9: Anzahl toter T98G-Zellen unter Einfluss von Piperin…….……..….32
Abbildung 10: Wachstum der FaDu-Zellen nativ sowie unter dem Einfluss von Piperin…..…..33
Abbildung 11: Anzahl toter FaDu-Zellen unter dem Einfluss von Piperin…….…….35
Abbildung 12: Mikroskopische Darstellung der Koloniemorphologie der T98G-Zellen……...37
Abbildung 13: Klonogenes Überleben der T98G-Zellen……..39
Abbildung 14: Mikroskopische Darstellung der Koloniemorphologie der FaDu-Zellen……...40
Abbildung 15: Klonogenes Überleben der FaDu-Zellen…….…..42
Abbildung 16: Proliferation der T98G-Zellen……..……43
Abbildung 17: Proliferation der FaDu-Zellen……..……45
Abbildung 18: Darstellung von Zellkernen ……47
Abbildung 19: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in den T98G-Zellen……48
Abbildung 20: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in den FaDu-Zellen……50
Abbildung 21: Expression des Gens *RB1* in den T98G-Zellen……...……53
Abbildung 22: Expression des Gens *CDKN1B* in den T98G-Zellen……...54
Abbildung 23: Expression des Gens *RB1* in den FaDu-Zellen…….……...55
Abbildung 24: Expression des Gens *CDKN1B* in den FaDu-Zellen……..……56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die unterschiedlichen Verdünnungen der Piperinstammlösung…....17
Tabelle 2: Zellpopulationsverdopplungszeiten der Zelllinie T89G……...30
Tabelle 3: Berechnete IC_{50}-Werte des Piperins für die Zelllinie T98G……31
Tabelle 4: Zellpopulationsverdopplungszeiten der Zelllinie FaDu……..34
Tabelle 5: Berechnete IC_{50}-Werte des Piperins für die Zelllinie FaDu……..……35
Tabelle 6: Plattiereffizienzen der Zelllinie T98G……..……37
Tabelle 7: Plattiereffizienzen der Zelllinie FaDu……..……41

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Die Bedeutung maligner Tumorerkrankungen nimmt in den westlichen Industrienationen stetig zu. Heute zählen sie in Deutschland nach den kardiovaskulären Erkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache, mit steigender Tendenz (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2017). Auch weltweit zeigt sich bei steigender Lebenserwartung sowie einem deutlichen Rückgang von Infektionserkrankungen, ein Anstieg der Mortalität durch Krebserkrankungen, wobei Tumorerkrankungen aufgrund des teilweise langen und schweren Verlaufs in der Bevölkerung gefürchtet sind.

Der Begriff „Tumor“ ist nur unscharf definiert und bedeutet nach medizinischer Definition zunächst einmal jede Art von Schwellung, unabhängig ihrer Dignität. Ein Tumor entwickelt sich also aus bereits vorhandenem, körpereigenem Gewebe und besteht wie gesundes Gewebe aus einzelnen Zellen. Diese Zellen unterscheiden sich bei genauerer Betrachtung jedoch teilweise erheblich von jenen gesunden Zellen. Am Beginn einer Tumorentstehung steht die Transformation, also der Übergang einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle (BÖCKER et al., 2012).

Dieser Transformation geht zumeist eine genetische Veränderung voraus, welche in der Einzelzelle beginnt und auf die Tochterzellen übertragen werden kann. Im Laufe der Zeit kann es durch das teilweise unkontrollierte Wachstum zu weiteren genetischen sowie epigenetischen Veränderungen im Zellverbund kommen, welche zu einer ausgeprägten Heterogenität des Tumors führen kann.

Eine maligne Tumorzelle ist durch einige wesentliche Eigenschaften charakterisiert. Dazu zählen beispielsweise die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, ein unbegrenztes Wachstumspotenzial bei ausreichender Nährstoffversorgung, die Fähigkeit zur Unterdrückung des programmierten Zelltods (Apoptose) sowie die Möglichkeit zur Angiogenese, Invasion in benachbarte Gewebe und letztlich zur Metastasierung (WAGENER et al., 2010).

Unter benignen (gutartigen) Neoplasien werden Tumoren zusammengefasst, welche zwar ungesteuert wachsen, jedoch Gewebegrenzen respektieren und nicht invasiv wachsten. Die Gewebeinvasion ist ein Zeichen maligner (bösartiger) Neoplasien.

Abhängig vom Ursprungsgewebe können Karzinome (Epithelgewebe), Sarkome (mesenchymales Gewebe) und Tumoren des hämatopoetischen Systems (Leukämien, Lymphome, Plasmazellneoplasien) unterschieden werden (WAGENER et al., 2010).

In Deutschland zeigt das Prostatakarzinom beim Mann und das Mammakarzinom bei der Frau die höchste Prävalenz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit standen Tumorzellen des Pharynx sowie des Glioblastoms im Mittelpunkt der Betrachtung. Mit einem prozentualen Anteil von 3,8 % beim Mann stehen Karzinome im Bereich der Mundhöhle und des Rachens an 7. Stelle der

häufigsten Tumorlokalisationen, wobei Männer häufiger als Frauen erkranken. Histologisch handelt es sich hierbei hauptsächlich um Plattenepithelkarzinome (87 %) sowie Adenokarzinome, insbesondere der Speicheldrüsen (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2020). Als maßgebliche Risikofaktoren gelten der Konsum von Tabak und Alkohol, wobei ein Mischkonsum einen nicht unerheblichen additiven Effekt in Bezug auf die Malignomentstehung zeigt. Chronische Infektionen mit dem humanem Papillomavirus (HPV) stellen einen weiteren wichtigen Risikofaktor, insbesondere bei jüngeren Patienten dar. Tumoren des Pharynx werden häufig durch Schluckbeschwerden, Blutungen oder lokale Lymphknotenschwellungen symptomatisch. Die 5-Jahresüberlebensrate ist mit ca. 30 % schlecht (BÖCKER et al., 2012).
Seltener, jedoch mit einer noch schlechteren Prognose verbunden, kommen in Deutschland bösartige Tumoren des zentralen Nervensystems vor, wobei im Erwachsenenalter die Glioblastome bei beiden Geschlechtern dominieren. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren. Glioblastome zählen zu den WHO-Grad IV Tumoren astrozytären Ursprungs und können entweder de-novo oder sekundär aus einem niedrig gradigen Astrozytom entstehen. Bis auf erbliche Tumorsyndrome gibt es keine gesicherten Risikofaktoren (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2020). Für die eingeschränkte Überlebensrate sind insbesondere die späte klinische Manifestation sowie die eingeschränkten Therapieoptionen verantwortlich.

1.2 Einflüsse auf die Tumorentstehung

Allgemein zeichnen sich Tumoren durch eine progressive Zunahme der Zellzahl aus, welche durch eine erhöhte Teilungsrate bzw. einen reduzierten Untergang der Zellen bedingt sein kann. Eine unkontrollierte Teilung kann beispielsweise durch eine Mutation in einem (Proto)-Onkogen bedingt sein. Diese regulieren physiologischerweise die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Die Produkte der Protoonkogene sind heterogen und umfassen unter anderem Wachstumsfaktorrezeptoren, intrazelluläre Signalproteine oder nukleäre Transkriptionsfaktoren. Im Ergebnis kommt es durch eine Mutation somit zu einer deregulierten Proliferation („gain of function“). Im Gegensatz dazu stehen die Tumorsuppressorgene, deren Produkte inhibierend auf das Wachstum wirken. Ein Funktionsverlust („loss of function“) erlaubt somit ebenfalls ein ungehindertes Wachstum. Beispielhaft seien die Tumorsuppressorgene *RB1*, *TP53* oder *BRCA1* und *BRCA 2* genannt (BÖCKER et al., 2012).
Eine zentrale Stellung nimmt der Zellzyklus ein. Dieser lässt sich allgemein in eine Mitose-Phase (M-Phase) und eine Interphase einteilen, wobei während der Mitose die eigentliche Zellteilung stattfindet. In der Interphase wird die Mitose vorbereitet, indem u. a. das genetische Material verdoppelt wird. Diese Tatsache macht die Notwendigkeit einer strikten Regulation und Kontrolle der Replikation deutlich. Dabei haben regulatorische Proteine wie die Zykline mit ihren assoziierten zyklinabhängigen Kinasen (CDK) sowie deren Inhibitoren die CKI (z.B. $p16^{INK4A}$,

p21^{Cip1} oder p27^{Kip1}) eine zentrale Rolle. Durch mitogene Signale erlauben die Komplexe aus Zyklin/CDK phasenspezifisch einen Progress des Zellzyklus und wirken somit als Onkoproteine. Beispielhaft sei hier die Amplifikation des Zyklin D1-Gens und damit dessen Überexpression im Mammakarzinom genannt. Kommt es zu irreparablen Fehlern während der Replikation der DNA, muss der Zellzyklus arretiert werden, damit es nicht zur Weitergabe der Mutation auf die Tochterzelle kommt. Dazu werden die Zyklin-CDK-Komplexe selektiv von den CDK-Inhibitoren gehemmt. Aus der Funktion der CKIs lässt sich die Zuordnung ihrer Gene zu den Tumorsuppressorgenen erklären (RASSOW et al., 2015).

Ein klassisches Tumorsuppressorgen ist das Retinoblastomgen *RB1*, dessen Genprodukt – das Protein Rb – hemmend auf den Zellzyklus am Übergang der G_1- in die S-Phase (Restriktionspunkt) oder in der G_2-Phase wirkt. Wie in Abb. 1 dargestellt, muss Rb in ausreichendem Maß durch die CDKs phosphoryliert werden, um den Restriktionspunkt der G_1-Phase zu überwinden (DIMARAS et al., 2008).

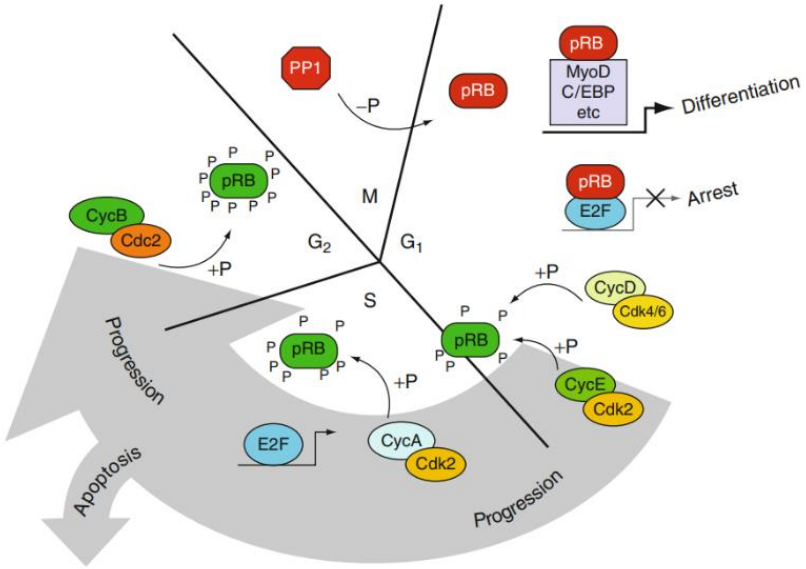

Abb. 3: Funktion des Retinoblastom-Proteins (Rb). Im hypophosphorylierten Zustand liegt Rb in einem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F vor und wirkt so als „Zellzyklusbremse“. Erst durch die Hyperphosphorylierung von Rb durch phasenspezifische CDKs kommt es zur Dissoziation von E2F, wodurch Gene für die S-Phase aktiviert werden. Auch für die Passage weiterer Kontrollpunkte ist die Hyperphosphorylierung von Rb essenziell. Nach der M-Phase wird Rb durch die Phosphoprotein-Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert. CDK: cyclin dependent kinase (Dimaras et al., 2008).

Neben einer verstärkten Proliferation durch einen deregulierten Zellzyklus kann es im Rahmen der Tumorentstehung bzw. der Progression der Erkrankung zu einer Hemmung der Apoptose, also des programmierten Zelltods, kommen.

Ferner kommt es bei soliden Tumoren im weiteren Verlauf zu einer Stimulation der Gefäßneubildung durch das umliegende Tumorgewebe, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Im Mittelpunkt dieser Angiogenese stehen die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF).
Lösen sich Tumorzellen aus dem Gewebeverbund und werden diese z. B. durch die Lymph- oder Blutbahn verschleppt, kann es zur lymphogenen bzw. hämatogenen Metastasierung in Lymphknoten oder anderen Organen kommen, was nicht selten der Grund für das Versterben der Patienten ist.

1.3 Tumorbehandlung

Die heutige Tumortherapie besteht im Wesentlichen aus drei Säulen: der chirurgischen Behandlung, der Chemotherapie sowie der Behandlung mittels Strahlentherapie.
Aufgrund der steigenden Inzidenz von malignen Tumorerkrankungen besteht ein großer medizinischer und gesellschaftlicher Bedarf an modernen Behandlungsoptionen. Die chirurgische Entfernung des soliden tumorösen Gewebes ist insbesondere in den frühen Erkrankungsstadien eine der wichtigsten Behandlungsoptionen.

1.3.1 Strahlentherapie

Ferner hat sich die Radioonkologie als wichtige Disziplin in der Behandlung von onkologischen Patienten etabliert. Dabei beruht die heutige Strahlentherapie auf eine lange Historie. Bereits 1899 konnten die Schweden Sjögren und Stenbeck ein Plattenepithelkarzinom der Nase erfolgreich bestrahlen (BAUER, 1949). Dank der fortgeschrittenen Entwicklung neuerer Technologien ist es heute möglich, Tumoren in tieferen Gewebeschichten und äußerst präzise mittels ionisierender Strahlung zu behandeln.
Das wichtigste intrazelluläre Ziel der Strahlung stellt die DNA dar, wodurch es zur radiogenen Auslösung des Zelltods bzw. von Mutationen kommt. Dabei sind die Formen der Schädigung an diesem Molekül vielfältig: Neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen kann es auch zu isolierten Strukturveränderungen von Basen oder zu einer Störung der kovalenten Bindung der DNA mit den assoziierten Proteinen kommen. Nach einer Bestrahlung mit nur einem Gy kommt es pro Zelle zu ca. 4.000 - 5.000 DNA-Schäden, wobei die Doppelstrangbrüche mit einer Anzahl von 30 - 40 am seltensten sind (HERRMANN et al., 2005). Nicht jeder DNA-Schaden führt zu einer Mutation, da die eukaryotische Zelle über multiple DNA-Reparaturmechanismen verfügt. Den wichtigsten Anteil der biologischen Strahlenwirkung stellen residuelle Doppelstrangbrüche dar, die nicht, unvollständig sowie nicht korrekt repariert wurden (HERRMANN et al., 2005). Effekte solcher irreparabler DNA-Schäden sind das Auftreten von Mutationen sowie unterschiedliche

Formen des Zelltods. Neben der Nekrose spielt aus strahlenbiologischer Sicht insbesondere der intrinsische, mitochondrial-vermittelte Weg der Apoptose eine wichtige Rolle.
Funktionell betrachtet stellt einen der wichtigsten Mechanismen der Strahlentherapie zudem der klonogene Zelltod durch den Mitosetod dar. Klonogen bezeichnet die Fähigkeit der Zelle mehrere Zellteilungen zu durchlaufen, wodurch Kolonien gebildet werden. Bei vielen Zellen kommt es nach Einwirkung ionisierender Strahlung nicht zum sofortigen Zelltod. Sie sind zunächst in der Lage ihre morphologische und metabolische Integrität zu wahren. Durch die DNA-Schäden nach der Bestrahlung kommt es jedoch zu einem Verlust an genetischem Material. Dadurch kommt es zu einem Mangel an essenziellen Proteinen, wodurch die Zellen nach einer gewissen Zeit ihre Proliferation einstellen (SAUER, 2010).
Zellen zeigen ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Bestrahlung, welches genetisch determiniert ist. Eine abweichende Strahlenempfindlichkeit zeigt sich ferner zwischen den unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Während der Mitose sowie an den Übergängen der unterschiedlichen Phasen sind die Zellen am empfindlichsten. In der späten S-Phase sowie der frühen G_1-Phase sind viele Zelllinien relativ resistent gegenüber einer Bestrahlung (HERRMANN et al., 2005).
Durch die Bestrahlung und die dadurch bedingte Radiolyse von Wasser entstehen zudem freie Radikale, welche maßgeblich an der indirekt schädigenden Wirkung beteiligt sind. Die erklärt, warum die Anwesenheit von Sauerstoff mit einer erheblich verbesserten Strahlenwirkung verbunden ist. Für Tumoren, welche unter anoxischen Bedingungen wachsen, werden wesentlich höhere Bestrahlungsdosen benötigt als für Tumoren unter aeroben Bedingungen.

1.3.2 Chemotherapie

Neben der Strahlentherapie und der chirurgischen Behandlung spielt die medikamentöse Tumortherapie heutzutage eine herausragende Rolle. Zusätzlich zu den klassischen Zytostatika, kommen durch die Erforschung zahlreicher molekularer Zielstrukturen vermehrt zielgerichtete Therapien zum Einsatz. Klassische Zytostatika wirken beispielsweise als Antimetabolite und hemmen die Purin- und Pyrimidinsynthese oder als Alkylanzien und führen so direkt zu einer Schädigung der DNA. Dabei kommt es zumeist nicht nur zu einer Schädigung der malignen Zellen, sondern auch von gesundem Gewebe mit einer hohen Proliferationskapazität.
Neuere Onkologika wirken, nach entsprechender Charakterisierung des Tumors, zielgerichtet auf Schlüsselproteine wie z.B. Rezeptor-Tyrosinkinasen (EGFR, HER2) oder aber direkt durch Eingriff in den Zellzyklus in Form von CDK-Inhibitoren. Aufgrund der Heterogenität der Tumorzellen durch eine genetische Instabilität, besteht jedoch durchaus die Gefahr der Resistenzentwicklung gegenüber der Chemotherapie (MUTSCHLER, 2019).

1.3.3 Radiochemotherapie

Eine wichtige Strategie in der heutigen Radioonkologie ist die Kombination aus Strahlentherapie mit zytostatischen bzw. zytotoxischen Substanzen. Grundsätzlich lässt sich bei einer solchen Kombinationstherapie ein additiver von einem supraadditiven Effekt unterscheiden. Additive Effekte sind durch eine fehlende Interaktion der Bestrahlung mit der Chemotherapie gekennzeichnet. Durch die Chemotherapie wird ein gewisser Anteil an Tumorzellen abgetötet, die Zellen selbst werden durch die Therapie jedoch nicht sensibler gegenüber der Bestrahlung.
Zeigt sich ein supraadditiver Effekt, werden die Zellen einerseits durch das Chemotherapeutikum allein abgetötet und zusätzlich gegenüber der Bestrahlung sensibilisiert, sodass solche Substanzen aus strahlentherapeutischer Sicht besonders interessant sind (HERRMANN et al., 2005).
Neben der Entwicklung neuer Therapieansätze bietet die Suche nach Wirkstoffen in der Natur nach wie vor ein großes Potenzial. Bereits in der Vergangenheit war es so möglich, Wirkstoffe aus Pflanzen zu gewinnen, welche auch heute noch Anwendung in der in der Onkologie, u. a. der kombinierten Radiochemotherapie finden. Dazu zählen z. B. das Paclitaxel aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), das Camptopthecin, welches zur Herstellung von Irinotecan verwendet wird, aus dem chinesischem Glücksbaum (*Camptotheca acuminata*) oder das Vinblastin aus dem Madagaskar-Immergrün (*Cantharanthus roseus*). Aktuell befinden sich weitere, zumeist sekundäre Pflanzenstoffe, in der experimentellen Anwendung zur Therapie und Prävention von Tumorerkrankungen (HUBER et al., 2013).
Eine solche Substanz, die aufgrund ihrer antitumorigenen Wirkung in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist, ist Piperin.

1.4 Antitumorigene Wirkung von Piperin

Piperin (1-Piperoylpiperidin) stellt ein Säureamid-Alkaloid aus Pflanzen der Familie der *Piperaceae* dar. Alkaloide sind eine Gruppe organischer Verbindungen, welche unter anderem aus einem heterozyklischen Ring mit einem Stickstoffatom bestehen und zumeist alkalische Eigenschaften besitzen (CORDELL, 1981). Erster repräsentativer Vertreter dieser medizinisch bedeutsamen Stoffklasse war das Morphin. Danach kam es zur Entdeckung nicht weniger bedeutsamer Alkaloide wie z.B. Nikotin, Coffein und Strychnin. Piperin lässt sich aus den Früchten bzw. Wurzeln des schwarzen (*Piper nigrum*) und langen Pfeffers (*Piper longum*) isolieren (ZHENG et al., 2016).

Erstmals extrahiert wurde Piperin im Jahr 1819 von Hans Christian Orsted (GORGANI et al., 2017). Der exakte Syntheseweg des Piperins ist weiterhin unklar. Erst vor kurzem konnte die Piperin-Synthase als Acyltransferase identifiziert werden, welche den terminalen Schritt in der Synthese des Piperins aus Piperoyl-CoA und Piperidin katalysiert (SCHNABEL et al., 2021; siehe Abb. 2).

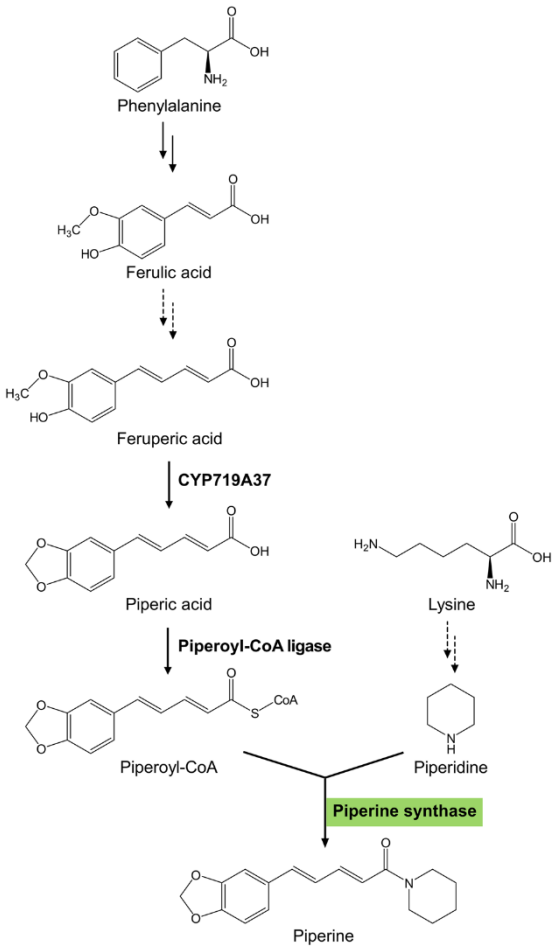

Abb. 4: Syntheseweg des Piperins in Früchten des schwarzen Pfeffers *Piper nigrum* (Schnabel et al., 2021).

Der schwarze Pfeffer gehört seit Jahrhunderten zu den beliebtesten Gewürzen dieser Welt. Bereits im 15. Jahrhundert wurde dieser zum Würzen von Speisen verwendet. Der scharfe Geschmack wird dabei maßgeblich durch den Inhaltsstoff Piperin hervorgerufen, welches wie Capsaicin agonistisch auf den TRPV-1 (transient receptor potential vanilloid 1) wirkt, ein sensorischer Kationenkanal des peripheren und zentralen Nervensystems, welcher u. a. nozizeptive Eigenschaften besitzt (SCHNABEL et al., 2021).

Neben dem Einsatz als Gewürz ist *Piper nigrum* schon lange ein wesentlicher Bestandteil in der traditionellen Phytomedizin, wobei die Pflanze vornehmlich bei Verdauungs- und Atemwegsbeschwerden eingesetzt wurde (GORGANI et al., 2017).

Im Verlauf wurden dem Piperin zudem antihypertensive, antiinflammatorische sowie hepatoprotektive Eigenschaften zugeschrieben (SINGH et al., 2013). Gesichert ist die Wirkung als sog. Bioenhancer, wodurch die Wirkung diverser Arzneistoffe verstärkt werden kann. Dies wird u. a. durch eine Verstärkung des gastrointestinalen Blutflusses sowie eine Inhibition des P-Glykoproteins, einer ATP-abhängigen Effluxpumpe in eukaryontischen Zellen, welche die Arzneistoffe aus dem Intrazellulärraum ausschleusen können und so zu einer geringeren Wirkung beitragen, realisiert (SINGH et al., 2013).

Neuere Untersuchungen weisen zudem auf eine antitumorigene Wirkung des Piperins hin. So konnten u.a. in Prostata- und Kolonkarzinomzellen ein Zellzyklusarrest am Übergang der G_1/S-Phase durch eine verstärkte Expression der CDK-Inhibitoren $p21^{Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ beobachtet werden, woraus eine Hemmung des Komplexes aus CDK2/CyclinE resultiert und eine Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins zur Überwindung des Restriktionspunktes unterbleibt (OUYANG et al., 2013, YAFFE et al., 2015; siehe Abb. 3).

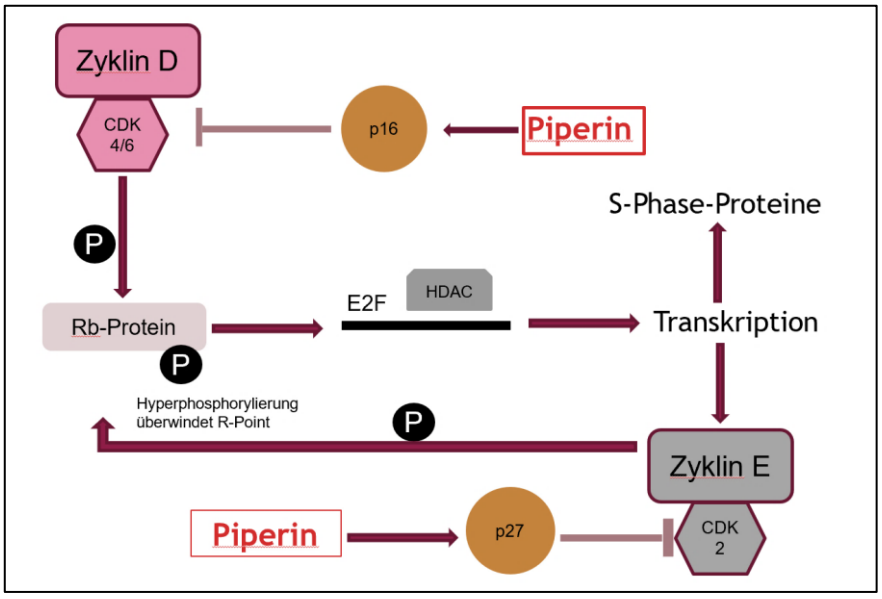

Abb. 3: Wirkung des Piperins auf den Übergang der G_1-Phase in die S-Phase während des Zellzyklus. Unter Einfluss des Piperins kommt es zu einer verstärkten Expression der CDK-Inhibitoren $p16^{Cip1}$ und $p27^{Kip1}$, wodurch u. a. die Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins am Übergang der G_1-Phase in die S-Phase unterbleibt, sodass der Transkriptionsfaktor E2F nicht aus dem Komplex mit dem Rb-Protein dissoziiert und ein Fortschreiten des Zellzyklus unterbunden wird. CDK: cyclin dependent kinase; p16/p27: CDK-Inhibitoren; HDAC: Histon-Deacytelase.

Ähnliche Beobachtungen konnten an einem weiteren Restriktionspunkt des Zellzyklus zwischen der G_2-Phase und der Mitose gemacht werden. In Bronchialkarzinom- und Sarkomzellen kam es unter dem Einfluss von Piperin zu einer verminderten Expression des M-Phase stimulierenden Faktors (Maturation promoting factor, MPF), einem Komplex aus Cyclin B und CDK1, wodurch es zu einer Störung beim Eintritt in die Mitose kommt. Neben dieser direkten Wirkung auf den

MPF konnte zudem eine indirekte Wirkung beschrieben werden: Eine zunehmende Phosphorylierung der Checkpoint-Kinase 2 (Chk 2) führt zu dessen Aktivierung (ZHANG et al., 2015). Diese Kinase ist nun in der Lage die Cdc25-Phosphatase verstärkt zu phosphorylieren, was zu einem Abbau durch Ubiquitinierung führt (GREENSHIELDS et al., 2015).

Neben diesen Wirkungen auf den Zellzyklus konnten zudem pro-apoptotische Einflüsse beobachtet werden. Neben einer verstärkten Aktivierung der Effektorcaspase 3 konnte in Melanomzellen ein Abfall des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 sowie eine erhöhte Expression der Proteine Bax und der Caspase 9 nachgewiesen werden (EUN SEON YOO et al., 2019).

Zudem konnten Wirkungen auf die Invasion bzw. Metastasierung durch eine verminderte Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Fibrosarkomzellen (HWANG et al., 2011) sowie eine Inhibition der Angiogenese durch Unterdrückung der VEGF-Wirkung (DOUCETTE et al., 2013) nachgewiesen werden (siehe Abb. 4).

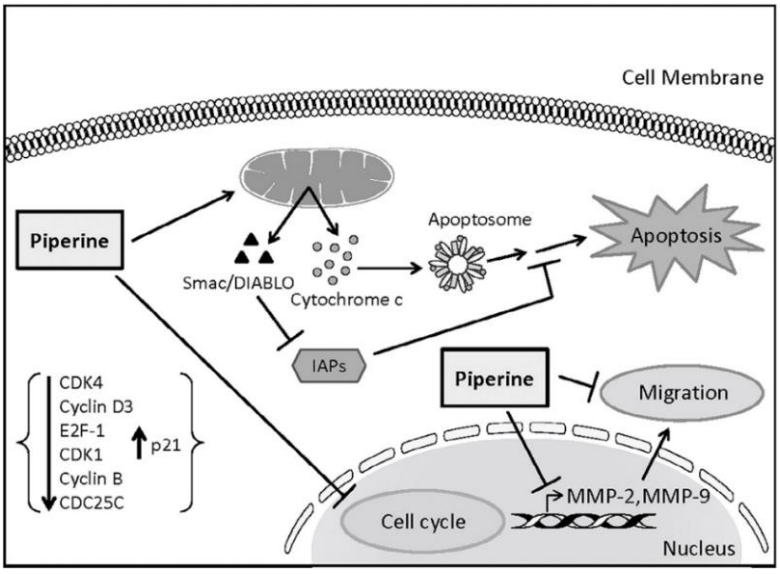

Abb. 4: Wirkungen des Piperins auf den Zellzyklus, die Apoptose sowie die Migration von Tumorzellen.
Piperin zeigt eine inhibierende Wirkung auf den Zellzyklus sowie eine Induktion der mitochondrial vermittelten Apoptose, wobei vermehrt proapoptotische Moleküle wie Smac/DIABLO und Cytochtom c ausgeschüttet werden. Zudem vermindert Piperin die Expression von MMP-2 und MMP-9, was mit einer verminderten Migration und Metastasierung der Tumorzellen verbunden ist. CDK: cycline dependent kinase; cdc25c: cell division cycle (Phosphatase); MMP: Matrix-Metalloproteinase; Smac/DIABLO: proapoptotische Moleküle; IAP: Inhibitors of apoptosis-Protein; E2F-1: Transkriptionsfaktor. (Greenshields et al., 2014).

1.5 Zielstellung

In-vitro-Analysen konnten bereits eine Vielzahl an antitumorigenen Ansatzpunkten bei unterschiedlichen etablierten Zelllinien für den Wirkstoff Piperin aufzeigen, sodass eine Kombination mit ionisierender Bestrahlung vielversprechend erscheint.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die kombinierte Wirkung des Alkaloids Piperin und ionisierender Strahlung auf die humanen Tumorzelllinien T98G (Glioblastom) sowie FaDu (Hypopharynxkarzinom) zu untersuchen.

Dazu sollte zunächst die Wachstumskinetik beider Zelllinien unter dem Einfluss des Piperins mit Hilfe von Wachstumskurven beurteilt werden. Das klonogenen Zellüberleben nach Bestrahlung und Einwirkung des Piperins kann mit Hilfe eines Koloniebildungstest untersucht werden, sodass Aussagen über das Langzeitüberleben der behandelten Zellen getroffen werden können.

Mit Hilfe weiterer *In-vitro*-Methoden kann die Wirkung des Piperins dezidierter charakterisiert werden. Es war geplant, durch einen BrdU-Assay Aussagen über das Proliferationsverhalten beider Zelllinien unter der kombinierten Behandlung zu treffen und so das Wachstumsverhalten, welches in den vorrangegangenen Methoden untersucht wurde, weiter einzuordnen. Ferner war beabsichtigt, die Reparaturkapazität der Tumorzellen nach radiogen induzierten DNA-Schäden zu ermitteln. Diese stellen eine der wichtigsten strahlenbiologischen Wirkungen dar.

Schließlich sollte durch eine qRT-PCR das Expressionsverhalten der beiden Tumorsuppressorgene *RB1* und *CDKN1B*, welches für das Protein $p27^{Kip1}$ codiert, charakterisiert werden.

Die untersuchten Zelllinien stehen repräsentativ für *In-vivo*-Tumorentitäten, welche trotz moderner Therapieoptionen mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten verbunden sind. Eine etablierte Therapiemöglichkeit beider Tumorentitäten besteht in der strahlentherapeutischen Behandlung. Additive bzw. supraadditive Effekte des Wirkstoffs Piperin könnten zu einer weiteren Verminderung der Tumorlast sowie einer Reduktion der Bestrahlungsdosen führen, um die Nebenwirkungen für den Patienten zu minimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Tumorzelllinien

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden in den Experimenten die beiden Tumorzelllinien T98G sowie FaDu benutzt.

Bei der Zelllinie T98G handelt es sich um Zellen, welche aus einem Glioblastom eines 61- jährigen, männlichen Patienten isoliert wurden. Die Zellen wachsen adhärent; das Erscheinungsbild ist polymorph (Abb. 5A). Neben der fibroblastenähnlichen Morphologie kann auch eine polygonale und kugelförmige Struktur beobachtet werden. Charakteristisch ist eine hohe Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), einem Wachstumsfaktor, welcher für die gute Vaskularisation von Glioblastomen mitverantwortlich ist.

Die FaDu-Zellen sind ebenfalls adhärent wachsende Karzinomzellen (Abb. 5B) und stammen aus einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx eines 56 Jahre alten, männlichen Patienten. Die Zellen wachsen zunächst radiär in Zellnestern, welche mit der Zeit zu einer Epithelschicht verschmelzen.

Beide Tumorzelllinien wurden aus der amerikanischen Zellbank ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) bezogen.

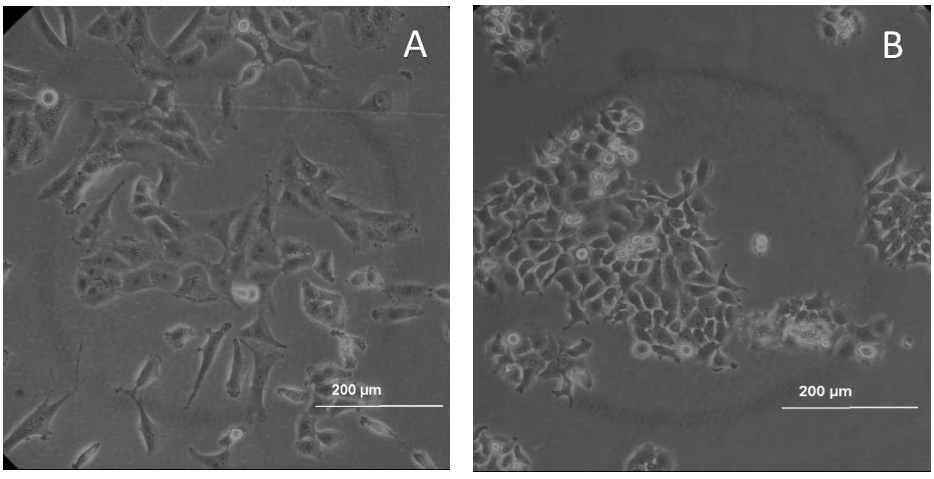

Abb. 5: Mikroskopische Darstellung der T98G-Zellen (A) und der FaDu-Zellen (B) in Kultur. 200-fache Vergrößerung

2.1.2 Zellkulturmedium und Zusätze

Für die Kultivierung der T98G- sowie der FaDu-Zellen wurde das Basalmedium DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium) mit einer Glukosekonzentration von 4,5 g/l verwendet. Grundlage heutiger Basalmedium stellen isotonische Salzlösungen dar. Enthaltene Na^+ und Cl^- - Ionen sind für die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks sowie Na^+ und K^+-Ionen für das Zellmembranpotenzial verantwortlich. Ca^{2+} und Mg^{2+}-Ionen spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion.

Das verwendete Medium bestand neben dem DMEM zusätzlich zu 10 % aus fetalem Kälberserum (FBS, Fetal Bovine Serum). Das Serum versorgt die Zellkultur mit lebenswichtigen Proteinen wie Wachstums- und Adhäsionsfaktoren, Vitaminen und Spurenelementen, Hormonen, Fettsäuren und Lipiden. Die genaue Zusammensetzung ist jedoch wie bei vielen biologischen Flüssigkeiten unbekannt. Zur Vermeidung einer möglichen Kontamination enthielt das Medium 1 % einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin. Penicillin zählt zu den Betalaktam-Antibiotika und inhibiert die Zellwandsynthese, wohingegen Streptomycin die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt.

Für die Kultivierung der FaDu-Zellen bestand das Medium neben den oben genannten Komponenten aus weiteren Zusätzen: 1 % Natrium-Pyruvat, welches unterstützend im aeroben Energiestoffwechsel wirkt. Ferner enthielt es 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren sowie 2 % HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure), das neben dem $NaHCO_3$ im Basalmedium als zusätzlicher Puffer für eine verbesserte pH-Stabilität sorgt.

2.1.3 Zellen ausfrieren

Die Lagerung der Zellkulturen erfolgte bei -152 °C in einem Kryomedium, welches aus DMEM mit 5% Dimethylsufloxid (DMSO) bestand. DMSO fungiert hierbei als sog. Kryoprotektivum, wobei allgemein zwischen penetrierenden und nicht penetrierenden Kryoprotektiva unterschieden werden kann (SCHMITZ, 2010). Penetrierende Gefrierschutzmittel dringen dabei in den Intrazellulärraum ein. Dies wird durch ihr geringes Molekulargewicht erreicht. Intrazellulär können sie hohe Konzentrationen erreichen und die Bildung von Eiskristallen unterbinden. Damit kann die osmotische Dehydrierung der Zelle verhindern. DMSO zählt zu den penetrierenden Kryoprotektiva und passiert die Zellmembran komplett. Bei zu hohen Konzentrationen können jedoch auch toxische Effekte beobachtet werden (SCHMITZ, 2010).

Die kryokonservierten Zellen wurden in dem Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Verdünnung durch vorsichtige Zugabe von 10 ml des entsprechendem Kulturmediums. Die T98G-Zellen wurden daraufhin 5 min bei 15 x g zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem FBS-haltigem Medium resuspendiert und anschließend auf zwei T_{25}-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Bei den FaDu-Zellen entfiel der Schritt der Zentrifugation. Die Zellen wurden ebenfalls auf zwei T_{25}-Zellkulturflaschen im Verhältnis 1/3 : 2/3 aufgeteilt. Bei beiden Zelllinien erfolgte nach 24 h ein kompletter Mediumwechsel. Vor dem Beginn der Versuche wurden die Zellen ca. 2-3 Mal subkultiviert.

2.1.4 Subkultivierung der Zellkultur

Allgemein lassen sich Zellkulturen unterscheiden, welche adhärent oder in Suspension wachsen. Adhärent wachsende Zellen gehen mittels Zell-Substrat-Interaktion eine Verbindung mit der Oberfläche des Zellkulturgefäßes ein. Dabei handelt es sich um ähnliche Mechanismen wie bei der Zell-Matrix-Adhäsion *in vivo*. Bei der Anheftung der Zellen an eine Oberfläche spielen insbesondere zweiwertige Kationen sowie Adhäsionsproteine wie Laminin und Fibronectin eine wichtige Rolle spielen.

Für die Kultivierung von Zellen werden in der Regel Gefäße aus Kunststoff, meist aus Polysterol, benutzt. Adhärente Zellen bedecken mit der Zeit als sog. konfluente Monolayer die gesamte Wachstumsfläche. Normalzellen wachsen dann i. d. R. nicht mehr weiter. Dies beruht im Wesentlichen auf dem Phänomen der sog. Kontakthemmung. Tumorzellen bzw. transformierte Zellen wachsen weiter als Multilayer, da bei ihnen durch den Verlust von regulatorischen Proteinen die Kontakthemmung herabgesetzt bzw. verloren gegangen ist. Jedoch sind dann bei den Tumorzellen aufgrund der hohen Zelldichte durch die hohen Proliferationsraten nicht mehr genug Nährstoffe für alle Zellen vorhanden, sodass es zu einem Untergang von Zellen und dem Entstehen von toxischen Zerfallsprodukten kommen kann, welche die Zellkultur nachhaltig schädigen können. Aus diesem Grund wird eine Subkultivierung durchgeführt.

Ziel der Subkultivierung der adhärent wachsenden Zellen war somit die Verhinderung einer vollständigen Konfluenz und die Reduktion der Zellzahl. Gleichzeitig erfolgte ein Mediumwechsel zweimal pro Woche.

Vor dem Passagieren wurden alle Reagenzien im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Zellen unter dem Lichtmikroskop inspiziert. Hierbei konnten Hinweise auf die Vitalität bzw. auf eine mögliche Kontamination gewonnen werden.

Zunächst wurde das alte Medium verworfen, der Zellrasen mit PBS gespült, um Zelldetritus zu entfernen und die Zellen mittels einer Mischung aus Trypsin/EDTA von der Kulturunterlage gelöst. Dieser Prozess wird auch als Detachment bezeichnet. Trypsin stellt dabei eine alkalische Serinprotease aus dem Pankreas dar, welche als Endopeptidase fungiert und Peptidbindungen spaltet und größtenteils die Zell-Substrat-Verbindungen auflöst.

Das EDTA (Ethylendiamintetraacetat) als Komplexbildner für zweiwertige Ionen wie Calcium und Magnesium, welche mitverantwortlich für die Integrität der zellbindenden Membranproteine sind,

löst vorrangig Zell-Zell-Kontakte. Zusätzlich führt die Zugabe von EDTA zu einer Ansäuerung der Trypsinlösung und somit zu einer Beschleunigung der hydrolytischen Spaltungen durch Trypsin. Für die T98G-Zellen wurden 3 ml einer Trypsinlösung mit einer Konzentration von 0,05 % benutzt, während die FaDu-Zellen mit 1 ml einer 0,25 %igen Trypsinlösung behandelt wurden. Der Trypsinierungsprozess erfolgte bei beiden Kulturen für zehn min bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator.

Danach wurde der Ablösevorgang unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Eventuell weiter anhaftende Zellen oder Zellinseln wurden durch vorsichtiges Abklopfen gelöst. Der Trypsinierungsprozess wurde durch die Zugabe des entsprechenden Vollmediums gestoppt. Das im Vollmedium enthaltene Serum bewirkt eine sofortige Inaktivierung des Trypsins und bindet zum Teil auch das zytotoxische EDTA. Im Folgenden wurden noch lose anheftende Zellen mittels einer Pipette abgespült. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und anschließend mit 594 x g bei 24 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene Überstand vorsichtig verworfen und die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels automatischer Zellzählung. Danach konnte ein berechnetes Volumen der Zellsuspension in die neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt werden. Für die T98G-Zellen wurde eine Einsaatdichte von 3,75 x 10^5 Zellen/T_{75}-Zellkulturflasche und für die FaDu-Zellen eine Dichte von 1,25 x 10^5 Zellen/T_{25}- Kulturflasche gewählt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2-Begasung inkubiert.

2.1.5 Automatische Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl zählt bei Arbeiten mit Zellkulturen zu den Routinemethoden und erfolgte mit einem Zellzählgerät (Casy® TT der Firma Roche).

Vorbereitend wurde ein Probenvolumen von 50 µl in ein Gefäß (Casycup®) mit 10 ml einer isotonischen Lösung (Casyton®) pipettiert und anschließend vorsichtig invertiert, damit die Probe gut durchmischt wurde. Diese wurde nun unter die Messkapillare gestellt und die Messung erfolgte mit einem Aliquot von 200 µl. Dieses Aliquot wird dabei automatisch durch die Messkapillare gesaugt, an welcher eine Spannung angelegt ist. Diese elektrische Spannung wird durch zwei Platinelektroden erzeugt. Bei jedem Durchtritt einer Zelle durch eine Pore in der Kapillare wird ein elektrischer Impuls ausgelöst, welcher zur Änderung der Spannung führt. Die Anzahl der gemessenen Pulse entspricht dabei der Zellanzahl. Pro Messung erfolgte eine Dreifachbestimmung, wobei ein Mittelwert bestimmt und im Folgenden angezeigt wurde. Dieser Wert entsprach einer Hochrechnung des Systems für 1 ml.

Neben der Darstellung von vitalen und toten Zellen kann auch der Zellschrott (Debris) angezeigt werden. Mit dieser Methode ist somit eine Aussage über die Vitalität einer Zellkultur möglich.

2.2 Wirkstoff

Piperin wurde in Pulverform von der Firma Sigma Aldrich (Hamburg, Deutschland) bezogen. Es handelt sich um einen geruchslosen, gelblich tingierten Feststoff mit mikroskopischer Kristallstruktur. Insgesamt wurden 5 g Piperin mit einem Reinheitsgrad von über 97 % geliefert. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Das Molekulargewicht von Piperin beträgt 285,34 g/mol.

2.2.1 Herstellen einer Piperin-Stammlösung

Um eine Stammlösung mit einer Stoffmengenkonzentration von 150 mM anzusetzen wurden 100 mg Piperin mit der Feinwaage abgewogen und anschließend in 2,34 ml DMSO gelöst. Die Piperin-Stammlösung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Herstellen von Verdünnungslösungen

Für die weiteren Versuche war es nötig, die Piperin-Stammlösung zu verdünnen. Dieses erfolgte in Zellkulturmedium (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, DMEM). Es wurde eine 1:100 - sowie eine 1:10 - Verdünnungslösung angesetzt.
Auffallend war eine nach Zugabe der Piperinstammlösung in das Medium beginnende Auskristallisierung des Piperins. Diese war insbesondere in der 1:10-Verdünnung erkennbar (siehe Abb. 6).

Abb. 6: Kristallbildung von Piperin nach Zugabe der 1:10 Verdünnungslösung in das Medium (c=200 µM), 100-fache Vergrößerung.

2.3 Untersuchung des Zellwachstums mittels Wachstumskurven

Zellen in Kultur zeigen unter optimalen Wachstumsbedingungen ein teilweise bemerkenswert schnelles Wachstum, wobei unter dem Begriff „Wachstum“ die Zunahme der Anzahl bzw. der Masse der Zellen zu verstehen ist. Im Folgenden wurde die Zunahme der Zellzahl bestimmt.
Mithilfe dieser ermittelten Zellzahlen kann eine Wachstumskurve konstruiert werden, welche Aussagen über das charakteristische Wachstumsverhalten einer Zellkultur erlaubt.
Zum Ansetzen der Wachstumskurven wurde zunächst vorgegangen wie beim Subkultivieren einer Zellkultur. Die Monolayer wurde abgelöst und aus der entstandenen Zellsuspension die Zellzahl bestimmt. Die Einsaat der Zellen erfolgte in einer 24er-Multiwellplatte, wobei eine Einsaatdichte von 1×10^4 Zellen pro Well gewählt wurde. Der Versuch wurde für die Kontrolle, die DMSO-Kontrolle als Lösungsmittel des Piperins sowie für sechs unterschiedliche Konzentrationen in Dreifachbestimmung pro Tag über insgesamt sieben Tage durchgeführt.
Nach dem Einsäen der Zellen wurden die Multiwell-Platten bei 37 °C und 5 % CO_2-Begasung im Brutschrank inkubiert. 24 h nach der Aussaat erfolgte die Wirkstoffzugabe mit den Konzentrationen 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM sowie 200 µM (siehe Tab. 1). Für die Konzentrationen 25-75 µM wurde eine 1:100-Verdünnungslösung der Piperinstammlösung angesetzt, für die Konzentrationen 100-200 µM eine 1:10-Verdünnungslösung (wie in Kap. 2.2.2 beschrieben). Zudem erfolgte eine Lösungsmittelkontrolle durch Zugabe von DMSO (0,1 %). Am Tag der Wirkstoffzugabe wurde die Zellzahl der am vorherigen Tag ausgesäten Zellen ermittelt. Dazu wurde zunächst die Zellzahl aus dem Überstand bestimmt. Anschließend wurde das restliche Medium abpipettiert und die adhärenten Zellen mit 200 µL 0,25 %igem Trypsin/EDTA abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Brutschrank wurde aus dieser Lösung eine Probe von 50 µL entnommen und die Zellzahl gemessen. In den folgenden sechs Tagen erfolgte dann die Ermittlung der Zellzahlen für alle Wirkstoffkonzentrationen sowie der DMSO-Kontrolle und der unbehandelten (nativen) Wachstumskontrolle.

Tab. 1: Übersicht über die unterschiedlichen Verdünnungen der Piperin-Stammlösung (SL).

Konzentration im Ansatz	Verdünnung (Piperin-SL : Medium)	Pipettiertes Volumen/ ml Zellsuspension
25 µM	1 : 100	16,7 µL
50 µM	1 : 100	33,3 µL
75 µM	1 : 100	50,0 µL
100 µM	1 : 10	6,7 µL
150 µM	1: 10	10,0 µL
200 µM	1 : 10	13,3 µL

2.4 Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger

Für die folgenden Versuche erfolgte die Bestrahlung der Zellen jeweils in Zellkulturflaschen bzw. in Multiwellplatten. Für die Bestrahlung wurde der Versa HD-Linearbeschleuniger der Firma Elekta Ltd, (Crawley, Großbritannien) verwendet.

Mit einem Linearbeschleuniger werden Tumor- und andere Erkrankungen mittels energiereicher Elektronen und Photonenstrahlung behandelt. Ein stromdurchflossener Draht sendet Elektronen aus, die in einem Hochvakuum-Rohr nahezu auf Lichtgeschwindigkeit beschleunigt werden. Am Ende des Rohres werden die Elektronen mithilfe eines starken Magneten in ihrer Bahn in die gewünschte Richtung umgelenkt. Ein im Linearbeschleuniger enthaltenes Kollimatorsystem begrenzt das Strahlenbündel auf eine bestimmte Feldgröße. Innerhalb dieses Feldes befand sich auf dem Patientenlagerungstisch eine Plexiglasscheibe mit einer Ringfläche, in welcher die Zellkulturflaschen respektive die Multiwellplatten positioniert wurden. Die isozentrische Positionierung der Plexiglasscheibe wurde mittels Laservisier durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer nominellen Photonenenergie von 6 MV und einer Dosisleistung von 6.6 +/- 0.6 Gy/min mit Dosen von 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy oder 8 Gy. Eine Kontrolle (0 Gy) wurde jeweils mit in den Bestrahlungsraum transportiert, um vergleichbare Umgebungsfaktoren zu gewährleisten.

2.5 Bestimmung des klonogenen Überlebens mittels Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest stellt eine durch PUCK & MARKUS (1956) eingeführte Methode dar, welche das Langzeitüberleben von Zellen, meist unter dem Einfluss von Noxen wie Strahlung und Zytostatika, misst. Um eine Aussage über das Langzeitüberleben zu treffen, sollten die Zellen mindestens 6 Mitosen durchlaufen haben und somit aus wenigstens 50 Zellen bestehen (SCHMITZ, 2010).

Ziel dieser Methode ist es, die Teilungsfähigkeit einer Einzelzelle unter der Einwirkung von Noxen zu beurteilen. Ist die Zelle in der Lage, eine Kolonie zu bilden, bleibt ihre Reproduktivität auch unter Noxeneinfluss erhalten. Dies wird als klonogenes Überleben bezeichnet. Einerseits kann somit der Einfluss ionisierender Strahlung auf die proliferative Integrität getestet werden. Andererseits kann nach Zugabe von Piperin auch ein synergistischer Effekt auf die Strahlensensibilität untersucht werden.

Zur Auswertung des Koloniebildungstests ist die Berechnung der Plattiereffizienz (engl. Plating Efficiency, PE) sowie der Überlebensfraktion (engl. Surviving Fraction, SF) von Bedeutung. Die Plattiereffizienz erlaubt eine Aussage, über die Anzahl der Zellen, welche nach einer bestimmten Inkubationszeit in der Lage waren, eine Kolonie zu bilden und errechnet sich aus dem Quotienten der gezählten Kolonieanzahl durch die Anzahl der initial ausgesäten Zellen.

$$\mathbf{PE}\ [\%] = \frac{\mathbf{Kolonieanzahl}}{\mathbf{Anzahl\ ausgesäter\ Zellen}}\ \mathbf{x\ 100}$$

Ausgehend von der PE lässt sich für eine definierte Bestrahlungsdosis bzw. Wirkstoffkonzentration eine SF berechnen, indem die PE der jeweiligen Strahlendosis für eine bestimmte Wirkstoffkonzentration durch die Plattiereffizienz der Kontrolle (ohne Bestrahlung) dividiert wird.

$$\mathbf{SF} = \frac{\mathbf{PE\ mit\ Bestrahlung/Wirkstoff}}{\mathbf{PE\ ohne\ Bestrahlung/Wirkstoff}}$$

Folglich ergibt sich eine Überlebensfraktion der Kontrolle von 1. Nach halblogarithmischer Darstellung in einem Diagramm ergibt sich eine Zellüberlebenskurve, in der eine mögliche Dosis-Effekt-Beziehung ablesbar ist.

Die Durchführung des Koloniebildungstests erfolgte mit einer Zelldichte von 2 x 10^3 Zellen/T_{25}-Zellkulturflasche, sowohl für die T98G- als auch die FaDu-Zellen. Die Wirkung von Piperin wurde mit vier Endkonzentrationen getestet: 50 µM, 100 µM, 150 µM sowie 200 µM. Zudem erfolgte eine Kontrolle ohne Wirkstoff sowie eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO. Die Behandlung mit Piperin erfolgte 24 h nach der Zellaussaat. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mittels Linearbeschleuniger mit Dosen von 0 Gy (Kontrolle), 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy bestrahlt. Sieben Tage nach Versuchsbeginn wurde das Medium und der darin gelöste Wirkstoff entfernt und neues, wirkstofffreies Vollmedium hinzugefügt. Nach weiteren fünf Tagen Inkubationszeit erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen. Hierzu wurde das Medium verworfen und die Zellen anschließend mit 5 ml Ethanol (70 %) für 10 min fixiert. Das Ethanol wurde nach der Fixierung entfernt und es erfolgte die Färbung der Zellkolonien mit 1 %iger Kristallviolettlösung. Nach einer Inkubationszeit von etwa 30 min wurde die Kristallviolettlösung verworfen und die Zellkulturflaschen mit kaltem Leitungswasser gespült, um die Reste des Kristallvioletts zu entfernen. Die Zellkulturflaschen wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Zunächst wurde die Größe der Zellkolonien unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Es wurden nur Kolonien mit einer Größe von mindestens 50 Zellen gezählt. Die Zählung fand anschließend mit Hilfe der Lichtplatte statt.

2.6 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Assay

Mit Hilfe von Zellproliferationstests ist es möglich, das komplexe Geschehen des Zellwachstums direkt oder indirekt zu erfassen. Eine Möglichkeit stellt die bereits erwähnte Aufnahme von Wachstumskurven dar. Durch die Bestimmung der Zellzahlen in der Zellkultur lassen sich Rückschlüsse auf deren proliferative Kapazität ziehen. Anhand des BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin)-Assays besteht im Gegensatz dazu die Möglichkeit, die Proliferation direkt zu bestimmen. Hierbei wird der Einbau des nichtradioaktiven Thymidinanalogons BrdU in die sich replizierende genomische DNA untersucht, um deren Syntheserate während der S-Phase des Zellzyklus zu bestimmen.

Anschließend wurde der Einbau des BrdU mittels Enzymimmunoassay indirekt quantifiziert (Abb. 7). Das BrdU fungiert dabei als Antigen für einen primären Antikörper, welcher mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase oxidiert die chromogene Substanz 3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin (TMB), sodass diese bei einem Absorptionsmaximum von 370 nm blau erscheint.

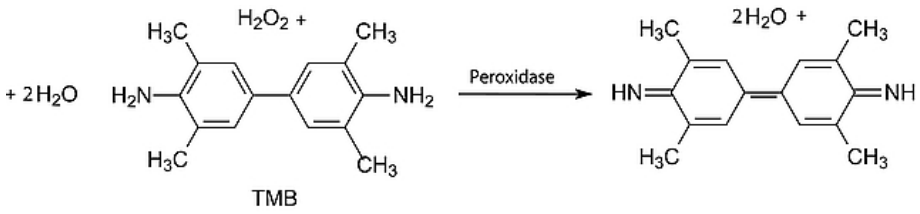

Abb. 7: Oxidation des Chromogens 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin durch die Peroxidase (Palladino et al., 2020).

Durch Zugabe von Schwefelsäure wird diese enzymkatalysierte Reaktion abgestoppt und die Lösung färbt sich gelblich, mit einem Absorptionsmaximum von 450 nm. Mittels Photometer kann die Absorption bestimmt werden, welche nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz direkt proportional zur Stoffmengenkonzentration ist.

Für die Versuchsdurchführung wurde eine 96er-Wellplatte verwendet. Pro Ansatz erfolgte eine Vierfachbestimmung. Je Well wurden 2 x 10^3 Zellen in 200 µl Medium eingesät. Diese wurden 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Wirkstoffzugabe, wobei die Wirkstoffkonzentrationen 0 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM und 200 µM verwendet wurden. Zudem erfolgte eine DMSO-Kontrolle. Insgesamt 46 h nach Zelleinsaat wurde die BrdU-Lösung (20 µl/Well) hinzugefügt. Nach 2 h erfolgte die Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger mit Dosen von 0 Gy (Kontrolle), 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy sowie 8 Gy. Die Messung der BrdU-Inkorporation erfolgte 24 h nach der Bestrahlung.

Für das weitere Vorgehen wurde sich nach den Angaben des Zellproliferationskits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) orientiert. Es folgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm am Photometer.

2.7 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels ɣ-H2AX-Assay

Der ɣ-H2AX-Test stellt eine Methode zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung dar.

Das Protein H2A kommt in eukaryontischen Zellkernen als Teil der Histone vor. H2AX stellt eine Variante des H2A dar. Zu 20 % wird das Histonprotein H2A durch H2AX ersetzt. Kommt es zu einer Beschädigung der DNA in Form eines Doppelstrangbruchs wird ein Serinrest in Position 139 durch Kinasen aus der Gruppe der Phosphoinositid-3-Kinasen phosphoryliert. Diese modifizierte Form des H2AX-Proteins wird als ɣ-H2AX bezeichnet und kann als Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche herangezogen werden. ɣ-H2AX und Reparaturproteine konzentrieren sich großzügig um die Bruchstelle und bilden einen Reparaturfokus (HERMANN et al., 2005).

Mithilfe der Immunfluoreszenz ist es möglich, diese Reparaturfoci sichtbar zu machen. Dazu bindet zunächst ein primärer Antikörper spezifisch an das ɣ-H2AX. Ein sekundärer Antikörper, welcher mit einem Fluorochrom markiert ist, ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet. Ein Fluoreszenzsignal entspricht genau einem DNA-Doppelstrangbruch bzw. dem dazugehörigen Reparaturfokus. Vorteil des Reparaturproteins ɣ-H2AX gegenüber anderen Vertretern wie z. B. RAD51 ist die Nachweisbarkeit in allen Zellzyklusphasen (SCHMITZ et al., 2018). Mittels einer Färbung mit 4´-6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist es möglich, die Zellkerne sichtbar zu machen, indem es an DNA-Abschnitte bindet, welche reich an den Basen Adenin und Thymin sind.

Für den Versuch wurden Objektträger mit vier Kammern verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte pro Ansatz als Duplikat. In jede Kammer wurden 2 x 10^4 Zellen ausgesät. Das Volumen der Zellsuspension je Kammer betrug 0,5 ml. Nach 24 h erfolgte die Wirkstoffzugabe von 100 µM sowie 200 µM Piperin. Zudem wurde erneut eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO angesetzt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger mit 6 Gy. Die Fixierung der Zellen fand 30 min bzw. 24 h nach der Bestrahlung statt. Dafür wurde im ersten Schritt das Medium abgegossen und anschließend die Kammern mit Hilfe eines Schiebers entfernt. Die abgelösten Objektträger wurden nun für 15-20 min in einer zuvor angesetzten Fixierlösung fixiert. Für die Fixierung wurde eine 2 %ige Formaldehydlösung mit PBS als Lösungsmittel angesetzt. Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Spülung mit PBS unter ständigem Schwenken der Hellendahl-Küvette auf dem Orbitalschüttler.

Nun erfolgt die Permeabilisierung der Kernmembran. Dazu wurde das Detergenz Triton® X-100 (Octoxinol-9) in einer 0,25 %ig verdünnten Lösung angesetzt. Zudem wurde der Permeabilisierungslösung 0,075 g Glycin hinzugefügt, welches zellprotektive Eigenschaften besitzt. Nach 15 min in der Permeabilisierungslösung wurden die Objektträger in die Blockierungslösung überführt. Diese diente dem Abblocken unspezifischer Bindungsstellen und bestand zu 2 % aus Ziegen-Serum, 1 % BSA (Bovines Serumalbumin) sowie 0,1 % Tween® 20 (Polysorbat 20). Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur in der Blockierungslösung betrug 1 h. Im Anschluss konnte der Primärantikörper (Mouse monoclonal to gamma H2A.X (Phospho S139)) aufgetragen werden.

Dazu wurde der Primärantikörper 1:500 in der Blockierungslösung verdünnt und 50 µl pro Objektträger pipettiert. Die Objektträger wurden dann für mindesten eine h in der feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Bevor der Sekundärantikörper aufgetragen wurde, erfolgte erneut ein zweimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min.

Für die nachfolgenden Schritte wurde im Dunkeln gearbeitet. Der Sekundärantikörper (Alexa Fluor 549 goat anti-mouse IgG) wurde 1:400 mit Blockierungslösung verdünnt und nach der Auftragung ebenfalls für 1 h in der feuchten Kammer auf den Zellen belassen. Im Anschluss wurden nicht gebundene Antikörper erneut jeweils 5 min mit PBS abgewaschen und die Objektträger vorsichtig abgetrocknet. Direkt vor dem Abdecken mit einem Deckgläschen wurden

2-3 Tropfen Vectashield® with DAPI aufgetragen. Anschließend erfolgte die Versiegelung der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack, um die Präparate vor dem Austrocknen zu schützen. Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und am folgenden Tag wurde mit der Auszählung begonnen.
Die Auszählung der gefärbten Zellpräparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Bei 1.000-facher Vergrößerung kamen mithilfe von Immersionsöl blau gefärbte Zellkerne mit rötlichen Foci zur Darstellung. Pro Ansatz wurden die Foci von insgesamt 50 Zellkernen ausgezählt. Anschließend wurde aus den Auszählungen der Duplikate der Mittelwert gebildet und als Ergebnis eines Versuchs gewertet. Insgesamt wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt.

2.8 Untersuchung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction, PCR) ist es möglich, geringste DNA-Mengen exponentiell zu amplifizieren und so einer Analyse zugänglich zu machen. Prinzip der Methode stellt eine zyklische Wiederholung der Replikation eines DNA-Fragments dar.
Die Zellaussaat erfolgte in T_{25}-Zellkulturflaschen, wobei pro Flasche 3 x 10^5 Zellen in einem Endvolumen von 5 ml ausgesät wurden. Es folgte eine 24-stündige Inkubationszeit unter Standardbedingungen. Analog zu den anderen Methoden wurde das Piperin nach 24 h in einer Konzentration von 100 µM sowie 200 µM hinzugefügt. Zudem erfolgte erneut eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO. Durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflaschen wurde die Wirkstofflösung im Medium verteilt. Nach einem weiteren Tag Inkubationszeit erfolgte die Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger mit den Bestrahlungsdosen 2 Gy und 6 Gy. Zudem wurden auch die scheinbestrahlten Ansätze (0 Gy) mit in den Bestrahlungsraum geführt. 24 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt fand die RNA-Isolierung statt.

2.8.1 Isolierung der RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA der vorbereiteten Zellen wurde zunächst vorgegangen wie bei der Subkultivierung der Zellen (siehe Kap. 2.1.4). Nach der Trypsinierung der Zellen sowie einer Zentrifugation erfolgte eine elektronische Zellzahlbestimmung für jeden Ansatz. Anschließend wurden die Ansätze ein weiteres Mal für 5 min mit 24 x g zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und das Zellsediment in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße wurden vor der nächsten Zentrifugation (5 min mit 11.000 x g bei 4 °C) auf Eis gelagert. Der nach der Zentrifugation entstandene Überstand wurde abgenommen.

Die nun folgende RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®-Kits, wobei die nötigen Arbeitsschritte entsprechend der Herstellerangaben (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) durchgeführt wurden.
Nun konnte die im Folgenden beschriebene RNA-Gehaltsmessung erfolgen. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -20 °C respektive für eine längere Lagerung bei -70 °C.

2.8.2 RNA-Konzentrationsmessung mittels Biophotometer

Nach der Isolation der RNA wurde deren Konzentration in den Proben sowie der Reinheitsgehalt der RNA-Lösungen bestimmt. Dazu wurde zunächst eine 1:10-Verdünnung der Proben erstellt, indem ein Aliquot von 2 µL aus den Proben entnommen wurde und dieses in 18 µL nukleasefreien Wasser resuspendiert wurde. Die eigentliche Messung erfolgte mit Hilfe eines NanoDrop-Spektralphotometers (BioPhotometer® von Eppendorf).
Zunächst wurde eine Blank-Messung mit 4 µL RNase-freiem Wasser durchgeführt. Die Messungen der Proben pro Ansatz als Vierfachbestimmung mit jeweils 4 µL der Probenverdünnungslösung, wobei im Anschluss für die Konzentrationsbestimmung ein Mittelwert aus den vier Messungen gebildet wurde. Die Ermittlung der Konzentration erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Daraus konnte dann die Konzentration bestimmt werden:

$$\mathbf{c = OD_{260} \times V \times F}$$

c = Konzentration in µg/ml
OD_{260} = Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
V = Verdünnungsfaktor
F = Multiplikationsfaktor (40 für RNA → OD_{260} von 1 entspricht 40 µg/ml)

Die Konzentration wurde automatisch ermittelt. Daneben konnte auch der Reinheitsgehalt der Probenlösung bestimmt werden. Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} war eine Aussage über die Proteinkontamination möglich. Ein Wert von 2,0 entspricht einem hohen Reinheitsgrad. Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{230} waren Rückschlüsse auf Verunreinigung mit Kohlenhydraten oder Salzen möglich.

2.8.3 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Die Abkürzung cDNA steht für complementary DNA. Die reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, ist in der Lage, aus RNA als Vorlage DNA zu synthetisieren. Die einzelnen RNA-Proben sowie die Komponenten des für die cDNA-Synthese benötigten Kits wurden auf Eis aufgetaut.
Für die folgende cDNA-Synthese sollte ein RNA-Gehalt zwischen 0,1 ng und 5 µg je Ansatz vorliegen. Proben mit einem höheren RNA-Gehalt wurden mit nukleasenfreien Wasser verdünnt, sodass letztlich für jeden Ansatz die gleiche RNA-Menge in cDNA umgeschrieben wurde. Von diesen Proben wurde ein Aliquot von 4 µL entnommen und zusammen mit 7 µL RNase-freien Wasser und 1 µL Oligo-dT-Primer in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, sodass ein Endvolumen von 12 µL entstand. Alle Komponenten wurden durch vorsichtiges Invertieren und Zentrifugieren vermischt. Anschließend wurden die 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 65°C für 5 min in einem Thermomixer inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA).
Es folgte eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der cDNA mittels Nanodrop-BioPhotometer, wobei pro Ansatz erneut eine Vierfachbestimmung erfolgte (siehe Abschnitt 2.8.2). So konnte zudem auch der der Reinheitsgrad der Proben ermittelt werden. Die cDNA-Proben wurden im Anschluss bei -70 °C gelagert.

2.8.4 Amplifikation und Quantifizierung der cDNA mittels Real Time PCR

Zur Vorbereitung der Real-Time PCR wurde ein Mastermix angesetzt. Dieser bestand für eine Einzelreaktion aus 5 µl RNase-freiem Wasser, 1 µl des entsprechenden Primers sowie 10 µl des TaqMan® Gene Expression Master Mix, welcher u.a. die DNA-Polymerase enthält. Die Primer wurden für die Gene von *CDKN1B* ($p27^{Kip1}$), *RB1* sowie der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), einem Enzym der Glykolyse, als sog. Housekeeping-Gen gewählt. Das Housekeeping-Gen diente als externer Standard, dieses Gen mit kleinen Schwankungen relativ konstant exprimiert wird, sodass die Expression der zu untersuchenden Gene *CDKN1B* und *RB1* mit dem Standard verglichen werden konnte.
Von dem Mastermix wurden pro Well 16 µl pipettiert und die 96er-Mikrotiterplatte auf Eis gelagert. Aus den auf Eis aufgetauten cDNA-Proben wurde für jeden Ansatz eine 1:5-Verdünnung angesetzt, wobei in jeder Probe 1000 ng (in 4 µl Volumen) cDNA enthalten waren. 4 µl der verdünnten Probe wurden dem vorgelegten Mastermix hinzugefügt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µL pro Well ergab. Die Untersuchung je Ansatz und Primer erfolgte als Duplikat. Zudem erfolgten pro Primer jeweils zwei Negativkontrollen mit RNase-freiem Wasser.

Der Mikrotiterplatte wurde im Anschluss mit einer Schutzfolie versiegelt und bei 24 x g für 1 Minute zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die PCR mit dem QuantStudio3 PCR-System für 1,5 h.
Zur Messung der amplifizierten Gene werden Fluoreszenzsignale genutzt. Dazu sind die jeweiligen Primer mit zwei Fluorochromen gekoppelt. Eines dieser Fluorochrome ist 6-FAM-phosphoramidit, ein Derivat des 6-Carboxyfluorescein (FAM), und dient als sog. Reporter Es ist kovalent an der 5´-Ende des Primer-Oligonukleotids gebunden. Der Reporter-Farbstoff ist zur Fluoreszenz befähigt. Am 3´-Ende der Primer-Sonde ist ein sog. Quencher-Farbstoff gebunden, welcher nicht-fluoreszierend ist (NFQ = non-fluorescent quencher). Durch die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter auf dem Primer-Oligonukleotid wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher unterdrückt, da das Emissionsspektrum des Reporters dem Anregungsspektrum des Quenchers entspricht. Neben der Polymeraseaktivität besitzt die DNA-Polymerase zudem eine 5´Exonukleaseaktivität. Wird nun der Reporter im Zuge der Amplifikation der DNA freigesetzt, wird dieser räumlich vom Quencher getrennt, sodass nun bei einem bestimmten Anregungsspektrum das Fluoreszenzsignal des Reporters gemessen werden kann. Mit steigender DNA-Synthese steigt auch die Anzahl freigesetzter Reporter-Moleküle und somit auch die Signalstärke, welche detektiert werden kann. Dieses Zusammenspiel zweier Fluorochrome wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet.
Durch Messung der Fluoreszenzsignale können Amplifikationskurven durch das PCR-System berechnet und grafisch dargestellt werden. Die Reportersignale werden dazu auf ein Fluoreszenzsignal eines passiven Referenzfarbstoffs, welcher dem TaqMan® Gene Expression Master Mix beigefügt war, normalisiert. Werden diese Werte für die Anzahl der PCR-Zyklen dargestellt, erhält man Amplifikationskurven. Der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit einem zuvor festgelegten Schwellenwert wird als Ct-Wert bezeichnet. Ct steht für „cycle threshold“ und stellt ein relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der PCR-Reaktion dar (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2016).
Im Folgenden wurde ein ΔC_T-Wert aus dem C_T-Wert des zu untersuchenden Zielgens (*CDKN1B* bzw. *RB1*) und dem C_T-Wert des Haushaltsgens (*GAPDH*) der jeweils gleichen Probe gebildet, sodass Rückschlüsse hinsichtlich einer verminderten respektive verstärkten Expression des Zielgens gezogen werden konnten.

2.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung der erhaltenen Messdaten sowie deren grafische Darstellung erfolgte mit Microsoft® Excel 2019. Die Überlebenskurven aus den Koloniebildungstests wurden mit Hilfe des Programms OriginPro® 2021 der Firma OriginLab Corporation erstellt. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit dem zweiseitigen Student´s t-Test. Auf eine Adjustierung für multiples

Testen wurde verzichtet, da alle Versuche einzeln durchgeführt wurden und somit unabhängig voneinander betrachtet wurden.
Die Wachstumsversuche wurden für jede Konzentration jeweils als Triplikat durchgeführt. Die Untersuchungen des klonogenen Überlebens, der Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels ɣ-H2AX sowie des Genexpressionsverhaltens erfolgten als Duplikate. Die Messung der Proliferation mittels BrdU-Inkorporation wurde als Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse jeder Methode wurden aus jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

2.10 Materialien und Geräte

Chemikalien:	**Hersteller, Ort:**
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Walkersville (USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Nichtessenzielle Aminosäuren (NEA)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Phosphate buffered Saline (PBS)	PAN BioTech, Aidenbach
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,25 %)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Casyton®-Lösung (Isotone Lösung)	Omni Life Science GmbH & Co.KG, Bremen
Piperin (> 97 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (70 %), vergällt	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Ethanol (96 %), vergällt	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Kristallviolett	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
H_2SO_4 (1 mol/l)	Morphisto GmbH, Offenbach
Aqua bidest	SG Reinstwasser-System, Hamburg
Formaldehyd (37 %)	Merck KG, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG, Darmstadt
Natriumchlorid	Avantor Performance Materials, Gliwice
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KG, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KG, Darmstadt

BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA, Pasching (Österreich)
Goat Serum	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Vectashield® with DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TaqMan® Gene Expression Master Mix	
RNase Away®	Fisher Scientific, Waltham (USA)

Testkits:	**Hersteller, Ort:**
NucleoSpin® RNA Isolation	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
BrdU-Testkit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Verbrauchsmaterialien:	**Hersteller, Ort:**
Falconröhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T_{75}-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T_{25}-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen bis 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pasteurpipetten 5 ml- 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
24er-Multiwellplatte	Techno Plastic Products AG, Tarsadingen
96er-Wellplatte	Techno Plastic Products AG, Tarsadingen
Kaiser prolite basic Leuchtplatte	Kaiser Fototechnik, Buchen
Eppendorf Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
4-Kammer-Objektträger	Lab-Tek, Rochester, NY
Glas-Deckgläser 24 mm x 60 mm	Menzel GmbH, Braunschweig

Geräte:	**Hersteller, Ort:**
Begasungsbrutschrank	Binder, Tuttlingen
Sicherheitswerkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Casy®-Zellzählgerät	Omni Life Science GmbH &Co.KG, Bremen
Laborzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Phasenkontrast-Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel
Vortex-Genie 2	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen

ELISA-Reader	Anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe
Plattformschüttler	Edmund Bühler GmbH, Tübingen/Hechingen
Orbitalschüttler	Stuart, Staffordshire (UK)
Multichannel-Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Kaiser Prolite Basic Leuchtplatte	Kaiser Fototechnik, Buchen
Eppendorf Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroliterzentrifuge 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Minizentrifuge	Peqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen
BioPhotometer®	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
DNA/RNA UVT-B-AR Reinigungsbox	Biosan, Riga
Vortex-Schüttler	Scientific Industries, Inc., New York
Laborabzug	Köttermann GmbH, Uetze
Label Guard Messzelle für Photometer	Implen GmbH, München
Quantstudio3® PCR-System	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum

Wachstumskurven können zur Untersuchung des individuellen Wachstumsverhaltens von Zellkulturen *in vitro* herangezogen werden. Nach grafischer Darstellung der Zellzahlen war es ebenfalls möglich, die Populationsverdopplungszeit zu berechnen.

3.1.1 Wachstum der T98G-Zellen

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der T98G-Zellen erfolgte einerseits nativ sowie unter der Beeinflussung des Wirkstoffs Piperin in 6 unterschiedlichen Konzentrationen. Zusätzlich wurde das Wachstum unter Zugabe des Lösungsmittels DMSO ermittelt, um dessen Effekte auf die Wachstumskinetik auszuschließen. Die Ergebnisse für die vitalen Zellen sind in der folgenden Abb. 8 dargestellt.

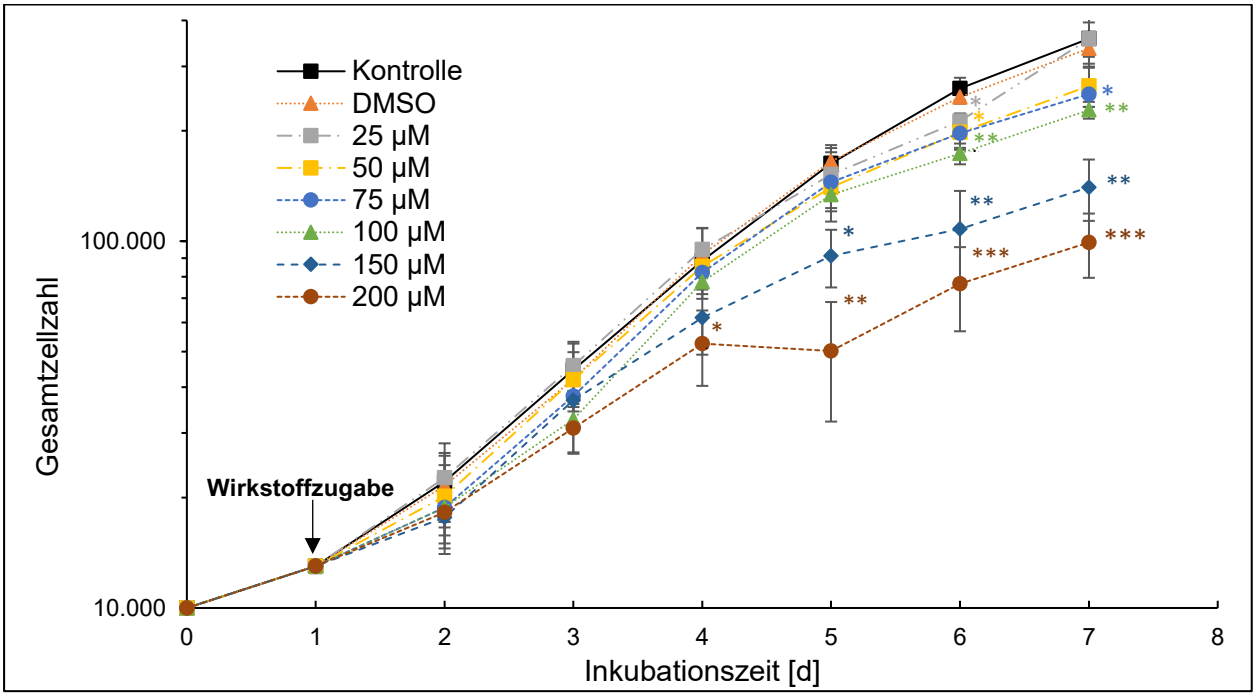

Abb. 8: Wachstum der T98G-Zellen nativ sowie unter Einfluss von Piperin. Dargestellt sind MW ± SD (n=3); * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01, *** = p ≤ 0,001 bezogen auf die Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt.

Zunächst soll das Wachstum der T98G-Zellen ohne den Einfluss des Piperins beschrieben werden. Aus der Abb. 8 ist zu erkennen, dass die lag-Phase der nativen Wachstumskurve nach ungefähr 24 h beendet war. Die Zellen haben sich an das veränderte Milieu adaptiert und adhärierten am Boden des Wells, womit die Bedingungen für den Übergang in die Phase des exponentiellen Wachstums gegeben waren. Diese hielt ca. vier Tage an. Nach insgesamt fünf Tagen begann sich andeutungsweise die Plateauphase einzustellen, wobei eine klassische Plateauphase nach einer Inkubation von 7 Tagen nicht erreicht werden konnte. In der exponentiellen Phase (Tag 1-5) ergab sich rechnerisch eine Populationsverdopplungszeit von 26,3 h ± 0,8 h.

Im Folgenden soll das Wachstum der T98G-Zellen unter dem Einfluss der unterschiedlichen Piperinkonzentrationen beschrieben werden. Ein wachstumshemmender Effekt durch das Lösungsmittel DMSO konnte ausgeschlossen werden. Eine klassische Plateauphase stellte sich nach 7 Tagen auch unter Einfluss von Piperin nicht ein.

Bereits einen Tag nach Zugabe des Piperins war bei den höheren Wirkstoffkonzentration (ab 100 µM) ein Effekt auf das Wachstumsverhalten erkennbar (Abb. 8). Diese Wachstumshemmung nahm mit zunehmender Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrollpopulation zu. Eine Dosis von 200 µM führte bereits ab dem 4. Tag zu einer signifikanten Inhibition ($p \leq 0,05$). Dieses Ergebnis konnte für 150 µM ebenfalls am 5. Tag erreicht werden. Am 6. Tag ergab sich für alle Piperinkonzentrationen ab 25 µM eine signifikante Wachstumshemmung ($p \leq 0,05$ für 25 µM – 75 µM, $p \leq 0,01$ für 100 µM und 150 µM, $p \leq 0,001$ für 200 µM). Am Tag 7 lag der Anteil der Zellzahl im 100 µM-Ansatz im Verhältnis zur Kontrolle (100 %) bei ca. 64 %, bei 150 µM betrug der Anteil 39 % und bei einer Konzentration von 200 µM waren es lediglich 28 %.

Es erfolgte die Berechnung der täglichen Populationsverdopplungszeiten in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungszeiten der T98G-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Piperinkonzentrationen; Mittelwerte aus n=3; n.b.= nicht bestimmbar.

Zellpopulationsverdopplungszeiten [h]								
	Kontrolle	**DMSO (0,1 %)**	**25 µM**	**50 µM**	**75 µM**	**100 µM**	**150 µM**	**200 µM**
0. - 1.Tag	63,5	63,5	63,5	63,5	63,5	63,5	63,5	63,5
1. - 2.Tag	31,3	33,0	30,0	38,0	45,0	45,1	54,5	49,1
2. - 3.Tag	23,7	24,8	23,6	22,7	23,8	30,1	22,6	31,5
3. - 4.Tag	24,3	21,3	22,8	23,4	21,4	19,3	32,1	31,4
4. - 5.Tag	27,2	28,5	35,4	33,5	29,3	30,5	42,9	*-374,2*
5. - 6.Tag	35,4	41,1	49,6	48,0	54,0	64,2	98,3	39,5
6. - 7.Tag	53,2	54,5	32,2	57,5	67,8	60,8	63,4	64,2
MW (Tag 1-7)	32,5	33,9	32,3	37,2	40,2	41,7	52,3	n.b.

Es zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wachstumsverzögerung. Dies verdeutlichte auch die Berechnung der mittleren Populationsverdopplungszeit (Tag 1-7) für die jeweiligen Ansätze. Diese betrug ohne die Zugabe des Wirkstoffs 32,5 h und verlängerte sich unter dem Einfluss von 50 µM Piperin auf 37,5 h. Nach Zugabe von 75 µM Piperin betrug die mittlere Populationsverdopplungszeit 40,2 h und in den 150 µM-Ansätzen wurde diese bereits um nahezu 20 h verlängert (auf 52,3 h). Bei höheren Piperinkonzentrationen zeigten sich jedoch Schwankungen in der Zellzahl zwischen den einzelnen Versuchen, welche auch an den erhöhten Standardabweichungen ab einer Konzentration von 150 µM zu erkennen waren. So war z.B. ein Abfall der Zellzahl am Tag 4 unter dem Einfluss von 200 µM Piperin zu beobachten, weshalb eine negative Populationsverdopplungszeit berechnet wurde (siehe Tab. 2 kursiv geschrieben). Aus diesem Grund konnte für die 200 µM-Ansätze keine mittlere Populationsverdopplungszeit berechnet werden.

In der Tab. 3 sind die berechneten IC_{50}-Werte ab einer Inkubationszeit des Piperins von 96 h dargestellt. Eine Berechnung der Werte zu einem früheren Zeitpunkt war nicht möglich, da die ermittelten Zellzahlen in keinem behandelten Ansatz weniger als 50 % im Vergleich zur Kontrolle lagen.

Tab. 3: Berechnete IC_{50}-Werte des Piperins für die Zelllinie T98G.

Inkubationszeit nach Zugabe des Wirkstoffs [h]	IC_{50}-Wert [µM]
96	166
120	136
144	133

Nach 96 h lag der IC_{50}-Wert bei 166 µM Piperin. Bereits zwei Tage später konnte dieser Wert um 33 µM reduziert werden und konnte mit 133 µM ermittelt werden, was erneut die zeitabhängige Wirkung des Piperins bestätigte.

In Abb. 9 kommt die Anzahl der toten Zellen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration und der Inkubationszeit zur Darstellung.

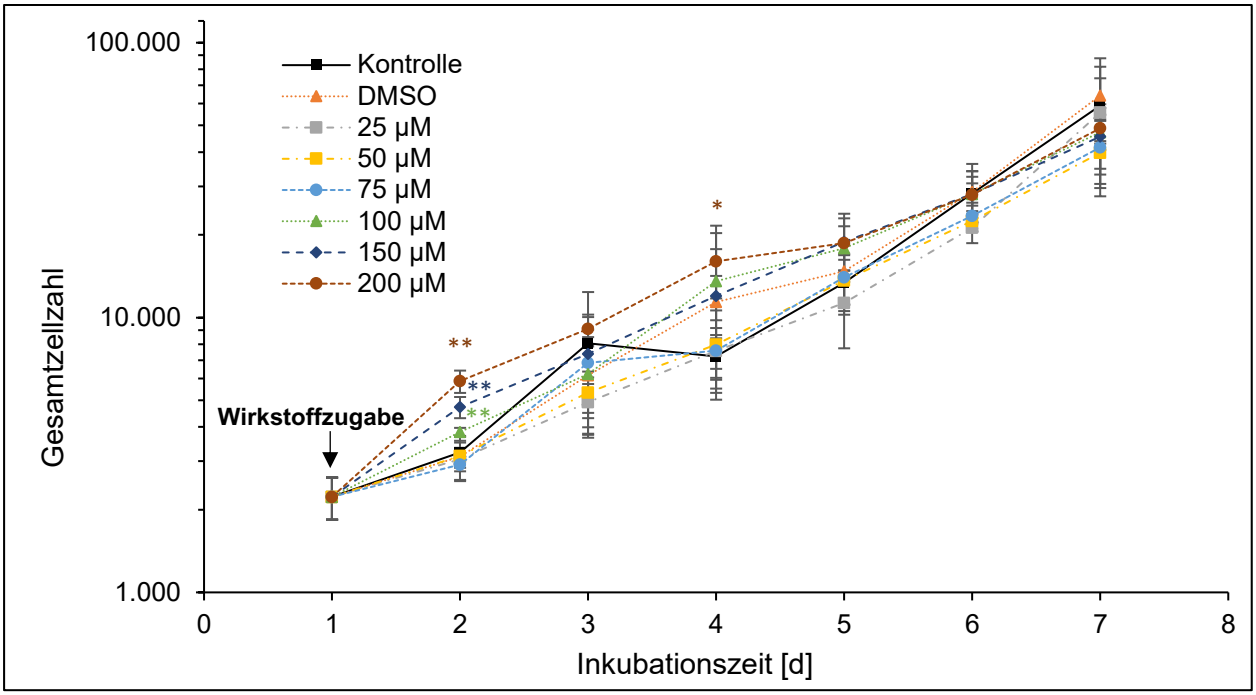

Abb. 9: Anzahl toter T98G-Zellen unter Einfluss von Piperin und der Inkubationszeit. Dargestellt sind MW ± SD (n=3), bezogen auf die Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. ** = p ≤ 0,01 bezogen auf die unbehandelte Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt.

Es fiel ein insbesondere anfänglich dominierender zytotoxischer Effekt des Piperins ab einer Konzentration von 100 µM auf. Dieser Effekt relativierte sich jedoch mit fortschreitender Inkubationszeit. Aufgrund der steigenden Zellzahl in den Kontrollpopulationen bzw. den Zellpopulationen, welche mit niedrigen Piperinkonzentrationen behandelt wurden, kam es zu einem zunehmenden Nährstoffverbrauch innerhalb des Mediums sowie einer fortschreitenden Konfluenz der Zellen. Diese Faktoren trugen zum deutlichen Anstieg der abgestorbenen Zellen, insbesondere in der Kontrollpopulation bei (siehe Abb. 9). Am Tag 7 zeigten sich dann lediglich geringfüge Unterschiede zwischen dem zytotoxischen Effekten des Piperins sowie durch den Nährstoffverbrauch bei zunehmender Zelldichte.

3.1.2 Wachstum der FaDu-Zellen

Die Beurteilung des Wachstumsverhaltens der FaDu-Zellen erfolgte analog zu der der T98G-Zellen. Auch hier wurde neben dem nativen Wachstum ohne Wirkstoff die Wachstumskinetik unter den sechs verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen 25 µM bis 200 µM sowie unter dem Einfluss des Lösungsmittels DMSO untersucht (siehe Abb. 10).

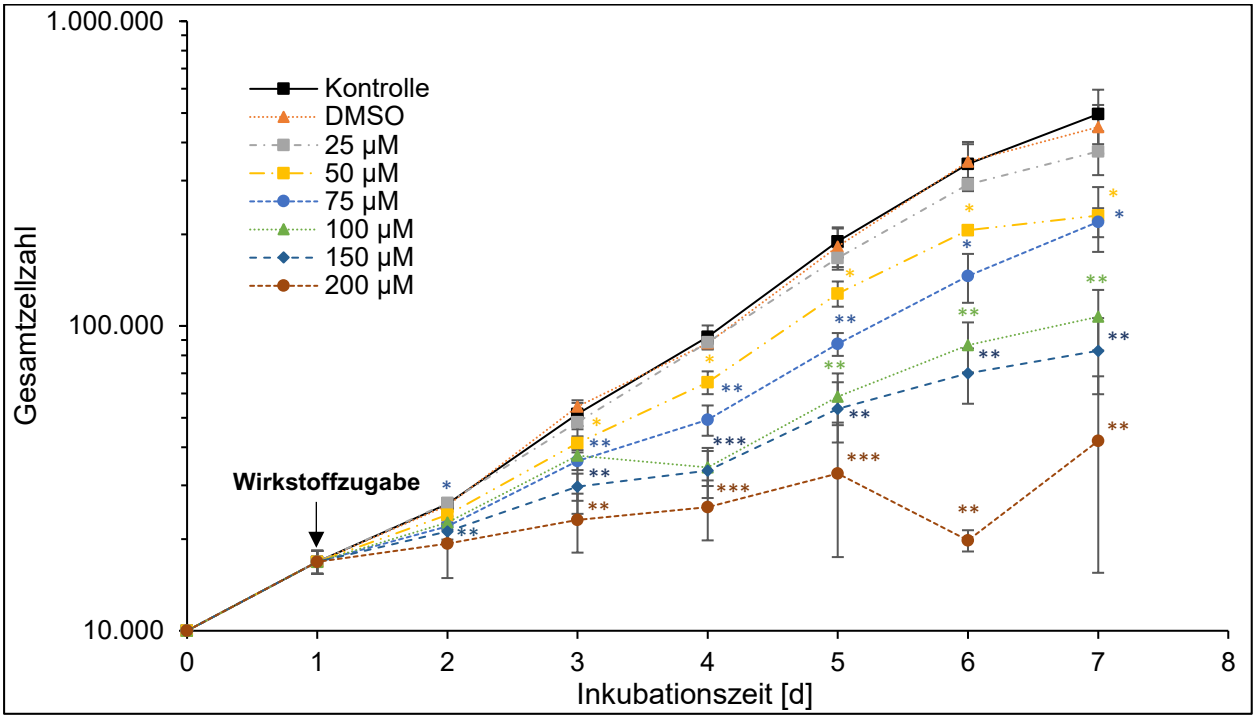

Abb. 10: Wachstum der vitalen FaDu-Zellen nativ sowie unter dem Einfluss von Piperin. Dargestellt sind MW ± SD (n=3); * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01, *** = p ≤ 0,001 bezogen auf die Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich ist, konnte bei der Untersuchung des nativen Wachstumsverhaltens der FaDu-Zellen keine lag-Phase beobachtet werden. Direkt nach der Einsaat begannen die Zellen in die log-Phase überzugehen. Eine eindeutige Plateauphase nach einem Beobachtungszeitraum von 7 Tagen war auch hier nicht erkennbar. Im Mittel (Tag 1-7) konnte für die Kontrolle eine Populationsverdopplungszeit von 31,1 h ± 1,1 h berechnet werden. Das Lösungsmittel DMSO zeigte keine relevante Wirkung auf das Wachstum der FaDu-Zellen. Eine Stagnation des Wachstums wurde auch hier in keinem Ansatz erreicht, jedoch ist bei einer Konzentrationen von 50 µM der Beginn einer Plateauphase deutlich zu erkennen.

Eine signifikante wachstumshemmende Wirkung des Piperins begann bereits 24 h nach Zugabe des Wirkstoffs in den Konzentrationen von 75 µM ($p \leq 0,01$) sowie 150 µM ($p \leq 0,05$). Am Tag 3 zeigte sich auch unter 50 µM ein signifikanter Einfluss ($p \leq 0,05$). 25 µM Piperin hatten über den gesamten Zeitraum der Wachstumsbeobachtung keinen signifikanten Einfluss hinsichtlich einer Wachstumsinhibition.

Im Vergleich zur Kontrolle lag der Anteil an vitalen Zellen am Tag 7 unter einer Konzentration von 50 µM bei ca. 46,5 %. 150 µM Piperin führten am 7. Tag zu einer Reduktion der vitalen Zellen um 83,5 % (der Anteil vitaler Zellen betrug 16,5 % im Vergleich zur Kontrolle mit 100 %).
Zudem kam es, analog zu den T98G-Zellen, unter den höheren Wirkstoffkonzentrationen zu teilweise stark schwankenden Zellzahlen innerhalb der einzelnen Versuche, was die hohe Standardabweichung erklärt.
Anhand der erhobenen Daten konnten die täglichen Zellpopulationsverdopplungszeiten für die jeweiligen Ansätze ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in der Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungszeiten der FaDu-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Piperinkonzentrationen. Mittelwerte aus n=3. n.b.= nicht bestimmbar.

Zellpopulationsverdopplungszeiten [h]								
	Kontrolle	**DMSO (0,1 %)**	**25 µM**	**50 µM**	**75 µM**	**100 µM**	**150 µM**	**200 µM**
0. - 1.Tag	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0
1. - 2.Tag	38,0	39,0	37,3	46,9	62,0	56,1	72,0	121,2
2. - 3.Tag	24,5	22,3	27,3	30,6	33,7	32,8	49,2	92,5
3. - 4.Tag	28,6	34,8	27,5	36,3	53,4	*-186,7*	138,3	171,4
4. - 5.Tag	23,1	22,7	26,1	24,8	29,1	31,2	35,7	65,5
5. - 6.Tag	28,4	26,0	29,9	34,7	32,4	42,6	61,6	*-32,9*
6. - 7.Tag	44,2	63,7	66,9	151,6	40,6	77,9	98,1	22,1
MW (Tag 1-7)	31,1	34,8	35,8	54,2	41,9	n.b.	75,8	n.b.

Im Mittel kam es bereits ab einer Piperinkonzentration von 50 µM zu einer deutlichen Verlängerung der Populationsverdopplungszeit um 23,1 h (auf 54,2 h) gegenüber der Kontrolle (32,0 h). Somit kam es im Vergleich zu den T98G-Zellen bereits bei einer geringeren Wirkstoffkonzentration zu einer Wachstumsverzögerung. Schwankungen der Zellzahlen innerhalb der einzelnen Versuche verursachten ab einer Piperindosis von 100 µM teilweise negative Populationsverdopplungszeiten, da ein Abfall der Zellzahlen innerhalb der jeweiligen Ansätze zu beobachten war, so dass in den 100 µM- und 200 µM-Ansätzen keine mittlere Populationsverdopplungszeit berechnet werden konnte.

Ferner wurden erneut die IC_{50}-Werte berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Berechnete IC_{50}-Werte des Piperins für die Zelllinie FaDu.

Inkubationszeit nach Zugabe des Wirkstoffs [h]	IC_{50}-Wert [µM]
48	176
72	112
96	95
120	83
144	74

Wie der Tab. 5 zu entnehmen ist, kam es mit zunehmender Inkubationszeit nach Zugabe des Piperins zu einer Reduktion des IC_{50}-Wertes. So konnte nach einer 48-stündigen Inkubationszeit ein IC_{50}-Wert von 176 µM ermittelt werden. Dieser verringerte sich nach einer kumulativen Inkubationszeit von 120 h auf weniger als die Hälfte (83 µM) und nach 140 h konnte ein IC_{50}-Wert von 74 µM berechnet werden. Ein Vergleich mit den zuvor betrachteten T98G-Zellen zeigt hier somit ein Ansprechen der FaDu-Zellen bereits bei niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen des Piperins.

In der Abb. 11 sind die Anzahlen toter Zellen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Piperinkonzentrationen graphisch dargestellt.

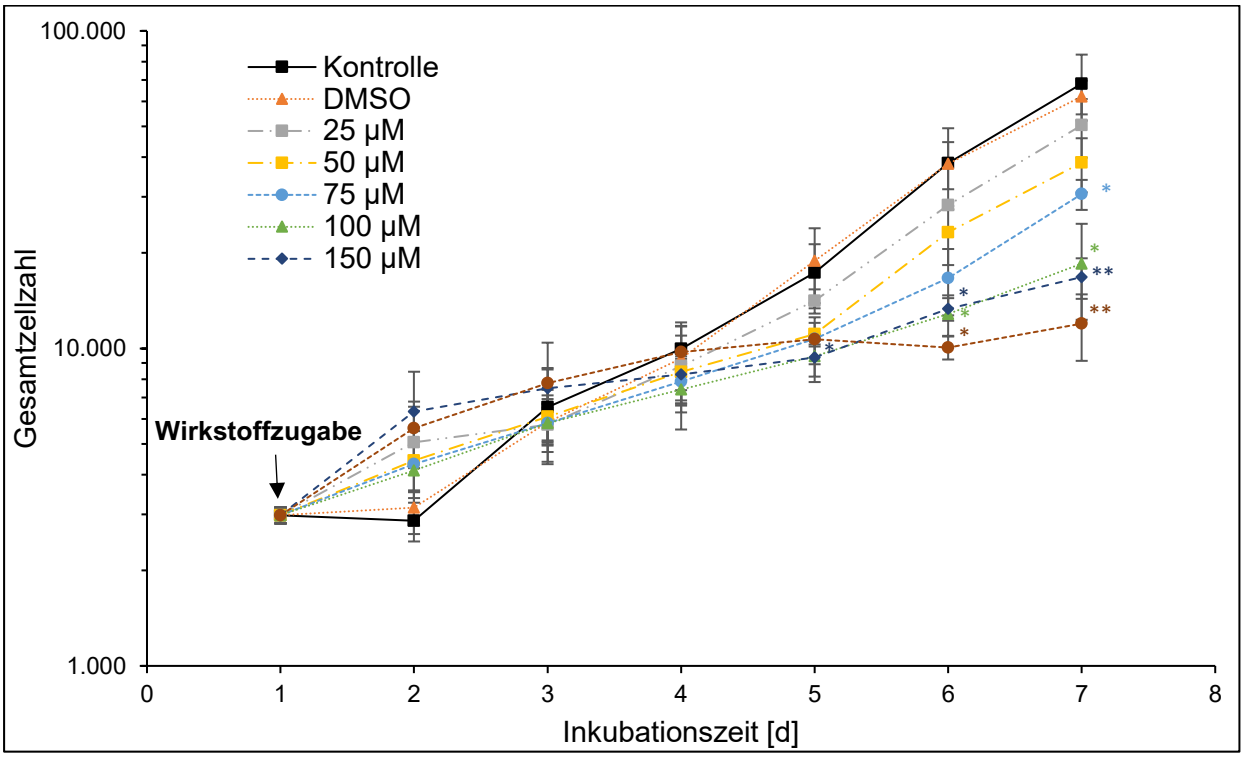

Abb. 11: Anzahl toter FaDu-Zellen unter dem Einfluss von Piperin. Dargestellt sind MW ± SD (n=3).

* = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01 bezogen auf die Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt.

Analog zu den T98G-Zellen ließ sich auch bei den FaDu-Zellen dosisabhängig initial nach Zugabe des Wirkstoffs eine deutliche Zunahme der Anzahl an toten Zellen beobachten (siehe Abb. 11). Die Differenz zwischen den behandelten Ansätzen und der Kontrolle bzw. der DMSO-Kontrolle fällt insbesondere einen Tag nach Piperin-Zugabe auf. In der Abb. 11 ist zudem zu erkennen, dass das DMSO keine relevante Zytotoxizität auf die FaDu-Zellen erkennen ließ. Am Tag 3 der Inkubationszeit waren hinsichtlich der Anzahl toter Zellen keine wesentlichen Differenzen in den einzelnen Ansätzen zu erkennen. Aufgrund des rasanten Zellwachstums in der exponentiellen Phase nahm der Anteil der toten Zellen in der Kontroll- bzw. DMSO-Population deutlich ausgeprägter zu, als in den Zellpopulationen, welche mit Piperin behandelt wurden. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls in den Ansätzen, welche mit einer geringen Piperindosis (bis 50 µM) behandelt wurden, gemacht werden. Dies lässt sich am ehesten, wie bei den T98G-Zellen, auf einen Nährstoffverbrauch im Medium sowie der Ansammlung zytotoxischer Stoffwechselmetabolite zurückführen.

3.2 Klonogenes Überleben

Der Koloniebildungstest gilt als eine Art Goldstandardmethode zur Bestimmung des klonogenen Überlebens einer Zellpopulation. Mithilfe dieser Methode war es möglich, einerseits die Wirkung ionisierender Strahlung allein, andererseits die Wirkung des Piperins in Kombination mit der Bestrahlung auf die Zellkulturen zu untersuchen.

3.2.1 Einfluss des Piperins auf das klonogene Überleben der T98G-Zellen

Der Koloniebildungstest wurde für die T98G-Zellen mit den Piperinkonzentrationen von 50 µM, 100 µM, 150 µM sowie 200 µM durchgeführt.
Auffallend war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 12A) eine deutlich veränderte Morphologie der Kolonien im 150 µM Piperin-Ansatz ohne den Einfluss ionisierender Strahlung (Abb. 12B).

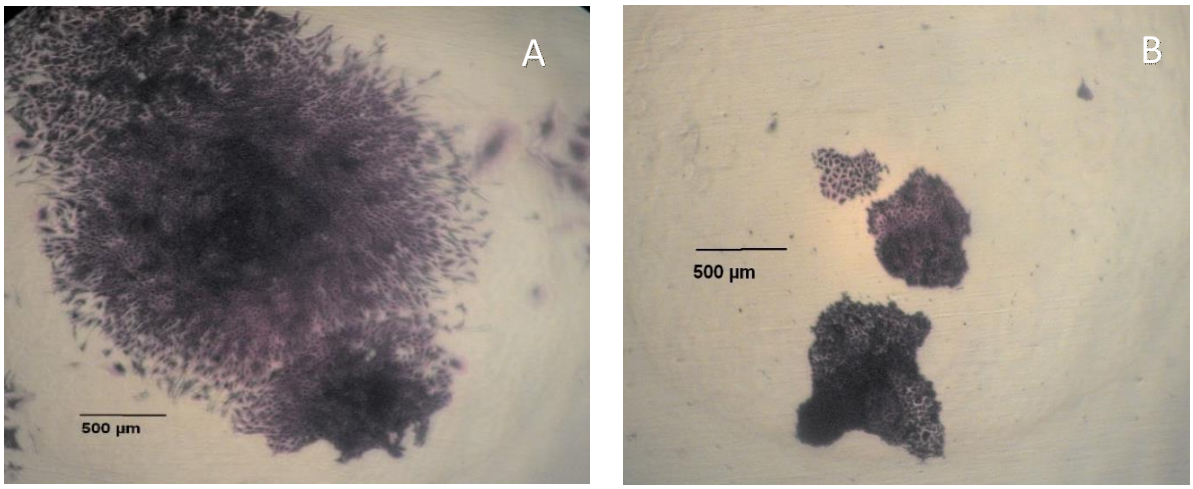

Abb. 12: Mikroskopische Darstellung der Koloniemorphologie der T98G-Zellen (A) ohne Zugabe von Piperin sowie (B) unter Einfluss von 150 µM Piperin, jeweils ohne Bestrahlung. 40-fache Vergrößerung.

Wie aus den Bildern der Abb. 12 A und B ersichtlich wird, hatten die Zellen nach der alleinigen Zugabe des Piperins ihre fibroblastenähnliche Gestalt verloren und zumeist ein eher polygonales Aussehen. Die Kolonien wirkten weit weniger ausladend und kompakter. Dieser Effekt nahm mit steigender Wirkstoffdosis deutlich zu.

Anhand der ausgezählten Kolonien konnten die Plattiereffizienzen berechnet werden, welche in der Tab. 6 dargestellt sind.

Tab. 6: Plattiereffizienzen in % der T98G-Zellen unter dem Einfluss ionisierender Strahlung sowie Piperin in unterschiedlichen Konzentrationen bei einer Einsaatdichte von 2 x 10^3 Zellen. Dargestellt sind MW ± SD (Kontrolle: n=7; DMSO-Kontrolle, 50 µM, 100 µM: n=3; 150 µM, 200 µM: n=4). In Klammern sind die p-Werte dargestellt (bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen Bestrahlungsdosis).

Bestrahlungs-dosis [Gy]	**Plattiereffizienzen [%] (p-Werte)**					
	Kontrolle	**DMSO (0,1 %)**	**50 µM Piperin**	**100 µM Piperin**	**150 µM Piperin**	**200 µM Piperin**
0	6,9 ± 1,3	6,2 ± 0,9 (0,47)	5,2 ± 0,4 (0,1)	3,2 ± 0,1 **(0,003)**	1,3 ± 0,8 **(≤ 0,001)**	0,7 ± 0,5 **(≤ 0,001)**
2	4,6 ± 0,9	4,7 ± 0,4 (0,78)	3,8 ± 0,4 (0,25)	4,4 ± 0,04 **(0,003)**	0,6 ± 0,4 **(≤ 0,001)**	0,4 ± 0,2 **(≤ 0,001)**
4	2,7 ± 0,9	2,6 ± 0,2 (0,91)	2,0 ± 0,1 (0,4)	3,1 ± 0,03 (0,12)	0,2 ± 0,1 **(0,003)**	0,1 ± 0,09 **(0,002)**
6	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2 (0,8)	0,7 ± 0,1 (0,098)	1,0 ± 0,03 **(0,014)**	0,1 ± 0,04 **(≤ 0,001)**	0,1 ± 0,04 **(≤ 0,001)**
8	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,07 (0,55)	0,3 ± 0,04 (0,094)	0,3 ± 0,06 **(0,017)**	(0,01 ± 0,01) **(≤ 0,001)**	(0,02 ± 0,02) **(≤ 0,001)**

Die Plattiereffizienzen (PE) erlaubten eine Aussage über den Anteil der Zellen, welche in der Lage waren, eine Kolonie (mindestens 50 Zellen) zu bilden. Wie aus der Tab. 6 ersichtlich ist, waren dies für die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, ohne Wirkstoff) im Mittel 6,9 %. Somit bildeten nur 6,9 % der initial 2000 ausgesäten Zellen eine auszählbare Kolonie. Die Kolonien der unbehandelten T98G-Zellen waren jedoch sehr ausladend und nach 12 Tagen nahezu konfluierend. Das Lösungsmittel DMSO hatte keinen Einfluss auf die PE. Die alleinige Zugabe von 50 µM Piperin verringerte die PE bereits von 6,9 % auf 5,2 %, wobei der Unterschied zur Kontrolle nicht signifikant war. Eine Verdopplung der Piperinkonzentration auf 100 µM führte zu einer weiteren Reduktion der PE auf 3,2 %. Diese Differenz war im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p \leq 0,05$). Nach Behandlung mit 200 µM Piperin reduzierte sich die Plattiereffizienz auf 0,7 % ($p \leq 0,001$).

Erwartungsgemäß hatte auch ionisierender Bestrahlung einen Einfluss auf die PE. Durch eine alleinige Bestrahlung mit 2 Gy waren nur noch 4,6 % der initial ausgesäten T98G-Zellen in der Lage, eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden. Mit zunehmender Bestrahlungsdosis reduzierte sich die berechnete PE weiter. So konnte nach einer alleinigen Bestrahlung mit 6 Gy eine PE von 1,1 % ermittelt werden. Eine weitere Steigerung der Bestrahlungsdosis auf 8 Gy verringerte die PE auf 0,4 %.

Mithilfe der PE war es möglich, die Überlebensfraktion zu berechnen; diese wurde anschließend in einer Zellüberlebenskurve normiert aufgetragen (Abb. 13).

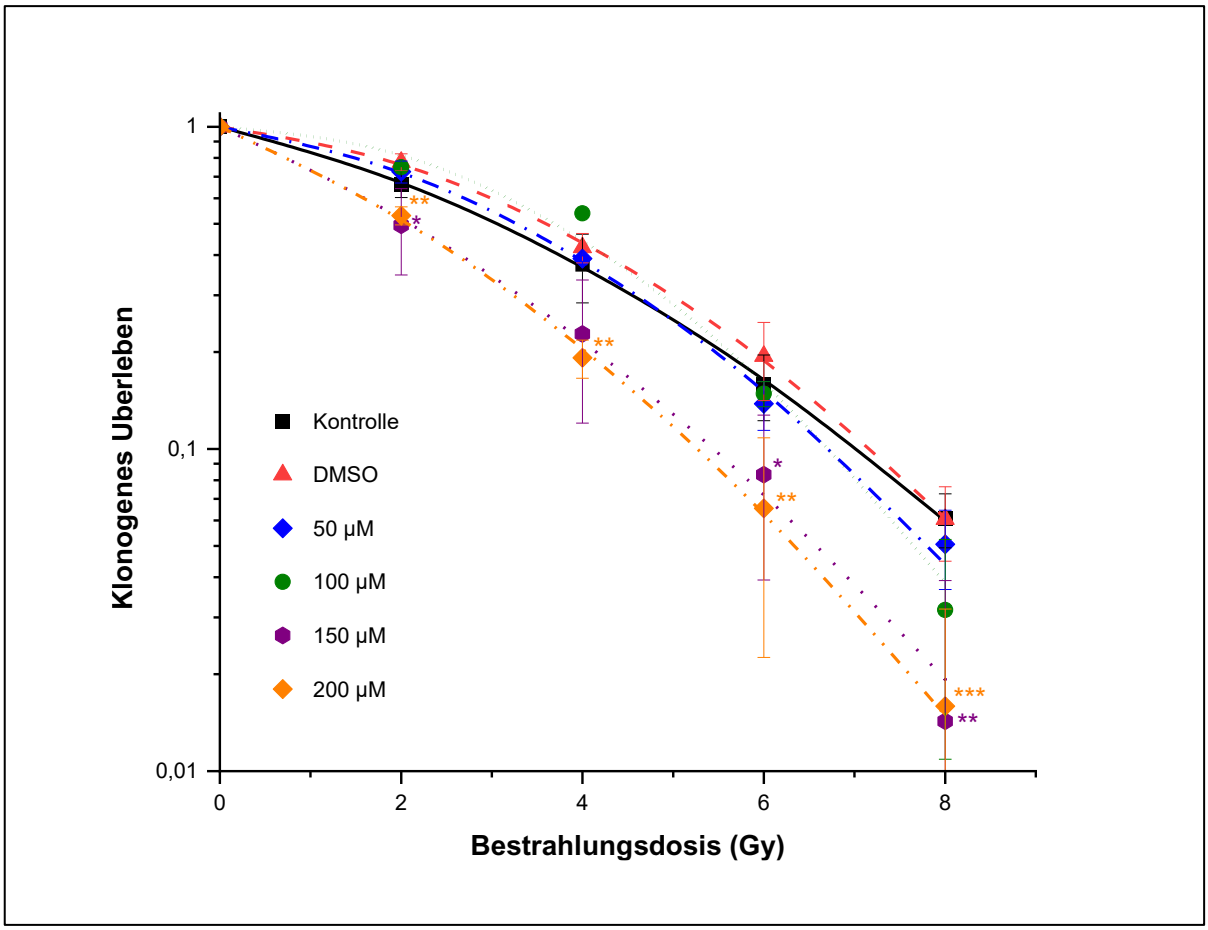

Abb. 13: Klonogenes Überleben der T98G-Zellen unter Einfluss von Piperin und Bestrahlung. Wirkstoffzugabe 24 h vor Bestrahlung. Versuchsdauer 12 Tage. Normiert auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle. Dargestellt sind MW ± SD (Kontrolle: n=7; DMSO-Kontrolle, 50 µM, 100 µM: n=3; 150 µM, 200 µM: n=4); *= p ≤ 0,05, **= p ≤ 0,01, ***= p ≤ 0,001 bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen Bestrahlungsdosis.

Die Abb. 13 veranschaulicht das klonogene Überleben der T98G-Zellen unter dem Einfluss ionisierender Strahlung und dem Wirkstoff Piperin. Die Linien resultieren aus einem nichtlinearen Fit nach dem sog. Linear-Quadratischen-Modell.

Für die unbehandelten Zellen ließ sich anhand der Zellüberlebenskurve ein SF_2-Wert von 0,66 ermitteln, was bedeutet, dass nach einer Bestrahlung mit 2 Gy 66 % der Zellen im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle überlebten.

Wie in der Abb. 13 zu erkennen ist, hatten das Lösungsmittel DMSO sowie Piperin in einer Konzentration von 50 µM keinen signifikanten Einfluss auf das klonogene Überleben. Die Kurven zeigten einen annähernd identischen Verlauf wie die Zellüberlebenskurve der Kontrollansätze.

Im Bereich höherer Bestrahlungsdosen ab 6 Gy wich die Zellüberlebenskurve der Zellen, welche mit 50 µM Piperin behandelt wurden von der Kontrollkurve ab, wobei sich aufgrund der Standardabweichungen keine sicheren Aussagen hinsichtlich einer Strahlensensibilisierung treffen ließen.

Eine Piperinkonzentration von 100 µM zeigte in Kombination mit einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy eine Reduktion der Überlebensfraktion. Aufgrund der erhöhten Standardabweichung war dieser Effekt jedoch ebenfalls nicht signifikant (p = 0,38). Ab einer Wirkstoffkonzentration von 150 µM ließ sich ein strahlensensibilisierender Effekt bereits ab einer Strahlungsdosis von 2 Gy ermitteln. Ähnliche Effekte zeigten sich auch bei Betrachtung der Zellen, welche mit 200 µM Wirkstoff behandelt wurden. Mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis lagen die Kurven der 150 µM- bzw. der 200 µM-Ansätze deutlicher unterhalb der Kontrollkurve, wobei sich eine signifikante Hemmung des Zellüberlebens ab 2 Gy ermitteln ließen.

3.2.2 Einfluss des Piperins auf das Klonogene Überleben der FaDu-Zellen

Die Morphologien der Kolonien unbestrahlter FaDu-Zellen ohne Behandlung sowie nach Zugabe von 150 µM Piperin sind in der folgenden Abb. 14 bespielhaft dargestellt.

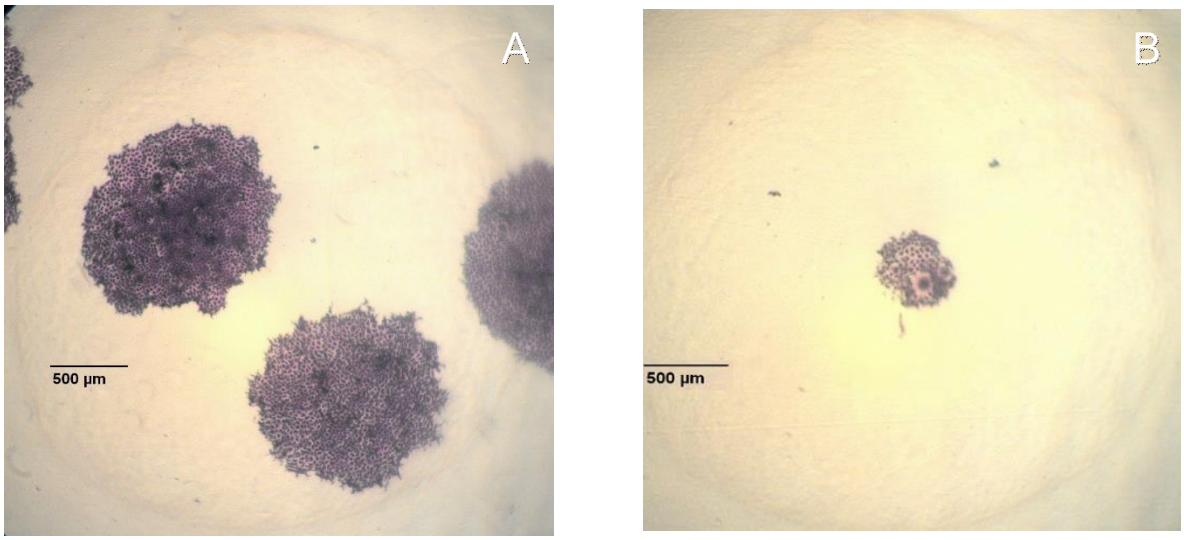

Abb. 14: Mikroskopische Darstellung der Koloniemorphologie der FaDu-Zellen (A) ohne Zugabe von Piperin sowie (B) unter Einfluss einer Wirkstoffkonzentration von 150 µM ohne Bestrahlung. 40-fache Vergrößerung.

In den Ansätzen ohne Piperinbehandlung stellten sich die Zellkolonien eher kompakt, zum Teil kreisrund und wenig ausladend dar (siehe Abb. 14A). Die Kolonien hatten vereinzelt eine leicht kugelige Gestalt. Nach Zugabe des Wirkstoffs Piperin in einer Konzentration von 150 µM wirkten die Kolonien weniger kompakt und die zuvor beschriebene, zum Teil kugelige Morphologie war nicht mehr zu erkennen (Abb. 14B).

Im Folgenden konnten die Plattiereffizienzen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration und der Bestrahlungsdosis berechnet werden, welche der Tab. 7 zu entnehmen sind.

Tab. 7: Plattiereffizienzen in % der FaDu-Zellen unter dem Einfluss ionisierender Strahlung sowie Piperin in unterschiedlichen Konzentrationen bei einer Einsaatdichte von 2 x 10^3 Zellen. Dargestellt sind MW [%] ± SD (Kontrolle: n=7; DMSO-Kontrolle, 50 µM, 100 µM: n=4; 150 µM, 200 µM: n=3). In Klammern sind die p-Werte dargestellt (bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen Bestrahlungsdosis)

Bestrahlungs-dosis [Gy]	**Plattiereffizienzen [%] (p-Werte)**					
	Kontrolle	**DMSO (0,1 %)**	**50 µM Piperin**	**100 µM Piperin**	**150 µM Piperin**	**200 µM Piperin**
0	21,4 ± 4,2	18,3 ± 2,6 (0,23)	14,7 ± 2,4 **(0,03)**	3,8 ± 0,6 **(≤ 0,001)**	1,5 ± 1,35 **(≤ 0,001)**	1,0 ± 0,36 **(≤ 0,001)**
2	16,1 ± 3,8	13,5 ± 2,1 (0,27)	10,4 ± 1,8 **(0,03)**	2,1 ± 0,5 **(≤ 0,001)**	0,9 ± 0,8 **(≤ 0,001)**	0,5 ± 0,17 **(≤ 0,001)**
4	9,1 ± 2,2	8,2 ± 2,4 (0,59)	5,5 ± 1,5 **(0,03)**	0,8 ± 0,3 **(≤ 0,001)**	0,1 ± 0,06 **(≤ 0,001)**	0,1 ± 0,06 **(≤ 0,001)**
6	3,3 ± 0,9	3,1 ± 0,8 (0,82)	2,1 ± 0,5 **(0,04)**	0,3 ± 0,06 **(≤ 0,001)**	0,1 ± 0,04 **(≤ 0,001)**	0,01 ± 0,0 **(≤ 0,001)**
8	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1 (0,46)	0,4 ± 0,1 (0,059)	0,1 ± 0,04 **(≤ 0,001)**	(0,01 ± 0,01) **(≤ 0,001)**	(0,0 ± 0,0) **(≤ 0,001)**

Wie in der Tab. 7 ersichtlich ist, zeigt der isolierte Einfluss ionisierender Bestrahlung einen dosisahängige Effekt auf die Plattiereffizienz (PE) der FaDu-Zellen. In den nicht bestrahlten und nicht mit Piperin behandelten Ansätzen konnte eine durchschnittliche PE von 21,4 % berechnet werden. Bereits nach der Bestrahlung mit 2 Gy reduzierte sich die PE auf 16,1 %, bei 4 Gy verringerte sich die PE auf 9,1 %. Wurde die Bestrahlungsdosis auf 6 Gy erhöht, betrug die PE lediglich 3,3% und eine weitere Erhöhung der Bestrahlungsdosis auf 8 Gy hatte eine Reduktion der PE auf 0,64 % zur Folge. Die Vehikelkontrolle mit DMSO zeigte in allen Ansätzen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, sodass auch hier ein Effekt durch das Lösungsmittel auf das klonogene Überleben ausgeschlossen werden konnte.
Der Tab. 7 ist weiterhin zu entnehmen, dass auch der Wirkstoff Piperin allein eine reduzierende Wirkung auf die PE hat. Wurden die nicht bestrahlten FaDu-Zellen mit Piperin in einer Konzentration von 50 µM behandelt, verringerte sich die PE auf 14,7 % ($p \leq 0,05$). Eine Verdopplung der Piperinkonzentration auf 100 µM hatte nochmals eine signifikante Reduktion der Plattiereffizienz auf 3,8 % ($p \leq 0,001$) zur Folge, was einen Anteil von 17,8 % im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin) entsprach. Nach einer weiteren Konzentrationserhöhung auf 200 µM waren mit einer PE von 0,95 % kaum noch FaDu-Zellen in der Lage, eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden.

Mittels der Plattiereffizienzen konnte erneut eine normierte Darstellung der Überlebensfraktionen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration und der Bestrahlungsdosis erstellt werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 15 dargestellt.

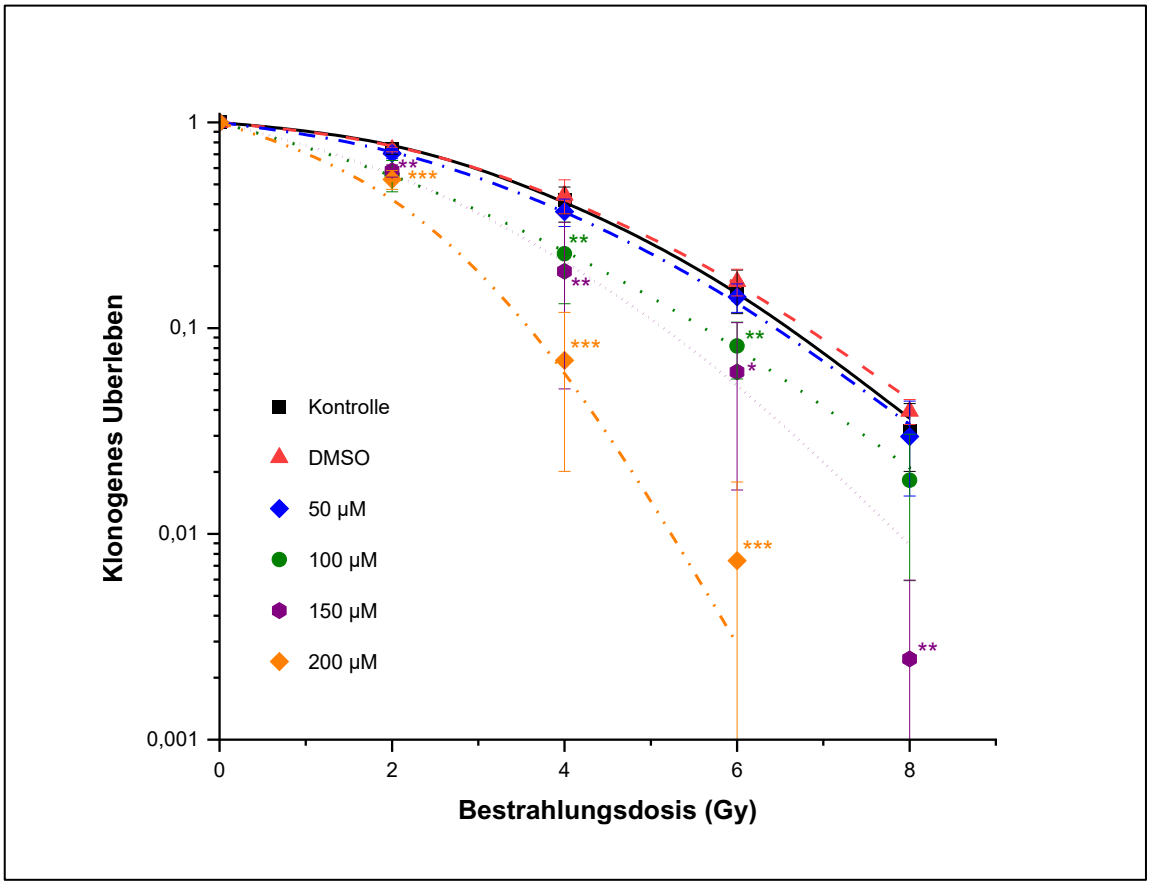

Abb. 15: Zellüberlebenskurve der FaDu-Zellen (80 Zellen/cm^2) in Abhängigkeit von der Piperinkonzentration sowie der Bestrahlungsdosis (0 Gy–8 Gy). Wirkstoffzugabe 24 h vor Bestrahlung. Versuchsdauer 12 Tage. Normiert auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle (Kontrolle n=7, DMSO-Kontrolle, 50 µM, 100 µM n=4, 150 µM und 200 µM n=3). *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$.

Für die unbehandelte Kontrolle ließ sich anhand der Zellüberlebenskurve ein SF_2-Wert von 0,75 berechnen. Nach Behandlung mit 50 µM Piperin konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des klonogenen Überlebens ermittelt werden. Wie aus der Abb. 15 ersichtlich ist, verläuft die Zellüberlebenskurve der 50 µM-Ansätze nahezu identisch mit der der Kontrollkurve. Nach Zugabe von 100 µM Wirkstoff kam es jedoch zu einem Abflachen der Kurve mit signifikanter Reduktion auf die ermittelte SF ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy ($p \leq 0,01$). Eine Erhöhung der Piperindosis auf 150 µM hatte eine weitere Reduktion des Überlebens zur Folge, wobei diese bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy signifikant war. Dieser Effekt zeigte sich auch in den 200 µM-Ansätzen. Nach Behandlung mit 200 µM Piperin und einer Bestrahlung mit 8 Gy waren keine Kolonien mehr auszählbar. Allgemein ließen sich synergistische Effekte aus der Kombination von Piperin und ionisierender Bestrahlung beobachten. Die FaDu-Zellen zeigten sich, ähnlich wie in den Wachstumsversuchen, empfindlicher gegenüber Piperin dar.

3.3 Zellproliferation

Zum Nachweis proliferierender Zellen wurde der BrdU-Assay verwendet. Diese Methode beruht im Wesentlichen auf einer Untersuchung der DNA-Verdopplung während der S-Phase des Zellzyklus und lässt so Rückschlüsse auf die Proliferationskapazität der Zellen zu.

3.3.1 Zellproliferation der T98G-Zellen

Die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der T98G-Zellen erfolgte unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Wirkstoffs Piperin (0-200 µM) sowie ionisierender Strahlung in diversen Bestrahlungsdosen. Die Ergebnisse des BrdU-Assays für die T98G-Zellen sind in der Abb. 16 dargestellt.

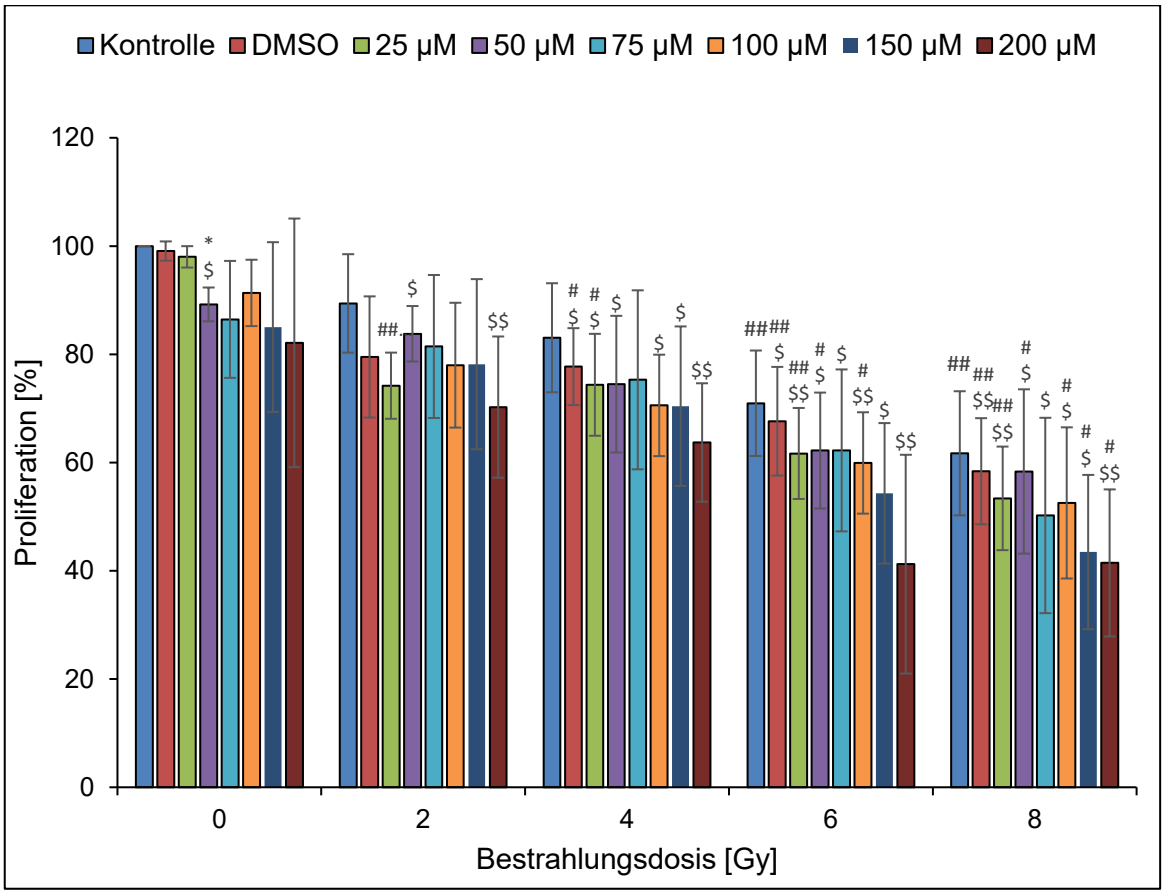

Abb. 16: Proliferation der T98G-Zellen, gemessen mittels BrdU-Inkorporation nach einer Inkubationszeit von 48 h mit Piperin; normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 µM, 0 Gy). Dargestellt sind MW ± SD (Kontrolle – 150 µM: n=3; 200 µM: n=4); * = p ≤ 0,05 (bezogen auf die Kontrolle der gleichen Bestrahlungsdosis); # = p ≤ 0,05, ## = p ≤ 0,01 (bezogen auf den unbestrahlten Ansatz der gleichen Wirkstoffkonzentration); $ = p ≤ 0,05, $$ = p ≤ 0,01 (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin)).

Die Abb. 16 stellt die Ergebnisse des BrdU-Assays der T98G-Zellen normiert auf die Kontrolle (0 µM Piperin, 0 Gy) dar. Dies ermöglicht die Betrachtung der kombinierten Wirkung des Piperins sowie der ionisierenden Strahlung auf das Proliferationsverhalten.

Unter dem alleinigen Einfluss von Piperin nahm die Proliferation konzentrationsabhängig ab (Kontrolle: 100 %; 25 µM: 98 %; 50 µM: 89 %; 75 µM: 86 %; 150 µM: 85 %; 200 µM: 82 %). Eine Ausnahme bildete der Ansatz mit 100 µM Piperin, in dem die Proliferation aufgrund hoher Standardabweichung nur um 9 % sank. Die Hemmung der Proliferation bei Behandlung mit 50 µM Piperin war signifikant ($p \leq 0,05$). Für die weiteren Wirkstoffkonzentrationen konnten aufgrund der zum Teil hohen Standardabweichung keine signifikanten Ergebnisse berechnet werden. Das Lösungsmittel DMSO hatte keinen relevanten proliferationshemmenden Effekt.

Wie aus der Abb. 16 weiterhin ersichtlich ist, zeigten die T98G-Zellen auch unter alleiniger Bestrahlung eine Verminderung der Proliferation. Diese nahm im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) mit steigender Strahlendosis ab auf 89 % (2 Gy) über 83 % (4 Gy) und 71 % (6 Gy) bis hin zu 62 % (8 Gy). Signifikante Proliferationshemmungen ($p \leq 0,01$) konnten für die höheren Bestrahlungsdosen von 6 und 8 Gy berechnet werden.

Nach kombinierter Behandlung mit Piperin und ionisierender Strahlung konnte eine weitere Verminderung der Proliferation beobachtet werden. Beispielhaft soll im Folgenden auf die Ansätze, welche mit 200 µM Piperin behandelt wurden, eigegangen werden. So konnte nach Bestrahlung mit 4 Gy sowie nach Zugabe von 200 µM eine Proliferation von 64 % ermittelt werden ($p \leq 0,01$). Im Vergleich zur dosisspezifischen Kontrolle (0 µM Piperin, 4 Gy) zeigte sich somit eine Abnahme der Proliferation um fast 20 %. Aufgrund der Standardabweichung war dieses Ergebnis, verglichen mit der Kontrolle der gleichen Bestrahlungsdosis, jedoch nicht signifikant ($p = 0,21$). Bezogen auf den nicht bestrahlten Ansatz der gleichen Wirkstoffkonzentration (200 µM) kam es zu einer Reduktion des Proliferationsverhaltens um 18 %. In den 6 Gy-Ansätzen, welche ebenfalls mit 200 µM Wirkstoff behandelt wurden, konnte eine durchschnittliche Proliferation von 41 % ermittelt werden ($p \leq 0,01$).

Zusammenfassend zeigten die T98G-Zellen sowohl nach alleiniger Bestrahlung, durch alleinige Wirkstoffgabe als auch unter kombinierter Behandlung eine dosis- respektive konzentrationsabhängige Proliferationshemmung.

3.3.2 Zellproliferation der FaDu-Zellen

Analog zur Durchführung des BrdU-Assays für die Zelllinie T98G erfolgten die Untersuchungen zur Proliferationskapazität für die FaDu-Zellen. Die Ergebnisse, normiert auf die unbehandelte Kontrolle, sind in der folgenden Abb. 17 dargestellt.

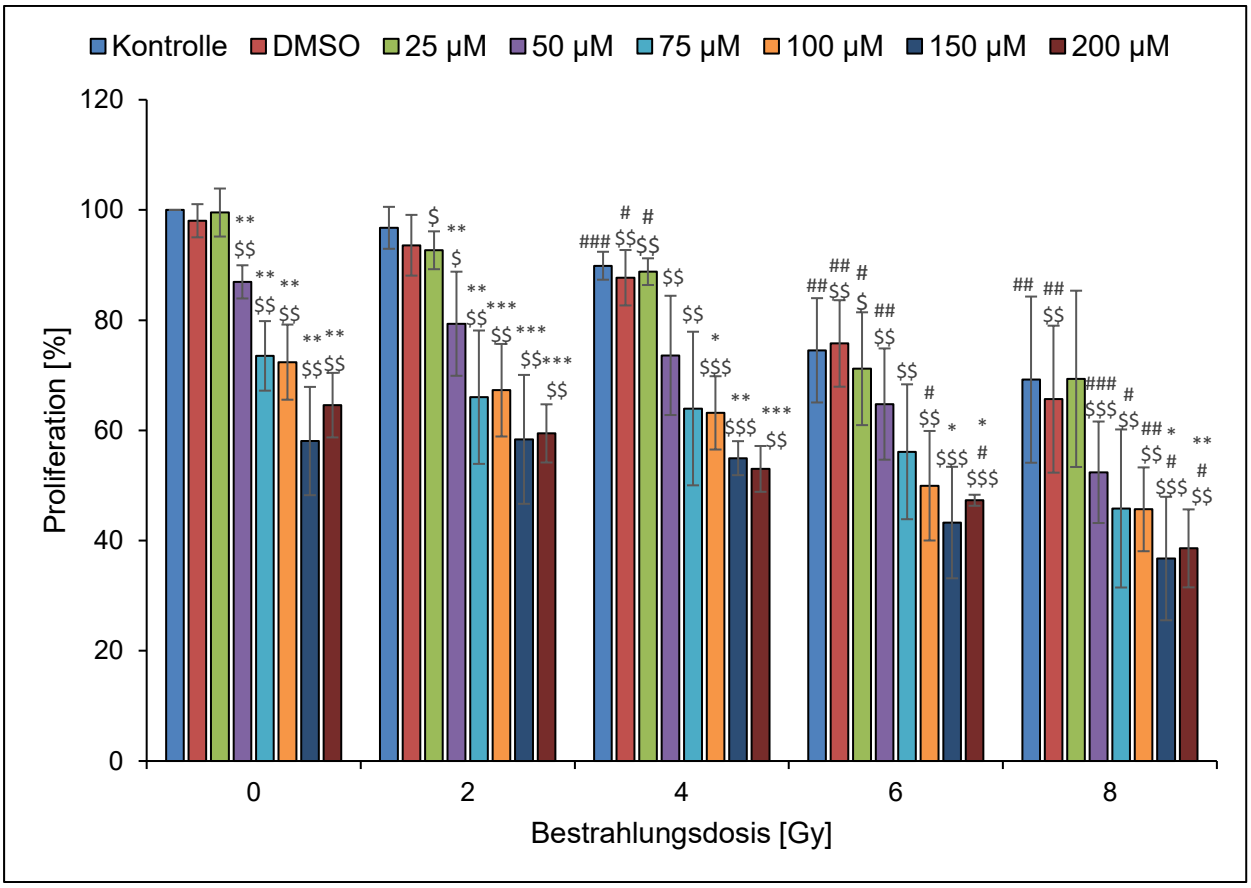

Abb. 17: Proliferation der FaDu-Zellen, gemessen mittels BrdU-Inkorporation nach einer Inkubationszeit von 48 h mit Piperin; normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 µM, 0 Gy). Dargestellt sind MW ± SD (n=4, außer 25 µM sowie 200 µM: n=3); * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01, *** = p ≤ 0,001 (bezogen auf die Kontrolle der gleichen Bestrahlungsdosis); # = p ≤ 0,05, ## = p ≤ 0,01, ### = p ≤ 0,001 (bezogen auf den nicht bestrahlten Ansatz der gleichen Wirkstoffkonzentration); $ = p ≤ 0,05, $$ = p ≤ 0,01, $$$ = p ≤ 0,001 (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin)).

Aus der Abb. 17 lässt sich entnehmen, dass die FaDu-Zellen nach alleiniger Behandlung mit dem Wirkstoff Piperin ohne Bestrahlung ebenfalls eine annähernd konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation zeigten. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 µM, 0 Gy) zeigten die FaDu-Zellen unter dem Einfluss von 50 µM Piperin eine reduzierte Proliferation um 13 % auf 87 % (p ≤ 0,01). Wurden die nicht bestrahlten Zellen mit 75 µM bzw. 100 µM Piperin behandelt, reduzierte sich die Proliferation auf 74 % bzw. 72 % (p ≤ 0,01). Eine weitere Erhöhung

der Piperinkonzentration auf 150 µM führte zu einer Proliferation von 58 % und somit zu einer Reduktion um 42 % im Vergleich zu Kontrolle (0 µM, 0 Gy).
Die Vehikelkontrolle mit DMSO hatten keinen Einfluss auf die Proliferationskapazität. Auch nach alleiniger Behandlung mit der niedrigsten Wirkstoffkonzentration von 25 µM zeigte sich keine relevante Hemmung der Proliferation.
Bei Betrachtung der alleinigen Bestrahlung ließ sich ebenfalls eine dosisabhängige Verminderung der Proliferation der FaDu-Zellen feststellen. Wurden die Zellen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, reduzierte sich die Proliferation um 3 % auf 97 %. Nach Bestrahlung mit 4 Gy wurde Proliferation von 89 % ermittelt ($p \leq 0{,}001$). Die Erhöhung der Strahlenexposition auf 6 Gy respektive 8 Gy hatte Proliferationen von 75 % bzw. 69 % zur Folge ($p \leq 0{,}01$).
Eine Kombination aus Bestrahlung und Wirkstoffzugabe zeigte ab einer Piperinkonzentration von 25 µM synergistische Effekte. Die Kombination von 25 µM Piperin mit einer Bestrahlung mit 2 Gy konnte beispielsweise die Proliferation verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (0 Gy, 0 µM) signifikant um 7 % auf 93 % senken ($p \leq 0{,}05$) . Bei Erhöhung der Piperinkonzentration auf 50 µM sowie einer Bestrahlung mit 4 Gy resultierte eine signifikante Reduktion der Proliferation auf 74 % ($p \leq 0{,}01$) Wurde bei gleicher Piperinkonzentration (50 µM) die Bestrahlungsdosis auf 8 Gy erhöht, konnte eine Proliferation von 52 % ermittelt werden ($p \leq 0{,}001$). Mit zunehmender Wirkstoffkonzentration und Bestrahlungsdosis kam es auch zu einer weiteren Reduktion der Proliferation. Beispielhaft seien im Folgenden die Proliferationen für die 150 µM- bzw. die 200 µM-Ansätze aufgeführt.
Wurden die FaDu-Zellen mit 150 µM Piperin behandelt, ergaben sich für die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen folgende Werte der Proliferation: 0 Gy: 58 %; 2 Gy: 58 %; 4 Gy: 55 %; 6 Gy: 43 %; 8 Gy: 37 %. Für die 200 µM-Ansätze ließen sich im Vergleich dazu folgende Proliferationen ermitteln: 0 Gy: 65 %; 2 Gy: 59 %; 4 Gy: 53 %; 6 Gy: 47 %; 8 Gy: 39 %. Diese sind somit annähernd mit den Proliferationen der 150 µM-Ansätze vergleichbar.
Vergleichend mit den T98G-Zellen zeigte die Zelllinie FaDu tendenziell eine stärker ausgeprägte Proliferationshemmung nach Zugabe des Wirkstoffs. In den nicht bestrahlten Ansätzen (0 Gy) führte z. B. die Behandlung mit 100 µM in den T98G-Zellen zu einer Reduktion der Proliferation um 9 % im Vergleich zur dosisspezifischen Kontrolle. Demgegenüber verminderte sich die Proliferation unter den gleichen Bedingungen in der Zelllinie FaDu um 28 %. Dieser Trend war auch unter dem Einfluss einer Bestrahlung zu erkennen. Beispielsweise zeigte sich unter der kombinierten Einwirkung von 2 Gy ionisierender Strahlung sowie 200 µM Piperin in den FaDu-Zellen eine Proliferation von 59 %. In den T98G-Zellen betrug die Proliferation unter identischen Bedingungen durchschnittlich 70 %, was ein unterschiedliches Ansprechen beider Zelllinien auf das Piperin hinsichtlich der Proliferation nahelegt. Mit zunehmender Dosis der Bestrahlung zeigten sich ein ähnliches Proliferationsverhalten beider Zelllinien.

3.4 Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen

Mithilfe des ɣ-H2AX-Tests war es möglich, die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen und somit deren Reparaturkapazität in den T98G- und FaDu-Zellen nach ionisierender Strahlung bzw. unter dem Einfluss von Piperin zu analysieren. Das Reparaturvermögen wurde jeweils 30 min sowie 24 h nach der Bestrahlung untersucht. Die folgende Abb. 18 zeigt beispielhaft Aufnahmen mit der Kamera des Mikroskops.

Die Abb. 18 veranschaulicht bespielhaft die Morphologie der Zellkerne der Zelllinie T98G ohne angefärbte DNA-Doppelstrangbrüche (Abb. 18A) sowie Zellkerne der Zelllinie FaDu mit gefärbten DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Bestrahlung mit 6 Gy ohne die Zugabe von Piperin (Abb. 18B).

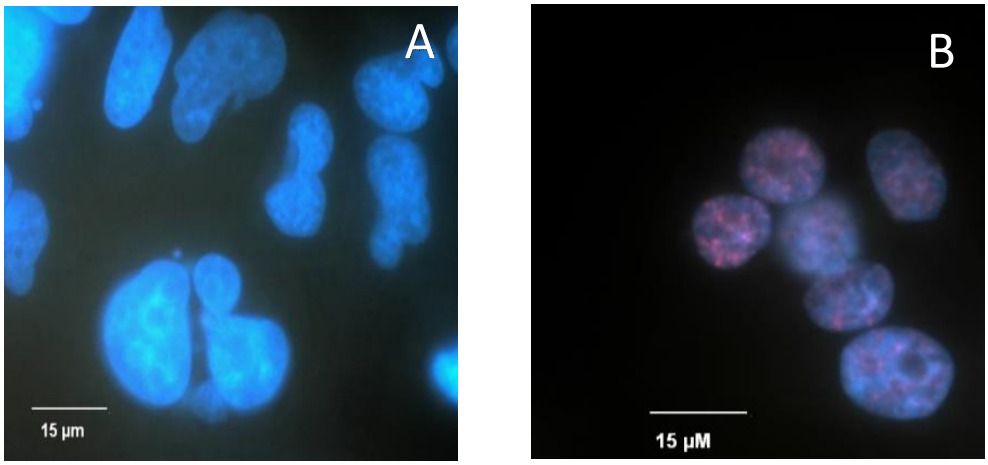

Abb. 18: Darstellung der Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau). (A) T98G-Zellen (0 Gy) ohne sowie (B) FaDu-Zellen (6Gy) mit angefärbten DNA-Doppelstrangbrüchen (rot) . 1000-fache Vergrößerung.

3.4.1 Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen der T98G-Zellen

Die folgende Abb. 19 stellt die mittlere Anzahl an ausgezählten Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration zu den Fixierungszeitpunkten 0,5 h (Abb. 19A) sowie nach 24 h (Abb. 19B) jeweils ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 6 Gy dar.

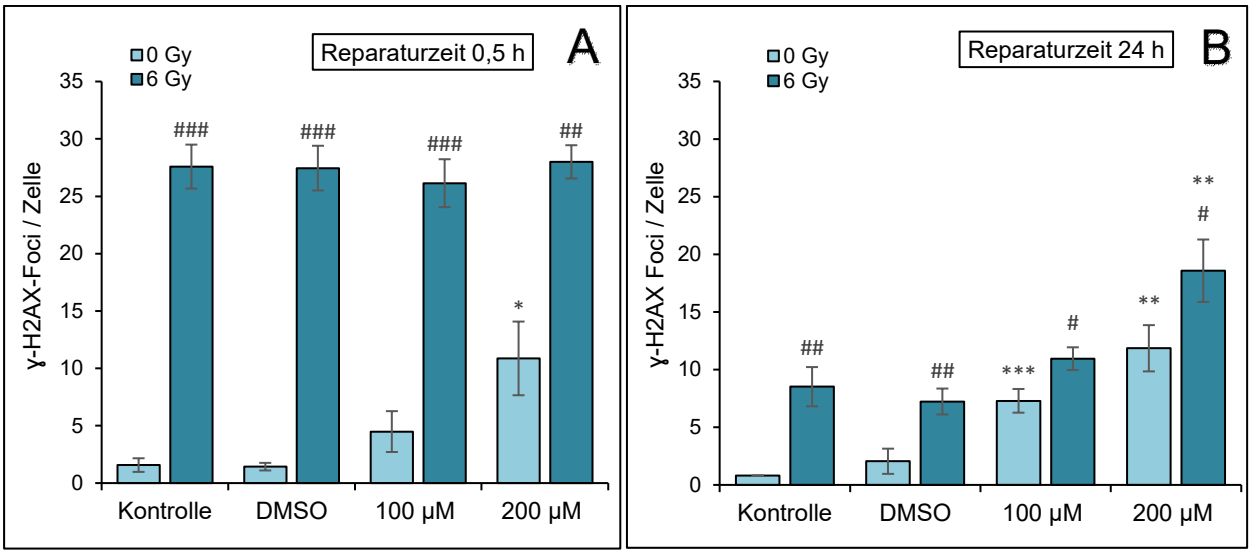

Abb. 19: Anzahl der mittels ɣ-H2AX-Assay gezählten DNA-Doppelstrangbrüche in den T98G-Zellen in Abhängigkeit von der Piperinkonzentration mit und ohne Bestrahlung. Fixierung der Zellen jeweils nach (A) 0,5 h sowie (B) 24 h nach Bestrahlung. Darstellung der MW ± SD (n=3); *= p ≤ 0,05, **= p ≤ 0,01, ***= p ≤ 0,001 (bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen Bestrahlungsdosis). # = p ≤ 0,05, ## = p ≤ 0,01, ### = p ≤ 0,001 (bezogen auf den nicht bestrahlten Ansatz der gleichen Wirkstoffkonzentration).

Wie aus der Abb. 19A ersichtlich ist, betrug die mittlere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen/Zelle in den Kontrollansätzen 0,5 h nach der Scheinbestrahlung 1,6. Demgegenüber wurden unter dem Einfluss des Lösungsmittels DMSO ca. 1,4 DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) gezählt. Somit konnte bei nicht signifikantem Unterschied eine Einwirkung des Lösungsmittels auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden. Nach Zugabe des Piperins in einer Konzentration von 100 µM konnte ohne Bestrahlung eine mittlere Anzahl an DSB von ca. 4,5 gezählt werden, was einer Steigerung um 286 % im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle entsprach. Unter dem alleinigen Einfluss von Piperin in einer Konzentration von 200 µM wurden im Mittel 10,9 DSB/Zelle gezählt. Dies wiederum war mit einer signifikanten Steigerung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle um 694 % verbunden ($p \leq 0,05$) . Somit konnte nachgewiesen werden, dass die alleinige Behandlung mit Piperin ohne den Einfluss ionisierender Strahlung die Anzahl an DSB/Zelle signifikant erhöhte.

Der Abb. 19A ist ferner zu entnehmen, dass es in allen Ansätzen 0,5 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy im Vergleich zu den nicht bestrahlten Ansätzen zu einer signifikanten Zunahme DNA-Schäden kam (Kontrolle, DMSO und 100 µM: $p \leq 0{,}001$; 200 µM: $p \leq 0{,}01$).
Relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen ließen sich dabei nicht detektieren (Kontrolle: 27,6 DSB/Zelle; DMSO: 27,5 DSB/Zelle; 100 µM: 26,1 DSB/Zelle; 200 µM: 28 DSB/Zelle), wobei pro Zelle maximal 30 DSB ausgezählt wurden. Verglichen mit den nicht bestrahlten Proben, kam es in den Kontrollansätzen durch die Bestrahlung mit 6 Gy zu einer Zunahme der Focianzahl um ca. 1700 %. Nach Zugabe von 200 µM Piperin kam es nur zu einer Steigerung von 257 %, da bereits die alleinige Piperinbehandlung ohne Bestrahlung zu einem ausgeprägteren DNA-Schaden führte.

Die Abb. 19B veranschaulicht die Ergebnisse für die T98G-Zellen 24 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt und stellt somit die residualen DSB dar. In der nicht bestrahlten Kontrolle wurde eine mittlere Anzahl an Doppelstrangbrüchen von 0,8 pro Zellkern ermittelt. Somit halbierte sich die Anzahl im Vergleich zum Fixierungszeitpunkt nach 0,5 h (siehe Abb. 19A). In den Ansätzen, welche mit dem Wirkstoff Piperin behandelt wurden konnten zum zweiten Fixierungszeitpunkt 24 h nach der Scheinbestrahlung mehr DSB/Zelle ausgezählt werden im Vergleich zum ersten Fixierungszeitpunkt. Nach Behandlung mit 100 µM Piperin wurden nach 24 h im Mittel 7,3 Foci/Zellkern gezählt. Verglichen mit dem ersten Fixierungszeitpunkt (0,5 h nach Scheinbestrahlung) kam es im 100 µM-Ansatz somit zu einer Steigerung der ausgezählten Doppelstrangbrüche um nahezu 62 %. Unter alleiniger Zugabe von 200 µM Piperin konnten nach 24 h im Mittel 11,9 Foci/Zelle gezählt werden. Verglichen mit den Kontrollansätzen des gleichen Fixierungszeitpunkts entsprach dies einer signifikanten Zunahme von fast 1500 % der DSB ($p \leq 0{,}01$).
Der Abb. 19B ist zudem zu entnehmen, dass 24 h nach der Bestrahlung in allen Ansätzen weniger Foci im Vergleich zum vorherigen Fixierungszeitpunkt detektiert werden konnten. In den Kontrollproben waren nur noch durchschnittlich 8,5 DSB/Zelle auszählbar. Dies entsprach einem Anteil von 30,8 % im Vergleich zum ersten Fixierungszeitpunkt 0,5 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy (siehe Abb. 19A). Somit kam es zu einer Reduktion und damit Reparatur von 69,2 % der Doppelstrangbrüche.
Unter dem Einfluss von 100 µM Piperin konnten 24 h nach der Bestrahlung im Mittel 11 DSB pro Zellkern gezählt werden, was einer Reduktion der Focianzahl von 58 % im Vergleich zum ersten Fixierungszeitpunkt (nach 0,5 h) entsprach. Wurden die T98G-Zellen mit 200 µM behandelt konnten 24 h nach der Bestrahlung 18,6 Foci/Zelle ermittelt werden. Dies entsprach einer Reduktion der DNA-DSB um 33,6 % im Vergleich zur Fixierung nach 0,5 h.
Nach Zugabe der höchsten Piperinkonzentration von 200 µM konnten somit signifikant mehr DSB/Zellkern nach der Bestrahlung detektiert werden als in den ebenfalls mit 6 Gy bestrahlten Ansätzen ohne Piperinzugabe ($p \leq 0{,}01$).

Auch im Vergleich zu den nicht bestrahlten 200 µM-Ansätzen (11,9 DSB/Zellkern) konnte 24 h nach kombinierter Behandlung mit Piperin und Bestrahlung eine erhöhte Anzahl an DNA-DSB von 18,6 DSB/Zellkern ermittelt werden (Abb. 19B).

Im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle waren 24 h nach der Bestrahlung und nach Zugabe von 100 µM Wirkstoff 2,5 DSB/Zellkern mehr ausgezählt werden, wobei dieses Ergebnis nicht signifikant war ($p = 0,15$). Unter dem Einfluss von 200 µM Piperin konnten jedoch mit 18,6 DSB/Zellkern signifikant ($p \leq 0,01$) mehr Doppelstrangbrüche im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle zum gleichen Fixierungszeitpunkt detektiert werden. Somit konnten die T98G-Zellen unter dem Einfluss von Piperin in einer Konzentration von 200 µM signifikant weniger DSB reparieren.

3.4.2 Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen der FaDu-Zellen

Analog zu den Versuchen der T98G-Zellen erfolgte der γ-H2AX-Test für die FaDu-Zellen. Die Abb. 20 gibt die mittlere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen ohne Bestrahlung sowie nach einer Bestrahlung mit 6 Gy wieder. Dabei wurden die Foci erneut 0,5 h (Abb. 20A) und 24 h (Abb. 20B) nach dem Bestrahlungszeitpunkt ausgezählt.

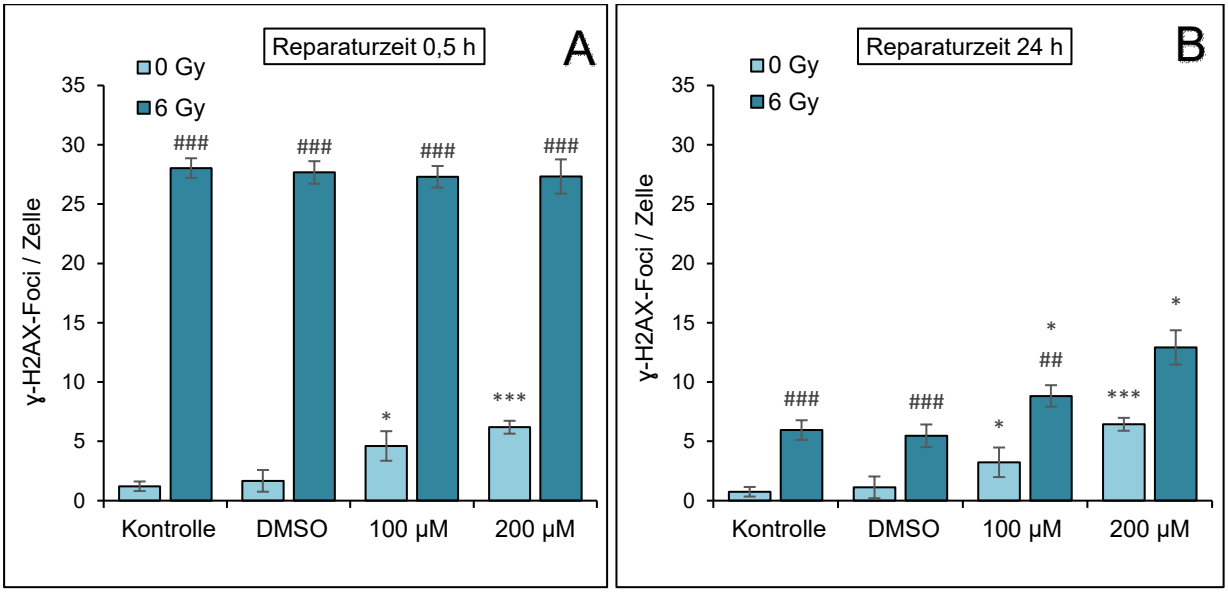

Abb. 20: Anzahl der mittels γ-H2AX-Assay gezählten DNA-Doppelstrangbrüche in den FaDu-Zellen in Abhängigkeit von der Piperinkonzentration ohne Bestrahlung sowie nach Bestrahlung mit 6 Gy. Fixierung der Zellen jeweils nach 0,5 h (A) sowie 24 h (B) nach Bestrahlung. Darstellung der MW ± SD (n=3); *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$ (bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen Bestrahlungsdosis). # = $p \leq 0,05$, ## = $p \leq 0,01$, ### = $p \leq 0,001$ (bezogen auf den nicht bestrahlten Ansatz der gleichen Wirkstoffkonzentration).

Die Abb. 20A veranschaulicht die Anzahl an Doppelstrangbrüchen in den bestrahlten sowie nicht bestrahlten FaDu-Zellen 0,5 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt. Wurden die Zellen weder bestrahlt noch mit Piperin behandelt konnten im Mittel 1,2 DSB/Zellkern nach 0,5 h gezählt werden. Die Zugabe des Lösungsmittels DMSO hatte auch hier keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der DSB zu diesem Fixierungszeitpunkt (1,7 DSB/Zellkern).
Nach der Zugabe von Piperin in einer Konzentration von 100 µM konnten in den Ansätzen, welche nicht bestrahlt wurden und nach 30 min fixiert wurden, 4,6 Foci/Zellkern ermittelt werden. Dieser Anstieg war im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM) signifikant ($p \leq 0,05$). Nach einer Verdopplung der Piperinkonzentration auf 200 µM zeigten sich nach 0,5 h 6,2 DSB/Zellkern. Dies entspricht einem Anstieg von mehr als 500 % im Vergleich zur Kontrolle zum gleichen Fixierungszeitpunkt, wobei diese Erhöhung signifikant war ($p \leq 0,001$).
Aus der Abb. 20A ist weiterhin ersichtlich, dass es nach einer Bestrahlung mit 6 Gy in allen Ansätzen 0,5 h nach der Bestrahlung zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl an Doppelstrangbrüchen kam, wobei diese sich zwischen den verschiedenen Ansätzen nicht signifikant unterschieden. In der Kontrolle (6 Gy, 0 µM Piperin) konnten durchschnittlich 28 DSB/Zellkern ermittelt werden. Somit führte die Bestrahlung zu einer Zunahme der absoluten Anzahl an Foci um fast 27 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Nach Zugabe von 100 µM bzw. 200 µM Piperin wurden 0,5 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy jeweils 27,3 DSB/Zellkern gezählt.
Die Abb. 20B stellt die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche nach einer Reparaturzeit von 24 h dar. In den Kontrollansätzen wurden zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 0,75 DSB/Zellkern gezählt, somit kam es zu einer Reduktion der DSB um 37,5 % im Vergleich zum ersten Fixierungszeitpunkt nach 0,5 h. In den ausschließlich mit DMSO behandelten Ansätzen wurden 1,1 DSB/Zellkern ermittelt. Auch im 100 µM-Ansatz konnte nach 24 h eine Reduktion der Focianzahl detektiert werden, wobei sich die Anzahl um 30 % verringerte (3,2 DSB/Zellkern). Verglichen mit der Anzahl der DSB nach einer Reparaturzeit von 0,5 h konnte unter dem Einfluss von 200 µM Piperin nach 24 h kein relevanter Unterschied festgestellt werden. Die Anzahl der Foci pro Zelle stieg dezent auf 6,4 DSB/Zelle.
Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy kam es nach einer Reparaturzeit von 24 h in allen Ansätzen zu einer Reduktion der Focianzahl (Abb. 20B). In der Kontrolle (6 Gy, 0 µM Piperin) wurden 6 DSB/Zellkern gezählt, was einem Anteil von 21,4 % verglichen mit dem ersten Fixierungszeitpunkt entsprach. Somit wurden in den Kontrollansätzen ca. 78,6 % der DNA-Schäden, welche durch die Bestrahlung entstanden sind, repariert. DMSO hatte keinen relevanten Einfluss auf die Reparaturkapazität. In den FaDu-Zellen, welche mit 6 Gy bestrahlt und mit 100 µM Piperin behandelt wurden, konnten 24 h nach der Bestrahlung 8,8 DSB/Zellkern gezählt werden. Bezogen auf die ebenfalls bestrahlte Kontrolle zum gleichen Fixierungszeitpunkt war dieses Ergebnis signifikant ($p \leq 0,05$). Im Vergleich zum ersten Fixierungszeitpunkt wurden nach 24 h unter der Einwirkung von 100 µM Piperin 67,8 % weniger Foci ermittelt.

Wurde die Konzentration des Wirkstoffs auf 200 µM verdoppelt, wurden 24 h nach der Bestrahlung durchschnittlich 12,9 DSB/Zelle ermittelt. Verglichen mit dem gleichen Ansatz am ersten Fixierungszeitpunkt wurden somit 52,7 % der DSB repariert. Gegenüber der alleinig bestrahlten Kontrolle zum gleichen Fixierungszeitpunkt zeigten sich nach Zugabe von 200 µM Wirkstoff fast 7 DSB/Zelle mehr, was einer Verminderung der Reparaturkapazität durch das Piperin in der höchsten eingesetzten Konzentration um 31,3 % entsprach ($p \leq 0,05$). Somit konnte in der Zelllinie FaDu ab einer Konzentration von 100 µM Piperin eine signifikant verminderte Reparaturkapazität ermittelt werden.
Im Vergleich mit den T98G-Zellen zeigten somit auch die FaDu-Zellen einen ausgeprägten DNA-Schaden nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy. Unter dem Einfluss des Piperins waren in den T98G-Zellen nach einer Reparaturzeit von 24 h jedoch mehr DSB/Zellkern auszählbar als in den FaDu-Zellen. Beispielsweise konnten in der Zelllinie T98G nach Behandlung mit 200 µM Piperin 24 h nach einer Bestrahlung 18,6 DSB/Zellkern gezählt werden. Für den identischen Ansatz waren dies in der Zelllinie FaDu 12,9 DSB/Zellkern. Auch ohne den Einfluss ionisierender Strahlung waren in den T98G-Zellen nach Behandlung mit Piperin mehr Doppelstrangbrüche auszählbar.
In beiden Zelllinien war die Reparaturkapazität nach Zugabe des Piperins vermindert, wobei signifikante Ergebnisse in der Zelllinie T98G nach Behandlung mit 200 µM Piperin und in der Zelllinien FaDu bereits nach Behandlung mit 100 µm Wirkstoff ermittelt werden konnten.

3.5 Untersuchung der Genexpression mittels qRT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR war es möglich, die Expression der beiden Tumorsuppressorgene *RB1* und *CDKN1B* zu untersuchen, welche für das Retinoblastom-Protein sowie das Proteine $p27^{Kip1}$ (ein CDK-Inhibitor) codieren.

3.5.1 Genexpression der T98G-Zellen

Die folgenden Abb. 21 und 22 veranschaulichen die relative Genexpression der Tumorsuppressorgene *RB1* sowie *CDKN1B* für die etablierte Tumorzelllinie T98G. Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte einerseits nach einer Strahlenexposition mit 2 Gy und 6 Gy sowie unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin in einer Konzentration von 100 µM und 200 µM.

Zunächst sind in der Abb. 21 die relativen Expressionen des *RB1*-Gens dargestellt.

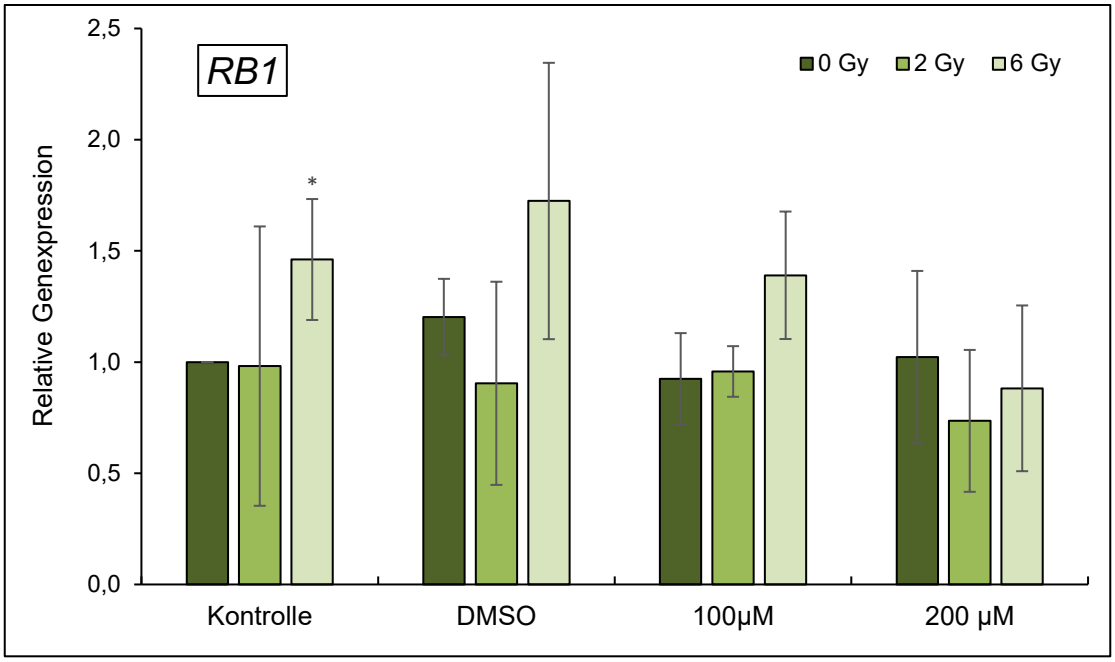

Abb. 21: Expression des Gens *RB1* in den T98G-Zellen in Abhängigkeit von einer Bestrahlung sowie unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin. Normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin). Für die relative Quantifizierung diente *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dargestellt sind MW ± SD (n=3); *= $p \leq 0,05$ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Wie aus der Abb. 21 ersichtlich ist, hatte die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy eine um 46 % erhöhte Expression des *RB1*-Gens zur Folge. Dieses Ergebnis war zudem signifikant ($p \leq 0,05$). Die alleinige Zugabe des Piperins ohne Bestrahlung zeigte keine wesentliche Änderung im Expressionsverhalten. Auch nach Behandlung mit 200 µM Wirkstoff war keine signifikante Änderung nachweisbar.

Eine Kombination aus ionisierender Strahlung sowie Piperin ging nach Zugabe von 200 µM sowie nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy mit einer leichten Reduktion der relativen Genexpression einher, wobei die Ergebnisse ebenfalls nicht signifikant waren, sodass die vorliegenden Daten keine hinreichend sicheren Aussagen bezüglich der Beeinflussung des Expressionsverhaltens durch das Piperin erlauben.

Ferner wurde die Expression des Gens *CDKN1B* in den T98G-Zellen untersucht, wobei die Ergebnisse in der nun folgenden Abb. 22 veranschaulicht sind.

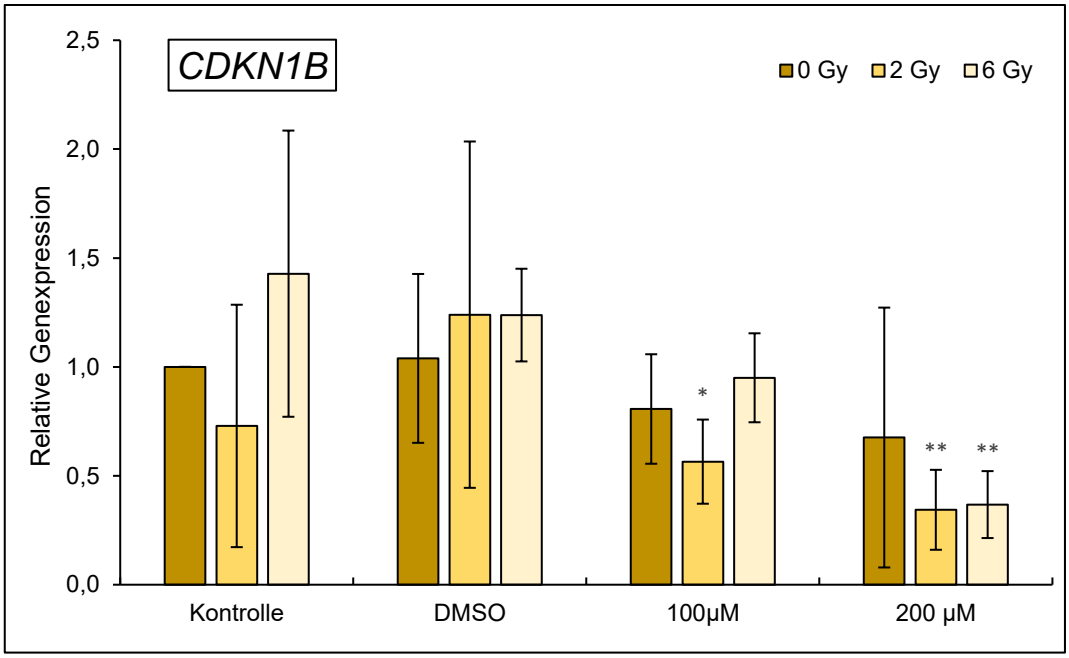

Abb. 22: Expression des Gens *CDKN1B* in den T98G-Zellen in Abhängigkeit von einer Bestrahlung sowie unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin. Normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin). Für die relative Quantifizierung diente *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dargestellt sind MW ± SD (n=3); *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Der Abb. 22 ist zu entnehmen, dass die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy eine erhöhte Expression des Gens *CDKN1B* zur Folge hatte. Wurden die nicht mit Piperin behandelten T98G-Zellen mit 2 Gy bestrahlt, kam es entgegen der Erwartung, zu einer Reduktion der relativen Expression . Beide Ergebnisse waren jedoch durch eine hohe Standardabweichung gekennzeichnet und somit unter Vorbehalt zu sehen.

Wurden die nicht bestrahlten Zellen nur mit Piperin behandelt, zeigte sich eine Abnahme der Genexpression. Auch hier konnte aufgrund der Varianz zwischen den Versuchen kein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Das Lösungsmittel DMSO hatte keinen signifikanten Einfluss.

Die kombinierte Behandlung der T98G-Zellen mittels ionisierender Strahlung und Piperin zeigte eine deutliche Abnahme der relativen Genexpression des *CDKN1B*-Gens. Diese war in den Ansätzen, welche mit 2 Gy und 100 µM Wirkstoff behandelt wurden, signifikant um 43 % reduziert. Wurde die Piperinkonzentration auf 200 µM erhöht, konnte in den mit 2 Gy bestrahlten Zellen eine relative Expression von 34 % berechnet werden, was somit einer signifikanten Reduktion um 66 % entsprach ($p \leq 0,05$). Wurden die T98G-Zellen mit 200 µM Piperin behandelt und bestrahlt konnte eine signifikante Reduktion der relativen Genexpression (2 Gy: 0,34; 6 Gy: 0,37) ermittelt werden.

3.5.2 Genexpression der FaDu-Zellen

Die Untersuchung der relativen Genexpressionen für die beiden Tumorsuppressorgene *RB1* sowie *CDKN1B* erfolgte für die Tumorzelllinie FaDu analog zu den T98G-Zellen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abb. 23 und 24 dargestellt.

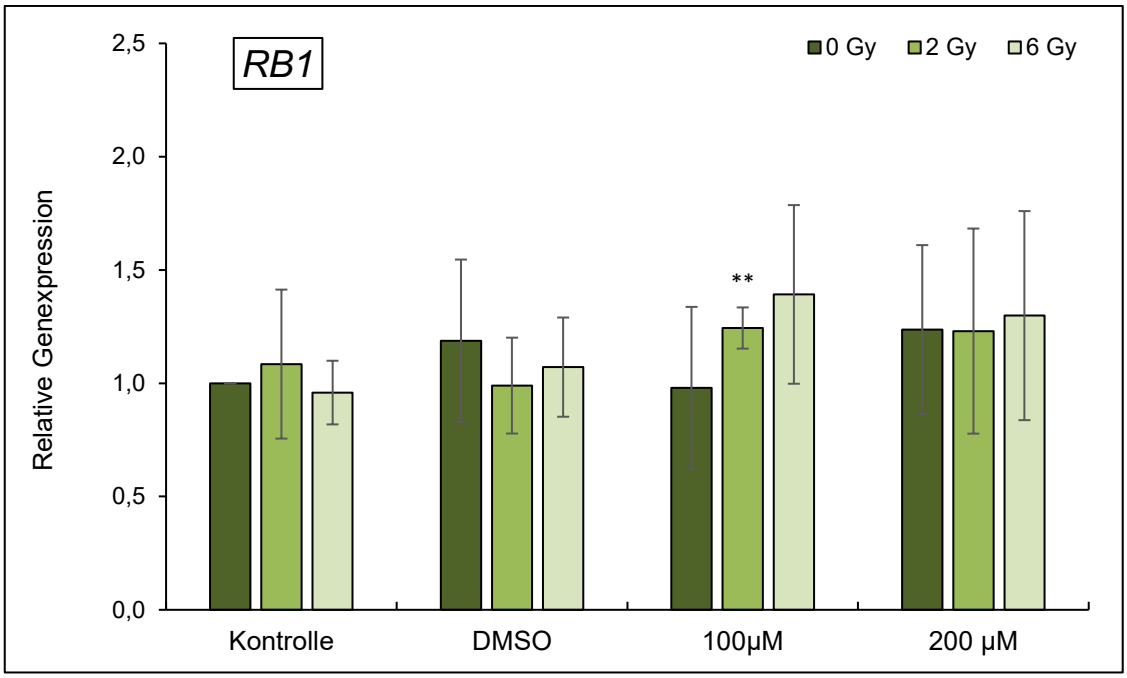

Abb. 23: Expression des Gens *RB1* in den FaDu-Zellen in Abhängigkeit von einer Bestrahlung sowie unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin. Normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin). Für die relative Quantifizierung diente *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dargestellt sind MW ± SD (n=3); **= p ≤ 0,01 bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Wie die Abb. 23 verdeutlicht, können anhand der vorliegenden Daten bezüglich der *RB1*-Expression in den FaDu-Zellen aufgrund der hohen Standardabweichungen keine sicheren Aussagen für alle Datenpunkte getroffen werden. Es zeigte sich eine Erhöhung der relativen Genexpression nach alleiniger Zugabe des Wirkstoffs mit 200 µM. Diese Änderung war jedoch nicht signifikant. Die alleinige Bestrahlung der FaDu-Zellen erbrachte keine signifikante Änderung der RB1-Expression. Die Kombination von Bestrahlung und Piperin führte ebenfalls zu einer Genexpressionserhöhung. Eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression um 24 % ließ sich jedoch lediglich nach einer Bestrahlung mit 2 Gy und Zugabe von 100 µM ermitteln.
Anhand der vorliegenden Daten ließen sich aufgrund der hohen Standardabweichungen keine sicheren Aussagen hinsichtlich des Genexpressionsverhaltens treffen, sodass weitere Untersuchungen nötig sind.

Die nachfolgende Abb. 24 verdeutlicht die relative Expression des *CDKN1B*-Gens in den FaDu-Zellen.

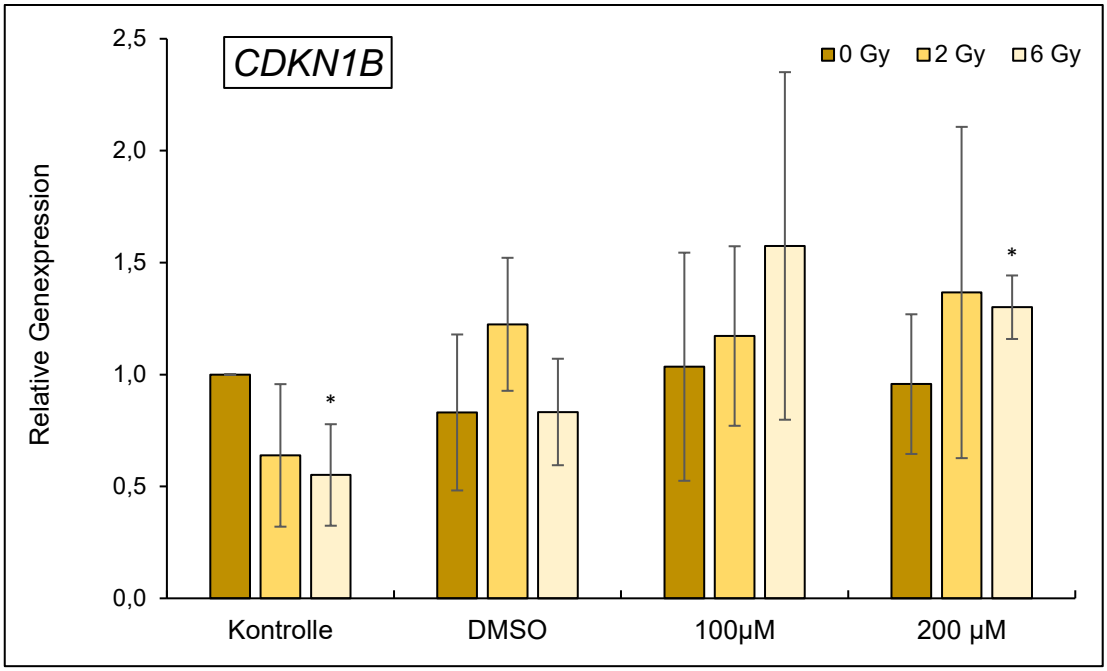

Abb. 24: Expression des Gens *CDKN1B* in den FaDu-Zellen in Abhängigkeit von einer Bestrahlung sowie unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin. Normiert auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 µM Piperin). Für die relative Quantifizierung diente *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dargestellt sind MW ± SD (n=3); *= $p \leq 0,05$ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Der Abb. 24 ist zu entnehmen, dass die FaDu-Zellen nach einer alleinigen Bestrahlung mit 6 Gy ohne den Einfluss des Piperins eine signifikant verminderte Expression des *CDKN1B*-Gens von um 45 % zeigten. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy (ohne Zugabe von Piperin) erbrachte aufgrund der hohen Standardabweichung keine signifikante Änderung des Expressionsverhaltens. Ein relevanter Lösungsmitteleffekt durch das DMSO war nicht zu erkennen. Signifikante Änderungen der relativen Genexpression nach alleiniger Zugabe des Wirkstoffs zeigten sich nicht.

Die Kombination aus Bestrahlung und Piperin führte in den FaDu-Zellen zu einer gesteigerten *CDKN1B*-Expression. Anhand der vorliegenden Daten waren die Aussagen hinsichtlich des Genexpressionsverhaltens nach einer Kombination aus Piperin und Bestrahlung aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nur unter Vorbehalt möglich. Lediglich nach einer Bestrahlung mit 6 Gy sowie der Zugabe von Piperin in einer Konzentration von 200 µM zeigte sich, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, eine signifikante Erhöhung der *CDKN1B*-Expression um 30 % ($p \leq 0,05$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe zellbiologischer Methoden die Wirkung von Piperin auf die Tumorzelllinien T98G, welche einem Glioblastom entstammt, sowie auf die FaDu-Zellinie aus einem Hypopharynxkarzinom hinsichtlich eines zytotoxischen sowie strahlensensibilisierenden Effekts untersucht.

4.1 Zellwachstum

Durch die Aufnahme von Wachstumskurven konnte einerseits das native Wachstum der jeweiligen Zelllinie ohne Wirkstoffzugabe und andererseits die Wachstumskinetik nach Zugabe des Piperins in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden. Ziel dieser Methode war es zudem geeignete Wirkstoffkonzentrationen für die nachfolgenden Versuche zu ermitteln.
Allgemein werden bei der Darstellung einer Wachstumskurve vier unterschiedliche Phasen unterschieden. Direkt nach der Aussaat der Zellen beginnt eine Latenzphase (kurz lag-Phase). In dieser Phase müssen sich die Zellen an ihre neue Umgebung adaptieren und teilen sich daher kaum.
Bei der sich anschließenden log-Phase handelt es sich um eine Phase des exponentiellen Wachstums. Die Zellen wachsen mit maximaler Teilungsrate. In dieser Phase ist es möglich, die sog. Populationsverdopplungszeit zu bestimmen. Dabei handelt es sich um das Zeitintervall, in der es zu einer Verdopplung der Zellzahl kommt.
Mit zunehmender Zellzahl kommt es zu einer Reduzierung des Nährstoffangebots in dem Kulturmedium. Bei adhärent wachsenden Zellen hemmt zudem die Kontaktinhibition das weitere Wachstum. Es kommt zum Absterben von Zellen, wobei auch toxische Zerfallsprodukte entstehen. In der sich nach dem exponentiellen Wachstum anschließenden stationären Phase (auch Plateauphase genannt) halten sich absterbende sowie proliferierende Zellen zunehmend die Waage, bis mit der Zeit die Zahl der absterbenden Zellen überwiegt und die Kultur in die Absterbephase übergeht. In der Plateauphase ist es möglich, die maximal erreichbare Zelldichte (Sättigungsdichte) einer Zellkultur zu bestimmen.

4.1.1 Natives Wachstum der T98G-Zellen und der FaDu-Zellen

Die Wachstumskurven ohne den Einfluss des Wirkstoffs Piperin zeigten einen annähernd typischen Verlauf. Eine lag-Phase war lediglich bei den T98G-Zellen über einen Zeitraum von 24 h nach Beginn des Versuchs zu erkennen. Die Wachstumskurve der FaDu-Zellen zeigte keine klassische lag-Phase.

Die Populationsverdopplungszeit der T98G-Zellen betrug 26,3 h. Dieser Wert entspricht nahezu dem bei der Etablierung dieser Zelllinie beschriebenen Wert von 26 h (STEIN, 1979).
Für die FaDu-Zellen konnte eine Populationsverdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase von 27,7 h ermittelt werden. Laut der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) liegt diese bei ca. 30 h. Ursächlich für diese zeitlichen Differenzen können andere Millieubedingungen sein, wie die Zusammensetzung des Mediums und die Kultivierung im Begasungsbrutschrank. Laut DSMZ wurden dem Medium der FaDu-Zellen keine weiteren Zusätze außer FBS hinzugefügt. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden dem Medium der FaDu-Zellen jedoch Zusätze wie HEPES, nicht-essenzielle Aminosäuren sowie Natriumpyruvat supplementiert, welche unter anderem unterstützend auf den aeroben Energiestoffwechsel wirken und so ein verstärktes Wachstum bedingen können.
In beiden Zelllinien kam es ca. nach 6 Tagen zu einem beginnenden Sättigungsverhalten und damit zur Einleitung einer Plateauphase. Eine Plateauphase selbst war im untersuchten Zeitraum jedoch nicht zu beobachten.

4.1.2 Zellwachstum unter Einfluss von Piperin

Für beide Zelllinien konnte unter dem Einfluss von Piperin eine dosis- und zeitabhängige Wachstumsverzögerung nachgewiesen werden.
Bei den **T98G-Zellen** zeigte sich drei Tage nach einer Behandlung mit Piperin ab einer Konzentration von 150 µM eine Wachstumshemmung, welche nach Zugabe von 200 µM sogar statistisch signifikant war. Fünf Tage nach Wirkstoffzugabe konnten auch für geringere Piperinkonzentrationen von 25 µM, 50 µM, 75µM sowie 100 µM eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum nachgewiesen werden.
Der IC_{50}-Wert lag nach einer sechstägigen Inkubation bei 133 µM. Vergleichbare IC_{50}-Werte konnten nach einer 48-stündigen Inkubation in der Bronchialkarzinomzelllinie A549 mit 122 µM Piperin (LIN et al., 2014) sowie nach 24 h in der Prostatakarzinomzelle PC3 mit 110 µM Piperin (OUYANG et al., 2013) beobachtet werden.
Ein komplettes Sistieren des Zellwachstums der T98G-Zellen konnte bis 200 µM nicht beobachtet werden, wobei die Populationsverdopplungszeit jedoch deutlich verlängert wurde. Zudem kam es unter dem Einfluss der höchsten Piperinkonzentration (200 µM) nach 6 Tagen zu einer Reduktion des Anteils an vitalen Zell um 72 %.
Bei den **FaDu-Zellen** war der wachstumsverzögernde Effekt früher als in der Zelllinie T98G erkennbar. Die Wachstumshemmung war bereits nacheiner 48-stündigen Inkubation ab einer Piperinkonzentration von 50-75 µM deutlich zu erkennen und für die 75 µM-Konzentration statistisch signifikant. Der IC_{50}-Wert lag nach einer sechstägigen Inkubation mit Piperin bei 74 µM

und damit deutlich unter dem IC_{50}-Wert der T98G-Zellen (133 µM). Somit waren die FaDu-Zellen hinsichtlich ihres Wachstums sensibler gegenüber Piperin als die T98G-Zellen.
In der Literatur konnte für die Oropharynxkarzinomzelllinie KB nach einer Inkubationszeit von 24 h ein IC_{50}-Wert von 124 µM ermittelt werden (SIDDIQUI et al., 2017). Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnte für die Zelllinie FaDu nach einer Inkubationszeit von 48 h ein IC_{50}-Wert von 176 µM berechnet werden. Somit zeigte sie Zelllinie KB ein früheres Ansprechen bei geringeren Piperinkonzentrationen. Im Vergleich zu den FaDu-Zellen war die Oropharynxkarzinomzelllinie KB damit sensibler bezüglich einer Wachstumshemmung.
Für die Zelllinie T98G konnten hinsichtlich der Vitalität unter dem Einfluss von Piperin ähnliche Beobachtungen durch den MTT-Assay gemacht werden (JEONG et al., 2020), bei dem durch die Aktivitätsuntersuchung mitochondrialer bzw. zytosolischer Dehydrogenasen auf die Zellvitalität geschlossen wird. In der Arbeit von JEONG et al. (2020) konnte bei Piperinkonzentrationen von 100 µM - 200 µM eine deutliche Reduktion der Zellvitalität gezeigt werden. Die Ergebnisse wurde durch diese Arbeitsgruppe zudem für die Glioblastomzelllinie U251-MG gezeigt. Eine signifikante Wachstumshemmung konnte in dieser Zelllinie bereits ab einer Piperinkonzentration von 50 µM erzielt werden. Ferner wurde durch diese Arbeitsgruppe wie in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein zeitabhängiger Effekt des Piperins bestätigt. Eine 24-stündige Inkubation mit 50µM Piperin reduzierte das Wachstums um ca. 30 %, während eine Inkubationszeit von 72 h mit der gleichen Wirkstoffkonzentration das Wachstum um nahezu 60 % reduzierte.
Neben den Wachstumsuntersuchungen unter Einfluss des Piperins auf die Glioblastomzellen ist eine Wachstumsinhibition für diverse weitere Zelllinien in der Literatur beschrieben. So konnte beispielsweise ein hemmender Effekt auf das Zellwachstum bei mehreren Mammakarzinomzelllinien (T-47D, MDA-MB-468, MCF-7) ab einer Konzentration von 50 µM Piperin (72 h Inkubation) nachgewiesen werden (GREENSHIELDS et al., 2014). Hier zeigte sich ebenfalls eine zeitabhängige Zytotoxizität des Piperins. Für die MDA-MB-468-Zelllinie, welche 144 h mit 75 µM behandelt wurde, konnte der gleiche wachstumshemmende Effekt wie nach 72 h mit 150 µM Piperin nachgewiesen werden.
Anhand der vorliegenden Daten zeigte Piperin, abhängig von der Tumorzelllinie, ein etwas unterschiedliches Ansprechen. Für beide untersuchten Tumorzelllinien konnte ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Dies spiegelte sich auch in einem deutlichen und dosisabhängigen Anstieg der toten Zellen in den Anfangsphasen der Wachstumskurven wieder.
Mit Hilfe der Untersuchung des Zellwachstums können jedoch keine Aussagen über die möglichen Mechanismen der Wachstumshemmung getroffen werden. Die Ursachen dieser durch Piperin induzierten Wachstumshemmung scheinen jedoch multifaktoriell bedingt zu sein. In der Literatur wurde vielfach ein apoptoseinduzierender Effekt des Piperins beschrieben, wobei Piperin sowohl den extrinsischen als auch in intrinsischen Signalweg der Apoptose zu beeinflussen scheint. Unter anderem konnten erhöhte Aktivitäten der Caspase 3 und 9, z.B. bei Ovarialkarzinomzellen (QUI et al., 2019) und bei Kolonkarzinomzellen HT-29 (YAFFE et al., 2013)

nach Zugabe des Piperins nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich beispielhaft in Mammakarzinomzelllinien der intrinsische, mitochondriale Signalweg des programmierten Zelltods alteriert. Es konnte eine Zunahme proapoptotischer Proteine wie Bax (Bcl-2 associated X protein) nachgewiesen werden (KHAMIS et al., 2018). Nachfolgend zeigte sich auch eine Erhöhung weiterer proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom c und Smac/DIABLO, welche caspaseaktivierende Wirkungen haben (GREENSHIELDS et al., 2015).

Die Zunahme der toten Zellen war in dieser Arbeit insbesondere bei den T98G-Zellen dosisabhängig erst ab einer Konzentration von 100 µM zu erkennen. Im Hinblick auf eine Apoptoseinduktion konnte ein ähnliches Ergebnis bereits publiziert werden. Eine Behandlung der T98G-Zellen mit 50 µM Piperin hatte keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen (JEONG et al., 2020).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten den Anstieg der toten Zellen während der Initialphase in der Zelllinie FaDu bereits ab einer Wirkstoffkonzentration von 25 µM. Eine verstärkte Apoptose als Ursache kann erneut diskutiert werden. So konnte an der zuvor beschriebenen Oropharynxkarzinomzelllinie KB eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen werden, wodurch es zu einem Verlust des mitochondrialen Potenzials kam und in der Konsequenz ebenfalls der programmierte Zelltod ausgelöst wurde (SIDDIQUI et al., 2017).

Neben dieser Apoptoseinduktion wurde auch ein Arrest des Zellzyklus, sowohl am Restriktionspunkt der G_2/M-Phase bei MCF-7-Zellen (KHAMIS et al., 2018), als auch am Übergang von der G_0- in die G_1-Phase bei Prostatakarzinomzellen (GEORGE et al., 2019) beschrieben, wodurch eine zelluläre Seneszenz bzw. eine Einleitung der Apoptose hervorgerufen wurde.

Um die Ergebnisse der *In-vitro*-Analysen *in vivo* zu bestätigen, sollten weitere Versuche am Tiermodell folgen. Eine wachstumsverzögernde Wirkung des Piperins konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden. Nach lokaler Injektion des Piperins in das Tumorgewebe zeigte sich im Mausmodell ein verringertes Tumorwachstum von Brustkrebszellen (welche) mit reduzierter pulmonaler Metastasierung (LAI et al., 2012). Weitere *In-vivo*-Versuche mit Prostatakarzinomzellen (SAMYKUTTY et al., 2013) sowie bei Melanomen (YOO et al., 2019) konnten nach Verabreichung des Piperins ebenfalls ein vermindertes Tumorwachstum nachweisen.

4.2 Klonogenes Überleben

Mit Hilfe des Koloniebildungstests konnte das klonogene Überleben der Tumorzellen *in vitro* untersucht werden. Die aus den Ergebnissen des koloniebildenden Tests gewonnenen Zellüberlebenskurven lassen Rückschlüsse auf die Strahlensensibilität der Zellen zu.

In den ohne Wirkstoff behandelten Zellen führte eine steigende Strahlendosis in beiden Zelllinien zu einer Abnahme des Überlebens. Damit konnte sowohl für die T98G- als auch für die FaDu-Zellen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung im Hinblick auf die Behandlung mit ionisierender Strahlung nachgewiesen werden. Der Anteil klonogener Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy kann als SF_2-Wert angegeben werden und dient als Maß für die Strahlensensibilität einer Zelllinie. Für die Zelllinie T98G konnte ein SF_2-Wert von 0,66 ermittelt werden. Für diese Glioblastomzelllinie sind in der Literatur mit 0,7 (SHORT et al., 2007) sowie 0,8 (MURAD et al., 2018) etwas höhere Werte beschrieben.

Die FaDu-Zellen zeigten sich mit einem berechneten SF_2-Wert von 0,75 strahlenresistenter als die T98G-Zellen. Ähnliche Werte von 0,71 wurden durch SHAO et al. (2015) publiziert. Beide untersuchten Zelllinien können aufgrund der ermittelten SF_2-Werte als strahlenresistent angesehen werden (DEACON et al., 1984).

Die zelluläre Strahlensensibilität ist u. a. abhängig von der Fraktionierung der Strahlendosis, der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit, welche genetisch determiniert ist, der Sauerstoffkonzentration (sog. Sauerstoffeffekt) sowie von der Zellzyklusphase, in welcher sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden. Zellen am G_1/S- und am G_2/M-Übergang sowie während der Mitose gelten als besonders empfindlich (HERMANN et al., 2005).

Nach Zugabe des Wirkstoffs Piperin konnten synergistische Effekte aus der Kombination von Bestrahlung und Piperin anhand der Zellüberlebenskurven beobachtet werden. Für beide Zelllinien konnte durch das Piperin in höheren Konzentrationen ein strahlensensibilisierender Effekt nachgewiesen werden. Die Hypopharynxkarzinomzelllinie FaDu zeigte bereits nach Bestrahlung mit 2 Gy und unter dem Einfluss von 150 µM sowie 200 µM Piperin eine signifikante Radiosensibilisierung. Wurde die Strahlendosis auf 4 Gy erhöht, war ein strahlensensibilisierender Effekt bereits ab einer Wirkstoffkonzentration von 100 µM statistisch signifikant. Für die Zelllinie T98G konnte eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens nach Zugabe von 150 µM sowie 200 µM und nach Bestrahlung mit 2 Gy ermittelt werden. Geringere Piperinkonzentrationen hatten trotz Erhöhung der Strahlendosis keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das klonogene Überleben.

Die Definition des klonogenen Überlebens spielt insbesondere in der Strahlenbiologie eine herausragende Rolle. Als klonogen sind solche Zellen zu bezeichnen, welche multiple Zellteilungen durchlaufen und somit Kolonien von mindestens 50 Zellen bilden können. Der Endpunkt von 50 Zellen pro Kolonie setzt dabei auch eine Teilung von Tochterzellen voraus (WANNENMACHER et al., 2006). Ionisierende Strahlung oder andere toxische Agenzien können

zum Verlust der reproduktiven Integrität der Tumorzellen führen und bedingen dadurch den klonogenen Zelltod, welcher multifaktoriell bedingt ist. Hauptverantwortlich ist nach heutigem Kenntnisstand insbesondere in der Strahlentherapie der sog. Mitosetod. Dabei bleiben die Zellen nach Einwirkung der ionisierenden Strahlen zunächst intakt, sowohl was ihre Morphologie als auch die metabolische Aktivität betrifft. Teilweise können diese Zellen sogar noch wenige Zellteilungen durchführen. Durch die beschädigte DNA werden jedoch vermindert Proteine exprimiert, welche für die Proliferation notwendig sind bzw. kommt es durch Chromosomenaberrationen zu einer verhinderten Teilungsfähigkeit (HERMANN et al., 2005).
Alternativ können Zellen durch eine initiale Apoptose untergehen, wobei die Mitosephase im Zellzyklus noch nicht erreicht wurde (sog. Interphasetod). Ferner kann der Einfluss ionisierender Strahlung eine vorzeitige Differenzierung von Zellen bedingen, welche dann ebenfalls nicht mehr in der Lage sind, Kolonien zu bilden. Dieser Mechanismus spielt u.a. bei radiogen bedingten Fibrosen eine Rolle (HERRMANN et al., 2005).
Untersuchungen hinsichtlich eines radiosensibilisierenden Effekts durch Piperin wurden für die beiden untersuchten Zelllinien T98G und FaDu bisher nicht publiziert. Eine erhöhte Strahlenwirkung konnte jedoch für die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 nachgewiesen werden (GREENSHIELDS et al., 2014). In diesen Untersuchungen zeigte sich bereits nach einer Behandlung mit 25 µM Piperin ein strahlensensibilisierender Effekt nach dosen von 4 Gy und 6 Gy. Ähnliche Versuche erfolgten auch für die Zelllinie HT-29 eines kolorektalen Karzinoms (SHAHEER et al., 2020). Diese etablierte Zelllinie zeigte nach einer Piperinbehandlung ebenfalls eine verstärkte Radiosensibilität. Als ursächlicher Mechanismus konnte ein Zellzyklusarrest am Übergang der G_2- in die M-Phase nachgewiesen werden. Dieser sog. G_2/M-Block stellt eine bekannte biologische Wirkung ionisierender Strahlung dar (HWANG et al., 1998). Dabei ist die Dauer dieses temporären Blocks abhängig von der Zelllinie sowie der Bestrahlungsdosis. Sind die Zellen nicht in der Lage, die strahleninduzierten Schäden zu reparieren, kann der programmierte Zelltod eingeleitet werden.
Eine verstärkte Apoptose, insbesondere des mitochondrial vermittelten Weges, wurde durch SHAHEER et al. (2020) als weiterer strahlensensibilisierender Mechanismus durch Piperin diskutiert. Dabei konnte eine Hochregulierung proapoptotischer Proteine wie Bax sowie eine verminderte Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Untersuchungen an der murinen Melanomzelllinie B16F10. Mittels Western-Blot-Analyse zeigte sich nach einer Zugabe von Piperin in einer Konzentration von 30 µM sowie nach einer Bestrahlung mit 5 Gy eine deutlich vermehrte Spaltung der Effektorcaspase 3 (TAK et al., 2012). Diese proapoptotischen Wirkungen des Piperins konnten multipel auch an unbestrahlten Zellen, wie z. B. Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden (ZENG et al., 2018).
Ferner konnte durch den Wirkstoff Piperin eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Bestrahlung bewiesen werden (TAK et al., 2012). Die Generierung von

Sauerstoffradikalen nach Einwirkung ionisierender Strahlung stellt eine wichtige radiobiologische Wirkung dar (HERMANN et al., 2005). Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) schädigen Moleküle jeglicher Art. So kann es u. a. zu Strangbrüchen innerhalb des DNA-Moleküls, zu Proteinmodifizierungen und zur Oxidation von Lipidmolekülen kommen, wobei diese Prozesse als oxidativer Stress zusammengefasst werden (LÖFFLER et al., 2014). Erhöhte ROS-Level können durch ausgeprägte Zellschädigung die Apoptose einleiten (REDZA-DUTORDOIR et al., 2016). An murinen Melanomzellen (B16F10) sowie Kolonkarzinomzellen (CT26) konnte nach Bestrahlung eine Alteration des mitochondrialen Potenzials durch die verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen nachgewiesen werden. Die Generierung reaktiver Sauerstoffmoleküle war nach Zugabe von Piperin signifikant erhöht (TAK et al., 2012).

Zusammenfassend konnte durch das Piperin ein radiosensibilisierender Effekt in den Tumorzelllinien T98G und FaDu nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen aus der Literatur für andere etablierte Zelllinien deckt.

4.3 Zellproliferation

Eine Beurteilung der Proliferation der T98G- sowie FaDu-Zellen war mittels BrdU-Assay möglich. Durch die Inkorporation des Thymidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) kann die Proliferation in der S-Phase des Zellzyklus mittels Enzymimmunoassay detektiert werden und die ursächlichen Mechanismen beispielsweise der mittels Wachstumskurven und Koloniebildungstest beobachteten Ergebnisse weiter eingeordnet werden.

Proliferationshemmende Effekte zeigten sich in beiden untersuchten Zelllinien nach einer alleinigen Bestrahlung. In der Zelllinie T98G reduzierte sich die Proliferation der unbehandelten Kontrolle (100 %) statistisch signifikant auf 71 % nach einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy. In den FaDu-Zellen zeigte sich eine signifikante Proliferationshemmung auf 89 % ab einer Dosis von 4 Gy. Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy konnte in den FaDu-Zellen eine Proliferation von 75 % im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle berechnet werden.

MURAD et al. (2018) publizierten für die Zelllinie T98G eine Inhibition der Proliferation nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Autoren beschrieben einen G_2/M-Arrest als Ursache dafür. Allgemein gilt die Zelllinie T98G als relativ strahlenresistent. YAO et al. (2003) untersuchte mehrere etablierte Glioblastomzelllinien hinsichtlich ihrer Radiosensibilität. Die Zelllinie T98G zeigte sich im direkten Vergleich als besonders resistent gegenüber ionisierender Strahlung. Eine Hemmung der Zellproliferation konnte ebenfalls erst ab einer Bestrahlungsdosis von 10 Gy detektiert werden. Eine Bestrahlung mit 5 Gy hatte keinen signifikanten Effekt (YAO et al., 2003).

RESENDEZ et al. (2019) untersuchten ebenfalls die Proliferationskapazität der FaDu-Zellen unter dem Einfluss ionisierender Strahlung. Dabei zeigte sich keine relevante Reduktion der Proliferation nach Bestrahlung mit 2,5 Gy, wohingegen die Erhöhung der Dosis auf 5 Gy die

Proliferation um ca. 25 % reduzierte. Deutlich sensibler präsentierte sich eine weitere Zelllinie eines Plattenepithelkarzinoms des Oropharynx (SCC-25). Für diese Zelllinie konnte eine Proliferation von 40 % nach Bestrahlung mit 5 Gy im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle ermittelt werden (RESENDEZ et al., 2019).
Für die FaDu-Zellen wurde eine Mutation des p53-Proteins beschrieben (REISS et al., 1992), einem wichtigen Tumorsuppressor am G_1-Checkpoint. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen nach einer Bestrahlung p53-abhängig in einen G_1-Arrest eintreten (DI LEONARDO et al., 1994). Mutationen des p53-Gens können zu einem Verlust der Kontrollfunktion nach der G_1-Phase führen, sodass die Zelle unter Umständen einen verminderten G_1-Arrest nach einer Bestrahlung zeigen kann. Da durch den BrdU-Assay die Proliferation während der nachfolgenden Zellzyklusphase detektiert wird, kann dies als mögliche Ursache für die tendenziell vermehrte BrdU-Inkorporation der FaDu-Zellen im Vergleich zu den T98G-Zellen diskutiert werden.

Für beide Zelllinien konnte ein proliferationshemmender Effekt durch das Piperin nachgewiesen werden, wobei dieser in der Zelllinie FaDu deutlicher ausgeprägt war. Nach Zugabe des Wirkstoffs Piperin in einer Konzentration von 50 µM wurde die Proliferation in beiden untersuchten Zelllinien signifikant reduziert. Eine weitere signifikante Verminderung der Proliferation konnte in der Zelllinie T98G aufgrund der hohen Standardabweichung nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für die zum Teil abweichenden Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen und damit die ermittelte Standardabweichung kann in der Abhängigkeit der gemessenen Extinktion von der initial eingesäten Zellzahl pro Well, der zum Zeitpunkt der BrdU-Zugabe noch vorhandenen Anzahl an vitalen Zellen sowie dem Anteil proliferierender Zellen begründet sein.
Im Gegensatz dazu zeigte sich in den FaDu-Zellen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. So konnte beispielsweise die Proliferation nach Zugabe von 150 µM Piperin signifikant auf 58 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%) reduziert werden. Mit einer Reduktion auf 85 % war dieser Effekt unter der gleichen Wirkstoffkonzentration in der Zelllinie T98G deutlich weniger ausgeprägt und nicht statistisch signifikant.
Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen aus den Wachstumsversuchen. In den Wachstumskurven konnte ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Effekt des Piperins nachgewiesen werden, wobei sich die FaDu-Zellen auch in diesen Versuchen deutlich sensibler als die T98G-Zellen zeigten.
Ein bereits weiter oben ausführlich dargestellter G_1-Arrest durch die Behandlung mit Piperin würde zu einem reduziert gemessenen BrdU-Einbau führen. Tatsächlich konnten Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen ebenfalls einen proliferationshemmenden Effekt durch Piperin in diversen Zelllinien bestätigen. In diesem Zusammenhang konnte sowohl ein G_1- als auch ein G_2/M-Arrest nachgewiesen werden. In humanen Melanomzellen (SK MEL 28) kam es unter dem Einfluss von Piperin zu einer Blockade des Zellzyklus in der G_1-Phase. Als mögliche

ursächliche Mechanismen konnten eine reduzierte Expression von Zyklin D und E2F-1 sowie ein verstärkter Nachweis des CDK-Inhibitors $p21^{Cip1}$ nachgewiesen werden (FOFARIA et al., 2014). Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen an der Zelllinie HT-29 (YAFFE et al., 2015). In diesen Untersuchungen zeigten sich auch eine verlängerte Blockade des Zellzyklus nach der G_1-Phase, welche mit einer verminderten Expression der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 sowie einer vermehrten Expression der CDK-Inhibitoren $p21^{Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ einherging. Somit stellt der durch Piperin induzierte G_1-Arrest eine mögliche Ursache für die in dieser Arbeit gemessene Proliferationshemmung dar. Zur Bestätigung dieser Hypothese wäre eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie denkbar. Mit dieser Methode ist es möglich, die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen darzustellen.

Die kombinierte Behandlung mit ionisierender Strahlung und dem Wirkstoff Piperin hatte für beide Zelllinien eine synergistische Wirkung im Hinblick auf die Proliferationshemmung. Beispielsweise wurde in der Zelllinie FaDu nach Bestrahlung mit 2 Gy unter Einfluss von 200 µM Piperin die Proliferation um 42 % gemindert. Wurden die FaDu-Zellen lediglich mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, ergab sich hingegen eine Proliferationshemmung von nur 3 % und nach alleiniger Behandlung mit 200 µM Wirkstoff von 35 %. Durch die Erhöhung der Bestrahlungsdosis auf 8 Gy und unter dem Einfluss der gleichen Wirkstoffkonzentration reduzierte sich die Proliferation sogar um 61 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, sodass Synergien in diesen Ansätzen noch deutlicher waren. Nach alleiniger Bestrahlung mit 8 Gy ergab sich eine Proliferationshemmung von nur 31 %, nach alleiniger Zugabe von 200 µM, wie oben erwähnt, 35 %. Bezogen auf die nicht bestrahlte Zellpopulation, welche ebenfalls mit 200 µM Piperin behandelt wurde, war die Proliferationshemmung ab einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy signifikant.
Dieser synergistische Effekt ließ sich in der Zelllinie T98G ebenfalls erkennen, allerdings konnte ab einer Piperinkonzentration von 150 µM sowie einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy die Proliferation durch Erhöhung der Wirkstoffkonzentration bzw. der Bestrahlungsdosis nicht weiter signifikant reduziert werden. Die ermittelten Ergebnisse für die Zelllinie T98G gingen gerade im Bereich höherer Wirkstoffkonzentrationen (z.B. 200 µM) mit einer erhöhten Standardabweichung einher, sodass die Proliferationshemmung kritisch diskutiert werden muss.
Eine gesteigerte Proliferationshemmung durch ionisierende Strahlung konnte auch durch SHAHEER et al. (2020) für die Zelllinien A549 (Bronchialkarzinom) sowie HT-29 (Kolorektales Karzinom) nachgewiesen werden. Für die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 konnte so nach Zugabe von 25 µg/ml Piperin und nach Bestrahlung mit nur 1,25 Gy die relative Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um fast 60 % reduziert werden. Eine Verstärkung des Bestrahlungseffektes um ca. 20 % verbunden mit einer verminderten Proliferation wurde auch anhand der murinen Kolonkarzinomzelllinie CT26 bestätigt (TAK et al., 2012). Diese proliferationshemmenden Effekte konnten durch die Arbeitsgruppe um SHAHEER et al. (2020)

auch für die Bronchialkarzinomzelllinie A549 bestätigt werden, wobei sich die nicht so sensibel wie die Zelllinie HT-29 zeigte.

4.4 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen bzw. deren Reparatur nach einer Bestrahlungsexposition und/oder unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin wurde der γ-H2AX-Assay angewendet. Dieser Assay stellt eine der wichtigsten Methoden zur indirekten Visualisierung sowie zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar.

Bei Betrachtung der Ergebnisse des γ-H2AX-Assays für die Zelllinien T98G und FaDu fiel eine geringe Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen bereits in den Kontrollansätzen auf, welche weder bestrahlt noch mit Wirkstoff behandelt wurden. Durchschnittlich konnten für beide Zelllinien 1- 2 Foci pro Zellkern in den Kontrollproben ausgezählt werden. Diese Tatsache, dass sich γ-H2AX-Foci auch in nicht behandelten Zellen detektieren ließen, lässt sich u.a. im Rahmen einer genetischen Instabilität in den Tumorzellen erklären. Die Lokalisation des H2AX-Gens (11q23) zeigt sich in Tumorzellen häufig mutiert, was zu einem 3-fachen Anstieg der γ-H2AX-Konzentration führt (BANNATH et al., 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) in Tumorzellen durch Autophosphorylierung konstitutiv aktiv ist, wodurch nachgeschaltete Proteine wie p53 oder H2AX vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert werden. Dabei ist die Phosphorylierungsrate des H2AX sowie diverser Proteinkinasen insbesondere in den frühen Tumorstadien deutlich erhöht und nimmt mit zunehmender Progression ab (BARTKOVA et al., 2005). Die Anzahl konstitutiver γ-H2AX-Foci ist unter anderem von der Zelllinie sowie der Zellzyklusphase abhängig. So konnten HUANG et al. (2006) für die Bronchialkarzinom-Zelllinie A549 mehr Foci detektieren als für die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. In der S-Phase bzw. am G_2/M-Übergang zeigte sich ein höheres Level an γ-H2AX-Foci. Diese Beobachtung konnte auch für die humane Gliomzelllinie U87 gemacht werden (MACPHAIL et al., 2003). Aber auch in Normalgewebszellen kommt es durch die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies zu DNA-Doppelstrangbrüchen und damit zu einer vermehrten Anzahl an γ-H2AX-Foci. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu 50 DSB pro Nukleus während eines Zellzyklus generiert werden können (VILENCHIK und KNUDSON, 2003).

Nach der alleinigen Bestrahlung mit 6 Gy kam es in der vorliegenden Arbeit in beiden Tumorzelllinien im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Doppelstrangbruch-Anzahl. Bereits 0,5 h nach der Strahlenexposition konnten sowohl in den T98G- als auch in den FaDu-Zellen durchschnittlich 28 DSB pro Zellkern ermittelt werden, wobei maximal 30 DSB/Zellkern ausgezählt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen

Ansätzen innerhalb der gleichen Zelllinie ließen sich somit nicht beobachten. Nicht bzw. falsch reparierte DNA-Doppelstrangbrüche sind eine der entscheidendsten Mechanismen für die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung. Um dem Zelltod zu entgehen, verfügt die eukaryotische Zelle über effektive, jedoch sehr komplexe Mechanismen diese DNA-Schäden zu reparieren. Einen Teil dieser Vorgänge stellt die Phosphorylierung am Serin 139 des Histonproteins H2AX dar. Nach einem Doppelstrangbruch kommt es u.a. zur Rekrutierung der Proteinkinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ATM-Rad3-related) sowie der DNA-PK-Kinase. Alle drei Proteinkinasen weisen Homologien zur PI3-Kinase auf (WAGENER et al., 2010). Das Protein H2AX wird sehr früh nach der Entstehung eines DNA-Doppelstrangbruchs durch alle drei Kinasen phosphoryliert, wobei ATM den größten Beitrag zur Phosphorylierung liefert (WAGENER et al., 2010). Diese Phosphorylierung hat die Aktivierung weiterer Proteine zur Folge, welche ihrerseits ATM aktivieren, sodass es zu einem positiven Feedback kommt. Das ɣ-H2AX hat also neben der Rekrutierung von Reparaturproteinen die Funktion einer Verstärkung des Signals. Dabei beschränkt sich dieses Signal nicht nur auf die benachbarten Nukleosomen des beschädigten DNA-Abschnitts, sondern kann sich über eine große Anzahl von Basenpaaren erstrecken (KINNER et al., 2018). Zudem führt ionisierende Strahlung dosisabhängig zu einer Zunahme der ɣ-H2AX-Foci, wobei sich insbesondere die Proteinkinase ATM für die Phosphorylierung des H2AX verantwortlich zeigt (KUO et al., 2008). Das Maximum an DNA-Doppelstrangbrüchen lässt sich ca. 30-90 min während einer Plateauphase nach dem schädigenden Ereignis darstellen (MAH et al., 2010), weshalb der erste Fixierungszeitpunkt in dieser Arbeit nach 0,5 h gewählt wurde. Danach kommt es durch Reparaturvorgänge zu einer sukzessiven Reduktion der DNA-Doppelstrangbrüche und damit der ɣ-H2AX-Foci. KINNER et al. (2018) konnten in der Bronchialkarzinomzelllinie A549 eine quantitative Reduktion der Foci um 50 % bereits ca. 150 min nach dem Bestrahlungsereignis mit 1 Gy beobachten.

Auch schädigende Agenzien wie Zytostatika (z. B. Topoisomerase-Inhibitoren wie Topotecan oder Irinotecan) oder Anthrazykline, wie Mitoxantron, führen ebenfalls zu einer konsekutiven Schädigung der DNA, wodurch vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche und somit ɣ-H2AX-Foci entstehen (HUANG et al., 2003). Piperin allein führte in dieser Arbeit zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche. Dabei zeigten sich die T98G-Zellen unter dem Einfluss von 200 µM Wirkstoff an beiden Fixierungszeitpunkten mit durchschnittlich ca. 11-12 DSB sensibler als die FaDu-Zellen (ca. 6 DSB/Zellkern). Auch durch 100 µM Piperin ließ sich bereits eine signifikante Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche in beiden Zelllinien erkennen.

Um den Einfluss des Wirkstoffes auf die Reparaturkapazität der Zellen nach der Bestrahlungsexposition zu beurteilen, erfolgte die Auswertung des ɣ-H2AX-Assays ebenfalls 24 h nach der Bestrahlung. Für beide Zelllinien konnte nach 24 h eine verminderte Reparaturkapazität unter dem Einfluss des Piperins ermittelt werden, wobei signifikante Ergebnisse in der Zelllinie

T98G nach Behandlung mit 200 µM Piperin und in der Zelllinien FaDu bereits nach Behandlung mit 100 µm Wirkstoff beobachtet werden konnten. Ohne Piperin konnten in der Zelllinie T98G 24 h nach der Bestrahlung 9 DSB/Zelle ausgezählt werden. Nach Zugabe von 200 µM Piperin wurden hingegen 19 DSB/Zelle detektiert. Für die Zelllinie FaDu ergaben sich ähnliche Ergebnisse: Ohne Wirkstoffeinfluss wurden 6 DSB/Zelle gezählt, wohingegen nach Behandlung mit 200 µM Piperin 13 DSB/Zelle sichtbar waren.

Die genotoxische Wirkung des Alkaloids Piperin scheint vielfältig zu sein. Untersuchungen der humanen Melanomzelllinie SK MEL 28 ergaben nach Zugabe von Piperin dosis- und zeitabhängig erhöhte Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies. Diese führten insbesondere in der S-Phase während der Replikation der DNA zu Strangbrüchen und damit zur vermehrten Rekrutierung von ɣ-H2AX (FOFARIA et al., 2014). Ferner konnte durch Piperin in diversen Zelllinien ein Zellzyklusarrest sowohl in der G_1- als auch in der G_2-Phase beobachtet werden. In diesem Zusammenhang konnten FOFARIA et al. (2014) einen G_1-Arrest durch verminderte Expression von Zyklin D1 sowie Induktion des Zellzyklusinhibitors $p21^{Cip1}$ nachweisen. Dieser Zellzyklusstopp war mit einem vermehrten DNA-Schaden sowie einer verstärkten Apoptose verbunden.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eine verminderte Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung unter dem Einfluss von Piperin nachweisen.
Allgemein werden im Rahmen der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zwei grundsätzliche Mechanismen unterschieden: Die homologe Rekombination (HR) und die nicht homologe End-zu-End-Verbindung (NHEJ, engl. für non-homologous end joining).
Die HR findet in der späten S-Phase bzw. der G_2-Phase des Zyklus statt, da die Voraussetzung für diesen Reparaturmechanismus eine verdoppelte DNA mit zwei identischen Schwesterchromatiden ist. Nach einem DNA-Doppelstrangbruch kommt es zu einem Strangaustausch zwischen den Schwesternchromatiden, was eine Reparatur zu Folge hat. Die homologe Rekombination wird vorzugsweise durch die Proteinkinase ATR aktiviert und findet häufig zeitlich verzögert statt. Deutlich schneller, da unabhängig von der Zellzyklusphase, und zumeist durch die ATM induziert, findet die nicht homologe End-zu-End-Verbindung statt. Die Art der Reparatur ist häufig deutlich fehleranfälliger, da es durch die Prozessierung nicht glatter Bruchenden zu Deletionen und damit zu einem Verlust genetischer Information kommen kann (RASSOW et al., 2015).
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten somit hinweisgebend dafür sein, dass sich die Art des Reparaturprozesses und damit die Kinetik zwischen beiden Zelllinien unterscheidet. Da der Anteil an residualen ɣ-H2AX-Foci in der T98G-Zelllinie 24 h nach der Bestrahlung größer war als bei den FaDu-Zellen, wäre es denkbar, dass die DNA-Doppelstrangbrüche in dieser Zelllinie bevorzugt mittels ATR induzierter homologer Rekombination repariert wurden, zumal die HR häufig bei Versagen anderer Reparatursysteme eingesetzt wird (MÜLLER-ESTERL et al., 2017).

FOFARIA et al. (2014) konnten eine erhöhte Expression phosphorylierten ATRs durch Piperin nachweisen. Radiogen bedingte DNA-Schäden in den FaDu-Zellen könnten hauptsächlich durch das ATM vermittelte NHEJ korrigiert worden sein. Die Auswahl des jeweiligen Reparaturverfahrens stellt jedoch einen hoch komplexen Prozess dar und ist von vielerlei Faktoren abhängig, weshalb die Ergebnisse dieser Arbeit keine sicheren Aussagen bezüglich des bevorzugten Reparaturprozesses zulassen. Eine genauere Betrachtung der Art der Reparatur könnte in weiteren Studien untersucht werden.
Außerdem stellt das Auszählen der ɣ-H2AX-Foci durch das Fluoreszenzmikroskop eine sehr subjektive Form der Auswertung dar, weshalb die Versuchsauswertung durch die gleiche Person erfolgen sollte. Insbesondere die dreidimensionale Anordnung der Foci innerhalb der Zellkerne stellt eine Herausforderung dar und erfordern ein sehr genaues Vorgehen.
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Piperin die Reparaturkapazität in den Zelllinien T98G und FaDu deutlich beeinflusst und der Anteil an residualen DSB unter Wirkstoffeinfluss signifikant erhöht war. Dies stellt eine mögliche Ursache der Strahlensensibilisierung dar, welche mittels Koloniebildungstest detektiert wurde.
Um die Ergebnisse des ɣ-H2AX-Assays zu bestätigen bzw. zu erweitern wäre somit eine weitere objektivere Methode nötig. Die sog. pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), welche DNA-Fragmentgrößenveränderungen elektrophoretisch detektiert, stellt eine weitere Methode zur Untersuchung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Sie ist besonders für Bestrahlungsdosen über 5 Gy geeignet (KUO et al., 2008).

4.5 Genexpression

Die quantitative Real-Time-PCR erlaubt die Beobachtung eines Amplifikationsprodukts in Echtzeit. Anhand dieser Kinetik lassen sich Rückschlüsse auf die vorliegende Konzentration des zu untersuchenden Gens bzw. dessen Transkripts in der Zelle ziehen. Für diese Arbeit wurden die beiden Tumorsuppressorgene *RB1* und *CDKN1B* untersucht.

4.5.1 Expression des RB1-Gens

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten für die Tumorzelllinie **T98G** nach alleiniger Bestrahlung mit 6 Gy eine signifikant erhöhte relative Expression des *RB1*-Gens. Wurden die T98G-Zellen nur mit dem Wirkstoff Piperin behandelt, konnte keine signifikante Änderung des Expressionsveralten detektiert werden. Dies war auch unter der kombinierten Behandlung mit Piperin und ionisierender Strahlung der Fall. Es zeigte sich lediglich eine leichte Reduktion der RB1-Expression, jedoch konnten anhand der vorliegenden Daten aufgrund der hohen

Standardabweichung keine sicheren Aussagen hinsichtlich eines synergistischen Effekts getroffen werden.

Die Untersuchungen der **FaDu-Zellen** ergaben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Nach Zugabe des Wirkstoffs in einer Konzentration von 200 µM konnte eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der *RB1*-Expression ermittelt werden. Eine kombinierte Behandlung mit 100 µM Piperin und einer Bestrahlung mit 2 Gy ging mit einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von 24 % einher.

In beiden Zelllinien waren die Daten jedoch mit hohen Standardabweichungen vergesellschaftet, sodass Aussagen hinsichtlich des *RB1*-Expressionsverhaltens kritisch zu diskutieren sind und weitere Wiederholungen der Versuche nötig wären.

Methodische Fehler während der PCR-Vorbereitung stellen eine mögliche Ursache dieser schwankenden Ergebnisse dar. Zudem setzt die Berechnung nach der ΔΔCt-Methode eine optimale Effizienz der Real-Time-PCR voraus. Dies entspricht nicht immer für jede Probe der Realität, sodass bereits geringste Schwankungen in der Effizienz der zu untersuchenden Gene bezogen auf das Referenzgen zu großen Unterschieden in der berechneten relativen Expression führen können (PFAFFL, 2004).

Das Retinablastom-Gen (*RB1*) gilt als einer der ersten klassischen Tumorsuppressorgene. *RB1* codiert für das nukleäre Rb-Protein, welches zur Gruppe der sog. Pocketproteine zählt und eine Vielzahl an Funktionen besitzt, u.a. in der Kontrolle des Zellzyklus sowie im Bereich der Zelldifferenzierung (MULLIGAN et al., 1998). Dabei bindet und inhibiert phosphoryliertes Rb-Protein Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, welche essenziell für die Transkription von Genen bzw. dessen Proteine sind, die für den Übergang der G_1- in die S-Phase benötigt werden (LEES et al., 1993). Dazu zählen beispielsweise die DNA-Polymerasen oder die Dihydrofolatreduktase (LÖFFLER et al., 2014). Für die reprimierende Wirkung des Rb-Proteins auf den Zellzyklus muss es im hypophosphorylierten Zustand vorliegen (DELSTON & HARBOUR, 2006). Eine weitere Phosphorylierung löst die Bindung zum Transkriptionsfaktor E2F und der Zellzyklus kann voranschreiten.

In der Vergangenheit konnten mehrere Zykline als Bindungspartner des Rb-Proteins identifiziert werden, was einen Einfluss dieses Proteins an mehreren Checkpoints des Zellzyklus nahelegt. So interagiert Rb sowohl mit Zyklin D, welches eine Rolle in der Zellzykluskontrolle der G_1-Phase spielt, als auch mit Zyklin A aus der S- respektive G_2-Phase (MULLIGAN et al., 1998).

Gut untersucht ist die arretierende Funktion von Rb am Übergang der G_1- in die S-Phase. Eine Schädigung der DNA, beispielsweise durch ionisierende Strahlung, geht mit einer Konzentrationserhöhung des Tumorsuppressors p53 durch verminderten Abbau einher. In Folge kommt es zu einer vermehrten Expression des CDK-Inhibitors $p21^{Cip1}$, wodurch das Rb-Protein eine vermehrte Phosphorylierung des Rb-Proteins durch den Komplex CDK4/Zyklin D unterbleibt (WAGENER et al., 2010). In der Zelllinie T98G zeigte sich eine Erhöhung der relativen *RB1*-Expression nach einer Bestrahlung mit 6 Gy, sodass dieser Mechanismus als ursächlich für die

bestrahlungsinduzierte Proliferationshemmung, welche im BrdU-Assay ermittelt wurde, diskutiert werden kann. Zellen ohne funktionsfähiges Rb-Protein konnten durch Transfektion einer Rb1-cDNA in den Wachstumsstopp geführt werden und zeigten zudem Zeichen der Zellalterung (Seneszenz) und Differenzierung (QIN et al., 1992).
Für die Zellzykluskontrolle durch das Rb-Protein spielt jedoch nicht nur dessen absolute Konzentration eine Rolle, sondern letztlich ist der Phosphorylierungszustand entscheidend.
Nach Einwirkung ionisierender Strahlung konnte vermehrt hypophosphoryliertes Rb-Protein in embryonalen Mausfibroblasten nachgewiesen werden, was einen G_1-Block zur Folge hatte (NADERI et al., 2002).
Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben nach alleiniger Behandlung mit dem Wirkstoff Piperin keine signifikante Änderung der *RB1*-Expression. Der Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins wurde jedoch nicht untersucht, sodass auch eine verminderte Phosphorylierung des Rb-Proteins in den T98G- und FaDu-Zellen ursächlich für die Wachstumshemmung sein könnte. Diesbezüglich konnte in Melanomzellen nach Behandlung mit Piperin eine geringere Phosphorylierung des Rb-Proteins sowie eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors E2F-1 nachgewiesen werden (FOFARIA et al., 2014). Weiterhin konnte im Zuge einer Schädigung der DNA eine verstärkte Interaktion zwischen Rb und dem Transkriptionsfaktor E2F-1 beobachtet werden (DICK & DYSON, 2003). Demgegenüber kann jedoch angenommen werden, dass eine verminderte Expression des *RB1*-Gens mit einer Inhibition des Zellzyklus vergesellschaftet sein könnte. Bei einem reduzierten Rb-Level sinkt der Anteil an Rb, welcher phosphoryliert werden kann und letztlich ist das phosphorylierte Rb entscheidend für eine Progression des Zellzyklus. Rb scheint insbesondere nach einer Strahlenexposition jedoch eine hemmende Wirkung am G_2/M-Übergang des Zellzyklus zu haben. Strahleninduzierte DNA-Schäden führten zu einer verminderten Rb-Phosphorylierung, wodurch es konsekutiv zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G_2-Phase kam (GENOVESE et al., 2006). Ein *RB1*-knock-down durch RNA-Interferenz führte in Prostatakarzinomzellen zu einer vermehrten Vulnerabilität der Tumorzellen nach ionisierender Strahlung (FAN et al., 2021).

4.5.2 Expression des CDKN1B-Gens

Ferner wurde in dieser Arbeit die Expression des Gens *CDKN1B* untersucht, welches für das Protein $p27^{Kip1}$ codiert.
Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Zelllinie **T98G** zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der *CDKN1B*-Expression nach Bestrahlung mit 6 Gy. Die hohen Standardabweichungen ließen jedoch keine sichere Aussage bezüglich der *CDKN1B*-Expression nach Bestrahlung zu. Gleiches galt für die T98G-Zellen, welche nur mit Piperin behandelt wurden. Eine statistisch signifikante Reduktion der Genexpression konnte jedoch für die T98G-Zellen ermittelt werden, welche vor der Bestrahlung mit Piperin behandelt wurden.

Beispielsweise zeigte sich die *CDKN1B*-Expression nach Zugabe von 200 µM Piperin und Bestrahlung mit 6 Gy um 63 % reduziert.

Im Gegensatz dazu kam es in der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie **FaDu** nach alleiniger Bestrahlung mit 6 Gy zu einer um 45 % verminderten Expression des *CDKN1B*-Gens. Erfolgte nur eine Behandlung mit Piperin ohne den Einfluss ionisierender Strahlung konnte, wie in der Zelllinie T98G, keine signifikante Änderung der relativen Genexpression ermittelt werden.

Eine kombinierte Behandlung (200 µM Piperin, 6 Gy) hatte demgegenüber eine statistisch signifikante Steigerung der *CDKN1B*-Expression in den FaDu-Zellen zur Folge, was einem gegensätzlichen Expressionsverhalten im Vergleich mit den T98G-Zellen entsprach. Auch hier sind sichere Aussagen aufgrund der hohen Standardabweichungen nur unter Vorbehalt möglich und sollten durch weitere Versuche bestätigt werden.

$P27^{Kip1}$ stellt einen CDK-Inhibitor aus der Cip/Kip-Familie dar (SHERR & ROBERTS, 1999). Das Protein $p27^{Kip1}$ kann die Progression des Zellzyklus in der G_1-Phase unterbinden, in dem es an CDK2 respektive CDK4/6 bindet und so dessen Kinaseaktivität inhibiert (MORGAN, 1997). Ein zügiger Abbau des Proteins $p27^{Kip1}$ durch das Ubiquitin-Proteasom-System führt wiederum zu einem Fortschreiten des Zellzyklus (PAGANO et al., 1995).

Eine Stabilisierung des CDK-Inhibitors $p27^{Kip1}$ kann somit einen G_1-Arrest zur Folge haben. Dies kann einerseits durch einen verminderten Abbau durch das Proteasom und andererseits durch eine vermehrte Expression realisiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Rb-Protein die Expression von $p27^{Kip1}$ erhöhen kann (ALEXANDER und HINDS, 2001). Zudem wird die Stabilität des $p27^{Kip1}$ durch eine Rb-abhängige Reduktion der Ubiquitinierung erhöht (JI et al., 2004).

In der Zelllinie T98G kam es in der vorliegenden Arbeit nach alleiniger Bestrahlung mit 6 Gy zu einer nicht signifikanten Erhöhung der *CDKN1B*-Expression. Hier könnte sich ein Zusammenhang mit der vermehrten Expression des *RB1*-Gens herstellen lassen. Die vermehrte Expression des *RB1*-Gens könnte somit zu einer erhöhten Konzentration des Rb-Proteins führen, welches wiederum die Stabilität und damit Konzentration des CDK-Inhibitors $p27^{Kip1}$ bedingt. Eine mögliche Folge stellt die Arretierung des Zellzyklus in der G_1-Phase dar. Dieser G_1-Arrest würde zudem die Beobachtungen aus dem Proliferationstest unterstützen. Eine deutlich erhöhte Expression des *CDKN1B*-Gens nach Bestrahlung mit 5 Gy konnte in der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 nachgewiesen werden (KUTILIN, 2021).

Interessanterweise kam es nach der alleinigen Zugabe des Wirkstoffs Piperin sowie nach der kombinierten Behandlung mit Piperin und ionisierender Strahlung in den T98G-Zellen zu einer verminderten *CDKN1B*-Expression. Es zeigte sich zudem ein Kombinationseffekt. In der Literatur wurde vielfach unter dem Einfluss des Piperins erhöhte Konzentrationen des $p27^{Kip1}$ beschrieben, was mit einer verminderten Proliferation der Tumorzellen durch Inhibition des Zellzyklus vergesellschaftet war (OUYANG et al., 2013; YAFFE et al., 2015). Diese Konzentrationszunahme muss jedoch nicht zwangsläufig durch eine vermehrte Genexpression bedingt sein. Denkbar wäre auch, ähnlich wie durch das Rb-Protein verursacht, eine durch Piperin induzierte vermehrte

Stabilität des $p27^{Kip1}$. Zudem wird $p27^{Kip1}$ nicht nur durch Rb reguliert. Die Mechanismen sind äußerst komplex und bisher nur unzureichend verstanden. Beispielsweise ist eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors FKHR, einem Mitglied der Forkhead-Transkriptionsfaktoren, mit einer Konzentrationserhöhung von $p27^{Kip1}$ assoziiert (DIJKERS et al., 2000). Ähnlich dem Rb-Protein spielt auch bei dem CDK-Inhibitor $p27^{Kip1}$ der Phosphorylierungsstatus eine wesentliche Rolle für dessen Aktivität. Eine Phosphorylierung am Threonin157, welche in der Kernlokalisierungssequenz des Proteins liegt, hat einen vermehrten Export aus dem Zellkern zur Folge (FUJITA et al., 2002). So kann $p27^{Kip1}$ seine inhibierende Wirkung auf den Zellzyklus nicht mehr ausüben und wird im Zytoplasma zügig sequestriert (SHIN et al., 2002). Somit hängt die Funktion des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ nicht ausschließlich von dessen Expressionsrate ab, sondern vielfältige posttranslationale Modifikationen beeinflussen ebenfalls dessen Aktivitätsstatus.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung des sekundären Pflanzenstoffs Piperin allein sowie in Kombination mit ionisierender Strahlung auf die etablierte Gliobastomzelllinie T98G sowie die Hypopharynxkarzinomzelllinie FaDu näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden diverse *In-vitro*-Methoden angewandt.

Die vorliegenden Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Mit Hilfe von Wachstumskurven konnte für beide Zelllinien ein wachstumshemmender Effekt nachgewiesen werden. Die Wirkung war konzentrations- und zeitabhängig. Die Zelllinie FaDu war sensibler als die T98G: Nach 4-tägiger Inkubation wurde für die FaDu-Zellen ein IC_{50}-Wert von 95 µM, für die T98G-Zellen von 166 µM ermittelt.

- Mittels Koloniebildungstest wurde das Langzeitüberleben der Zellen untersucht. Das klonogene Überleben beider Zelllinien wurde nach Bestrahlung unter dem Einfluss des Piperins reduziert. Strahlensensibilisierende Effekte waren in der Zelllinie FaDu ab einer Piperinkonzentration von 100 µM, für die T98G ab 150 µM statistisch signifikant.

- Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mit Hilfe des BrdU-Assays untersucht. Sowohl die alleinige Bestrahlung als auch Piperin ab einer Konzentration von 50 µM resultierten in einer Hemmung der Proliferation. Ein Kombinationseffekt durch Piperin und ionisierende Strahlung war für beide Zelllinien nachweisbar.

- Durch den ɣ-H2AX-Assay konnte sowohl in den T98G- als auch in den FaDu-Zellen eine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen unter dem alleinigen Einfluss des Piperins ermittelt werden. Zudem war die Reparaturkapazität radiogen induzierter DNA-Doppelstrangbrüche signifikant reduziert: in den T98G-Zellen ab einer Piperinkonzentration von 200 µM; in der Zelllinie FaDu bereits ab 100 µM Piperin.

- Das Expressionsverhalten der beiden Tumorsuppressorgene *RB1* und *CDKN1B* wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die alleinige Wirkstoffzugabe hatte in keiner der untersuchten Zelllinien einen signifikanten Einfluss auf die *RB1*-Expression. Eine erhöhte *RB1*-Genexpression zeigte sich in den T98G-Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy; in den FaDu-Zellen war eine signifikante Erhöhung erst durch eine kombinierte Behandlung zu erkennen. Sichere Aussagen ließen sich aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nur eingeschränkt treffen.

- Ähnliche Ergebnisse wurden für das Tumorsuppressorgen *CDKN1B* mittels qRT-PCR gewonnen: Die alleinige Wirkstoffzugabe hatte keinen Einfluss. Die Kombination mit ionisierender Strahlung zeigte in der Zelllinie T98G eine verminderte Genexpression; in der Zelllinie FaDu erhöhte sich die relative Genexpression unter der kombinierten Behandlung. Auch hier waren sichere Aussagen nur zurückhaltend möglich.

6 Ausblick

Anhand der vorliegenden Daten konnten für die Glioblastom-Zelllinie T98G sowie für die Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu ein konzentrationsabhängiger wachstumshemmender Effekt durch den Wirkstoff Piperin nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich durch die Untersuchungen zum klonogenen Überleben ein strahlensensibilisierender Effekt auf beide etablierte Zelllinien. Die Behandlung der Zellen mit dem Wirkstoff Piperin ging mit einer verminderten Proliferationskapazität sowie einer reduzierten Reparaturfähigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen einher.

Um diese Ergebnisse zu untermauern und die Frage der ursächlichen zellulären Mechanismen weiter einordnen zu können, sind zusätzliche Untersuchungen nötig. *In vitro* wären beispielsweise Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie denkbar. Eine Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies nach Zugabe des Piperins ist eine mögliche Erklärung der vermehrten DNA-Doppelstrangbrüche, sodass deren Untersuchung ebenfalls zielführend wäre.

Sichere Aussagen hinsichtlich einer Expressionsänderung der Tumorsuppressorgene *RB1* und *CDKN1B* waren anhand der geringen Versuchszahl der vorliegenden Ergebnisse nur eingeschränkt möglich. Weitere Versuche oder auch die Analyse anderer Gene wie *TP53,* welches für das Protein p53, einem Schlüsselprotein in der Zellzykluskontrolle, codiert, wären sinnvoll.

Letztlich sind auch *In-vivo*-Versuche in tierexperimentellen Studien nötig, um eine adäquate Dosierung und Applikationsform des Piperins zu finden und um den kombinierten Effekt mit einer Bestrahlung nachzuweisen. Untersuchungen mit Piperin am Mausmodell wurden bereits in der Literatur beschrieben. In diesen wurde erfolgreich die perorale, intraperitoneale und intratumorale Anwendung durchgeführt, jedoch bisher ohne die Kombination mit ionisierender Strahlung.

Es besteht ein großer Bedarf an Wirkstoffen, welche die Suszeptibilität der Tumorzellen hinsichtlich einer Strahlenwirkung erhöhen und somit das Behandlungsspektrum in der Radioonkologie erweitern. Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse stellt Piperin eine potentielle therapeutische Option in der strahlentherapeutischen Behandlung dar, welche in der Zukunft durch weitere Untersuchungen erforscht werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

ALEXANDER K, HINDS PW. Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. Mol Cell Biol. 2001; 21(11): 3616-3631.

BANATH JP, MACPHAIL SH, OLIVE PL. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. Cancer Res. 2004; 64: 7144-7149.

BARTKOVA J, HOREJSÍ Z, KOED K, KRÄMER A, TORT F, ZIEGER K, GULDBERG P, SEHESTED M, NESLAND JM, LUKAS C, ØRNTOFT T, LUKAS J, BARTEK J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. Nature. 2005; 434(7035): 864-870.

BAUER KH. Das Krebsproblem: Einführung in die allgemeine Geschwulstlehre. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. 1949; 551-564.

BÖCKER W, DENK H, HEITZ PU, HÖFLER G, KREIPE H, MOCH H. Pathologie. . Elsevier Urban & Fischer Verlag. 5. Auflage 2012; 124, 135-151, 252-253, 470.

BRADFORD JA, CLARKE ST. Dual-Pulse Labeling Using 5-Ethynyl-2′-Deoxyuridine (EdU) and 5-Bromo-2′-Deoxyuridine (BrdU) in Flow Cytometry. Current Protocols in Cytometry. 2011; 55: 73810-73815.

CORDELL GA. Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach. John Wiley & Sons. New York. 1981; 72(3): 328.

DEACON J, PECKHAM MJ, STEEL GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. Radiother Oncol. 1984; 2: 317–323.

DELSTON RB, HARBOUR JW. Rb at the interface between cell cycle and apoptotic decisions. Curr Mol Med. 2006; 6(7): 713-718.

DI LEONARDO A, LINKE SP, CLARKIN K, WAHL GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. Genes Dev. 1994; 8(21): 2540-2551.

DICK FA, DYSON N. pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. Mol Cell. 2003; 12(3): 639-649.

DIJKERS PF, MEDEMA RH, PALS C, BANERJI L, THOMAS NS, LAM EW, BURGERING BM, RAAIJMAKERS JA, LAMMERS JW, KOENDERMAN L, COFFER PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). Mol Cell Biol. 2000; 20(24): 9138-9148.

DIMARAS H, KHETAN V, HALLIDAY W, ORLIC M, PRIGODA NL, PIOVESAN B, MARRANO P, CORSON TW, EAGLE RC Jr, SQUIRE JA, GALLIE BL. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. Hum Mol Genet. 2008; 17(10): 1363-1372.

DOUCETTE CD, HILCHIE AL, LIWSKI R, HOSKIN DW. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. J Nutr Biochem. 2013; 24: 231–239.

FAN Y, FAN H, QUAN Z, WU X. Ionizing Radiation Combined with PARP1 Inhibitor Reduces Radioresistance in Prostate Cancer with RB1/TP53 Loss. Cancer Invest. 2021; 39(5): 423-434.

FOFARIA NM, KIM SH, SRIVASTAVA SK. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. PLoS One. 2014; 9(5): 1-10.

FUJITA N, SATO S, KATAYAMA K, TSURUO T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. J Biol Chem. 2002; 277(32): 28706-28713.

GENOVESE C, TRANI D, CAPUTI M, CLAUDIO PP. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family. Oncogene. 2006; 25(38): 5201-5209.

GEORGE K, THOMAS NS, MALATHI R. Piperine blocks voltage gated K+ current and inhibits proliferation in androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. Arch Biochem Biophys. 2019; 667: 36-48.

GORGANI L, MOHAMMADI M, NAJAFPOUR GD, NIKZAD M. Piperine-The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2017; 16(1):124-140.

GREENSHIELDS AL, DOUCETTE CD, SUTTON KM, MADERA L, ANNAN H, YAFFE PB, KNICKLE AF, DONG Z, HOSKIN DW. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. Cancer Lett. 2015; 357(1): 129-140.

HERRMANN T, BAUMANN M, DÖRR W. Klinische Strahlenbiologie - kurz und bündig. Elsevier Urban & Fischer Verlag. München. 4. Auflage. 2005; 16-45.

HUANG X, TANAKA T, KUROSE A, TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents is cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen species. Int J Oncol. 2006; 29(2): 495-501.

HUANG X, TRAGANOS F AND DARZYNKIEWICZ Z. DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relations to the cell cycle phase and apoptosis. Cell Cycle. 2003; 2: 614-619.

HUBER R, HÜBNER J, WOLF U. PHYTOTHERAPIE IN DER ONKOLOGIE. Der Onkologe. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013; 19: 132-135.

HWANG A, MUSCHEL RJ. Radiation and the G2 phase of the cell cycle. Radiat Res. 1998; 150(5): 52-59.

HWANG YP, YUN HJ, KIM HG, HAN EH, CHOI JH, CHUNG YC, JEONG HG. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKCα/ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. Toxicol Lett. 2011; 203(1): 9-19.

JEONG S, JUNG S, PARK GS, SHIN J, OH JW. Piperine synergistically enhances the effect of temozolomide against temozolomide-resistant human glioma cell lines. Bioengineered. 2020; 11(1): 791-800.

JI P, JIANG H, REKHTMAN K, BLOOM J, ICHETOVKIN M, PAGANO M, ZHU L. An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. Mol Cell. 2004; 16(1): 47-58.

KHAMIS AAA, ALI EMM, EL-MONEIM MAA, ABD-ALHASEEB MM, EL-MAGD MA, SALIM EI. Hesperidin, piperine and bee venom synergistically potentiate the anticancer effect of tamoxifen against breast cancer cells. Biomed Pharmacother. 2018; 105: 1335-1343.

KINNER A, WU W, STAUDT C, ILIAKIS G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic Acids Res. 2008; 36(17): 5678-5694.

KUO LJ, YANG LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks In Vivo. 2008; 22(3): 305-309.

KUTILIN D. Genetic and epigenetic bases of prostate tumor cell radioresistance. Klin Onkol. 2021; 34(3): 220-234.

LAI LH, FU QH, LIU Y, JIANG K, GUO QM, CHEN QY, YAN B, WANG QQ, SHEN JG. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. Acta Pharmacol Sin. 2012; 33(4): 523-530.

LEES JA, SAITO M, VIDAL M, VALENTINE M, LOOK T, HARLOW E, DYSON N, HELIN K. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. Mol Cell Biol. 1993; 13(12): 7813-7825.

LIN Y, XU J, LIAO H, LI L, PAN L. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. Tumour Biol. 2014; 35(4): 3305-3310.

LÖFFLER G, PETRIDES PE, HEINRICH PC, MÜLLER M, GRAEVE L. Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag. Heidelberg. 9. Vollständig überarbeitete Auflage. 2014; 537-544.

MACPHAIL SH, BANÁTH JP, YU Y, CHU E, OLIVE PL. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. Radiat Res. 2003; 159(6): 759-767.

MAH LJ, EL-OSTA A, KARAGIANNIS TC. GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. Epigenetics. 2010; 5(2): 129-136.

MORGAN MB, COWPER SE. Expression of p-27 (kip1) in nevi and melanomas. Am J Dermatopathol. 1999; 21(2): 121-124.

MÜLLER-ESTERL W, BRANDT U, ANDERKA O, KERSCHER S, KIEß S, RIDINGER K. Biochemie - Ein Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer-Spektrum Verlag. Berlin. 3. Auflage. 2017; 304.

MULLIGAN G, JACKS T. The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. Trends Genet. 1998; 14(6): 223-229.

MURAD H, ALGHAMIAN Y, ALJAPAWE A, MADANIA A. Effects of ionizing radiation on the viability and proliferative behavior of the human glioblastoma T98G cell line. BMC Res Notes. 2018; 11(1): 330.

MUTSCHLER E, GEISLINGER G, MENZEL S, GUDERMANN T, HINZ B, RUTH P. MUTSCHLER Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart. 11. Auflage. 2020; 825-844.

NADERI S, HUNTON IC, WANG JY. Radiation dose-dependent maintenance of G(2) arrest requires retinoblastoma protein. Cell Cycle. 2002; 1(3): 193-200.

OUYANG DY, ZENG LH, PAN H, XU LH, WANG Y, LIU KP, HE XH. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. Food Chem Toxicol. 2013; 60: 424-430.

PAGANO M, TAM SW, THEODORAS AM, BEER-ROMERO P, DEL SAL G, CHAU V, YEW PR, DRAETTA GF, ROLFE M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Science. 1995; 269(5224): 682-685.

PALLADINO P, TORRINI F, SCARANO S, MINUNNI M. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as multi-colorimetric indicator of chlorine in water in line with health guideline values. Anal Bioanal Chem. 2020; 412(28): 7861-7869.

PFAFFL MW. Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. BIOSpektrum. Springer-Verlag GmbH. Heidelberg. 2004; 10: 92-94.

PUCK TT, MARKUS PI, CIECIURA SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro: Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. J Exp Med. 1956; 103(2): 273-283.

QIN XQ, CHITTENDEN T, LIVINGSTON DM, KAELIN WG JR. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. Genes Dev. 1992; 6(6): 953-964.

QIU M, XUE C, ZHANG L. Piperine alkaloid induces anticancer and apoptotic effects in cisplatin resistant ovarian carcinoma by inducing G2/M phase cell cycle arrest, caspase activation and inhibition of cell migration and PI3K/Akt/GSK3β signalling pathway. J BUON. 2019; 24(6): 2316-2321.

RASSOW J, HAUSER K, NETZKER R, DEUTZMANN R. Duale Reihe Biochemie. Thieme-Verlag. Stuttgart. 4. Auflage. 2015; 523, 528-531.

REISS M, BRASH DE, MUÑOZ-ANTONIA T, SIMON JA, ZIEGLER A, VELLUCCI VF, ZHOU ZL. Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. Oncol Res. 1992; 4(8-9): 349-357.

REDZA-DUTORDOIR M, AVERILL-BATES DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta. 2016; 1863(12): 2977-2992.

RESENDEZ A, TAILOR D, GRAVES E, MALHOTRA SV. Radiosensitization of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) by a Podophyllotoxin. ACS Med Chem Lett. 2019;10(9): 1314-1321.

ROBERT-KOCH-INSTITUT (Hrsg.) und das Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland 2015/2016. Berlin. 12. Ausgabe. 2020; 24-27.

SAMYKUTTY A, SHETTY AV, DAKSHINAMOORTHY G, BARTIK MM, JOHNSON GL, WEBB B, ZHENG G, CHEN A, KALYANASUNDARAM R, MUNIRATHINAM G. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. PLoS One. 2013 Jun 18;8(6):e65889.

SAUER R. Strahlentherapie und Onkologie. Elsevier Urban & Fischer Verlag. München. 5. Auflage. 2010; 20-81.

SCHMITZ S, DESEL C. Der Experimentator Zellbiologie. Springer-Spektrum Verlag. Berlin. 1. Auflage. 2018; 168.

SCHMITZ S. Der Experimentator Zellkultur. Springer-Spektrum Verlag. Berlin. 3. Auflage 2011; 129-141.

SCHNABEL A, ATHMER B, MANKE K, SCHUMACHER F, COTINGUIBA F, VOGT T. Identification and characterization of piperine synthase from black pepper, Piper nigrum L. Commun Biol. 2021; 4(1): 445.

SHAHEER K, SOMASHEKARAPPA HM, LAKSHMANAN MD. Piperine sensitizes radiation-resistant cancer cells towards radiation and promotes intrinsic pathway of apoptosis. J Food Sci. 2020 ; 85(11): 4070-4079.

SHAO Y, QUAN F, LI HH, YAO XB, ZHAO Q, ZHAO RM. The Radiosensitizing Effect of Resveratrol on Hypopharyngeal Carcinoma Cell Line FADU and its Effect on the Cell Cycle. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine. 2015; 35(6): 699-703.

SHERR CJ, ROBERTS JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 1995; 9(10): 1149-1163.

SHIN I, YAKES FM, ROJO F, SHIN NY, BAKIN AV, BASELGA J, ARTEAGA CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. Nat Med. 2002; 8(10): 1145-1152.

SHORT SC, MARTINDALE C, BOURNE S, BRAND G, WOODCOCK M, JOHNSTON P. DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes. Neuro Oncol. 2007; 9(4): 404-411.

SIDDIQUI S, AHAMAD MS, JAFRI A, AFZAL M, ARSHAD M. Piperine Triggers Apoptosis of Human Oral Squamous Carcinoma Through Cell Cycle Arrest and Mitochondrial Oxidative Stress. Nutr Cancer. 2017; 69(5): 791-799.

SINGH DV, GODBOLE MM, MISRA K. A plausible explanation for enhanced bioavailability of P-gp substrates in presence of piperine: simulation for next generation of P-gp inhibitors. J Mol Model. 2013; 19(1): 227-238.

STATISTISCHES BUNDESAMT (DESTATIS). Todesursachen in Deutschland 2015. Fachserie 12, Reihe 4. 2017; 4.

STEIN GH. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. J Cell Physiol. 1979; 99(1): 43-54.

TAK JK, LEE JH, PARK JW. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. BMB Rep. 2012; 45(4): 242-246.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. Real-time PCR: Understanding CT. 2016. https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html. Zugriff am 23.08.2021.

VILENCHIK MM, KNUDSON AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100(22): 12871-12876.

WAGENER C, MÜLLER O. Molekulare Onkologie-Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Thieme-Verlag. Stuttgart. 3. Überarbeitete Auflage. 2010; 8-18, 119-126.

WANNENMACHER M, DEBUS J, WENZ F. Strahlentherapie. Springer-Verlag. Heidelberg. 2006; 48-49.

YAFFE PB, DOUCETTE CD, WALSH M, HOSKIN DW. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. Exp Mol Pathol. 2013; 94(1): 109-114.

YAFFE PB, POWER COOMBS MR, DOUCETTE CD, WALSH M, HOSKIN DW. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. Mol Carcinog. 2015; 54(10): 1070-1085.

YAO KC, KOMATA T, KONDO Y, KANZAWA T, KONDO S, GERMANO IM. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. J Neurosurg. 2003; 98(2): 378-84.

YOO ES, CHOO GS, KIM SH, WOO JS, KIM HJ, PARK YS, KIM BS, KIM SK, PARK BK, CHO SD, NAM JS, CHOI CS, CHE JH, JUNG JY. Antitumor and Apoptosis-inducing Effects of Piperine on Human Melanoma Cells. Anticancer Res. 2019; 39(4): 1883-1892.

ZENG Y, YANG Y. Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. Mol Med Rep. 2018; 17(5): 6363-6370.

ZHANG J, ZHU X, LI H, LI B, SUN L, XIE T, ZHU T, ZHOU H, YE Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. Int Immunopharmacol. 2015; 24(1): 50-58.

ZHENG J, ZHOU Y, LI Y, XU DP, LI S, LI HB. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. Nutrients. 2016; 8(8): 495.

Thesen

Für den sekundären Pflanzenstoff Piperin (1-Piperoylpiperidin) konnte in der Vergangenheit an unterschiedlichen humanen Zelllinien eine antitumorigene Wirkung gezeigt werden, sodass auch eine kombinierte Behandlung des Wirkstoffs Piperin mit ionisierender Bestrahlung zur Tumorbehandlung vielversprechend erscheint.

Anhand diverser präklinischer *In-vitro*-Methoden wurde die kombinierte Wirkung von Piperin und ionisierender Bestrahlung auf die beiden etablierten Tumorzelllinien T98G (Glioblastomzellen) sowie FaDu (Hypopharynxkarzinomzellen) untersucht.

Das Wachstum beider Zelllinien wurde unter dem Einfluss des Wirkstoffs Piperin signifikant gehemmt. Dabei war die Wirkung sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig.

Durch Koloniebildungstests konnte das Langzeitüberleben der Zellen untersucht werden. Eine kombinierte Behandlung beider Zelllinien mit Piperin und ionisierender Strahlung ging mit einer Reduktion des klonogenen Überlebens und somit mit einer Strahlensensibilisierung einher.

Beide Zelllinien zeigten unter dem Einfluss des Piperins eine signifikant reduzierte Proliferation, welche mittels BrdU-Assay untersucht wurde. Dabei konnten auch synergistische Effekte des Wirkstoffs nach einer Bestrahlung nachgewiesen werden.

Mittels ɣ-H2AX-Assay konnte gezeigt werden, dass Piperin zu einer Erhöhung der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen führt und somit zytotoxische Wirkungen hat.

Zudem konnte mit Hilfe der ɣ-H2AX-Methode eine eingeschränkte Reparaturkapazität nach radiogen induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen für beide Zelllinien ermittelt werden.

Der Einfluss des Wirkstoffs Piperin auf die relative Genexpression des Tumorsuppressorgens *RB1* wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Der alleinige Einfluss des Piperins ging in beiden Zelllinien mit keiner Veränderung der *RB1*-Expression einher. Lediglich in der Zelllinie FaDu zeigte sich nach Kombination mit ionisierender Strahlung eine Erhöhung der Genexpression.

Die qRT-PCR-Untersuchung des Tumorsuppressorgens *CDKN1B*, welches für den Zellzyklus-Inhibitor $p27^{Kip1}$ codiert, erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die relative *CDKN1B*-Genexpression nach alleiniger Piperinbehandlung. Die kombinierte Behandlung mit ionisierender Bestrahlung ging in der Zelllinie T98G mit einer verminderten Expression einher, in der Zelllinie FaDu konnte hingehen eine vermehrte Genexpression ermittelt werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse stellt der Wirkstoff Piperin eine potentielle therapeutische Option in der radioonkologischen Behandlung dar, welche in der Zukunft durch weitere präklinische sowie klinische Untersuchungen erforscht werden sollte.

Danksagung

Das Gelingen dieser Arbeit war nicht mein alleiniger Verdienst. All den Beteiligten schulde ich dafür Dank. Einige Personen möchte ich deshalb besonders hervorheben.

Bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt bedanke ich mich für die Vergabe des Themas und für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dipl. Biol. Jana Baake danke ich für die überaus freundliche und geduldige Einarbeitung in die zellbiologische Labormethodik.

Weiterhin danke ich besonders Frau Dr. rer. nat. Annemarie Schröder für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge sowie die Motivation und Einarbeitung in die verschiedenen Methoden. Ohne diese Hilfe wäre das Gelingen dieser Arbeit um einiges schwerer gewesen.

Ferner gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. rer. nat. habil. Katrin Manda für die Unterstützung bei der Themensuche und die ständige sowie überaus geduldige Betreuung dieser Arbeit. Frau Dr. Manda war mir eine große Unterstützung und ich konnte mich immer auf eine zügige Beantwortung meiner Fragen verlassen, so dass ich mich auch auf eine kommende Zusammenarbeit freue.

Weiterhin danke ich ebenfalls den weiteren Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Labors, wie Frau Anke Sund, sowie den Mitarbeitern der Medizinphysik für ihre tatkräftige Unterstützung.

Schlussendlich geht mein Dank auch an meine Familie und meinen Lebensgefährten, die mich moralisch unterstützten und mir über Zweifel hinweghelfen konnten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich durch eigenhändige Unterschrift, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus den Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in dieser Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Jürgenshagen, 04.07.2022 Sascha Diehl

Lebenslauf

Name: Sascha Diehl

Adresse: Neukirchener Weg 49, 18246 Jürgenshagen

Geburtsdatum: 14.09.1989 in Bützow

Schulbildung

07/96-06/00	Fritz-Weineck-Grundschule Bernitt
08/00-07/08	Geschwister-Scholl-Gymnasium Bützow

Zivildienst

09/08-05/09	Universitätsklinikum Rostock, Abteilung für Transfusionsmedizin

Ausbildung /Studium

10/09-09/10	Studium der Biowissenschaften an der Universität Rostock
10/10-12/16	Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz Arndt Universität Greifswald (EMAU)
09/12	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/15	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/16	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

02/17-11/22	Facharztweiterbildung Innere Medizin an der Warnow-Klinik Bützow
04/20	Beginn einer Promotion im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock
10/20-01/23	Beginn des Zweitstudiums Medizinische Biotechnologie (B. Sc.) an der Universitätsmedizin Rostock
01/2023	Facharztweiterbildung Innere Medizin Klinikum Südstadt Rostock