

1 Einleitung

1.1 Bronchialkarzinome

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie der Bronchialkarzinome

Bronchialkarzinome sind hochmaligne Lungentumoren. Diese können sich sowohl von den Oberflächenepithelien der Bronchial- und Bronchiolenwand als auch von dem diffusen neuroendokrinen System herleiten [Riede, Werner, Schaefe, 2004]. Die Lungenkarzinome stehen an erster Position der Ursachen für die karzinombedingte Sterblichkeit. Im Gegensatz zu anderen Tumoren nehmen die Inzidenz und die Mortalität der Lungenkarzinome weltweit zu [Peto et al., 1992; Hoffmann et al., 2000; Greenlee et al., 2001]. Für das Jahr 2004 wurden alleine in den USA 160.440 durch Lungenkarzinom bedingte Todesfälle prognostiziert [Jemal et al., 2004]. In Deutschland ist der Lungenkrebs aktuellen Schätzungen zufolge die dritthäufigste Erkrankung und zählt jährlich etwa 45.000 Neuerkrankungen. Männer sind mit ca. 15,0% gegenüber 6,1% bei den Frauen stärker betroffen. Jedoch steigt die Inzidenz bei den Frauen weiterhin kontinuierlich an. Der Anteil des Lungenkarzinoms an der Gesamtzahl der Krebstodesfälle beträgt zur Zeit 26,3% bzw. 10,4% und die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate 12,0% bzw. 14,0% bei Männern und Frauen [GEKID, RKI, 2006]. Bereits 1930 wurde das passive und aktive Rauchen von Tabak als einen der bedeutendsten Risikofaktoren für das Bronchialkarzinom dargestellt [Lickint, 1930]. Das Zigarettenkondensat enthält Karzinogene und Kokarzinogene in Form von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, die zu einer zehnfachen bis dreißigfachen Steigerung des Erkrankungsrisikos führen. Zu ihnen zählen die Nitrosamine und Benzopyren, das sich nach Oxidation im endoplasmatischen Retikulum interkalierend in die DNA integriert und damit stark mutagen wirkt [Römpp, 1995; Riede, Werner, Schaefe, 2004]. Weitere inhalative Noxen wie Asbest und Quarz, aber auch Radon und Uran, verursachen weniger als 1% aller Bronchialkarzinome. Die Deletion der Chromosomen 3p, 13q und 17p mit einem Verlust von Thyrosin- und Retinsäure-rezeptoren, von Rb- und p53-Proteinen stellt eine genetische Prädisposition dar. Des Weiteren wird eine virale Ätiologie u. a. in Zusammenhang mit dem Epstein-Barr-Virus diskutiert [Huber et al., 2002; Riede, Werner, Schaefe, 2004].

1.1.2 Klassifizierung der Bronchialkarzinome

Die Bronchialkarzinome werden von der WHO histologisch wie in Tab.1.1-1 gezeigt klassifiziert. Zu den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (engl. non-small-cell lung cancer, NSCLC) zählen das Plattenepithel-, das Adeno- und das großzellige Bronchialkarzinom. Daneben existiert die Form des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (engl. small-cell lung cancer, SCLC). Weitere epitheliale Lungentumoren sind das adenosquamöse Karzinom und das Karzinoid. [WHO, 1982; Brambilla et al., 2001]

Tab.1.1-1: Histologische Klassifikation der vier häufigsten Bronchialkarzinome. [modifiziert nach Brambilla et al., 2001 und Parker, Janjan, Selch, 2003]

	relative Häufigkeit	mittlere Überlebenszeit ohne Therapie	Differenzierung
Plattenepithelkarzinom	35-71%	7 Monate	– spindelzelliges Karzinom
Adenokarzinom	9-29%	8 Monate	– azinäres Karzinom – papilläres Karzinom – broncho-alveoläres Karzinom – solides Karzinom mit Schleimbildung
großzelliges Karzinom	3-16%	4 Monate	– Riesenzellkarzinom – klarzelliges Karzinom
kleinzelliges Karzinom	12-25%	2 Monate	– reines kleinzelliges Karzinom (Oat-cell-Karzinom) – gemischtes klein- und großzelliges Karzinom (intermediärer Typ) – kombiniertes kleinzelliges Karzinom (kombinierter Oat-cell-Typ)

1.1.3 Therapie der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome

Die Therapie der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome orientiert sich am Tumorstadium, das nach der TNM- Klassifikation bestimmt wird (Tab. 1.1-2 und Tab. 1.1-3). In den Stadien IA bis IIB stehen primär die chirurgische Tumorresektion und Lymphknoten-Dissektion mit kurativer Zielsetzung im Vordergrund. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt dabei im Stadium I 40% bis 67% und im Stadium II 25% bis

55%. Unterstützend kann zur Reduzierung lokaler Rezidive sowohl eine präoperative Induktionstherapie als auch eine adjuvante Strahlentherapie erfolgen. Sie nehmen aber keinen Einfluss auf das Überleben. Dem gegenüber zeigen neuere Untersuchungen eine verlängerte Überlebenszeit bei Einsatz einer postoperativen Chemotherapie nach kompletter chirurgischer Resektion. Bei Inoperabilität besteht die Indikation zur primären Strahlentherapie mit dem Ziel der Zerstörung maligner, klonogener Tumorzellen bzw. Hemmung der Zellteilung unter Schonung von gesundem Gewebe. Mittels fraktionierter Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 bis 70 Gy in einem Zeitraum von sieben bis acht Wochen wird eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von bis zu 15% erreicht. Eine postoperative Bestrahlung ist sowohl bei N2 und N3, bei T3 und T4, als auch bei inkompletter chirurgischer Resektion indiziert. Im Stadium IIIA bis IV ist eine lokal-regionale Bestrahlung zur Tumorkontrolle angezeigt. Eine induktive, aber auch adjuvante Chemotherapie unterstützt die selektive Steigerung der Strahlenwirkung auf den Tumor. Der palliative Einsatz der Strahlentherapie dient der Schmerzkontrolle bei tumorbedingten Komplikationen durch Knochen- und Hirnmetastasen, Hämoptoe und Obstruktion. Die Chemotherapie bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom ist der chirurgischen und Strahlentherapie nachgestellt und findet ihren kurativen Einsatz im Stadium IIIA und IIIB. Sie basiert vorrangig auf cisplatinhaltigen Chemotherapeutika sowohl in Form einer Mono- als auch Polychemotherapie und wird mit der Radiotherapie bzw. operativen Tumorresektion kombiniert. Damit bestehen eine verbesserte lokale Kontrolle des Primärtumors, Reduzierung von Fernmetastasen und schließlich eine verlängerte Überlebenszeit. Klinische Studien wie die International Adjuvant Lung Cancer Trial (IALT) und die Adjuvant Lung Project Italy Trial (ALPI) zeigen, dass eine Verbesserung der Fünf-Jahres-Überlebensrate um etwa fünf Prozent auf ca. 45% erreicht werden kann. Neuere Therapieformen greifen auf zytokinetischer Ebene des Zellsignalweges und -überlebens, der Angiogenese und der tumorassoziierten Antigene. Diese überwiegend noch in Untersuchungsphasen befindlichen Therapieansätze konzentrieren sich u. a. auf die Thyrosin-Kinasen, der größten Familie dominanter Onkogene. [Mountain, 1997; Mountain, Dresler, 1997; Hoffmann et al., 2000; Lynch, 2001; Dy, Adjei, 2002; Parker, Janjan, Selch, 2003; Scagliotti et al., 2003; Seeber, Schütte, 2003; Arriagada et al., 2004; Sedrakyan et al., 2004]

Tab. 1.1-2: Anatomische Tumorausbreitung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome nach UICC entsprechend der TNM-Klassifikation. [modifiziert nach Mountain, 1997 und Seeber, Schütte, 2003]

Primärtumor – T

TX	positive Zytologie
T1	≤ 3 cm
T2	> 3 cm, Hauptbronchus ≥ 2 cm von der Carina tracheae, Invasion von viszeraler Pleura, partielle Atelektase
T3	Brustwand, Zwerchfell, Perikard, mediastinale Pleura, Hauptbronchus < 2 cm von der Carina tracheae, totale Atelektase
T4	Mediastinum, Herz, große Gefäße, Carina tracheae, Trachea, Ösophagus, getrennte Tumorherde im selben Lungenlappen, maligner Erguss

Lymphknotenbefall – N

N0	kein Lymphknotenbefall
N1	ipsilaterale peribronchiale bzw. hiläre Lymphknoten
N2	ipsilaterale mediastinale bzw. subkarinale Lymphknoten
N3	kontralaterale mediastinale, hiläre, ipsi- oder kontralaterale Skalenus- oder supraklavikuläre Lymphknoten

Metastasenstatus – M

M0	Metastasen nicht nachweisbar
M1	Fernmetastasen, einschließlich vom Primärtumor getrennter Tumorherd in einem anderen Lungenlappen (ipsi- oder kontralateral)

Tab. 1.1-3: Stadieneinteilung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome nach UICC, basierend auf der TNM-Klassifikation. [modifiziert nach Mountain, 1997 und Seeber, Schütte, 2003]

okkultes Karzinom	0			IA			IB			IIA			IIB			IIIA			IIIB		IV
	Tis	T1	T2	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	jedes T	T4	jedes T			
N0	N0	N0	N0	N1	N1	N0	N2	N2	N1, N2	N3	jedes N	jedes N									
M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M1			

1.2 Regulation von Zellzyklus und Apoptose

1.2.1 Zellzyklusprogression und -kontrolle

Der Zellzyklus durchläuft die Interphase mit der Unterteilung G_1 (Gap-Phase 1 mit unvermeidlichem Beginn der folgenden Synthesephase S), S (Synthesephase zur DNA-Verdopplung), G_2 (Gap-Phase 2 mit unvermeidlichem Beginn der folgenden Mitosephase M) und die Mitose M mit der Pro-, Meta-, Ana- und Telophase zur DNA-Separierung und sich anschließender Zellteilung. Zur Regulation sind phasenspezifische Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) und den zugehörigen Cyclinen notwendig. Die Kinasen sind nur unter Assoziation mit dem jeweiligen Cyclin enzymatisch wirksam und werden durch Phosphorylierung eines Threonin- und Dephosphorylierung eines Tyrosin-Restes aktiviert. Die Cdk-Aktivierung für die Komplexbildung wird durch die hypophosphorylierte Form des Retinoblastom-Proteins (Rb) inhibiert. Der Tumorsuppressor Rb ist mit dem E2F-Protein konjugiert, das in dissoziierter Form die Transkription von Cyclin A, B und E bewirkt und darüber hinaus zur Acetylierung der Histone im Chromatin und damit zur Kontrolle der Transkription beiträgt. Es besteht ein kontrollierender negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen den Cyclinen und E2F. Der Beginn der Zellproliferation wird durch den Restriktionspunkt R über die Komplexbildung aus Cdk4 bzw. Cdk6 und Cyclin D in der späten G_1 -Phase bestimmt. Dieser Komplex führt zur Phosphorylierung von Rb am Serin- und Threonin-Rest. Der Komplex aus Cyclin E und Cdk2 leitet den Übergang aus der G_1 - in die S-Phase ein. Der Komplex aus Cyclin A und Cdk2 steuert die Progression in die S-Phase und führt zusammen mit dem Komplex Cyclin B und Cdc2 bzw. Cdk1 zum Übergang von der G_2 -Phase in die Mitose. [Pardee, 1974; Wagener, 1996; Flatt et al., 2000; Bartek, Lukas, 2001 (I) und (II)] (Abb. 1-1)

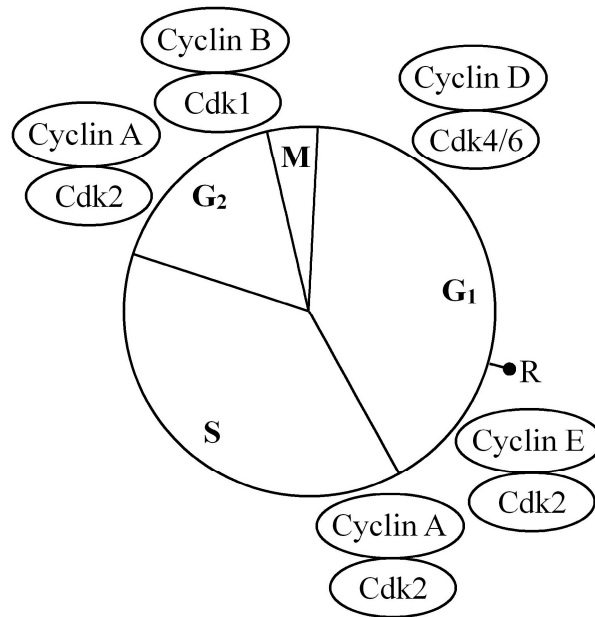


Abb. 1-1: Zellzyklus. Quantitative Darstellung der einzelnen Zellzyklusphasen mit den zugehörigen Komplexen zur Zellzyklusprogression und dem Restriktionspunkt R. [modifiziert nach Wagener, 1996]

Verschiedene Proteine kontrollieren den Zellzyklus und die Integrität der DNA. Sie bewirken Mechanismen zur Reparatur und Apoptose. Von zentraler Bedeutung ist der auf Chromosom 17p lokalisierte Transkriptionsfaktor p53. Der Wildtyp von p53 wirkt tumorsuppressiv und ist in etwa 37% aller Tumorarten und in ca. 60% der Lungentumoren mutiert. Die Strahlensensibilität von Tumorgewebe ist von funktionellem p53 entscheidend abhängig. Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, aber auch die Kontrollproteine ATM und ATR aus der PIKK-Familie, Chk1 und Chk2, inhibiertes Rb und mangelnde Zellwachstumsbedingungen führen zur Aktivierung des p53-Systems durch Oligomerisierung von nukleären p53-Monomeren und deren Akkumulation im Nukleus. Aber auch Chk1 und Chk2 selber werden durch ATM angeregt. Es folgt die Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung von Serin (15, 20) und Acetylierung von Lysin. Durch Interaktion des N-Terminus mit Mikrotubuli wird p53 im Nukleus lokalisiert. Das aktivierte p53 bindet mit seiner C-Domäne unspezifisch an DNA-Enden. p53 lagert sich bei DNA-Schädigung in Form stabiler Tetramere an kleinen Insertionen und Deletionen an. Es erfolgt die Expression und Transkription tumorsuppressiver Gene mit dem Ziel der DNA-Reparatur und Wahrung der genomischen Integrität. Zu ihnen zählen u. a. p21, gadd45, 14-3-3 und das mitochondriale Gen bax. Sie regulieren die

Proliferation und die Apoptose. Zur Autoregulation stimuliert p53 zusätzlich die Transkription der mdm2-mRNA. Das codierte Protein besitzt eine Affinität zur dephosphorylierten N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53 und führt durch Ubiquitin vermittelt zur Proteolyse und Degradation von p53. Im phosphorylierten Zustand besitzt p53 jedoch eine stabilisierte Mdm2-Bindungsdomäne. Aber auch virale Proteine wie E6 des humanen Papilloma-Virus HPV 16 und 18 und das T-Antigen des SV40-Virus führen durch proteolytische Degradation bzw. Hemmung der DNA-Bindungsfähigkeit zur p53-Inhibierung. [Winters et al., 1998; Chaturvedi et al., 1999; Matsuoka et al., 2000; Vogelstein et al., 2000; Bartek, Lukas, 2001 (I) und (II); Zhao, Piwnica-Worms, 2001]

Eine wichtige Funktion von p53 liegt in der Hemmung der Zellzyklusprogression zur Reparatur geschädigter DNA. Das durch p53 aktivierte p21 führt zusammen mit Gadd45 und 14-3-3 zur Inhibierung von Cdk1 bzw. Cdc2 und Cdk2 und damit zur Inaktivierung der Cyclinkomplexe. Als Folge kommt es zur Abkapselung der Komplexe vom Zellkern. Darüber hinaus wird Cdk2 durch phosphoryliertes bzw. degradiertes Cdc25(A) unabhängig von p53 inhibiert. Damit wird Rb hypophosphoryliert und der Zellzyklus in der G₁- bzw. G₂-Phase arretiert. Ohne funktionelles p53 kann nach Bestrahlung keine G₁-Arretierung im beschriebenen Sinne eintreten. Auch die Dauer der G₂-Arretierung wird durch p53 wesentlich bestimmt. p53 ist ferner an der Genstabilität durch Induktion von Genen für die chromosomale Segregation und Rekombination und an der Inhibierung der Angiogenese beteiligt. Eine Aktivierung von 14-3-3 vermittelt die nukleäre Translokation von p53 als Voraussetzung für die p53-Funktionalität. Die Komplexbildung aus 14-3-3 und Cdk1 bzw. Cdc2 bewirkt außerdem einen G₂-Block durch Bindung und Inaktivierung von Cdc25(C). Aber auch Chk1 führt durch Phosphorylierung zur Inaktivierung von Cdc25(C) und zu dessen Bindung an 14-3-3-Proteine. [Heald et al., 1993; McIlwrath et al., 1994; Pellegata et al., 1996; Wagener, 1996; Winters et al., 1998; Chan et al., 1999; Zhan et al., 1999; Flatt et al., 2000; Vogelstein et al., 2000; Bartek, Lukas, 2001 (I) und (II); Hildesheim et al., 2002; Sphyris, Harrison, 2005]

Darüber hinaus besitzt auch Rad51 eine bedeutende Funktion bei der DNA-Reparatur. Rad51 wird durch γ -Strahlung induziert und bewirkt die homologe Rekombination (HR) von Doppelstrangbrüchen. Die Transkription von rad51 wird u. a. durch Wortmannin gesteigert. Die Überexpression ist mit einer Abnahme von DNA-

Brüchen, der Apoptoserate, der Translokationen und der Chromosomenaberrationen sowie einer Steigerung der Rekombinationsfrequenz verbunden. Eine relativ geringe Konzentration von Rad51 korreliert mit einer gesteigerten Strahlensensibilität. Das an Nukleoproteinfilamenten lokalisierte Protein besitzt seine höchste Akkumulation in der S- und G₂-Phase. ATM führt neben einer Aktivierung von p53 auch zum Anstieg der Rad51-Loci im Zellkern. Dem gegenüber reduziert aktiviertes p53 die Gesamtkonzentration von Rad51. [Sak et al., 2005]

Die Reparatur von DNA-Schäden mit Doppelstrangbrüchen ist ebenso von DNA-Proteinkinasen (DNA-PK) abhängig. Sie bewirken die Phosphorylierung von DNA-Bindungsproteinen wie p53. Mdm2 wird dagegen durch die Proteinkinase phosphorylierend inhibiert. [Kachnic et al., 1999; Sak et al., 2002]

1.2.2 Apoptose

Ein zentraler Mechanismus zur Sicherung der DNA-Integrität des Gesamtorganismus ist die Apoptose. Sie stellt einen geregelten physiologischen Zelltod für funktionslose und fehlentwickelte Zellen dar und dient der Eliminierung DNA-geschädigter und tumorigener Zellen. Im Vergleich zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose nicht um einen Entzündungsprozess. Die Apoptose kann in jeder Zellzyklusphase auftreten. Sie wird u. a. durch die Caspasen, TNF, Bax und durch Ca²⁺ vermittelte gesteigerte Endonucleaseaktivität, aber auch durch p53 vermittelt. Das Onkogen Bcl-2 inhibiert den Prozess der Apoptose und fördert indessen die Mitose. Zur Differenzierung der Apoptose wird eine frühe und späte Form beschrieben. Die innerhalb von 12 h einsetzende frühe Apoptose basiert auf genetischen Mutationen und ist von funktionellem p53 abhängig. Die späte, nach 24 h eintretende Apoptose wird durch γ -Strahlung induziert und kann von p53 unabhängig sein. Dabei führt eine Bestrahlung in der G₁-Phase im Vergleich zu den anderen Zellzyklusphasen zu einer reduzierteren Apoptoserate. Eine p53-unabhängige Apoptose kann durch p21 initiiert erfolgen. NSCLC-Zelllinien besitzen bei mutiertem p53 eine deutlich größere strahlenbedingte Apoptose. [Kerr et al., 1994; Hain et al., 1996; Sit et al., 1997; Komarova et al., 2000; Vogelstein et al., 2000; Stuschke et al., 2002; Sak et al., 2003; Sphyris, Harrison, 2005]

Die Zellmorphologie unter der Apoptose ist initial durch Kondensation des Zytoplasmas und Chromatins gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf kommt es zur

Fragmentierung des Zellkerns, zur Membranabschnürung mit Vesikelbildung und zur Entstehung von Apoptosekörpern. Die Zellbestandteile werden von umliegenden Zellen wie Makrophagen phagozytiert. Der Ablauf der Apoptose unterliegt u. a. den Caspasen, die Einfluss auf das Zytoskelett nehmen und sowohl direkt als auch indirekt die morphologischen Veränderungen entscheidend mitbestimmen. [Kerr et al., 1972; Kerr et al., 1994; Darzynkiewicz et al., 1997] (Abb. 1-2)

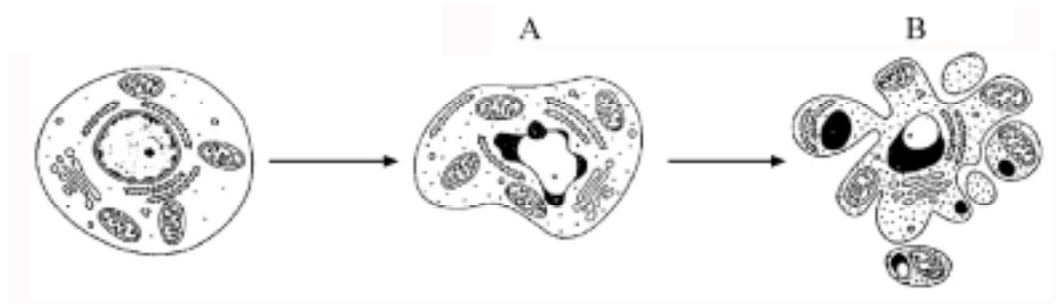


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose. A: Chromatinkondensation, nukleäre Fragmentierung und intrazelluläre Dehydrierung. B: DNA-Degradation und Ausbildung von Apoptosekörpern bei erhaltener Membranintegrität. [modifiziert nach Darzynkiewicz et al., 1997]

1.3 Coffein

1.3.1 Charakterisierung von Coffein

Coffein ist ein zu den Purinen zählendes Pflanzenalkaloid. Es besteht aus einem Fünfer- und einem Sechsering mit jeweils zwei Stickstoff-Atomen. An den Kohlenstoffatomen C₂ und C₆ befindet sich jeweils ein doppelt gebundenes Sauerstoffatom; an den Stickstoffatomen N₁, N₃ und N₇ sind Methylgruppen angelagert (Abb. 1-3). Nach der systematischen IUPAC-Nomenklatur lautet die vollständige Bezeichnung für Coffein 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3,7-trimethyl-2,6-purindion (1,3,7-Trimethylxanthin). Das Molekül mit der Summenformel C₈H₁₀N₄O₂ besitzt eine molare Masse von 194,19 g/mol. Das zur Gruppe der Methylxanthine bzw. Xanthinderivate gehörende Molekül ist weiß, geruchlos und kommt als kristallines Pulver bzw. ineinander verfilzte Nadeln vor. Der Schmelzpunkt liegt bei 238°C und die Substanz ist bei 178°C leicht zu sublimieren. Coffein ist in Wasser, Pufferlösungen und in Chloroform löslich und bildet mit Säuren und Wasser leicht lösliche Salze. [Römpp, 1995]

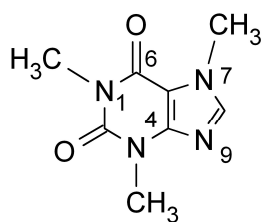


Abb. 1-3: Coffein [aus: Römpp, 1995]

Das Methylxanthin kann pharmakologisch den Psychostimulanzien und den Hemmstoffen der Phosphodiesterase (PDE) zugeordnet werden. Es wird u. a. als Kombinationspartner in analgetischen Mischpräparaten verwendet. Die Substanz wirkt primär zentral stimulierend. Weiterhin bestehen kardiovaskuläre und diuretische Effekte. Coffein bewirkt sowohl eine zentrale Vasokonstriktion als auch eine Dilatation peripherer Gefäße und eine Relaxierung glatter Muskulatur. Es besteht ferner eine positiv inotrope und chronotrope Wirkung. Zusätzlich existiert ein schwacher bronchospasmolytischer Effekt, die dem Theophyllin ähnlich ist. Theophyllin und Coffein führen neben einer Hemmung der PDE auch zu einer kompetitiven Blockierung der Adenosin-Rezeptoren. Das dem Xanthin strukturähnliche Adenosin kann in Folge dessen die dem Rezeptor angekoppelte Adenylatcyclase nicht inhibieren. Der Adenosin-Rezeptor-Antagonismus führt gleich der Inaktivierung der PDE zu einer Steigerung der intrazellulären Konzentration an cAMP. Ein daraus resultierender Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Kontraktion der glatten und quergestreiften Muskulatur sowie zur Relaxierung von Bronchialmuskelzellen. Die orale Aufnahme von Coffein führt zu einer nahezu 100%igen Bioverfügbarkeit. Im Organismus wird Coffein zu Theobromin und Theophyllin demethyliert. Weitere Abbauprodukte sind Uracil- und N-Methylharnsäurederivate. Die Plasmahalbwertszeit von Coffein beträgt ca. 5 h. Nebenwirkungen wie Emesis, Diarrhö und Tremor können ab einer Dosis von ca. 300 mg auftreten. Eine Toxizität besteht bei einer Einzeldosis ab 1 g. Die Symptome sind Schlaflosigkeit und starke psychische Erregungszustände, aber auch Delirien mit Störungen der visuellen und auditiven Wahrnehmung, Tachykardie und Extrasystolen können auftreten. Die letale Dosis beträgt 10 g. Eine teratogene und mutagene Wirkung von Coffein konnte nur in vitro nachgewiesen werden. [Römpp, 1995; Oberdisse, Hackenthal, Kuschinsky, 2002]

1.3.2 Einflussnahme von Coffein auf den Zellmechanismus

Coffein besitzt eine strahlensensibilisierende Wirkung auf der Ebene der Zellzyklusregulierung und DNA-Reparatur. Die Wirkungsweise wird seit Tolmach et al., 1977 weiterhin aktuell diskutiert. Durch Einflussnahme auf die DNA-Replikation und -Reparatur blockiert das Methylxanthin die Zellzyklusprogression. Ein breites Spektrum von Kinasen der PIKK-Familie wird inhibiert. Zu ihnen zählen ATM und ATR, die durch Coffein reversibel inaktiviert werden. Aber auch p53, Chk1 und Chk2 werden durch das Methylxanthin blockiert. Damit werden DNA-Reparaturmechanismen aufgehoben. Eine Strahlensensibilisierung tritt ein [Blasina et al., 1999; Sarkaria et al., 1999; Bartek, Lukas, 2001 (I) und (II); He et al., 2003]. Untersuchungen der G₁-S- und G₂-M-Transition zeigen, dass durch Coffein eine strahlungsbedingte G₂-Arretierung reduziert wird. Die strahlungsbedingte Inaktivierung von Cdc2 bzw. Cyclin B wird durch Coffein aufgehoben. Ein G₁-Block bleibt jedoch von Coffein unbeeinflusst. Vielmehr vermittelt Coffein unter ionisierender Strahlung eine Arretierung in der G₁-Phase. Ursächlich dafür ist die indirekte Inhibierung des Kontrollproteins Cdk2 bzw. Cyclin E [Sakurai et al., 1999; Sarkaria et al., 1999; Qi et al., 2002; Hashimoto et al., 2004]. Aber auch der Komplex aus Cyclin D(1) und Cdk4/6 wird durch Coffein inhibiert [Kaufmann et al., 2003].

Auch andere zelluläre Regulationskaskaden werden durch Coffein beeinflusst. Das Methylxanthin führt zur Reduzierung der Rad51-Loci im Zellkern und damit zur eingeschränkten homologen rekombinanten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Jedoch kommt es bei defizitärem oder mutiertem Rad51 zu keinem bzw. nur zu einem relativ geringen strahlensensibilisierenden Effekt durch Coffein [Wang et al., 2003 (I); Wang et al., 2004; Sak et al., 2005]. Darüber hinaus inhibiert Coffein die Phosphorylierung und Akkumulierung und damit die Funktionalität von p53 [Powell et al., 1995; Ribeiro et al., 1999; Deplanque et al., 2001; Qi et al., 2002]. Daneben ist bei ionisierender Strahlung eine verstärkte, p53-unabhängige Apoptose unter Coffein zu beobachten. Ferner wird eine Apoptose unter Coffein ohne Einwirkung ionisierender Strahlung beschrieben. [Hain et al., 1996; Winters et al., 1998; Higuchi et al., 2000; Qi et al., 2002; Vávrová et al., 2003].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Inzidenz der Bronchialkarzinome nimmt stetig zu. Eine kurative Therapie wird meist durch fortgeschrittenes Tumorstadium stark eingeschränkt. Palliativmaßnahmen stellen nicht selten die einzigste Form der Behandlung dar. Dabei ist für die primäre Therapie die Bestrahlung zur lokalen Tumorkontrolle, aber auch zur Tumorreduktion und Eindämmung der Metastasierung von großer Relevanz. Die Inhibierung der Zellproliferation und die Apoptose sind die dafür entscheidenden zellbiologischen Vorgänge. Auch die Anwendung von Zytostatika stellt neben der Strahlentherapie einen bedeutenden Aspekt bei der kurativen und palliativen Behandlung der Bronchialkarzinome dar. Jedoch wird die Anwendung dieser Pharmaka durch ihre zytotoxische Wirkungsweise limitiert. Unerwünschte Nebenwirkungen zeigen sich in einer Schädigung rasch proliferierender Gewebe. Aber auch mutagene Eigenschaften sind den Zytostatika zuzuordnen. Eines der häufigsten und größten Probleme ist dabei die Immunsuppression. Es gilt, alternative Wirkstoffklassen mit einem geringeren Potenzial an unerwünschten Nebenwirkungen ausfindig zu machen und sie in einer gezielten Tumorthherapie zu etablieren.

Für eine ideale Behandlung der Karzinome gilt im Allgemeinen eine maximale Schädigung des Tumors bei gleichzeitiger, maximaler Schonung des gesunden Gewebes. Im Zusammenhang mit der Therapie von Bronchialkarzinomen kann die Optimierung der Strahlentherapie durch eine gesteigerte Strahlensensibilität des Tumorgewebes erfolgen. Um die Zytotoxizität der Zytostatika für den Gesamtorganismus zu vermeiden, sollen die zellregulatorischen Funktionen der Tumorzellen gezielt beeinflusst werden. Dazu soll im Folgenden anhand zwei ausgewählter Zelllinien der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome eine mögliche Verstärkung der Strahlenwirkung durch die Modellsubstanz Coffein untersucht werden. Zur Beurteilung einer eventuellen Coffeinwirkung konzentrieren sich die Analysen auf die stationäre G_1 -Phase des Zellzyklus mit den dazugehörigen spezifischen Reparatursystemen der Zelle. In dieser Phase befindet sich die Zelle außerhalb von stressinduzierenden Teilungsvorgängen in einem relativ stabilen System mit phasenspezifischen, zellregulatorischen Mechanismen. Eine mögliche Beeinflussung der G_1 -S- bzw. G_2 -M-Transition durch die Anwendung einer subtoxischen Konzentration des Methylxanthins wird dazu unter besonderer Berücksichtigung des Tumorsuppressors p53 betrachtet, der bei einer Vielzahl von Tumoren in mutierter

Form vorliegt und somit zur Differenzierung zwischen gesundem und malignem Gewebe herangezogen werden kann. Die zellbiologischen, tumorspezifischen und für den Verlauf der Klinik entscheidenden Parameter Klonogenität, Zellproliferation, Apoptose und Migration sollen dazu dargestellt und mit Untersuchungen der Genaktivität und p53-p21-Proteinkaskade in Relation gesetzt werden.