

6 Zusammenfassung

Die strahlensensibilisierende Wirkung von Coffein ist seit den 70er Jahren bekannt. Der zu Grunde liegende Mechanismus greift komplex sowohl an der Reparatur der durch Bestrahlung verursachten DNA-Schäden als auch an der Zellzyklusprogression und der Apoptose. Das Methylxanthin kann dabei als ein „Breitspektrum-Kinase-Inhibitor“ angesehen werden, dessen Einfluss in den genannten Bereichen auch im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt werden konnte.

Die Untersuchungen erfolgten *in vitro* an zwei Vertretern der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome, A549 und H460, die als Gemeinsamkeit einen Wildtypstatus für den Tumorsuppressor p53 aufweisen. Allen Experimenten lag eine maximale Synchronisation in der G₁-Phase des Zellzyklus zu Grunde. Damit wurde eine weitere Perspektive für die Beurteilung zellregulatorischer Prozesse unter dem Einfluss von Coffein und Bestrahlung gegenüber der bestehenden Literatur ermöglicht.

Beide Zelllinien zeigten trotz ihrer unterschiedlichen Strahlensensibilität eine signifikante Reduzierung der Überlebensfraktion SF₂ durch Coffein (2 mM). Nur die strahlenempfindlichere H460 wies zudem eine Zunahme des letalen Strahlenschadens in SF₁ auf. Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse konnte in maximaler G₁-Synchronisation (G₁-Phase-Anteil > 80%) eine strahleninduzierte Blockierung der G₁-S-Transition in drei aufeinander folgenden Zellzyklen nachgewiesen werden. Das Methylxanthin führte bei A549 und H460 sowohl in bestrahlter als auch unbestrahlter Fraktion zur Zunahme dieser temporären Arretierung. Ferner wurde der Anteil der S-Phase durch Coffein reduziert. Ein strahlenbedingter G₂-Block bestand nicht. Die in der Literatur beschriebene apoptotische Wirkung von Coffein konnte jedoch im Zeitraum von bis zu 72 h anhand der Beurteilung der Sub-G₁-Phase nicht ausfindig gemacht werden. Erst die Konzentration von 5 mM Coffein bewirkte einen deutlichen Anstieg der strahlenbedingten Apoptose bei H460. Aber auch ohne Bestrahlung zeigte sich der apoptoseinduzierende Effekt von Coffein (5 mM). Dem gegenüber konnte bei der strahlenresistenten A549 keine durch Coffein (5 mM) vermittelte Apoptose nachgewiesen werden.

Zur Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus wurde der Einfluss von Coffein auf p53 und p21 untersucht. Auch die Vertreter der Bronchialkarzinome zeigten die in der Literatur beschriebene Induktion des p53- und p21-Proteins durch Bestrahlung

(6 Gy). Coffein (2 mM) reduzierte den strahlenbedingten Proteinanstieg deutlich auf das Kontrollniveau. Die Strahlensensibilisierung durch Coffein ist somit außerhalb der für die Kontrolle der Zellzyklusprogression, DNA-Reparatur und Apoptose notwendigen Proteine p53 und p21 zu suchen. Weitere Hinweise auf den Coffeinmechanismus ergaben sich bei der Untersuchung der Genexpression im Microarray-Verfahren. Coffein (2 mM) führte im Zusammenhang mit der Zellproliferation zur Reduzierung der mRNA von Cyclin D(1), Gadd45, p21 und HSP-70. Die Genexpression der an der Apoptose beteiligten Proteine Bax, Fas-1 und Tradd nahm durch Coffein zu. Der Einfluss des Xanthins war dabei aber bei den beiden Zelllinien nicht bezüglich aller untersuchten Gene identisch. Des Weiteren bestand auf der Ebene der mRNA kein Anhalt für eine Beeinflussung der für die Proliferation und Apoptose maßgebenden Regulatoren wie Cdk2, E2F und die Caspasen. Die Wirkung von Coffein basiert demnach eher auf Beeinflussung auf Protein- als auf Genebene.

Außerhalb der Proliferation und der Apoptose wurde auch *in vitro* die Migration von A549 und H460 in Hinblick auf die Metastasierung der Bronchialkarzinome untersucht. Beide Zellen migrierten unabhängig von Bestrahlung und Coffein nicht und weisen damit auch keine Beeinflussung durch das Methylxanthin auf.

Mit der Darstellung der Coffeinwirkung hinsichtlich einer Strahlensensibilisierung, Arretierung der Proliferation und Apoptoseinduktion bietet sich die Modellsubstanz aufgrund ihrer p53- und p21-unabhängigen Wirkung als Analogon für die Weiterentwicklung potenter Chemotherapeutika der Substanzgruppe der Methylxanthine wie Pentoxifyllin und Lisofyllin für die Tumorbehandlung p53-defizitärer Karzinome an, zu denen die meisten Bronchialkarzinome zählen. Ein direkter therapeutischer Einsatz von Coffein ist jedoch durch die Toxizität der strahlentherapeutisch wirksamen Konzentration nicht indiziert.

