

5 Diskussion

Eine Strahlensensibilisierung durch Coffein wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit von Russell et al., 1995 und Vávrová et al., 2003 bei humanen Bronchialkarzinom- und Leukämiezellen aufgezeigt. Auch bei den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen A549 und H460 zeigte sich dieser Coffeineffekt im Sinne einer signifikanten Reduzierung der Überlebensfraktion bei 2 Gy. Die von Sak et al., 2002 ermittelte unterschiedliche Strahlensensibilität der beiden Zelllinien konnte im eigenen Versuch bestätigt werden. Die Gabe von Coffein führte bei H460 und A549 zu einer signifikanten Reduzierung von SF₂. Dabei war der Einfluss von Coffein bei der strahlensensibleren H460 stärker als bei A549 ausgeprägt und lässt sich mit einer zellspezifischen Effektkonzentration des Methylxanthins erklären [Ribeiro et al., 1999; Qi et al., 2002]. Dies zeigte sich auch in der unterschiedlichen Beeinflussung des letalen Strahlenschadens in SF₁. Dieser war bei A549 durch Coffein nur unwesentlich gesteigert, wohingegen es bei der strahlensensibleren H460 zu einer signifikanten Zunahme des α/β -Quotienten und damit zu einem Anstieg von SF₁ kam. Dabei ist von einer durch Coffein verminderten Reparaturkapazität für die strahlungsbedingten Doppelstrangbrüche auszugehen. Es resultiert die Abnahme des Zellüberlebens [Sakata et al., 1992; Steel, 1993].

Die gesteigerte Strahlensensibilität durch Coffein ist sowohl in einer Beeinflussung der Zellproliferation, der Reparaturfähigkeit strahlenbedingter DNA-Schäden als auch der Apoptose begründet. Im Zusammenhang mit einer DNA-Schädigung nehmen die phosphorylierenden Kinasen ATM und ATR der PIKK-Familie eine zentrale Position ein. Sie werden bei defekter DNA aktiviert [Sarkaria, Eshleman, 2001]. Diese Kontrollproteine führen zur Aktivierung der Kinaseinhibitoren Chk1 und Chk2 und inhibieren damit indirekt über eine sich anschließende Proteinkaskade die für die G₁-S-Transition erforderliche Bildung des Komplexes Cyclin E-Cdk2. Die Zellzyklusprogression wird für die Reparatur defekter DNA gestoppt [Bartek, Lukas, 2001 (II)].

Die Untersuchungen von Deplanque et al., 2001 und Qi et al., 2002 zeigten, dass in der exponentiellen Phase mit Coffein inkubierte Zellen ebenso wie bestrahlte Zellen einen G₁-Arrest aufweisen. Dem gegenüber ist vielfach die Aufhebung eines strahleninduzierten G₂-Arrests durch Coffein beschrieben, mit der die Zytotoxizität der Bestrahlung aufgrund einer verkürzten Reparaturzeit und Übernahme von geschädigter

DNA von der Mutter- in die Tochterzellen zunimmt [Pellegata et al., 1996; Ribeiro et al., 1999; Sarkaria et al., 1999; Deplanque et al., 2000; Deplanque et al., 2001, Qi et al., 2002; Vávrová et al., 2003].

Die eigene Analyse der Zellzyklusprogression von A549 und H460 erfolgte in maximaler G₁-Synchronisation, der für die Zelle funktionellen Phase [Löffler, Petrides, 1998]. Ergänzend zu Deplanque et al., 2000, 2001 und Qi et al., 2002 zeigte sich auch im eigenen Versuch bei G₁-synchronisierten Zellen eine temporäre Arretierung der G₁-Phase und Abnahme der Syntheseleistung durch Coffein. Es bestand eine additive Wirkung der beiden Modulatoren Bestrahlung und Coffein, die sich bei den untersuchten Zelllinien in Form einer Zunahme der oben beschriebenen G₁-Arretierung und weiteren Reduzierung der DNA-Synthese zeigte. Da eine Inaktivierung der katalytischen Kontrollproteine ATM und ATR durch Coffein von Blasina et al., 1999, Sarkaria et al., 1999 und Sarkaria, Eshleman, 2001 beschrieben wurde, muss in Übereinstimmung mit der Darstellung von Wang et al., 2003 (I) von einer ATM- und ATR-unabhängigen Strahlensensibilisierung durch Coffein in der G₁-Phase ausgegangen werden. Die von Bartek, Lukas, 2001 (I) aufgezeigte Proteinkaskade, die bei DNA-Schädigung den Übergang der G₁- in die S-Phase blockiert, beschreibt die durch ATM und ATR vermittelte Aktivierung der cyclininhibierenden Kinasen Chk1 und Chk2. Letztere initiiert den frühzeitigen und transienten G₁-Arrest und wird ebenfalls durch Coffein inhibiert [Blasina et al., 1999]. Eine coffeininduzierte G₁-Arretierung ist daher aufgrund der ATM- und ATR-Inaktivierung durch Coffein nicht auf die Inhibierung von Chk2 zurückzuführen. Hinweise für einen direkten Einfluss von Coffein auf die cyclininhibierenden Kinasen bestehen nicht.

Für die Blockierung der Proliferation in der G₁-Phase ist die Inhibierung der Komplexbildung aus der cyclinabhängigen Kinase Cdk2 und dem Cyclin E von entscheidender Bedeutung. Qi et al., 2002 zeigen bei A549, dass Coffein und Bestrahlung sowohl separat als auch synergistisch Cdk2 inaktivieren. Die Bildung der Komplexverbindung von Cyclin E-Cdk2 ist somit neben der von Cyclin A-Cdk2 unterdrückt. Eine Synthese der beiden Komplexe Cyclin D-Cdk4/6 und Cyclin E-Cdk2 kann damit nicht erfolgen; diese ist jedoch für die Inaktivierung des transkriptionsinhibierenden Faktors Rb verantwortlich. Die Freisetzung des für die anschließende S-Phase erforderlichen Transkriptionsfaktors E2F ist weiterhin durch die Bindung mit Rb verhindert. Auf diese Weise wird die für die Zellzyklusprogression

notwendige Transkription und Proteinsynthese durch Coffein unterdrückt [Bartek, Lukas, 2001 (II); Deplanque et al., 2001]. Dem gegenüber wird ein Einfluss von Coffein auf die Komplexe Cyclin E-Cdk2 und Cyclin A-Cdk2 von Kaufmann et al., 2003 verneint. Es ist davon auszugehen, dass der proliferationshemmende Coffeineffekt sich überwiegend auf eine ggf. indirekte Beeinflussung der Proteine Rb und E2F beschränkt. Die Analyse der Genexpression zeigte bei den für die G₁-Phase relevanten Genen für Cyclin E sowie Cdk2 und E2F weder durch Coffein noch bei Bestrahlung eine Beeinflussung. Lediglich die Expression des in der frühen G₁-Phase bedeutsamen Cyclin D(1) wurde bei H460 nur durch Coffein bzw. in Kombination mit Bestrahlung bei A549 reduziert. Eine Inhibierung von Cyclin D(1)-Cdk4/6 durch Coffein auf der Proteinebene wird auch von Kaufmann et al., 2003 und Hashimoto et al., 2004 beschrieben. Eine Blockierung der G₁-S-Transition ist jedoch weniger direkt auf Cyclin D als auf Cyclin E und dessen Komplex zurückzuführen [Ohtsubo et al., 1995; Hashimoto et al., 2004].

Im Zusammenhang mit der Arretierung der Zellzyklusprogression nimmt der Tumorsuppressor p53 eine bedeutende Funktion ein [Vogelstein et al., 2000]. Auch p53 wird bei DNA-Schädigung durch die beiden Kinasen ATM und ATR indirekt und über Chk1 und Chk2 direkt durch Phosphorylierung an der Domäne Serin 15 bzw. 20 aktiviert. Das Protein akkumuliert. Der p53-Antagonist Mdm2 wird dagegen zusätzlich durch Chk2 sowie ATM und ATR inhibiert. Es folgt die p53-vermittelte Expression und Aktivierung von p21, das an Cdk2 bindet und die Komplexbildung Cyclin E-Cdk2 anhaltend blockiert [Bartek, Lukas, 2001 (I) und (II)].

In den Arbeiten von Pellegata et al., 1996 und Russell et al., 1996 konnte an Fibrosarkomzellen und an A549 die Induktion von p53 und p21 bei Bestrahlung in exponentieller Phase nachgewiesen werden. Auch die von Stuschke et al., 2002 als p53-funktionell positiv charakterisierten Bronchialkarzinomzellen H460 und A549 zeigten in der eigenen Analyse bei G₁-Synchronisation entsprechend ihrem unterschiedlichen Grundniveau einen strahleninduzierten Anstieg der Gesamtfraction von p53- und verzögert von p21-Protein. Sarkaria et al., 1999 stellten in exponentieller Phase bei A549 dar, dass Coffein die strahleninduzierte Phosphorylierung von p53 an Serin 15 unterdrückt. Das Protein ist damit instabil. Die Akkumulierung und p21-Aktivierung sowie eine durch p53 bedingte Arretierung in der G₁-Phase des Zellzyklus können nicht erfolgen. Die Konzentration sowohl von p53 als auch von p21 wird somit durch Coffein

reduziert, wie es auch in den untersuchten Bronchialkarzinomzellen unabhängig von der Bestrahlung in der G₁-Phase ersichtlich war. Die Genexpression für p53 bleibt jedoch von Coffein unbeeinflusst [Deplanque et al., 2001]. Auch die eigene Microarray-Analyse ergab keine Veränderung des mRNA-Gehalts von p53. Im Gegensatz dazu reduzierte Coffein bei beiden Zelllinien die Genexpression von p21 unabhängig von der Bestrahlung. Trotz der Inaktivierung bzw. Reduzierung des p53-Gesamtproteins resultierte eine gesteigerte Strahlensensibilität im Sinne einer Abnahme der Überlebensfraktion. Die Sensibilisierung ist dabei unabhängig von der Zellzyklusphase, in der die Bestrahlung erfolgt. Sie wird sowohl in der exponentiellen als auch – wie in der eigenen Untersuchung – in der stationär bestrahlten A549 und H460 nachgewiesen [Pellegata et al., 1996]. Da Coffein die p53- und p21-Proteingesamtfraktion reduzierte und die Bestrahlung zusammen mit Coffein die G₁-Blockierung steigerte, ist von einer p53-unabhängigen G₁-Arretierung bei Bestrahlung und Coffein in G₁-synchronisierten Zellen auszugehen, wie sie auch Qi et al., 2002 beschreiben. Die Coffeinwirkung bei Bestrahlung steht jedoch in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. Eine strahlenbedingte G₁- bzw. G₂-Arretierung wird unterschiedlich durch das Methylxanthin im Sinne einer Strahlensensibilisierung beeinflusst.

In exponentieller Phase bestrahlte Zellen weisen eine Blockierung der G₂-M-Transition auf. Dieser G₂-Block wird durch Coffein im Gegensatz zum G₁-Arrest aufgehoben. Die Wirkung des Methylxanthins ist dabei unabhängig von p53, obwohl das Protein auch eine bedeutende Funktion in der Vermittlung des durch Strahlung induzierten G₂-Blocks besitzt [Pellegata et al., 1996; Vogelstein et al., 2000]. Das in der S-Phase synthetisierte und für die G₂-M-Transition erforderliche Cdc2 bzw. Cdk1 wird durch p53 und p53-vermittelte p21-Cdc2-Bindung inaktiviert. Auch die Transkription der Cdc2-mRNA wird neben der für Cyclin B durch p53 unterdrückt [Winters et al., 1998; Taylor, Stark, 2001]. In Ergänzung dazu inhibieren durch Ubiquitin vermittelt Cds1 bzw. Chk2 und Chk1 die Proteinphosphatase Cdc25(C), die die Cdc2-Aktivierung bewirkt und selber durch die Bindung mit dem Protein 14-3-3 blockiert wird [Sanchez et al., 1997; Chan et al., 1999]. Unabhängig von p53 erfolgt ebenso hier die Inaktivierung von Cdc2 und daraus resultierend die Blockierung des Cyclin B-Cdc2-Komplexes für die G₂-M-Transition [Furnari et al., 1999]. Eine zusätzliche Kontrolle für den G₂-M-Übergang stellt Gadd45 dar, das die Komplexbildung Cyclin B-Cdc2 inhibiert. Zellen mit negativem Gadd45-Status weisen bei Bestrahlung sowohl einen

reduzierten G₁- als auch G₂-Arrest auf [Taylor, Stark, 2001; Hildesheim et al., 2002]. Russell et al., 1995 und Deplanque et al., 2001 stellten in diesem Zusammenhang die p53-Unabhängigkeit an E6-transfizierten und damit p53-funktionell negativen Zellen der A549 und der humanen Thyroidkarzinomzelllinie K1 dar. Auch im p53-negativen Knockout-Mausmodell mit embryonalen Fibroblasten sowie bei p53-defizitären, leukämischen Promyelozyten zeigte sich die p53-unabhängige Aufhebung des strahleninduzierten G₂-Arrests durch Coffein [Powell et al., 1995; Vávrová et al., 2003]. Diese Unabhängigkeit lässt sich zum einen mit der Inaktivierung von Cds1 bzw. Chk1 durch Coffein erklären [Blasina et al., 1999]. Auch wird durch Coffein die strahlenbedingte Cdc2-Reduzierung aufgehoben, wie es Qi et al., 2002 bei A549 feststellte. Die Komplexbildung Cyclin B-Cdc2 wird damit nicht weiter unterdrückt und es erfolgt der Übergang von der G₂-Phase in die Mitose. Darüber hinaus wurde bei den untersuchten Zelllinien A549 und H460 eine reduzierte Genexpression von Gadd45 bei Bestrahlung durch Coffein nachgewiesen, mit der der Antagonismus zur Komplexbildung von Cyclin B-Cdc2 inaktiviert wird [Taylor, Stark, 2001]. Die Expression von Cyclin B(2) wurde zudem durch Coffein und Bestrahlung bei A549 induziert. Das die Aktivierung des Komplexes Cyclin B-Cdc2 inhibierende 14-3-3 zeigte hinsichtlich seiner Genexpression weder durch Coffein noch durch Bestrahlung eine Regulation. Neben Gadd45 und 14-3-3 nimmt auch das Hitzeschockprotein HSP-70 Einfluss auf die Proliferation und eine Inhibierung des Proteins führt neben einer Zunahme der Apoptose vor allem zum Proliferationsstopp [Zhao, Shen, 2005]. Auch die für dieses Protein verantwortliche mRNA wurde durch Coffein bei beiden Zelllinien reduziert.

Die in der Literatur beschriebene G₂-Arretierung setzt eine Bestrahlung in exponentieller Phase außerhalb der aktivierten Kontrollproteine der G₁-Phase voraus. Durch die stattgefundene Synthesephase stehen die Proteine für die Zykluskontrolle in der folgenden G₂-Phase für eine mögliche Sensibilisierung durch Coffein zur Verfügung [Pellegata et al., 1996]. Dem gegenüber ist davon auszugehen, dass bei G₁-Synchronisation die Kontrollproteine, die die G₂-Blockierung initiieren, nicht wirksam werden. Eine Regulation der den G₂-Block vermittelnden Proteinkaskade durch Bestrahlung bzw. Coffein ist damit in dieser Phase nicht oder nur begrenzt möglich. Die Beeinflussung der Zellzyklusprogression konzentrierte sich demnach im eigenen Versuchsmodell nur auf die G₁-S-Transition. In beiden Zelllinien zeigte sich weder bei

Coffeingabe noch bei Bestrahlung bzw. deren Kombination eine Beeinflussung der G₂-M-Transition im Sinne einer Reduzierung oder Verzögerung von über 5%.

Zum einen führt die Schädigung der DNA zur Beeinflussung der Zellzyklusprogression. Eine notwendige Reparatur der Erbinformation kann durch Pausieren des Zellzyklus erfolgen. Zum anderen kann bei DNA-Schäden und unzureichender Reparaturkapazität der programmierte Zelltod zur Wahrung des Genoms und damit des Gesamtorganismus einsetzen. Bei den von Stuschke et al., 2002 charakterisierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigte A549 im Gegensatz zu H460 bei 20 Gy keine durch Bestrahlung induzierbare Apoptose. Dies bestätigte sich in der eigenen Analyse 240 h nach 10 Gy Bestrahlung, bei der der Anteil apoptotischer Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrolle bei A549 gleich blieb bzw. unter 6% und bei H460 über 30% betrug. Auch die Untersuchung in exponentieller Phase des Zellzyklus bei 10 Gy wies bei A549 keine strahleninduzierbare Apoptose auf; es konnte jedoch bei A549 gezeigt werden, dass Coffein in einer 5 mM Konzentration eine apoptoseinduzierende Wirkung besitzt [Qi et al., 2002]. Des gleichen beschrieben auch Vávrová et al., 2003 bei A549 eine durch Coffein induzierbare Apoptose. Ferner wies ebenso die eigene Untersuchung nach 240 h die apoptoseinduzierende Eigenschaft von 5 mM Coffein zumindest bei H460 nach, die auch die strahlungsbedingte Apoptose im Sinne eines additiven Effektes steigerte. Dagegen konnte die Beeinflussung von A549 durch Coffein, wie sie Qi et al., 2002 beschrieben, nicht bestätigt werden und ist auf die verkürzte Inkubationszeit von 72 h versus 96 h zurückzuführen.

Eine Aktivierung des programmierten Zelltods kann gleich dem Zellzyklusarrest indirekt durch den Tumorsuppressor p53 erfolgen [Vogelstein et al., 2000]. Die Konzentration von p53 korreliert positiv mit der Apoptoserate. Dabei wird die Apoptose letztendlich über das mitochondriale System reguliert. Die strahleninduzierte Phosphorylierung der Domäne Serin 46 von p53 reguliert die Expression verschiedener pro- und antiapoptotischer Gene. Die apoptosevermittelnden Proteine wie Bax, Fas/Apo-1 und p53/aip-1 führen bei mitochondrialer Lokalisation zum Zusammenbruch des Membranpotenzials und damit zur Permeabilitätsänderung dieses Organells; Apoptosepromotoren wie die Caspasen und Cytochrom C werden freigesetzt [Oda et al., 2000; Slee et al., 2004]. Nach dieser prämitochondrialen Phase der Apoptose aktivieren in der mitochondrialen Phase die Initiator-Caspasen die Effektor-Caspasen [Loeffler, Kroemer, 2000]. Dabei nimmt Caspase 3 als Effektor eine bedeutende Funktion bei der

irreversiblen Proteolyse ein und ist verantwortlich für die apoptosetypischen Charakteristika Chromatinkondensation, Membranabschnürung und Ausbildung von Apoptosekörpern [Kerr et al., 1972; Darzynkiewicz et al., 1997; Thornberry, Lazebnik, 1998]. Die aufgrund der Permeabilitätsänderung der Mitochondrien verbundene Exzitation des mitochondrialen, apoptoseinduzierenden Faktors AIP führt ebenso wie die durch Caspase 3 aktivierte DNase CAD nach nukleärer Translokation zur Fragmentierung der DNA in der postmitochondrialen Phase [Enari et al., 1998; Slee et al., 1999].

Die beschriebene Zunahme der Apoptose durch Coffein ist jedoch wie auch die Beeinflussung der Proliferation ebenfalls unabhängig von p53 zu erklären. Der Tumorsuppressor nimmt zwar in der Vermittlung der Apoptose eine entscheidende Position ein, dennoch wird eine p53-unabhängige Apoptose unter Einfluss von Coffein in Kombination mit Bestrahlung beschrieben [Higuchi et al., 2000]. Auch im eigenen Versuchsmodell war trotz p53- und p21-Reduktion die Apoptoserate durch Coffein zumindest bei der strahlensensibleren Zelllinie H460 gesteigert und ist ggf. auf eine zellspezifische Effektkonzentration zurückzuführen [Ribeiro et al., 1999; Bode, Dong, 2006]. Coffein nimmt dabei Einfluss auf die apoptoseinduzierenden Caspasen. Sowohl die Initiator- bzw. Procaspasen (-8) als auch die Effektorcaspasen (-3) werden dosis- und zeitabhängig durch Coffein induziert [Fernández et al., 2003; He et al., 2003]. Die Einflussnahme von Coffein beschränkt sich dabei jedoch nur auf die Proteinebene. Die Expression der mRNA der einzelnen Caspasen wurde nicht modifiziert. Des Weiteren bewirkt Coffein die Induktion von Bax, einem Apoptosepromotor der Bcl-2-Familie [He et al., 2003]. Die für dieses Protein zugehörige mRNA wurde aber lediglich bei A549 gesteigert und ist eher als eine unspezifische Reaktion zu bewerten. Neben der Beeinflussung der Caspasen und Bax wird außerdem ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg durch Coffein beschrieben. Die Zunahme von Ca^{2+} führt zur Apoptose und wird durch coffeinsensible Ryanodin-Rezeptoren vermittelt [Jang et al., 2002]. Damit lässt sich allgemein die apoptoseinduzierende Wirkung von Coffein außerhalb der p53-Funktion erklären. Es resultieren die zellmorphologischen Veränderungen mit Membranabschnürung und irregulärer Zellformierung, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung, Karyopyknose, -rhexis sowie -lyse mit Ausbildung perinukleärer Apoptosekörper, wie sie von Kerr et al., 1972, Darzynkiewicz et al., 1997 und im Zusammenhang mit Coffein von Jang et al., 2002 beschrieben und in der eigenen,

mikroskopischen Beurteilung gefunden wurden. Darüber hinaus führt Coffein zum Adhäsionsverlust [Jang et al., 2002]. Bei der Analyse der Plattiereffizienz im Rahmen des Koloniebildungstestes zeigte sich auch bei der strahlensensibleren Zelllinie H460 eine signifikante Reduzierung dieser durch Coffein. Es erfolgt damit ein weiteres Signal für den Zelltod in Form der Anoikis, u. a. vermittelt durch die Apoptosepromotoren Bim und Bmf [Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001; Puthalakath, Strasser, 2002].

Ein Hinweis auf eine mögliche Regulierung der Expression apoptosespezifischer mRNA durch Coffein bestand bei der Microarray-Analyse lediglich für die Gene des Bcl-2-Antagonisten Bag(-3), des Plasmamembranproteins Fas(-1)/Apo-1 aus der TNF-Rezeptorfamilie, des proapoptotischen, TNF-Rezeptor-assoziierten Proteins Tradd und wie bereits oben aufgeführt für Bax. Dabei zeigte sich bei den beiden Zelllinien mit Ausnahme von Tradd, dessen Genaktivität durch die Coffeingabe und Bestrahlung gesteigert wurde, keine einheitliche Beeinflussung dieser Genexpression. Es zeichnete sich jedoch auch teilweise eine antiapoptotische Regulation durch Coffein ab, so z. B. bei H460 die Herunterregulierung der mRNA von Bag(-3) durch Coffein und von Fas(-1) bei Kombination von Bestrahlung und Coffein. Alle weiteren, im Rahmen dieser Messung untersuchten Apoptosegene, wie aif(-1), apaf(-1), bak(-1), aber auch bcl-2 und p53, wiesen keine Beeinflussung weder durch Bestrahlung noch durch Coffein auf (vgl. Tab. 4.5-1). Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht in allen Fällen die mRNA ausreichend analysiert werden konnte und somit eine absolute Aussage bezüglich des Einflusses von Coffein bzw. Bestrahlung hinsichtlich einer eventuellen Regulierung der Genexpression nicht möglich ist. Dennoch kann angenommen werden, dass bei der z. T. transkriptionsunabhängigen Apoptose die apoptoseinduzierende Wirkung von Coffein sich auf die Proteinregulierung konzentriert und eine Beeinflussung apoptotischer Gene ohne größere Relevanz ist [Slee et al., 2004].

Die apoptoseinduzierende Wirkung konnte dagegen nicht in der Analyse der Zellzyklusprogression bis 72 h Inkubation mit Coffein nachgewiesen werden. Die verwendete Konzentration von 2 mM bewirkte keine Zunahme von über 5% des Sub-G₁-Phase-Anteils, der die fraktionierte DNA als Bestandteil apoptotischer Zellen präsentiert [Amirlak, Couldwell, 2003]. Es ist hier von einer für die untersuchten Zelllinien subtoxischen Konzentration auszugehen, die aber die Beurteilung des Zellzyklus erlaubte.

Neben der aufgezeigten Beeinflussung des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose nimmt Coffein auch Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität. Ein weiteres Zielprotein von Coffein stellt dabei die DNA-Proteinkinase dar, die bei DNA-Schädigung wie Fragmentierung und Deletion induziert wird und für die Reparatur der DNA essentiell ist [Sak et al., 2002]. Zwar wurden von Sarkaria et al., 1999 eine Unabhängigkeit der DNA-PK von Coffein beschrieben, es weisen jedoch neuere Untersuchungen auf eine Inhibierung der DNA-PK durch das Methylxanthin hin [Block et al., 2004]. So ist auch hier von einer zellspezifischen Effektkonzentration von Coffein auszugehen [Ribeiro et al., 1999; Bode, Dong, 2006]. Als Konsequenz der Inhibierung folgt eine verminderte Reparatur strahlenbedingter DNA-Doppelstrangbrüche im Sinne eines eingeschränkten nonhomologous-end-joining-Mechanismus (NHEJ) [Sak et al., 2002]. Im Gegensatz dazu wird die strahlensensibilisierende Wirkung von Coffein in der Arbeit von Wang et al., 2003 (II) als eine von dem NHEJ unabhängige Reaktion beschrieben. Coffein blockiert dabei die homologe direkte Reparatur (HDR), eine weitere Form der Behebung von DNA-Schäden außerhalb der G₁-Phase. Das Protein Rad51 ist bei der HDR entscheidend beteiligt. Eine Bestrahlung in der G₂-Phase führt zur Induktion von Rad51 und zu deren Lokalisation an der DNA. Die Rad51-abhängige HDR wurde für die beiden Zelllinien A549 und H460 nachgewiesen [Sak et al., 2005]. Coffein führt zur Reduzierung der strahleninduzierten Rad-Foci [Wang et al., 2004]. Da bei Rad51-negativen Zellen keine bzw. nur eine verminderte Strahlensensibilisierung durch Coffein besteht, ist dieses Protein neben der DNA-PK als ein Hauptangriffspunkt anzusehen. Die strahlensensibilisierende Wirkung von Coffein scheint somit auf der Beeinflussung der Reparaturkapazität der HDR und der NHEJ zu beruhen und erfolgt damit sowohl in exponentieller als auch in stationärer Phase des Zellzyklus [Wang et al., 2003 (I); Block et al., 2004]. (Abb. 5-1)

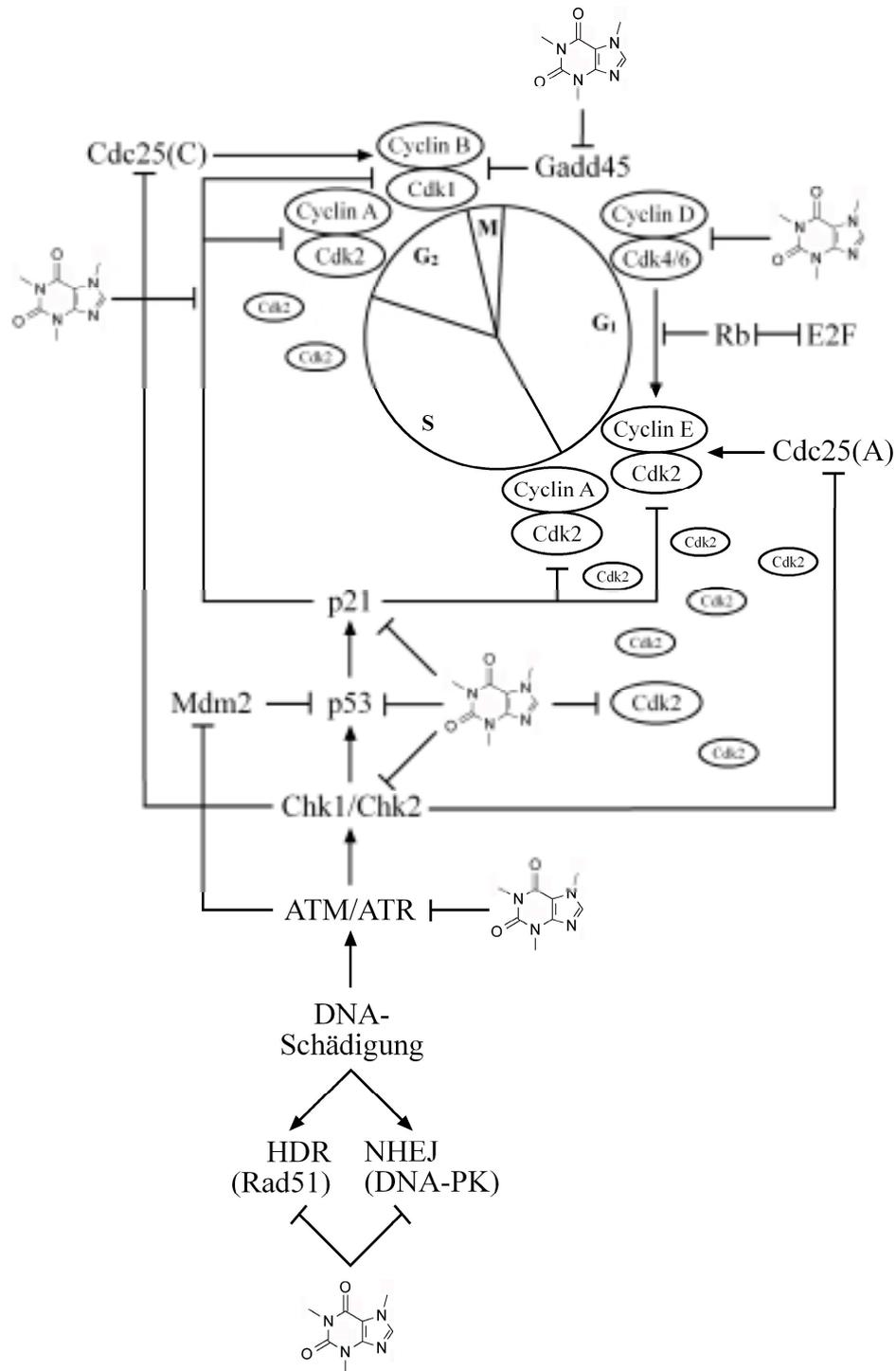


Abb. 5-1: Einfluss von Coffein auf die Zellzyklusprogression, -regulierung und Mechanismen der DNA-Reparatur. [modifiziert nach Blasina et al., 1999; Bartek, Lukas, 2001 (I) und (II); Taylor, Stark, 2001; Qi et al., 2002; Sak et al., 2005; Bode, Dong, 2006]

In Ergänzung zu der Überlebensfraktion, der Zellzykluskinetik und der Apoptose, die durch Bestrahlung bzw. Coffein beeinflusst werden, stellt die Metastasierung für die Klinik und Therapie der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome einen bedeutenden und limitierenden Aspekt dar. Bei den Zellen der NSCLC sind die Chemokine CXCL12 bzw. SDF-1 und deren Rezeptor CXCR4 für die Regulation der Metastasierung von großer Relevanz [Phillips et al., 2003; Oonakahara et al., 2004]. Sie vermitteln die für die Metastasierung notwendige Migration, Invasion und Adhäsion und werden bei Zellstreuung verstärkt in vivo exprimiert. Bei Vertretern der NSCLC stoppt eine Blockierung der Genexpression von SDF-1 und CXCR4 die Migration und deren Invasion und Adhäsion [Su et al., 2005]. Bei A549 und H460 blieb die Migration jedoch aus. Die eigene Untersuchung der Migrationsfähigkeit wies bei beiden Zelllinien sowohl bei Bestrahlung bzw. Coffein als auch in unbehandelter Form im Zeitraum bis zu 24 h keine Migration auf. Im Vergleich dazu zeigen NSCLC- und Gliomzellen in dieser Zeitspanne eine deutliche Migration bzw. Invasion [Joy et al., 2003; Su et al., 2005; unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe]. Jedoch konnte trotz fehlender Migration für beide Zelllinien SDF-1 in der mRNA-Analyse nachgewiesen werden. Die mRNA von CXCR4 stellte sich aber lediglich bei H460 dar und ist neben einer Gennegativität ggf. messtechnisch zu begründen. Da die Expression beider Gene weder durch Bestrahlung noch durch Coffein beeinflusst wurde, kann möglicherweise davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Zelllinien bezüglich der Migration und deren Metastasierung nicht potent sind und somit keine Modulation durch das Methylxanthin und die Bestrahlung erfolgen kann.