

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
(Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

Einfluss der Kombination von Coffein und Bestrahlung auf das Zell-
überleben humaner HNO-Tumorzelllinien am Beispiel XF354 und SAS

Stefanie Maria Käck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff
2. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

Die Dissertation wurde am 13.02.2012 bei der Technischen Universität
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2012
angenommen.

Gliederung

1	Einleitung	5
1.1	HNO-Tumore	5
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	5
1.1.2	Therapiemöglichkeiten der HNO-Tumore	7
1.1.3	Vorstellung der verwendeten Zelllinien	10
1.2	Zellzyklus und Apoptose	10
1.2.1	Regulation des Zellzyklus	10
1.2.2	Prozess der Apoptose	15
1.3	Wirkmechanismen der Strahlentherapie	18
1.3.1	Strahlenwirkung auf DNA	18
1.3.2	Auswirkungen auf Zellzyklus und Apoptose	20
1.3.3	Reparaturmechanismen der Zelle	21
1.4	Modulation der Strahlenwirkung	24
1.4.1	Grundlagen der fraktionierten Bestrahlung	24
1.4.2	Die vier R's der Strahlentherapie	26
1.5	Coffein	27
1.5.1	Molekulare Struktur	27
1.5.2	Wirkungen auf den Organismus	28
1.5.3	Einflussnahme von Coffein auf die Zelle und deren Strahlensensibilität	29
1.6	Zielsetzung der Arbeit	32
2	Materialien und Geräte	34
2.1	Zelllinien	34
2.2	Geräte und Hilfsmittel	34
2.3	Zellkulturmedien und Zusätze	36
2.4	Chemikalien	37
3	Methoden	38
3.1	Zellkultivierung	38
3.1.1	Auftauen der Zellen	38
3.1.2	Passagieren der Zellen	38
3.1.3	Einfrieren der Zellen	40
3.2	Koloniebildungsassay	40
3.2.1	Aussäen der Zellen	40

3.2.2	Zellfärbung	41
3.2.3	Linear-quadratisches Modell	42
3.2.4	Auswerten der Assays und Bestimmen der Survival Fraction	45
3.3	Durchführen einer Vorversuchsreihe.....	46
3.3.1	Bestimmen der optimalen Zellzahlen	46
3.3.2	Feststellen geeigneter Coffeinkonzentrationen	47
3.3.3	Diskussion über einen möglichen Mediumwechsel	48
3.4	Durchführung der Bestrahlung	48
3.4.1	Bestrahlung am RS225	48
3.5	Anwendung von Coffein	49
3.5.1	Herstellen einer Stocklösung.....	49
3.5.2	Zugabe von Coffein	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Plating Efficiency und Survival Fraction	52
4.2	Einfluss der Bestrahlung auf die Survival Fraction	53
4.3	Einfluss von Coffein auf die Survival Fraction	55
4.4	Effekt der Kombination von Coffein und Bestrahlung.....	60
4.5	3D-Modell-Analyse	64
5	Diskussion	70
6	Zusammenfassung und Ausblick	74
7	Literaturverzeichnis	76
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	83
9	Danksagung	87

1 Einleitung

1.1 HNO-Tumore

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Unter dem Überbegriff HNO-Tumore werden Tumore mit Lokalisation im Naso-, Oro- und Hypopharynx, in der Mundhöhle und dem Larynx zusammengefasst; dabei handelt es sich in der großen Mehrzahl (über 90 %) der Fälle um Plattenepithelkarzinome (Ihrler S 2009).

Weltweit gesehen stellen HNO-Tumore die sechsthäufigste Tumorart mit 650.000 Neuerkrankungen und 350.000 Krebstoten pro Jahr dar, wobei sich eine regionale Häufigkeitsverteilung zeigt (Argiris et al. 2008). Wie bei keiner anderen Krebserkrankung ist die altersstandardisierte Mortalität bei den Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs in den letzten 25 Jahren angestiegen. Seit Mitte der 90er Jahre scheint dieser Trend jedoch wieder leicht rückläufig zu sein.

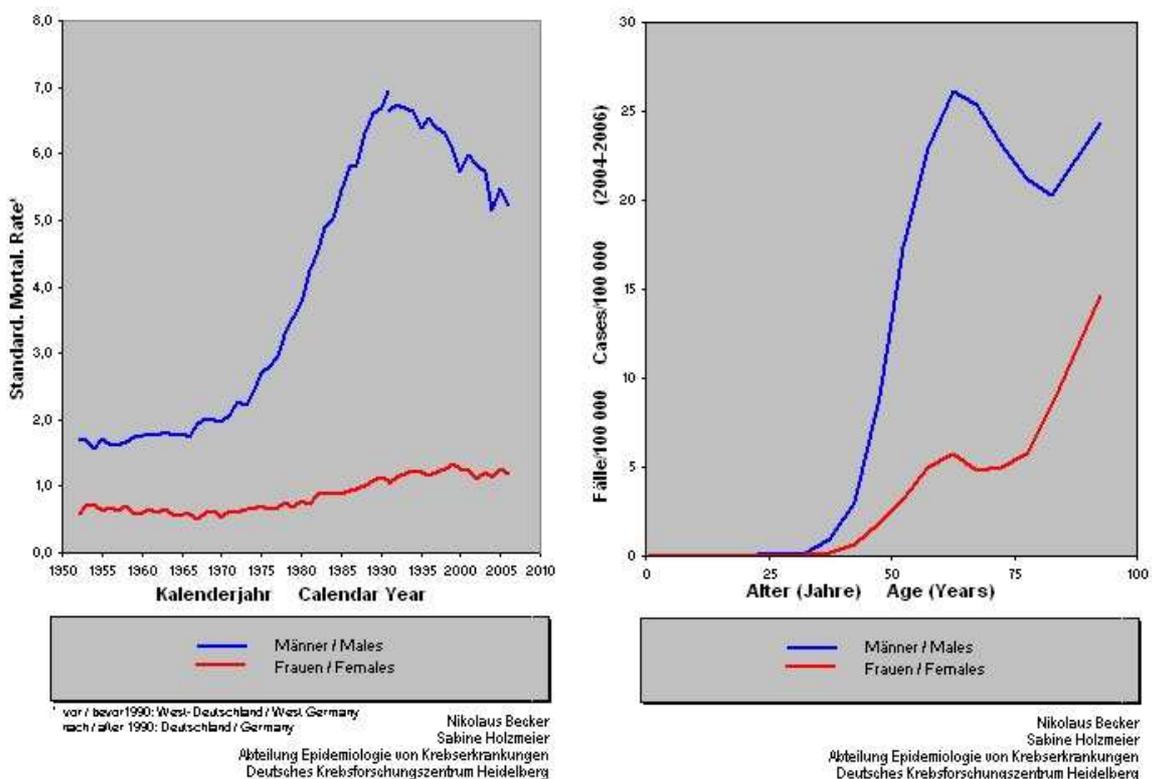


Abbildung 1: Mortalitätsrate und Altersverteilung bei Lippen-, Mundhöhle- und Rachentumoren (aus: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

In der Bundesrepublik Deutschland lag im Jahre 2002 der relative Anteil bei Männern bei 7,3 % im Gegensatz zu Frauen mit 2,1 %, was sich durch das unterschiedliche geschlechterspezifische Verhalten gegenüber den Risikofaktoren (s. u.) erklären lässt. Der Altersmittelwert bei Diagnosestellung liegt im Durchschnitt bei 60 Jahren, wobei dieser bei Männern je nach Tumorlokalisation bis zu 7 Jahre niedriger liegt (Ausnahme Nasopharynxmalignome) (Reiter M 2009). 60 % der neu diagnostizierten Patienten befinden sich in einem lokal fortgeschrittenen Stadium (mit Befall der regionalen Lymphknoten), bei 10 % kann bereits bei Erstdiagnose eine Fernmetastasierung festgestellt werden (Argiris et al. 2008; Yang et al. 2009).

Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich gelten allgemein Tabak- und Alkoholkonsum, welche sich bei 75 % aller Tumorpatienten finden lassen und multiplikative kombinierte Effekte besitzen. Des Weiteren erhöhen bestimmte Krebs-Suszeptibilitäts-Syndrome wie HNPCC (hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom), Li-Fraumeni-Syndrom, Fanconi-Anämie und Ataxia teleangiectasia das Risiko, an einem HNO-Tumor zu erkranken. In neueren Untersuchungen wurde auch das Humane Papilloma Virus HPV, insbesondere dessen Subtypen HPV 16 und 18, mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen in Verbindung gebracht. So ließ sich bei ca. 25 % dieser Malignome HPV-genomische DNA nachweisen. Die Beziehung zwischen HPV und HNO-Tumoren erwies sich am stärksten bei Tonsillenkarzinomen und wurde vor allem bei nicht rauchenden, trinkenden oder immunsupprimierten Patienten deutlich, wobei sich diese Karzinome häufig als gering differenziert und von histologisch basaloider Abstammung zeigten (Argiris et al. 2008; Shah et al. 2003).

Das 5-Jahres-Überleben (5-JÜ) gemittelt über alle Stadien liegt derzeit bei ca. 60 %, wobei dieses stark von der jeweiligen Tumorlokalisation abhängt.

Tab. 3.3 5-JÜ (%) in Abhängigkeit vom Stadium

Lokalisation	Stad I T1N0	Stad II T2N0	Stad III T3N0/ T1-3N1	Stad IV T4 oder N2-3 oder M1
Lippe	90	90	70	30
Mundboden, anteriore 2 Drittel der Zunge	80-90	60-70	40	20
Weicher Gaumen, Uvula	85	70	40	20
Tonsille	80	60	50	20
Hypopharynx	65	60	40	25
Zungengrund	60	60	40	10-20
Nasopharynx	80	50	50	20
Larynx	93-100	58-95	53-67	30-40

Cave: Die Definition der klinischen Stadien bezieht sich auf Oropharynx, Hypopharynx und Larynx-CA, die Einteilung der Nasopharynx-CA unterscheidet sich davon; wegen der Übersichtlichkeit wurden die Überlebensdaten in Abhängigkeit vom Stadium hier mit tabelliert.

Abbildung 2: 5-Jahres-Überlebensrate bei HNO-Tumoren (aus: Lohr et al. 2003))

1.1.2 Therapiemöglichkeiten der HNO-Tumore

Die Therapieprinzipien bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs sind stark abhängig von der Diagnose, der Lokalisation und der Ausdehnung der entsprechenden Raumforderung und können entweder eine kurative oder auch palliative Zielsetzung haben. Verschiedene Parameter haben Einfluss auf den Verlauf und die Prognose der HNO-Plattenepithelkarzinome: so kommen der Tumormasse, der Angioinvasion in Lymph- oder Blutgefäße, dem Resektionsstatus nach OP, der extrakapsulären Infiltration von Lymphknotenmetastasen sowie der Tumorphoxie eine entscheidende Rolle als prognostische Parameter zu (Röper B 2009).

Zu den Standardtherapien für Malignome des Kopf-Hals-Bereichs zählen die radikale Resektion des Primärkarzinoms mit einem auf die Tumorart abgestimmten klinischen Sicherheitsabstand. In letzter Zeit rückte auch verstärkt die endoskopische Laserchirurgie in den Behandlungsfokus, die vor allem für oberflächliche, gering differenzierte Tumore in frühen Stadien gute Ergebnisse erzielte (Dellian M 2009a). Bei lymphogener Metastasierung in die lokoregionalen Lymphknoten bzw. bei vorhandenem Metastasierungspotential kommt den verschiedenen Formen der Neck Dissection (als Ersttherapie, im Anschluss an eine Radiochemotherapie bei Residualzustand oder bei Verdacht auf Mikrometastasierung) eine wichtige Rolle im chirurgischen Behandlungskonzept zu (Argiris et al. 2008; Cornelius C P 2009; Lohr et. al. 2003, Schuler K 2009; Shah et al. 2003).

Auch die Strahlentherapie kommt in der Therapie von primären, rezidierten oder metastasierten Kopf-Hals-Tumoren unter sowohl kurativer als auch palliativer Intention zur Anwendung. So besteht bei frühen Tumorstadien (T1-2 N0 M0 vor allem bei Zungen-, Mundboden- und Tonsillenkarzinomen) eine vergleichbar gute Chance auf Heilung wie bei der radikalen Tumorresektion (Pigorsch St 2009b).

Die primäre Radiotherapie wird typischerweise konventionell fraktioniert mit Einzeldosen von 2 Gy und einer Gesamtdosis von bis zu 70 Gy, meist über einen Zeitraum von ca. 7 Wochen, verabreicht. Um eine Reduktion mikroskopischer Tumoranteile außerhalb der Resektionsgrenzen oder eine Remission des Tumors zur Verbesserung der Resektabilität zu erzielen, kann auch die präoperative Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von ca. 50 Gy in konventioneller Fraktionierung eingesetzt werden. Diese zeigte sich jedoch gegenüber der postoperativen Strahlentherapie unterlegen (Pigorsch St 2009b). Bei lokal weit fortgeschrittenen Tumoren wird meist auf eine hyperfraktioniert-akzelerierte Radiotherapie (häufig mit simultaner Applikation einer Chemotherapie) zurückgegriffen, da sich hierbei eine verbesserte Tumorkontrolle erzielen lässt. Unter palliativen Aspekten wird vor allem auf eine vorübergehende Tumorremission sowie die Symptomlinderung (Analgesie) abgezielt (Argiris et al. 2008; Pigorsch St 2009b).

Weitere Therapiemöglichkeiten bietet der Einsatz von Neutronenstrahlung, interstitieller/intrakavitärer Strahlentherapie, Brachytherapie oder Photodynamischer Therapie (PDT) mit jeweils unterschiedlichen Anwendungsgebieten. So wurden vor allem in letzter Zeit im Rahmen von Studien gute Ergebnisse mit PDT und Brachytherapie bei kleinen, lokalisierten Karzinomen erreicht (Allison R.R. 2005; Copper et al. 2007, Dellian M 2009b; Lajer et al. 2006; Nag et al. 2001; Nyst et al. 2009; Rigual et al. 2009).

Als dritte Therapieoption neben der Bestrahlung und der operativen Tumorresektion bietet sich die Chemotherapie an, die jedoch meist als alleiniger Therapieansatz nur unter palliativen Aspekten Anwendung findet. Dabei zeigten vor allem Platinderivate, Antimetabolite und Taxane eine gute Wirksamkeit sowohl als Einzelsubstanzen als auch in Kombination (Argiris et al. 2008). Bei lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen wird momentan der Einsatz einer neoadjuvanten Chemotherapie (vor Beginn einer Radio(Chemo)Therapie) als akzeptabler Therapieansatz untersucht (Oduncu F S 2009).

Somit gehört heute die Resektion mit additiver oder adjuvanter Radiotherapie (gegebenenfalls in Kombination mit einer Chemotherapie) aufgrund des verbesserten Wirkungsprofils zur Standardtherapie. Bei Patienten, die aufgrund des lokal fortgeschrittenen Tumors inoperabel sind oder bei denen eine organerhaltende Therapie erzielt werden soll, wird versucht, im Rahmen einer Radiochemotherapie durch intensivierete Fraktionierungsschemata und einer Kombination mit Chemotherapie die lokale Kontrolle zu erhöhen. Dabei sollen mögliche synergistische bzw. additive zytotoxische Effekte dieser beiden Behandlungsmethoden auf die Tumorzellen (jedoch unter Inkaufnahme einer erhöhten Rate an akuten Nebenwirkungen) ausgenutzt werden (Argiris et al. 2008; Schäfer et al. 2000; Siefert A 2009; Yang et al. 2009).

In den letzten Jahren rückte bei der Etablierung neuer Therapieansätze verstärkt die sogenannte „targeted therapy“ (zielgerichtete Therapie) in den Fokus der Forschung. Eine zentrale Rolle dabei spielt der EGF-Rezeptor, der von Plattenepithelkarzinom-Zellen im Kopf-Hals-Bereich in hohem Maße exprimiert wird (Pigorsch St 2009a). Die Funktionskaskade, die mit diesem Rezeptor in Verbindung steht, kann an mehreren Stellen unterbrochen werden: so ist eine Blockade des Rezeptors selbst durch monoklonale Antikörper (Cetuximab, Panitumumab) oder eine Inhibition der an den Rezeptor gekoppelten Tyrosinkinase (Gefinitib, Erlotinib, Lapatinib) möglich (Siefert A 2009), wobei sich vor allem der Einsatz von Cetuximab in Kombination mit Bestrahlung als sehr vielversprechend in Bezug auf lokoregionale Kontrolle und Gesamtüberleben zeigte (Argiris et al. 2008; Yang et al. 2009).

Wie jede Behandlung sind auch die Chemo- und die Radiotherapie mit Nebenwirkungen behaftet. Zu den akuten Schäden zählen Dysphagie, Aspiration, Geschmacksveränderungen, Dermatitis und vor allem die verminderte Speichelbildung sowie die Mucositis, die bei über 50 % der Patienten sehr schwer ausfällt. Im weiteren Verlauf zeigen sich als Spättoxizitäten Schluckprobleme, Osteoradionekrosen, Karies, subkutane Fibrosen, Schilddrüsendysfunktionen, Trismus, pharyngeale/ösophageale Stenosen, Myelitis und Xerostomie, die bei der Mehrzahl der Patienten eintritt. Um die Lebensqualität und die Organfunktionalität bei Patienten nach der Behandlung zu erhalten, muss ein besonderes Augenmerk auf die optimale Versorgung dieser Komplikationen wie eine umfangreiche Schleimhautpflege, eine regelmäßige Kontrolle des Zahnstatus, eine ausreichende

(im Notfall enterale) Ernährung sowie eine adäquate Schmerztherapie gelegt werden (Argiris et al. 2008; Pigorsch St 2009b; Yang et al. 2009).

Abschließend bleibt bei der Behandlung jeglicher Kopf-Hals-Malignome anzumerken, dass das Hauptaugenmerk auf eine interdisziplinäre Zusammenarbeit gelegt werden sollte, um ein optimales Behandlungsergebnis und ein bestmögliches Maß an Lebensqualität für den Patienten zu gewährleisten (Pouget-Schors D 2009).

1.1.3 Vorstellung der verwendeten Zelllinien

Für die durchgeführten Versuche wurden zwei HNO-Tumorzelllinien verwendet, die sich in ihrer Strahlensensibilität signifikant unterscheiden. Beschrieben wurden diese beiden Zelllinien unter anderem von Takahashi et al. 1989 und Yaromina et al. 2006 und 2007.

SAS leitet sich von einem primären Plattenepithelkarzinom der Zunge ab und verfügt nur über einen geringen Differenzierungsstatus (G3). XF354 hingegen stammt von einer Lymphknotenmetastase eines primären Mundbodenkarzinoms und zeigt sich mit einem G1-Status als gut differenziert. In Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung zeigt sich bei SAS ein höherer TCD50 (Tumor Control Dose 50 %)-Wert (126,7 Gy), was auf eine erhöhte Strahlenresistenz im Vergleich zur Zelllinie XF354 (47,4 Gy) zurückzuführen ist (Health Science Research Resources Bank; Riken Bio Resource Center; Takahashi K 1989; Yaromina et al. 2006; Yaromina et al. 2007).

1.2 Zellzyklus und Apoptose

1.2.1 Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus stellt einen geordneten Ablauf verschiedener molekularer Prozesse dar, der der identischen Verdopplung des genetischen Erbmateri als einer Zelle dient. Er lässt sich in vier unterschiedliche Phasen gliedern: G1-, S-, G2- und M-Phase. Außerdem existiert noch eine G0-Phase, in welche Zellen bei Mangel an

Wachstumsfaktoren, Erreichen einer hohen Populationsdichte oder eines bestimmten Differenzierungsgrades eintreten.

In der G1-Phase wird die Zelle durch Synthese unterschiedlicher Proteine auf die nachfolgende Verdopplung der DNA vorbereitet und legt an Größe zu; diese Phase dauert insgesamt ca. 3 – 12 Stunden. Es schließt sich die S-Phase an, welche der Replikation der DNA dient und über einen Zeitraum von ca. 8 – 12 Stunden abläuft. Die G2-Phase hat die Vorbereitung auf die anstehende Mitose zum Ziel und zeichnet sich durch die Synthese der dafür notwendigen Proteine und die Reparatur evtl. entstandener DNA-Fehlpaarungen aus; ihre Dauer beträgt ca. 1,5 – 3 Stunden.

Die Mitose, welche die eigentliche Zellteilung darstellt, wird wiederum in vier verschiedene Abschnitte unterteilt: Die Prophase mit Chromatinkondensation und Ausbildung des Spindelapparates; daran anschließend die Metaphase, in welcher sich die Chromosomen in der Äquatorialebene ausrichten; daraufhin die Anaphase, in der sich die Chromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen bewegen und schließlich die Telophase, in der die neuen Kern- und Zellmembranen entstehen. Der gesamte Zyklus der Mitose dauert bei menschlichen Zellen ca. 30 bis 60 Minuten (Rassow 2008).

Um Schäden in der DNA und somit eine fehlerhafte Replikation der Erbgut-Information zu vermeiden, welche zu einer Tumorerkrankung führen könnte, verfügt die Zelle über sogenannte Zellzyklus-„Checkpoints“. An diesen Kontrollpunkten wird überprüft, ob die Zelle für den Eintritt in die nächste Phase reif ist. Sollte dies nicht der Fall sein, werden zelleigene Reparaturmechanismen aktiviert oder – wenn keine Möglichkeit besteht, den physiologischen Zustand wieder herzustellen – die Apoptose eingeleitet. Die wichtigste Komponente dieses Regulationssystems, das einen Feedback-Mechanismus für die Zelle darstellt, bilden die Zyklin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs). Diese sind jedoch nur in Verbindung mit einem Zyklin in Form eines heterodimeren Komplexes biologisch aktiv und können sowohl durch Phosphorylierung als auch durch Dephosphorylierung (z. B. durch Wachstumsfaktoren) in ihrer Aktivität reguliert werden. Des Weiteren ist eine Anlagerung sogenannter CDK-Inhibitor-Proteine (CKIs) an den Komplex möglich, die eine Hemmung des selben hervorrufen. Sie lassen sich in zwei Familien untergliedern: zum Einen die Ink4-Familie, bestehend aus den Proteinen p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c} und p19^{Ink4d} und zum Anderen die Cip/Kip-Familie mit ihren Mitgliedern p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}. Dabei inhibieren die Ink4-CKIs spezifisch die CDK4 und

CDK6, während die CKIs der Cip/Kip-Familie die mit Zyklin D-, E- und A-assoziierten CDKs hemmen (Burhans, Heintz 2009; Jayat, Ratinaud 1993; Pawlik, Keyomarsi 2004; Rassow 2008).

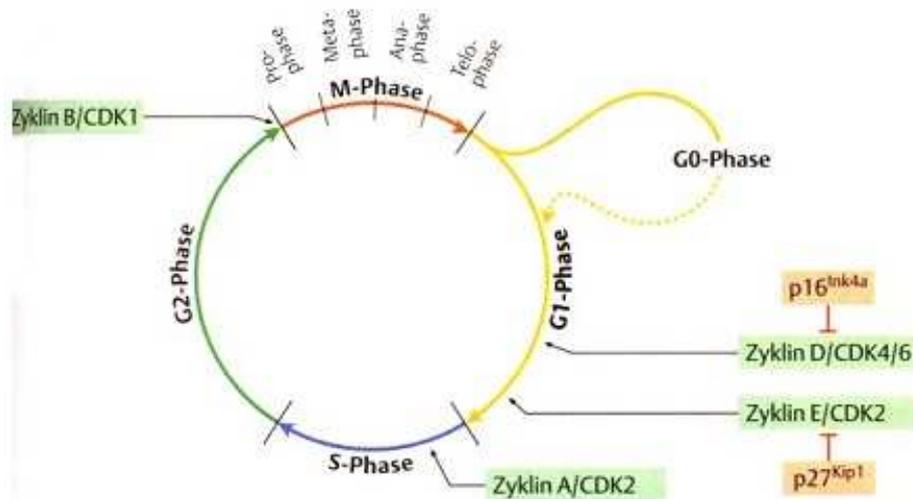


Abbildung 3: Regulation des Zellzyklus (aus: Rassow 2008)

Der exakte Mechanismus, wie ein Schaden an der DNA initial erkannt wird und welche Prozesse daraufhin im Einzelnen genau ablaufen, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine entscheidende Rolle dabei spielt jedoch die Proteinkinase ATM, die vermutlich über Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur aktiviert wird. Auch der Kinase ATR (ATM-Rad3-related) kommt bei der Checkpoint-Auslösung sowie der Reparatur über homologe Rekombination eine wichtige Bedeutung zu (Iliakis G. 2009; Lavin, Khanna 1999). Der erste Checkpoint reguliert den Übergang von der G1- in die S-Phase und steht unter der Kontrolle eines Komplexes aus den CDKs 4 oder 6 und dem zelltypspezifischen Zyklin D. Dieses Heterodimer gelangt mit Hilfe der Kernlokalisierungssequenz des Zyklins in den Zellkern und wird dort durch eine CDK-aktivierende Kinase (CAK) phosphoryliert. Im Anschluss wiederum phosphoryliert das CDK/Zyklin-Heterodimer das Retinoblastoma-Protein Rb, wodurch eine Histon-Deacetylase (HDAC) zur Abdiffusion von der DNA gebracht wird. Es kommt zu einem verstärkten Ablesen zellzyklusspezifischer Gene, unter anderem des ebenfalls für die Regulation der G1-Phase notwendigen Zyklin E. Ein Komplex aus Zyklin E und CDK2 führt schließlich zur Hyperphosphorylierung von Rb und einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F, woraus eine vermehrte Expression der für

die S-Phase notwendigen Gene resultiert (Endicott, Noble 1998; Rassow 2008). Zur Aktivierung dieses Checkpoints trägt bei vorhandenen DNA-Schäden vor allem das Tumorsuppressorgen p53 bei. Bei intakter DNA wird p53 fortlaufend an MDM2 gebunden und dadurch dem raschen Abbau im Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt. Kommt es beispielsweise durch Bestrahlung zu einem Defekt in der DNA, wird p53 von MDM2 entkoppelt und die Transkriptionsfunktion von p53 aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des CDK-Inhibitor-Proteins p21^{Cip1}, was letztendlich unter Einbeziehung einiger anderer Proteine zu einer Aktivierung des CDK2/CyclinE-Komplexes führt (Bates, Vousden 1996; Pawlik, Keyomarsi 2004).

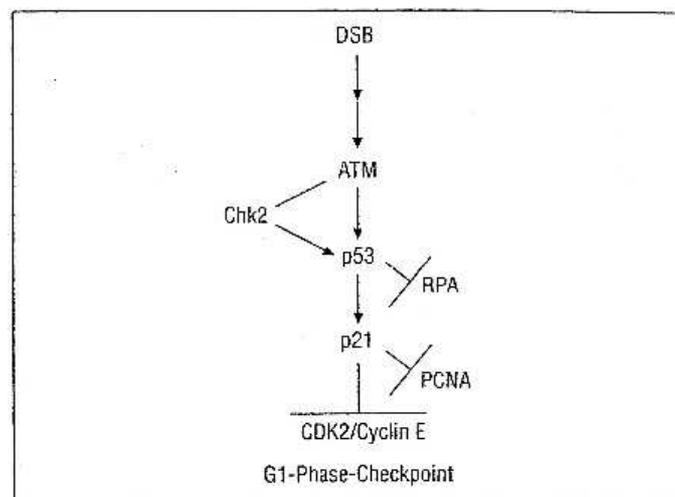


Abbildung 4: Schritte und einige Proteine, die an der Aktivierung des G1-Phase-Checkpoints nach DNA-DSB beteiligt sind (aus: Iliakis G. 2009)

Auch während der S-Phase lässt sich ein solcher Rückkopplungsmechanismus aufgrund eines Kontrollpunktes finden. Zunächst bildet sich der sogenannte Origin Recognition Complex (ORC) an der Stelle, an der die Replikation der DNA beginnen soll. Nach Anlagerung weiterer Proteine (Cdt1, Cdc6, mcm2-7) wandelt sich dieser zum Präreplikationskomplex um. Das Cdc6- und das ORC-Protein können nun von Zyklin A/CDK2 phosphoryliert werden, was zu einem Ablösen der Proteine vom ORC und somit zum Beginn der Replikation führt. Sollte es zu einer Aktivierung dieses Checkpoints kommen, gestaltet sich die Zeitverzögerung, die durch diese hervorgerufen wird, deutlich kürzer als die der anderen Checkpoints in der G1- und der G2-Phase (ungefähr 10 Minuten pro Gy) (Iliakis G. 2009; Rassow 2008). Hierbei spielt die Aktivierung der ATM eine entscheidende Rolle. Vermutlich führt diese zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Chk2-Kinase, welche wiederum CDC25A phosphoryliert und somit eine hemmende Wirkung auf CDK2/Cyclin A ausübt; p53

spielt bei dieser Signalkaskade eine eher untergeordnete Rolle. Sollte durch einen Schaden an der DNA ein Abschnitt einzelsträngiger DNA entstehen, wird der S-Phase-Checkpoint über die oben erwähnte ATM und einigen Kofaktoren ausgelöst, was ebenfalls in einer Hemmung des CDC25A-Proteins endet (Iliakis G. 2009).

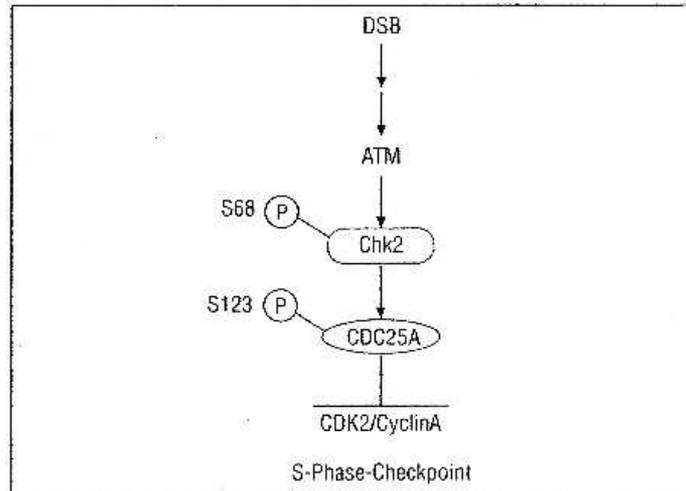


Abbildung 5: Schritte und einige Proteine, die an der Aktivierung des S-Phase-Checkpoints nach DNA-DSB beteiligt sind (aus: Iliakis G. 2009)

Der Übergang von der G2-Phase zur Mitose schließlich wird vom ZyklinB/CDK1-Komplex kontrolliert, dessen Aktivität auch als Mitosis Promoting Factor MPF bezeichnet wird (Rassow 2008). Die Dauer des Zellarrests, der durch Aktivierung dieses Checkpoints ausgelöst wird, beträgt ca. 1-2 h pro Gy (abhängig von der jeweiligen Zelllinie). Ähnlich wie beim S-Phase-Block werden durch Chk1 und Chk2 vermittelte Phosphorylierungen die Phosphatasen CDC25A und CDC25C inhibiert, welche beide der Regulation der ATM unterliegen. Das Protein p53 kann auch hier zum G2-Block beitragen (Iliakis G. 2009; Krempler et al. 2007; Pawlik, Keyomarsi 2004).

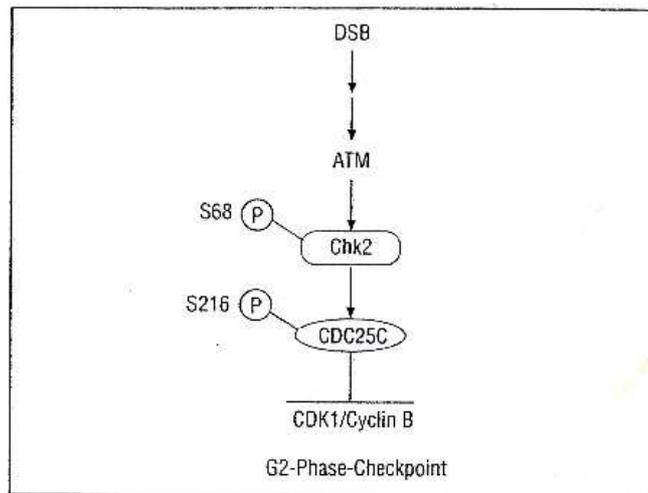


Abbildung 6: Schritte und einige Proteine, die an der Aktivierung des G2-Phase-Checkpoints nach DNA-DSB beteiligt sind (aus: Iliakis G. 2009)

1.2.2 Prozess der Apoptose

Prinzipiell lassen sich unterschiedliche Arten des Zelltodes voneinander abgrenzen, die Apoptose und die Nekrose.

Der frühe Zelltod (auch Interphasetod genannt) tritt im Allgemeinen innerhalb der ersten 12 Stunden ein. Er wird auch als Interphasetod bezeichnet, da die Zelle nach Bestrahlung bereits vor Erreichen der nächsten Mitose abstirbt. Der späte Zelltod (auch reproduktiver Zelltod genannt) hingegen kann bis zu 1 - 2 Tage nach Bestrahlung auftreten, da die Zelle zunächst vital bleibt und noch bis zu 5 Mitosen durchlaufen kann (die meisten Zellen sterben jedoch bereits nach der ersten oder zweiten Mitose ab) (Belka C. 2009).

Alle aktiv von der Zelle regulierten Zelltodarten lassen sich unter dem Begriff programmierter Zelltod oder Apoptose zusammenfassen. Diese beiden Begriffe sind jedoch nicht identisch – der Begriff Apoptose bezeichnet eine spezifische, morphologisch definierte Form des programmierten Zelltods, bei der es zu einer Aktivierung spezifischer intrazellulärer Proteine, der sogenannten Caspasen kommt. Weitere Zelltodprozesse, die über aktive und vorprogrammierte Wege jedoch ohne Einbeziehung der oben genannten Caspasen ablaufen, sind der Apoptose-ähnliche programmierte Zelltod (mit Chromatinkondensation) sowie der Nekrose-ähnliche programmierte Zelltod (ohne wesentliche Chromatinkondensation). Die Unterscheidung der Begriffe Apoptose, Apoptose-ähnlicher programmierter Zelltod

und Nekrose-ähnlicher programmierter Zelltod fällt schwer, zumal auch zahlreiche Übergangsformen auftreten können (Belka C. 2009; Kiechle, Zhang 2002).

Im Gegensatz zum programmierten Zelltod spricht man von Nekrose, wenn der Untergang einer Zelle mit der Zerstörung der Zellmembran korreliert. Dabei stirbt die Zelle aufgrund einer massiven chemischen oder physikalischen Zellschädigung oder einer unzureichenden ATP-Bildung unter Freisetzung von Zellbestandteilen ab. Es entwickelt sich eine lokale Entzündungsreaktion (Allen et al. 1997; Wyllie et al. 1980).

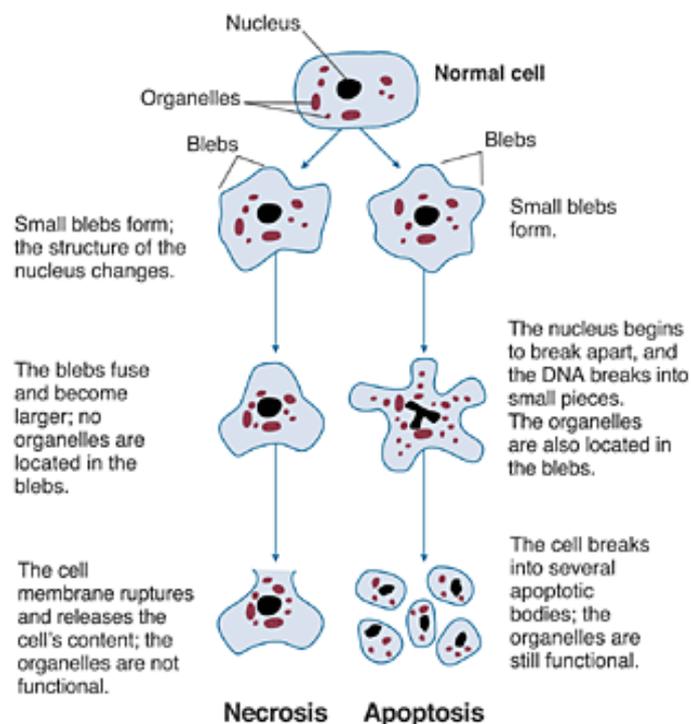


Abbildung 7: Unterschied zwischen Nekrose und Apoptose (aus: Goodlett et al. 2001)

Im Folgenden soll nun näher auf den Prozess der Apoptose eingegangen werden, da diese Art des Zelltodes überwiegend durch Bestrahlung induziert ist. Sie dient sowohl der Differenzierung des Organismus, der Entwicklung der Immuntoleranz, der Homöostase der Zellzahl sowie der Beseitigung defekter oder tumorartiger Zellen (Rassow 2008). Die Apoptose läuft nach einem geregelten Programm ab und kann in jeder Zellzyklusphase auftreten. Dabei kommt es initial zu einer Kondensation von Chromatin und Zytoplasma, die Zelle verformt sich und verliert den Kontakt zu den Nachbarzellen. Schließlich kommt es zur Fragmentierung der Zelle in einzelne

Membranvesikel (sogenannte Apoptosekörper), die daraufhin von umliegenden Makrophagen phagozytiert werden (Herrmann et al. 2006).

Während der Apoptose können drei Phasen voneinander unterschieden werden: Zunächst läuft die Initiierungs- oder Effektorphase ab, in welcher das Signal zur Einleitung der Apoptose gegeben wird. Daran schließt sich die Integrationsphase an, in der die pro- und anti-apoptischen Signale gegeneinander aufgewogen werden und es somit zu einer Entscheidung für oder gegen den Zelltod kommt. In der letzten, der Exekutionsphase, tragen schließlich unterschiedlichste zelleigene Mechanismen zum geregelten Absterben der Zelle bei (Belka C. 2009).

Auf molekularer Ebene unterscheidet man die extrinsische von der intrinsischen Apoptose. Der extrinsische Signalweg (auch rezeptor-vermittelte Apoptose genannt) beginnt mit der Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren (u. a. TNFR-1, Fas, TRAIL), was nach Bindung des FADD-Adapter-Moleküls die Aktivierung der Caspase 8 (zählt zusammen mit den Caspasen 2, 9 und 10 zu den sog. Initiator-Caspasen) zur Folge hat. Diese wiederum überführen durch proteolytische Spaltung die Effektor-Procaspasen 3, 6 und 7 in ihre aktive Form, welche dann durch Zerstörung wichtiger Proteine (z. B. Proteine des Zellskeletts und Endonuklease-Inhibitoren) zum Zelltod führen. Außerdem spaltet Caspase 8 das pro-apoptische Bcl-2-Protein Bid in das Protein tBid, welches den intrinsischen Signalweg (s. u.) einleitet (Herrmann et al. 2006; Kiechle, Zhang 2002; Shemarova 2010).

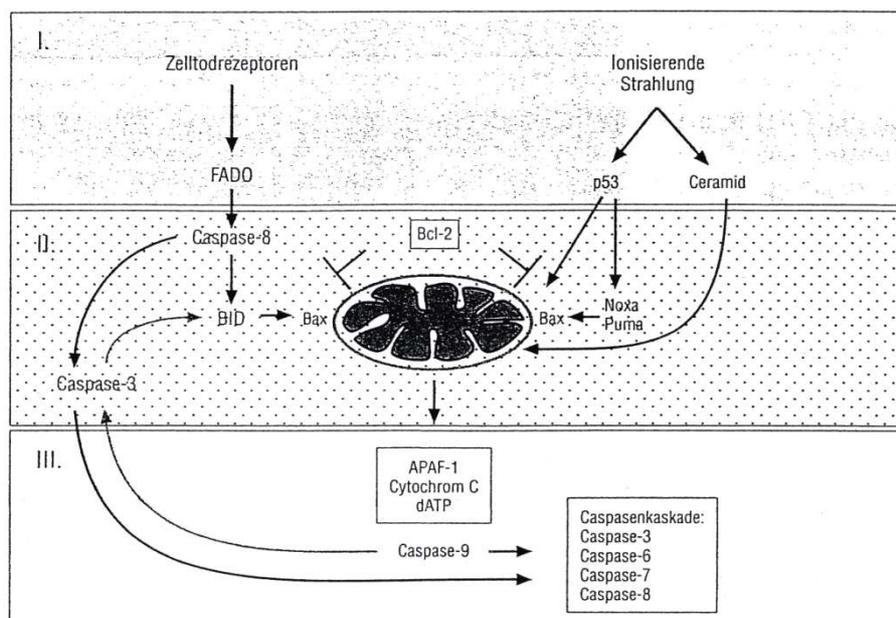


Abbildung 8: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg (aus: Belka et al. 2009)

Wird die Apoptose jedoch durch intrazelluläre Signale (z. B. oxidativer Stress oder Schäden an der DNA) ausgelöst, spricht man von einer intrinsischen Aktivierung. Unter normalen Bedingungen liegt im Mitochondrium eine Balance zwischen dem anti-apoptotischen onkogenen Protein Bcl-2 und den pro-apoptotischen Proteinen Bax, Bak und Bid vor. Kommt es durch die Einwirkung von Stress (z. B. ionisierende Strahlung) zu einer proteolytischen Aktivierung von Bid durch Caspase 8 (s. o.) oder einer vermehrten Expression von Bax oder Bak, bilden sich durch Mitwirken eben dieser zwei Proteine Bax und Bak sog. Permeabilitäts-Transitions-Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (Rassow 2008). Dabei ist zu erwähnen, dass dem Protein p53 hierbei eine entscheidende Rolle zukommt; unter dem Einfluss von p53 kommt es zu einer Hochregulation des pro-apoptotischen Proteins Bax. Auch weitere p53-gesteuerte Gene wie beispielsweise Puma oder Noxa sollen ähnliche Effekte auf das Mitochondrium besitzen und letztendlich zur Aktivierung der Apoptosekaskade führen (Bates, Vousden 1996; Belka C. 2009). Durch die entstandenen Poren in der Mitochondrienmembran werden mitochondriale Apoptose-Mediatorproteine (u. a. Endonuklease G, Cytochrom c und Smac/Diablo) freigesetzt, welche durch proteolytische Spaltungen, Aktivierung der Effektorcaspasen und Fragmentierung der DNA zur Apoptose beitragen. Das Apoptosom, bestehend aus Cytochrom c und dem monomeren Apoptotic Protease activating Factor 1 Apaf-1, aktiviert die Initiatorcaspase 9 (Kiechle, Zhang 2002; Rassow 2008; Shemarova 2010).

1.3 Wirkmechanismen der Strahlentherapie

1.3.1 Strahlenwirkung auf DNA

Da die Strahlentherapie bei der Behandlung von soliden Tumoren einen wichtigen Stellenwert einnimmt, sollte man sich immer über die Auswirkungen der therapeutisch erzeugten Strahlung auf den Organismus im Klaren sein. Auf molekularer Ebene erzielen ionisierende Strahlen in erster Linie eine Modifikation bzw. Schädigung der genetischen Erbinformation des Tumorgewebes, jedoch auch des umgebenden Normalgewebes. Daneben kommt es aber auch zu Auswirkungen auf die Zellmembran bzw. die mit ihr assoziierten Rezeptor- oder Nicht-Rezeptor-

Tyrosinkinasen und dadurch zu Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion (Herrmann et al. 2006).

Ionisierende Strahlung kann im Gewebe entweder auf direkte oder auf indirekte Art als Noxe wirken. Im Falle der direkten Schädigung findet die Energieaufnahme und die biologische Wirkung im gleichen Zielmolekül statt. Die indirekte Strahlenwirkung hingegen beruht auf der Entstehung freier Radikale, die dann sekundär das Zielmolekül, die DNA, angreifen können; Energieabsorption und Auslösung der biologischen Wirkung finden also in zwei unterschiedlichen Molekülen statt. In Bezug auf die DNA kann es durch diese beiden Mechanismen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie zu Basenschäden kommen. Des Weiteren beobachtet man, dass sich Läsionen an bestimmten, nahe beieinander liegenden Lokalisationen häufen und sich eine kovalente Bindung zwischen Kernproteinen und DNA ausbilden kann. Am häufigsten finden sich nach Bestrahlung Basenschäden (entstanden durch Ringöffnung und Fragmentierung), gefolgt von Einzel- und schließlich Doppelstrangbrüchen (Herrmann et al. 2006; Kauffmann et al. 2001).

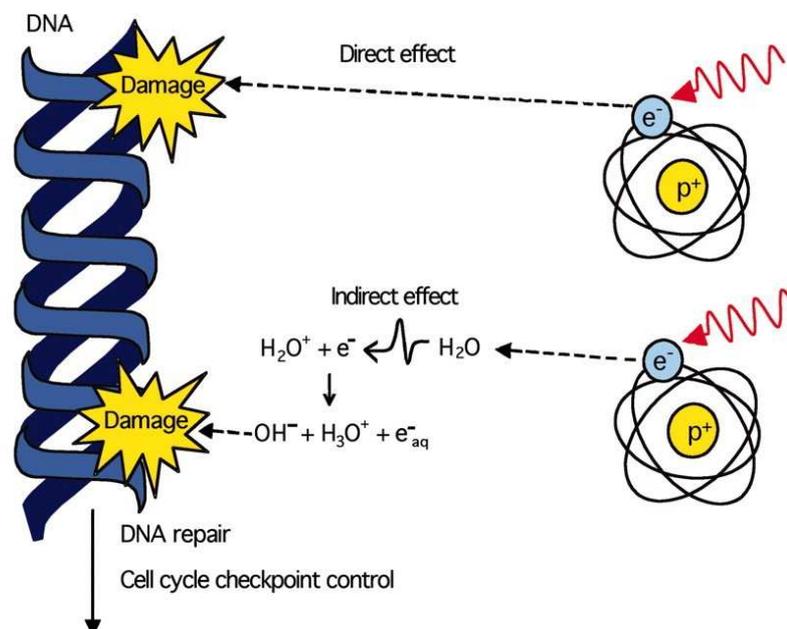


Abbildung 9: Effekte der Bestrahlung auf DNA-Ebene (aus: Morgan et al. 2005)

Dabei beruht der größte Effekt der Bestrahlung auf der Initiierung von Doppelstrangbrüchen, welche anschließend zur Apoptose und zum Untergang der Zelle führen. Dies begründet sich in der Tatsache, dass fehlerhaft oder nicht reparierte Doppelstrangbrüche Translokationen und Chromosomenbrüche nach sich ziehen können. Diese werden aufgrund ihrer Entstehung (zwei Einzelstrangbrüche auf zwei sich gegenüber liegenden DNA-Strängen, die typischerweise weniger als 10

Nukleotide voneinander entfernt liegen) als komplexe Läsionen bezeichnet. Zu diesen zählen auch die sogenannten „locally multiply damaged sites“ (LMDS), welche eine Kombination aus Strangbrüchen und Basenschäden darstellen. Diese können entweder direkt (durch die Läsion selbst) oder indirekt (durch fehlerhafte Reparatur) wiederum einen Doppelstrangbruch auslösen (Iliakis G. 2009) und sind aufgrund des diffusen Verteilungsmusters verschiedener DNA-Schäden meist irreparabel (Kauffmann et al. 2001).

1.3.2 Auswirkungen auf Zellzyklus und Apoptose

Entsteht aufgrund ionisierender Strahlung eine Läsion an der DNA, wird dies über sogenannte DNA-Schadensensoren erkannt und über eine Signaltransduktionskette mithilfe zahlreicher Phosphorylierungsschritte an die Effektorproteine weitergeleitet, welche an der Checkpointkontrolle (Anhalten des Zellzyklus, Einleiten der DNA-Reparatur, eventuell Initiierung der Apoptose) beteiligt sind.

Auf welche Weise diese Checkpoints genau aktiviert werden und vor allem welche Proteine als DNA-Schadenssensoren fungieren, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Im Gespräch sind momentan die dem PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) strukturell ähnlichen Proteine Rad1, Rad9, Hus1 und das Protein Rad17, das die Anlagerung von PCNA an die DNA katalysiert (Iliakis G. 2009)

Eine wichtige Rolle für die Aktivierung des zellzyklusspezifischen G1- und G2-Checkpoints spielt das Tumorsuppressorgen p53, das in der Zelle unterschiedlichste Funktionen erfüllt (Regulation des Zellzyklus nach Schädigung der DNA, Transkriptionsmodulation unterschiedlicher Zielgene, direkte Funktion als DNA-Reparaturenzym). In unbestrahlten Zellen wird p53 unmittelbar nach seiner Synthese von der Mdm2-Ubiquitin-Ligase ubiquitinyliert und zum Abbau an die 26S-Protease weitergeleitet. Nach Bestrahlung kommt es zur Abdiffusion von p53 vom MDM2-Protein (was einen verminderten Abbau zur Folge hat) und zur Aktivierung der Transkriptionsfunktion von p53. Dadurch wird das Protein p21 vermehrt gebildet und kann seine hemmende Wirkung auf den CDK2/Zyklus E-Komplex entfalten, woraus eine Verlängerung des Zellzyklus resultiert (Pawlik, Keyomarsi 2004; Rassow 2008). Das Protein p53 und einige weitere Familienmitglieder sind neben anderen Apoptose-regulierenden Proteinen wie c-myc und bc1-2 unter dem Einfluss potentiell

erbgutschädigender Bestrahlung auch am Prozess der Apoptose maßgeblich beteiligt: dort greifen sie sowohl in den extrinsischen als auch in intrinsische Signalwege ein und führt zu einer erhöhten Expression der Todesrezeptoren sowie zu einer vermehrten Transkription des Bax-Gens (und somit zu einer vermehrten Induktion von Apoptose über mitochondriale Mechanismen) (Bates, Vousden 1996; Gressner 2006; Meyn et al. 2009; Milas et al. 1994).

Ein weiterer Mechanismus, den DNA-Schäden im Rahmen einer Bestrahlung bewirken können, ist die Aktivierung der Proteinkinasen ATM (Ataxia teleangiectasia mutated), ATR (ATM- and Rad3-related) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase). Dies führt letztendlich über eine Aktivierung der Checkpoints zu einer Arretierung des Zellzyklus in der jeweils betroffenen Phase. Welche Signaltransduktionsketten dabei beteiligt sind und welche Proteine in diese Vorgänge involviert sind, wurde bereits weiter oben im Kapitel 1.2.1 erörtert (Iliakis G. 2009; Lavin, Khanna 1999; Wang et al. 2004).

Allgemein lässt sich feststellen, dass Zellen während der Mitose am sensibelsten auf Strahlung reagieren (gefolgt von der G2-Phase und der frühen S-Phase), während die Strahlenresistenz in der späten S-Phase und während einer langen G1-Phase am höchsten ist (Herrmann et al. 2006; Pawlik, Keyomarsi 2004; Reiser, Born 2006).

1.3.3 Reparaturmechanismen der Zelle

Wie bereits weiter oben erwähnt, tragen vor allem die Doppelstrangbrüche dazu bei, dass geschädigte Zellen schließlich den Prozess der Apoptose einleiten. Da das Zuckerrückgrat der Nukleotide durch ionisierende Strahlen oft zerstört wird und somit die 3'-OH-Enden zur Verknüpfung fehlen, ist es notwendig, dass die fehlerhaften Nukleotidreste zunächst exzidiert und anschließend durch ein intaktes Nukleotid ersetzt werden. Im Falle eines Doppelstrangbruches gestaltet sich dies im Gegensatz zum Einzelstrangbruch als relativ schwierig, da der komplementäre DNA-Strang als Matrizenvorlage fehlt. Um diese Schäden zu beheben, verfügt die Zelle über einen schnellen und einen langsamen Reparaturmechanismus: so benötigt die schnelle Komponente für die Entfernung eines Doppelstrangbruches im Allgemeinen unter 30 Minuten, während die Dauer der langsamen Komponente mit mehreren Stunden

veranschlagt werden kann (Ahnström et al. 2000; Bryant, Blöcher 1980; Iliakis G. 2009).

Beim ersten Mechanismus werden die geschädigten Nukleotide enzymatisch entfernt und anschließend die DNA-Enden miteinander verbunden. Dabei kann es sowohl zu einer Exzision fehlerfreier Nukleotide als auch zum Einfügen neuer, nicht der eigentlichen Information der DNA entsprechender Nukleotide und somit zu einer Veränderung der DNA-Sequenz kommen. Dabei lagert sich zuerst das Kernprotein Ku, welches über die Fähigkeit zur Erkennung von Doppelstrangbrüchen verfügt, an die entstandenen DNA-Enden an und bildet zusammen mit den DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) einen aktiven Komplex (Jeggo et al. 1999). Dieser bereitet die Wiederverknüpfung der DNA-Enden unter Rekrutierung weiterer Proteine (u. a. Sir-Proteine und das Protein XRCC4, die die DNA-Enden räumlich fixieren und vor Abbau schützen) vor, so dass schließlich die DNA-Ligase die Schlussligierung vornehmen kann. Dieser Reparaturmechanismus wird als Non Homologous End-Joining (NHEJ) bezeichnet; er benötigt nur eine relativ kurze Zeit, ist aber auch mit einer erhöhten Fehlerquote behaftet, da es zu einer Veränderung der ursprünglichen DNA-Sequenz kommen kann (Herrmann et al. 2006; Iliakis G. 2009).

Die homologe Rekombinationsreparatur (HRR) hingegen verwendet einen anderen DNA-Strang als Matrizenvorlage. Dabei werden zunächst die reparationsbedürftigen DNA-Enden erkannt und mit Hilfe von Exonukleasen so geschnitten, dass Einzelstränge mit 3'OH-Enden entstehen. An die Enden lagert sich im Folgenden eine Reihe von Proteinen (u. a. RPA und Rad51) an, die auf der Suche nach einer geeigneten homologen Matrize die restliche doppelsträngige DNA abtasten und diese daraufhin durch das Einzelstrangende des gebrochenen DNA-Strangs hindurchführen. Es kommt zur Paarung zwischen dem 3'OH-Ende und der Matrizenvorlage (dieser Vorgang wird stark vom Protein Rad51 beeinflusst) und letztlich zur Verlängerung der 3'OH-Enden mit anschließender Neusynthese der DNA über den Doppelstrangbruch hinweg mit Hilfe spezifischer DNA-Polymerasen. Mittels DNA-Resolvasen lösen sich die DNA-Stränge voneinander und lagern sich wieder mit den komplementären Partnersträngen zusammen. Dies kann unter Austausch nur eines kleinen Segments zwischen geschädigter und intakter DNA geschehen („gene conversion“); es kann aber auch ein ganzer Teil eines Chromosoms exzidiert und übertragen werden, wobei man dann von einem „crossing over“-Vorgang spricht (Iliakis G. 2009; Thacker 1999). Lange Zeit wurde angenommen, dass die HRR für

die langsame Komponente der Doppelstrangbruch-Reparatur verantwortlich ist; neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass diese langsame Komponente ebenfalls eine Form der NHEJ darstellt (Iliakis G. 2009). Welche der beiden Reparaturmechanismen von höheren Eukaryonten zur Beseitigung von Doppelstrangbrüchen ausgewählt wird ist weiterhin nicht letztlich geklärt, wobei sich eine Präferenz zugunsten der NHEJ verzeichnen ließ; so wird momentan auch diskutiert, ob menschliche Zellen anstatt der HRR alternative NHEJ-Formen verwenden (Iliakis 2009; Mladenov, Iliakis 2011).

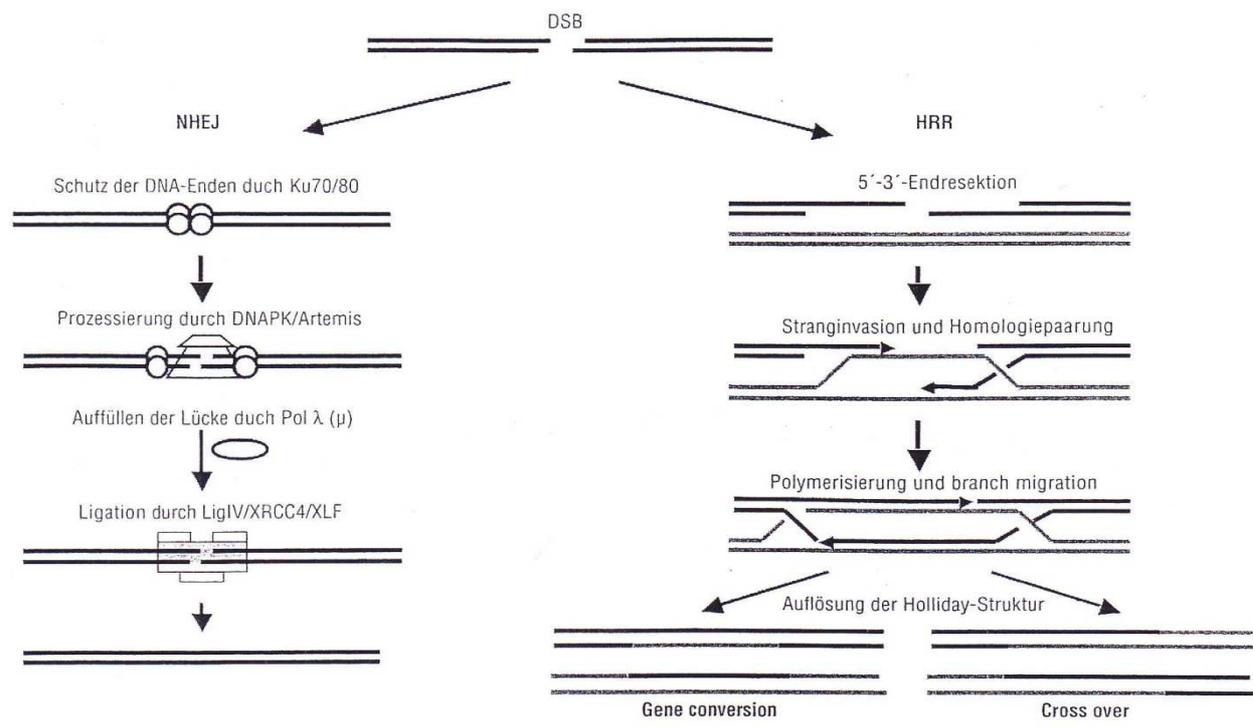


Abbildung 10: NHEJ und HRR im Überblick (aus: Iliakis G. 2009)

Zur Behebung von Schäden der DNA aufgrund eines Doppelstrangbruchs steht theoretisch noch ein dritter Reparaturmechanismus zur Verfügung, der jedoch immer mit Fehlern behaftet ist. Dabei werden die einzelnen DNA-Enden durch Exonuklease abgebaut und anschließend die beiden Doppelstränge ohne Einfügen weiterer Nukleotide wieder zusammengeführt – somit kommt es also immer zu einem Verlust genetischer Information (Kauffmann et al. 2001).

1.4 Modulation der Strahlenwirkung

1.4.1 Grundlagen der fraktionierten Bestrahlung

Um den Effekt einer Bestrahlung zu erhöhen und somit die Strahlensensibilität der klonogenen Tumorzellen zu beeinflussen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. So kann neben der Einzeitbestrahlung mit einer hohen Dosis die fraktionierte Bestrahlung verwendet werden, die sich durch eine Aufteilung der Gesamtdosis auf mehrere Einzeldosen auszeichnet.

In der Zellüberlebenskurve zeigt sich bei fraktionierter Bestrahlung nach jeder Fraktion eine Schulter, welche aufgrund der einsetzenden DNA-Schadensreparatur entsteht. Den strahlenbiologischen Hintergrund für diese fraktionierte Bestrahlung bildet die Tatsache, dass gesunde Zellen subletale Strahlenschäden besser reparieren können als Tumorzellen; deshalb zeigt ihre Zellüberlebenskurve eine ausgeprägtere Schulter als dies bei Tumorzellen der Fall ist. Da jedoch auch bei den Tumorzellen zwischen den einzelnen Bestrahlungen die Reparaturmechanismen aktiviert werden, muss insgesamt mit höheren Gesamtdosen als bei Einzelbestrahlung gearbeitet werden (Reiser, Born 2006). Um optimale Bestrahlungsergebnisse zu erhalten, können die jeweilige Dosis pro Fraktion, die zeitliche Dosisverteilung sowie die Gesamtbehandlungszeit modifiziert werden. Dabei müssen jedoch immer die Auswirkungen auf früh und spät reagierende Normal- und Tumorgewebe berücksichtigt werden.

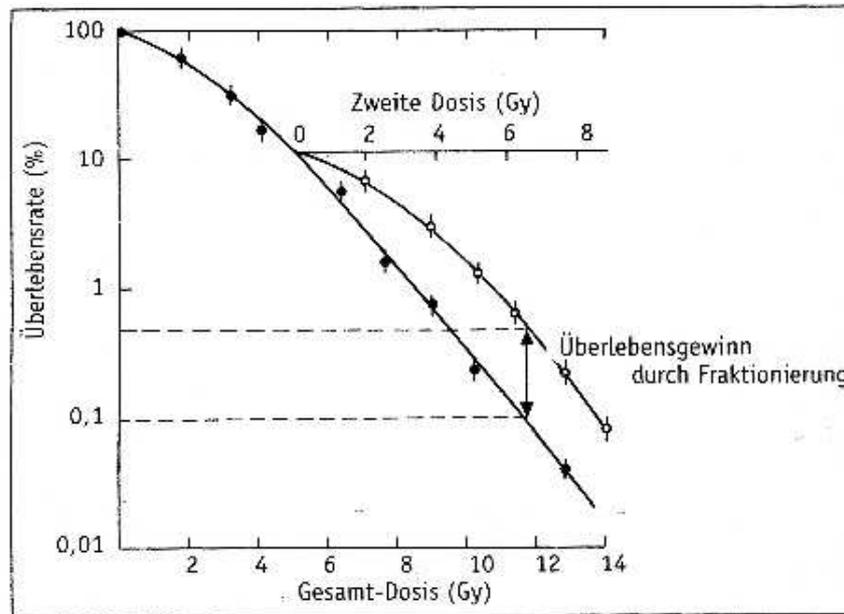


Abbildung 11: Effekt der Fraktionierung einer Dosis auf das Zellüberleben. Die Schulterregion wiederholt sich, das Überleben steigt an (aus: Herrmann et al. 2006, nach Elkind und Sutton 1960)

Es lassen sich vier verschiedene Formen der fraktionierten Bestrahlung unterscheiden. Dazu zählt zu allererst die konventionelle Fraktionierung, die sich durch eine Dosis von 1,8 – 2 Gy täglich für fünf Tage pro Woche und unterschiedlicher Gesamtdosis auszeichnet. Davon zu unterscheiden ist die Hyperfraktionierung, bei der die Gesamtdosis (die im Vergleich zur konventionellen Fraktionierung ebenso unverändert bleibt wie die Gesamtbehandlungszeit) in eine größere Anzahl niedriger dosierter Fraktionen (mehrmals täglich) unterteilt wird. Im klinischen Alltag wird jedoch die Gesamtdosis meist um 10-20 % bei geringfügiger Steigerung der Wochendosis erhöht. Die hypofraktionierte Bestrahlung hingegen setzt sich aus höheren Dosen (> 2 Gy) pro Fraktion zusammen, wobei die Gesamtdosis aufgrund der höheren Rate an Spätschäden reduziert werden muss; sie findet vor allem im Rahmen der palliativen Medizin eine breite Anwendung. Bei der rein akzelerierten Bestrahlung wird die Gesamtbehandlungszeit bei konventioneller Dosis pro Fraktion verkürzt, während bei der akzelerierten Hyperfraktionierung zusätzlich die Dosis pro Fraktion verringert wird; daraus resultiert bei beiden eine mehrmalige Dosisapplikation pro Tag (Baumann M. 2009; Herrmann et al. 2006).

1.4.2 Die vier R's der Strahlentherapie

In den 1970er Jahren wurden erstmals von H. R. Withers mit den sogenannten „vier R's“ der Strahlentherapie die strahlenbiologischen Mechanismen beschrieben, welche den Effekt der fraktionierten Bestrahlung auf Stammzellen modifizieren können. Dadurch kann auf die Strahlensensibilität der jeweiligen Zelle Einfluss genommen werden (Withers 1975).

Unter dem Begriff „Repair“ wird die Fähigkeit der (Tumor)zelle verstanden, die durch Strahlung entstandenen DNA-Schäden reparieren zu können. Dadurch kommt es zu einer Abnahme des Effekts der Strahlentherapie und zu einer Erhöhung der Strahlenresistenz. Als „Regeneration“ (Synonym „Repopulation“) bezeichnet man die Zunahme der Anzahl von klonogenen Zellen bzw. Stammzellen während der fraktionierten Strahlentherapie; dadurch ist eine höhere Dosis nötig, um diese zusätzlichen Zellen abzutöten. Die „Regeneration“ führt also zu einer Verringerung der Strahlenwirkung und zu einer Abnahme der Strahlensensibilität von Normal- und Tumorgewebe für weitere Strahlendosen.

Solide Tumore bilden oftmals aufgrund ihrer pathologischen Gefäßarchitektur Bereiche, die nur ungenügend mit Sauerstoff versorgt werden. Die anoxischen klonogenen Zellen, die sich in diesen Zonen befinden, sind etwa drei Mal strahlenresistenter als gut oxygenierte Zellen. Nach der Bestrahlung werden zunächst alle strahlenempfindlichen euoxischen Zellen abgetötet, so dass fast ausschließlich sauerstoffunterversorgte Tumorzellen übrig bleiben. Nach einer gewissen Zeit nimmt jedoch dieser Anteil an hypoxischen Zellen wieder ab (die genauen Mechanismen sind bislang noch nicht ausreichend verstanden), wodurch die Strahlensensibilität wieder erhöht und somit die weitere Bestrahlung effizienter wird; dieser Vorgang wird als „Reoxygenation“ bezeichnet.

Wie bereits weiter oben beschrieben, sind Tumorzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich strahlenempfindlich. So können Zellen, die sich nach einer Bestrahlung in strahlenresistenten Zellzyklusphasen befinden, im Bestrahlungsintervall in strahlensensiblere Phasen übergehen („Redistribution“/ „Reassortment“); durch diese Umverteilung von Zellen im Zellzyklus kann die Strahlensensitivität erhöht und somit der Effekt der Strahlentherapie verbessert werden. Eine Sonderform des „Reassortments“ stellt das sogenannte „Recruitment“ dar, bei dem in der G₀-Phase ruhende Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten. Dies

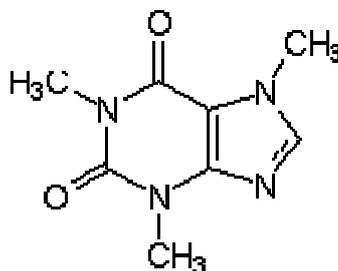
kann über den Mechanismus der „Redistribution“ eine positive Auswirkung auf die Strahlensensibilität haben. In der „Repopulation“ kann es aber auch zu einer Verringerung der Strahlenwirkung kommen (Baumann M 2009; Reiser, Born 2006; Withers 1975; Withers 1992).

1.5 Coffein

1.5.1 Molekulare Struktur

Der Begriff „Coffein“ bezeichnet eigentlich einen Trivialnamen, den die Substanz aufgrund ihres Vorkommens in Kaffeebohnen erhielt und somit nichts über die chemische Zusammensetzung derselben aussagt. Nach der systematischen IUPAC-Nomenklatur wird Coffein mit der Summenformel $C_8H_{10}N_4O_2$ als 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3,7-trimethyl-2,6-purindion (Kurzform 1,3,7-Trimethylxanthin) bezeichnet und zur Gruppe der natürlich vorkommenden Purine gezählt.

Strukturell handelt es sich bei Coffein um ein Molekül, das aus einem 5er- und einem 6er-Ring (Grundstruktur des Purins, eines Alkaloids) mit jeweils zwei Stickstoffatomen aufgebaut ist, an denen sich mehrere Substituenten befinden. So ist an den Stickstoffatomen an den Positionen 1, 4 und 7 jeweils eine Methylgruppe angelagert; das Stickstoffatom an Position 9 besitzt keinen Substituenten. Außerdem findet man an den Kohlenstoffatomen C2 und C6 des 6er-Ringes Doppelbindungen zu jeweils einem Sauerstoffatom.



Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin)

Abbildung 12: Molekulare Struktur des Coffeins (aus: Thieme Römpp online)

Coffein, das in seiner reinen Form ein Derivat des Xanthins darstellt, liegt unter natürlichen Bedingungen als geruchloses, weißes kristallines Pulver mit bitterem

Geschmack vor. Das Molekül besitzt eine molare Masse von 194,19 g/mol und eine Dichte von 1,23 g/cm³. Die Verbindung lässt sich leicht bei einer Temperatur von 178°C und bei vermindertem Druck sublimieren, der Schmelzprozess hingegen beginnt ab 238°C.

Die Löslichkeit von Coffein hängt stark von der Temperatur und Beschaffenheit des jeweiligen Lösungsmittels ab. So löst sich die Substanz in Wasser (v. a. bei Erreichen des Siedepunktes) und Chloroform gut, in Alkoholen nur mäßig und in Ether so gut wie gar nicht. Das schwach basische Molekül bildet mit Säuren in Wasser leicht lösliche Salze (Chou, Benowitz 1994; Jörn Schulze 2007; Thieme Römpf online 1947).

1.5.2 Wirkungen auf den Organismus

Coffein ist das weltweit am häufigsten konsumierte aktive Pharmakon. Die Wirkungen auf den Organismus gestalten sich sehr unterschiedlich, doch wird die Substanz in erster Linie zur zentralen Stimulation von Psyche, Antrieb und Konzentration verwendet. Coffein kann die Blut-Hirn-Schranke fast ungehindert passieren (Nehlig et al. 1992). Außerdem lassen sich noch diuretische (Hemmung der Wasserrückresorption aus dem Primärharn durch Dilatation der Vasa afferentia und Hemmung der tubulären Elektrolyt-Reabsorption) und kardiovaskuläre (positiv ino- und chronotrope Auswirkungen auf den Herzmuskel durch Blockade der Kaliumkanäle in Verbindung mit einer Erhöhung des Blutdrucks) sowie lipolytische Effekte nachweisen. Unter dem Einfluss von Coffein kommt es zu einer Vasokonstriktion der cerebralen und zu einer Dilatation der peripheren Gefäße. Außerdem wird die Magensäuresekretion nach Aufnahme von Coffein deutlich gesteigert und es tritt aufgrund der Erschlaffung der glatten Muskulatur eine bronchospasmolytische Wirkung ein (Chou, Benowitz 1994; Forth W. 2001).

Beim zugrunde liegenden Mechanismus handelt es sich hauptsächlich um die Hemmung der Phosphodiesterase (PDE), woraus ein verminderter Abbau des second messengers cAMP zu AMP resultiert und die zellstimulierende Wirkung verlängert wird. Außerdem führt Coffein aufgrund seiner molekularen Ähnlichkeit zu Adenosin (das einen zentral sedierenden Effekt besitzt) zu einer kompetitiven Inhibition von Adenosin-Rezeptoren, wodurch die an den Rezeptor angelagerte

Adenylatcyclase nicht mehr gehemmt und somit wiederum eine konstitutiv erhöhter cAMP-Spiegel erreicht wird (Thieme Römpp online 1947). Die vermehrte Verfügbarkeit von cAMP führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration und letztendlich zu einer Kontraktion der quergestreiften und Herz-Muskulatur. Außerdem kommt es zu einer Dilatation der Bronchialmuskulatur (Chou, Benowitz 1994; Höfer, Böttig 1994; Walach et al. 2002).

Nach oraler Aufnahme erfolgt eine rasche Resorption des Coffeins (ca. 30 - 45 Minuten) mit einer darauffolgenden Bioverfügbarkeit von ca. 90 - 100 %. Die maximale Plasmakonzentration wird 15 - 20 Minuten nach Aufnahme erreicht, die biologische Halbwertszeit beträgt zwischen 2,5 und 4,5 Stunden. In der Leber wird Coffein anschließend zu Theobromin und Theophyllin metabolisiert. Ab einer Dosis von ca. 300 mg kann es zu Nebenwirkungen kommen, die sich vor allem in Form von Diarrhoe, Nervosität, Emesis und Tremor zeigen, die Toxizitätsgrenze liegt bei ca. 1 g (Forth W. 2001; Thieme Römpp online 1947). Eine mittlere Dosis von 10 g (entspricht ca. 100 Tassen Kaffee bzw. 1 mmol/l) zieht bei 50 % der Individuen einen letalen Ausgang nach sich (LD50) (Julien 2001).

1.5.3 Einflussnahme von Coffein auf die Zelle und deren Strahlensensibilität

Coffein kann grundsätzlich auf drei verschiedene Arten in die molekularen Abläufe der Zelle eingreifen und somit deren Strahlensensibilität verändern: Zum Einen führt Coffein zu einer Hemmung der oben beschriebenen HRR-Reparatur; zum Anderen kommt es unter dem Einfluss von Coffein zu einer Aufhebung der Checkpoint-Regulation. Außerdem beeinflusst Coffein in geringerem Maße die Apoptoseregulation. Dabei wird vermutet, dass die Strahlensensibilität der Zelle durch die Störung der HRR-Reparatur erhöht wird und die Verkürzung des Checkpoint-getriggerten Arrests zur Entwicklung irreparabler Schäden an der DNA beiträgt.

Die Beeinflussung der HRR unter dem Einfluss von Coffein beruht auf der Hemmung bestimmter Reparaturmechanismen, die mit den Proteinen XRCC2 und XRCC3 (strukturell ähnlich dem Protein Rad51) vergesellschaftet sind. Noch unklar ist, ob Coffein direkt die Aktivität der beiden Proteine oder eine andere Komponente des mit XRCC2/3-assoziierten Komplexes inhibiert. Auch kann Coffein über eine direkte

Hemmung der ATR (die normalerweise für die Aktivierung des Checkpointarrests und somit der Reparaturmechanismen zuständig ist) auf die HRR einwirken (Wang et al. 2003a). Des Weiteren ist bekannt, dass sich Coffein direkt an geschädigte DNA anlagert und somit die Wiederherstellung der DNA-Integrität behindern kann (Asaad et al. 2000; Wang et al. 1999). Effekte von Coffein auf die NHEJ wurden bisher nicht nachgewiesen (Wang et al. 2003b).

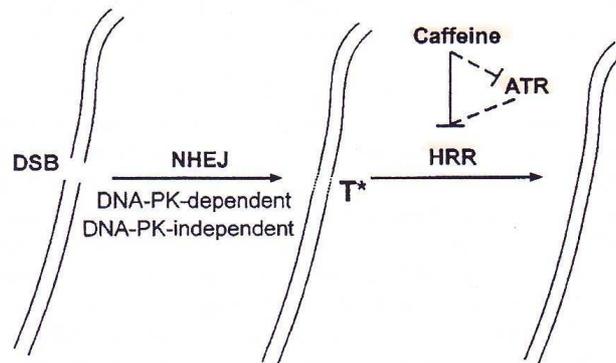


Abbildung 13: Einfluss von Coffein auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (aus: Asaad et al. 2000)

Auf Ebene des Zellzyklus führt Coffein hauptsächlich zu einer Verkürzung des G2-Arrests über eine Inhibition des G2-Phase-Checkpoints. Durch diesen Hemmmechanismus und die damit verbundene Verkürzung des G2-Arrests können die DNA-Reparaturmechanismen der Zelle nicht mehr suffizient arbeiten und die Zelle geht zugrunde (Asaad et al. 2000; Moser et al. 2000).

Wie es zur Inhibition dieses Checkpoints kommt, wird momentan kontrovers diskutiert. Es gilt jedoch als wahrscheinlich, dass Coffein über eine Hemmung der ATM das Protein cdc 25 C vor Abbau schützt; somit kann das cdc 25 C – Protein die G2-Checkpoint-Bestandteile Cyclin B und CDK1 (codiert durch das cdc2-Gen) in ihre aktive Form überführen. Dies führt dazu, dass der Zellzyklus trotz des durch Bestrahlung entstandenem DNA-Schadens unter dem Einfluss von Coffein weiterläuft und der Zelle nicht genügend Zeit zur Reparatur bleibt. Außerdem kann Coffein die Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 über ATM verhindern, wodurch über eine ausbleibende Aktivierung der Proteins p21 wiederum der G2-Phase-Arrest verkürzt wird (Asaad et al. 2000; Bode, Dong 2007; Busse et al. 1978; Cortez 2003; Kastan et al. 1991; Moser et al. 2000; Scott 1985; Zampetti-Bosseler 1985).

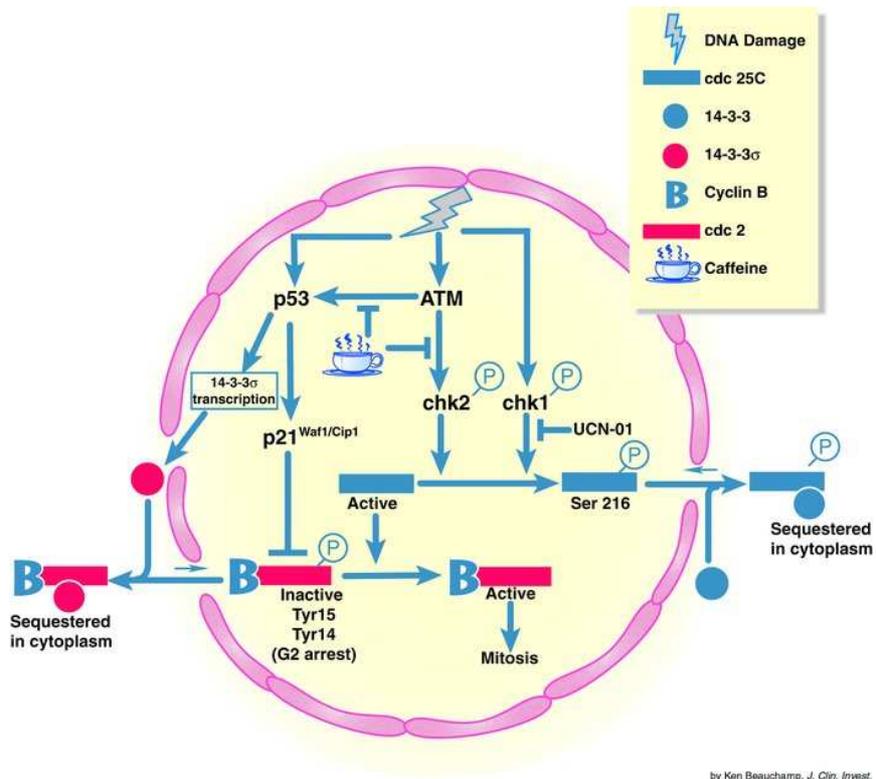


Abbildung 14: Wirkung von Coffein auf den G2-Arrest (aus: Shapiro et al. 1999)

Die Wirkungen von Coffein auf andere Zellzyklusphasen spielen eher eine untergeordnete Rolle. So konnte auch eine Aufhebung einer evtl. Verzögerung in der S-Phase durch Coffein nachgewiesen werden (Bode, Dong 2007; Griffiths et al. 1978; Kaufmann et al. 2003; Walters et al. 1974; Wang et al. 1999). Ebenso wird eine Verhinderung der regelrechten Zellzyklusprogression sowohl mittels Verkürzung des G1-Arrests (durch eine Reduzierung des p53-Spiegels in der Zelle) (Kastan et al. 1991) als auch über eine Verzögerung der G1-Phase (unter anderem über eine Hemmung der Proteine CDK2/Cyclin E bzw. CDK4/6/Cyclin D) (Bode, Dong 2007; Kaufmann et al. 2003; Valenzuela et al. 2000; Walters et al. 1974) beschrieben. Auch eine Inhibition des G0/G1-Phase-Arrests wurde beobachtet (Bode, Dong 2007; Hashimoto et al. 2004).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Coffein in den Prozess der Apoptose eingreift. Dabei wird sowohl ein p53-abhängiger als auch ein p53-unabhängiger Signalweg diskutiert. So kommt es unter dem Einfluss von Coffein zu einer vermehrten Phosphorylierung bzw. Aktivitätssteigerung des Tumorsuppressorgens p53, woraus eine erhöhte Konzentration des Proteins Bax und der Caspase 3 resultiert (Bode, Dong 2007; He et al. 2003). Jedoch wurde auch in p53-defizienten Zellen eine vermehrte Apoptose durch Coffein nachgewiesen, was die Vermutung

über eine p53-unabhängige Auslösung der Apoptose nahe legt (Bode, Dong 2007; Higuchi et al. 2000).

Allgemein gilt jedoch festzuhalten, dass sich die Effekte von Coffein von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden, wobei auch die verwendete Coffeindosis Einfluss auf die Effekte von Coffein besitzt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region gehören mit zu den häufigsten malignen Erkrankungen weltweit und verzeichnen in den letzten 25 Jahren einen deutlichen Anstieg der Mortalitätsrate. Momentan bilden die chirurgische Resektion, die Chemotherapie und die Bestrahlung sowie die Kombination aus den beiden letztgenannten die Therapie der Wahl. Abhängig von der Tumorlokalisierung, Fernmetastasen und dem Allgemeinzustand des Patienten werden Mono- oder duale Therapiekonzepte verfolgt. In letzter Zeit wurde auch vermehrt Forschung an neuen Substanzen wie beispielsweise Cetuximab betrieben, die in Studien eine hohe Wirksamkeit und geringe Nebenwirkungen aufweisen. Vor allem die Mucositis als eine akute Folge der radiogenen Therapie wird von den meisten Patienten als schmerzhaft und äußerst unangenehm empfunden, ähnliches gilt für die Xerostomie als chronische Komplikation der Bestrahlung.

Somit rückte in neuerer Zeit die Untersuchung potentiell strahlensensibilisierender Medikamente vermehrt in der Fokus wissenschaftlichen Interesses, da durch diese eine Reduzierung der Bestrahlungsdosis sowie eine Verminderung möglicher schädlicher Nebeneffekte erreicht werden könnte. Die Wirkung von Coffein in Kombination mit Bestrahlung wurde bereits in mehreren präklinischen Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht. Die Ergebnisse waren abhängig vom allgemeinen Versuchsaufbau, den verwendeten Strahlen- und Coffeindosen sowie den verwendeten Zelllinien. In der vorliegenden Studie wurde die strahlensensibilisierende Wirkung von Coffein speziell auf zwei unterschiedliche Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und XF354 untersucht. SAS stammt aus einem primären Zungen-Plattenepithelkarzinom und besitzt eine höhere Strahlenresistenz als XF354. XF354 leitet sich von einer Lymphnotenmetastase eines primären Mundboden-Plattenepithelkarzinoms ab. Diese beiden Zelllinien erweisen sich

aufgrund ihres raschen Wachstums als geeignet für die geplanten Versuche. In den Untersuchungen wurden verschiedene Konzentrationen von Coffein mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen kombiniert. Die Erwartung war, eine therapeutisch wirksame Coffeindosis unter der Toxizitätsgrenze zu definieren, die eingesetzt werden könnte, um zukünftig die Behandlung von Patienten mit HNO-Tumoren signifikant zu verbessern.

2 Materialien und Geräte

2.1 Zelllinien

SAS und XF354: Die Zelllinien wurden erhalten von Prof. M. Baumann, Dresden

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Bench: Thermo Electron Corporation, Waltham, USA

HERAsafe, Typ KS 18

Working Volume 1800 x 780 x 627 mm

Bestrahlungsgerät: Gulmay Medical Systems, Surrey, United Kingdom

Tube Voltage: 20 - 220 kV, Tube Current: 0 – 25 mA

Maximum Power Output 3 kW

Bioreader: Bio-Sys GmbH, Karben, Deutschland

Bioreader®5000 Elispot

Brutschrank: Thermo Electron Corporation, Waltham, USA

Heraeus, Typ BBD 6220

230 V; 5,2 A; 1,2 kW

Temperatur t° 37,2°C

CO₂-Gehalt 5,0 %

Luftfeuchtigkeit rH 95 %

Kolbenhubpipette: Corning Incorporated, Arizona, USA

Corning Lambda

Aufnahmevolumen 10 – 100 µl

Kombitips plus: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

10 ml

Kulturflaschen: Corning Incorporated, Arizona, USA

Corning Flask 3056

Zellkulturfläche 25 und 75 cm²

Kunststoff-Pipettenspitzen: SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Deutschland

200 µl, gelb

Messpipetten: Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

FALCON

Aufnahmeevolumen 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml

Mikroskop: Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Axiovert 25, Seriennummer 666083

Baujahr 2000

Millipore Anlage: Millipore DirectQ with Pump: Millipore, Billerica, USA

Multipette: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Neubauer Zählkammer: Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland

Tiefe 0,100 mm

Fläche 0,0025 mm²

Polypropylene Conical Tubes: Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

FALCON

50 ml

Stripettor: Corning Incorporated, Arizona, USA

Vakuumpumpe KNF Laboport: KNF Neuberger GmbH, Freiburg i. Br., Deutschland

Wellplatte (I): Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

FALCON

96 Wells

Wellplatte (II): Corning Incorporated, Arizona, USA

Non-pyrogenic cell culture plate, costar

12 Wells

Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3SR+ (Thermo scientific)

2.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Amino Acids: PAA cell culture company laboratories, Pasching, Österreich

Non essential

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

GIBCO 42430 invitrogen

Inclusive 4,5 g/l Glucose, L-Glutamine, 25 mM HEPES

Ohne Pyruvat

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

GIBCO 14190 invitrogen

ohne CaCl_2 und MgCl_2

FCS: Fetal Calf Serum 50 ml, PAA Laboratories, Pasching, Österreich

PenStrep Penicillin/Streptomycin 5 ml: GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

Medium für XF354 und SAS zusammengesetzt aus: 500 ml DMEM
50 ml FCS
5 ml PenStrep
5 ml Amino Acids

2.4 Chemikalien

Aqua dest.: Millipore DirectQ

Coffein: ReagentPlus[®], Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Pulver: Schmelzpunkt bei 234 – 236,5°C
Löslichkeit in Wasser 15 mg/ml

Ethanol 70 %: vergällt, mit ca. 1 % MEK, Ethylalkohol
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kristallviolett: Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
0,75 g Kristallviolett
300 g Aqua dest.

Methanol: 99,5 %, gelagert bei -20°C

Trypanblau-Lösung: Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Trypsin/EDTA: PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
0,05/0,02 % Ig in PBS
ohne Ca und Mg
steril gefiltert

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

3.1.1 Auftauen der Zellen

Um die benötigten Zellen aufzutauen, wird für diese zu Beginn 10 ml kaltes Medium vorgelegt. Anschließend wird das Cryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei einer Temperatur von 37°C unter leichtem Hin- und Herschwenken im Wasserbad aufgetaut. Daraufhin wird ca. 1 Milliliter des vorgelegten Mediums langsam zu den Zellen gegeben und dieses Gemisch dann vorsichtig mit einer Pipette aufgesaugt. Die Zell-Medium-Suspension wird nun zum restlichen Medium hinzugefügt und mit 1000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet in 7 ml resuspendiert und das Gemisch in eine T25-Zellkulturflasche übertragen. Abschließend wird die Flasche in den Brutschrank (t° 37,2°C, CO₂-Gehalt 5,0 %, rH 95,0 %) gestellt, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet werden muss. Das Nährmedium wird am nächsten Tag ausgewechselt.

3.1.2 Passagieren der Zellen

Um allgemein effizienter und mit einer größeren Anzahl an Zellen arbeiten zu können, wurde das Passagieren der Zellen in T75-Kulturflaschen (Bodenfläche 75 cm²) vorgenommen. Die Passage wird jeden dritten bis vierten Tag durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt eine optimale Vervielfachung der Zellen stattgefunden hat. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Zelllinie SAS im Vergleich zur Zelllinie XF354 ein größeres Wachstumspotential besitzt.

Zu Beginn wird die entsprechende T75-Zellkulturflasche aus dem Inkubator entnommen und die Zellen im Mikroskop auf Wachstumszunahme und Adhärenz geprüft. Dabei sollte auch auf die Farbe des Mediums geachtet werden, da eine zu helle Tönung oder eine Trübung auf eine Besiedlung mit Mikroorganismen hindeuten kann.

Anschließend wird das Medium mit einer Pipette vollständig abgesaugt und der Zellrasen mit ca. 10 ml PBS gewaschen, das daraufhin wieder entfernt wird – so werden eventuell vorhandene Mediumrückstände entfernt. Nun wird 1,5 ml Trypsin zur Ablösung der Zellen in die T25-Zellkulturflasche gegeben, geschwenkt und die Flasche für eine Dauer von 4 Minuten in den Inkubator bei 37,2°C gestellt. Nach Ablauf der Zeit werden die Zellen erst durch seitliches Beklopfen der Zellkulturflasche mit dem Handballen gelockert und danach im Mikroskop auf Ablösung, Form und Beweglichkeit getestet. Nachdem dies geschehen ist, wird 4,5 ml Medium hinzugefügt und dieses Gemisch einige Male resuspendiert, um eine optimale Trennung der einzelnen Zellen zu erreichen und die Trypsinierung durch das im Medium enthaltene FCS zu unterbinden. Nun werden 20 µl der Zell-Medium-Suspension zu 20 µl Trypanblau in ein Well der 96-Loch-Platte gegeben und nach sorgfältiger Resuspension anschließend ein kleines Aliquot davon in die Neubauer-Zählkammer eingefüllt. Es erfolgt die Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop, wobei besonders auf die Unterscheidung zwischen geschädigten (aufgrund der Aufnahme von Trypanblau dunkel gefärbt) und intakten Zellen geachtet werden muss.

Die standardisierte Kultivierung sieht für die T75-Zellkulturflaschen auf einer Fläche von 75 cm² eine konstante Einsaat von 1,5 x 10⁶ Zellen vor. Zunächst wird nun berechnet, wie viele Milliliter des Zell-Medium-Gemischs benötigt wird, um diese Anzahl von Zellen bereitzustellen:

1.
$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{(\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnung})}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

2.
$$X \text{ ml der Zelllösung} = 1,5 \times 10^6 / (\text{Zellzahl/ml})$$

Diese Menge wird dann in eine neue Zellkulturflasche übertragen und mit Medium bis zu einem Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Daraufhin wird die Flasche geschwenkt, um eine optimale Verteilung und Benetzung der Zellen zu gewährleisten. Nachdem der Erfolg der Zellpassage im Mikroskop geprüft wurde, wird die T75-Flasche zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt.

3.1.3 Einfrieren der Zellen

Das Einfriermedium, das den Zellen zugesetzt wird, setzt sich aus 14 ml Medium (dieses jedoch ohne FCS und Pen-Strep), 4 ml FCS (25 %) und 2 ml DMSO (10 %) zusammen. Es wurde festgesetzt, dass pro Cryoröhrchen 1×10^6 Zellen (aufgenommen in einem Milliliter Einfriermedium) eingefroren werden.

Zunächst werden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert, gezählt und anschließend mit 1000rpm über 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wird das Pellet in das Einfriermedium eingebracht, so dass die Zellkonzentration 1×10^6 /ml beträgt. Nun wird ein Milliliter dieses Gemisches pro Cryoröhrchen pipettiert und danach sofort mit dem Herunterkühlen (mithilfe von -80°C kaltem Isopropanol) begonnen (DMSO hat auf die Zellen eine tödliche Wirkung). Nach zwei bis drei Tagen können die Röhrchen in flüssigen Stickstoff gegeben werden.

3.2 Koloniebildungsassay

3.2.1 Aussäen der Zellen

Um beurteilen zu können, inwieweit sich die Zellzahl während der verschiedenen Versuche ändert, wird zunächst ein Koloniebildungsassay mit einer 12-Well-Platte durchgeführt. Dieser bildet die Grundlage für die Untersuchungen an jenen Zellen, deren Strahlensensitivität unter Einfluss von Coffein betrachtet werden soll.

Für die Zelllinie XF354 werden pro Well testweise 625, 1250, 2500 und 5000 Zellen ausgesät. Um diese Zellzahlen zu erreichen, muss zunächst mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die in den T75-Flaschen vorhandene Zellzahl bestimmt werden. Anschließend werden für die vier verschiedenen Zellzahlen vier Tubes mit einem jeweiligen Höchstvolumen von 50 ml vorgelegt, die zur Herstellung der jeweils passenden Zellzahl pro Milliliter benötigt werden. Daraufhin muss die Milliliteranzahl der Zellkultur nach oben genanntem Schema berechnet werden, die benötigt wird, um im ersten Tube eine Zellzahl von 5000 Z/ml bei einem Gesamtvolumen von 20 ml zu erreichen (dabei muss eventuell noch eine Verdünnung von 1:10 vorgenommen werden, falls eine sehr geringe, schwierig zu pipettierende Zellkulturmenge als Ergebnis vorliegen würde). Nachdem diese in den ersten Tube pipettiert wurde, wird

jener bis zu einem Endvolumen von 20 ml mit Medium aufgefüllt. Nach gründlichem Resuspendieren wird die Zellkultur von Tube zu Tube schrittweise 1:1 (jeweils Zugabe von 10 ml der vorherigen Verdünnungsstufe zu 10 ml reinem Medium) verdünnt, bis schließlich eine Zellzahl von 625 Zellen pro ml im letzten Tube vorliegt. Nun wird von jeder Verdünnungsstufe 1 ml pro Well (somit insgesamt 3 ml pro Tube) mithilfe der Multipipette vorgelegt, die 12-Well-Platte leicht geschwenkt und anschließend zum Bebrüten in den Inkubator gestellt. Die Inkubationsdauer beträgt sieben Tage, wobei eine Koloniegröße von ca. 50 Zellen pro Kolonie angestrebt wird. Mit der Zelllinie SAS wird ebenso verfahren; aus Vorversuchen ist jedoch bekannt, dass diese Zelle eine höhere Zell-Angehrate besitzt, weshalb von vornherein niedrigere Zellzahlen als bei der Zelllinie XF354 ausgesät werden (so wird die Zellkultur über 3 Schritte von 1600 Zellen pro ml auf 200 Zellen pro ml verdünnt).

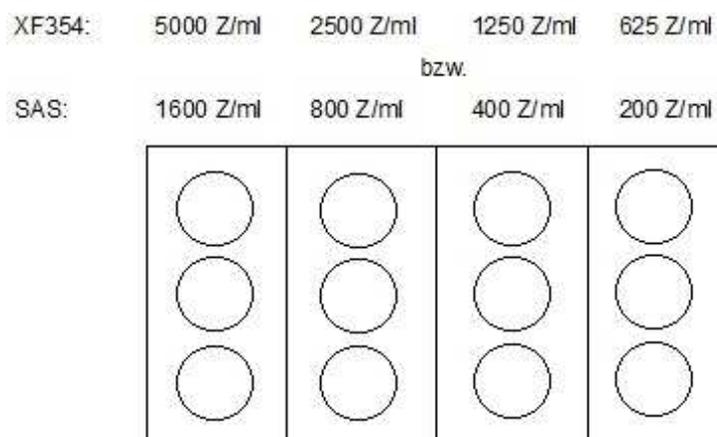


Abbildung 15: Schema zur Zellzahlverteilung innerhalb der 12-Well-Platte

Oben genannte Zellzahlen sind für die jeweiligen Zelllinien optimal, solange keine Bestrahlung durchgeführt wird. Werden Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt, müssen höhere Zellzahlen verwendet werden, um eine optimale verbleibende Zellzahl für Anfärben und Auszählen der Zellen zu erhalten; auf die dabei jeweils verwendeten Zellzahlen wird weiter unten näher eingegangen.

3.2.2 Zellfärbung

Um Veränderungen in der Zellzahl beobachten zu können und um das Auszählen der Zellen zu erleichtern, werden die Zellen sieben Tag nach Aussaat (also sechs

Tage nach Coffeinzugabe und Bestrahlung bzw. 4 Tage nach Mediumwechsel) fixiert und farblich markiert. Dazu wird zunächst das überschüssige Medium aus den Wells mit Hilfe der Millipore Pumpe abgesaugt und die Zellen anschließend einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Daraufhin wird die Fixation mit 1 ml kaltem 99,5 % Methanol (-20°C) für 5 Minuten vorgenommen. Nachdem das Methanol wieder entfernt wurde, werden die Zellen mit 1 ml Kristallviolett 0,1 % für 2 Minuten gefärbt, im Anschluss mit Wasser abgespült und die 12-Well-Platte zum Trocknen ausgelegt.

Um die Anzahl der Kolonien zu bestimmen, kann entweder ein Mikroskop oder der Elispot Reader verwendet werden, der ein schnelleres und effizienteres Auswerten der Zellzahlen gewährleistet. Um den Unterschied möglichst gering zu halten, wurde vor jedem Messvorgang ein Abgleich zwischen einer unter dem Mikroskop ausgezählten 12-Well-Platte (Eichplatte) und der Kamera des Elispot Readers vorgenommen. Um die Angehrate der Zellen (plating efficiency) in Prozent zu erhalten, werden die ausgezählten Kolonien zu den ausgesäten Kolonien ins Verhältnis gesetzt und mit 100 multipliziert. Die Überlebensrate (survival fraction) errechnet sich aus der Anzahl der behandelten ausgezählten Kolonien dividiert durch die Anzahl der unbehandelten ausgezählten Kolonien, wobei die Survival Fraction der unbehandelten Zellen mit 1 gleichzusetzen ist.

3.2.3 Linear-quadratisches Modell

Um das Zellüberleben in Abhängigkeit von der applizierten Dosis in Gy adäquat beurteilen zu können, wird seit Mitte der 1980er Jahre das linear-quadratische Modell (kurz LQ-Modell) mit der Grundformel $SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ von Kellerer und Rossi (1972) verwendet. Es eignet sich besonders gut für Bestrahlungen im Niedrigdosisbereich (zwischen 0 und 5 Gray), kann jedoch auch für die Analyse von fraktionierten Bestrahlungseffekten zur Hand genommen werden. Dabei bezeichnet SF die Überlebensrate und D die applizierte Dosis; bei α (Einheit Gy^{-1}) und β (Einheit Gy^{-2}) handelt es sich um zell- bzw. gewebsspezifische Proportionalitätskonstanten. Wird die Zellüberlebensrate in logarithmischer Form gegen die applizierte Dosis (linear) aufgetragen, erhält man eine sogenannte Schulterkurve, in der sich zwei Kurvenanteile unterscheiden lassen: Die lineare Komponente ($-\alpha D$) beschreibt die Anfangsneigung der Überlebenskurve (auch Schulter genannt), während die

quadratische Komponente ($-\beta D^2$) den weiteren Krümmungsverlauf der Kurve bestimmt, der sich bei höheren Dosen annähernd exponentiell verhält.

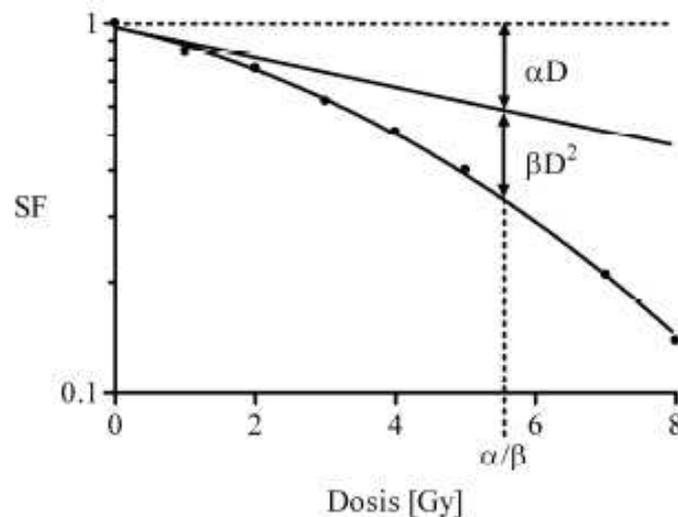


Abbildung 16: Linear-quadratisches Modell (aus: Herrmann et al. 2006)

Dabei entsteht die lineare Komponente (αD) auf dem Boden zweier räumlich sehr nahe beieinander liegender Doppelstrangbrüche, die durch ein einzelnes Sekundärelektron verursacht werden (Ein-Spur-Ereignis). Die Wahrscheinlichkeit P_1 eines solchen Ein-Spur-Ereignisses nimmt mit der Strahlendosis linear zu (I). Demgegenüber steht die quadratische Komponente des LQ-Modells (βD^2), deren benachbarte Doppelstrangbrüche durch zwei Sekundärelektronen hervorgerufen werden. Ein einzelner Doppelstrangbruch würde noch nicht zum Zelltod führen (man spricht hier von einem subletalen Schaden, der von entsprechenden Reparaturmechanismen wieder behoben werden kann), nur eine Wechselwirkung von zwei Doppelstrangbrüchen kann eine Apoptose nach sich ziehen. Die Wahrscheinlichkeit für einen einzelnen Doppelstrangbruch steigt wie oben beschrieben linear mit der Dosis an – demzufolge nimmt die Wahrscheinlichkeit P_2 für eine Interferenz zweier Doppelstrangbrüche proportional zum Quadrat der applizierten Dosis zu (II).

Somit lassen sich die bisherigen Überlegungen wie folgt zusammenfassen:

(I) $P_1 = \alpha D$

(II) $P_2 = \beta D^2$

Daraus ergibt sich für die Gesamtwahrscheinlichkeit eines letalen Ausgangs für die Zelle nach Bestrahlung:

$$(III) \quad P_{\text{ges}} = \alpha D + \beta D^2$$

Nimmt die Inzidenz von Strahlenschäden bzw. Doppelstrangbrüchen der DNA zu, so verringert sich in gleichem Maße der Anteil der überlebenden Zellen. Somit nimmt also für die lineare Komponente die Survival Fraction linear mit der Dosis ab ($-\alpha D$) (IV), während das Zellüberleben der quadratische Komponente, welche die Wahrscheinlichkeit der durch zwei Sekundärelektronen ausgelösten Doppelstrangbrüche widerspiegelt, mit dem Quadrat der Dosis abnimmt ($-\beta D^2$) (V). Das Gesamtzellüberleben wird mit Hilfe des natürlichen Logarithmus wiedergegeben (VI).

$$(IV) \quad \ln SF_1 = -\alpha D$$

$$(V) \quad \ln SF_2 = -\beta D^2$$

$$(VI) \quad \ln SF_{\text{ges}} = -\alpha D - \beta D^2$$

daraus folgt: $SF_{\text{ges}} = e^{-\alpha D - \beta D^2}$

Um Aussagen bezüglich der Schulter einer solchen Zellüberlebenskurve treffen zu können, ist der α/β -Wert von großer Bedeutung. Dieses Verhältnis gibt diejenige Dosis an, bei der die lineare und die quadratische Komponente den gleichen Beitrag zur Zellabtötung liefern ($\alpha D = \beta D^2$). Bei einem großen α/β -Wert überwiegt der Anteil der linearen Komponente, was zur Ausprägung einer kleinen Schulter führt. Im Extremfall (α/β geht gegen unendlich) bildet sich eine rein exponentielle Abnahme des Zellüberlebens ohne den Schulteranteil der Kurve aus. Ein kleines α/β -Verhältnis hingegen ergibt sich, wenn die quadratische Komponente hauptsächlich zur Zellabtötung führt und daraus eine große Schulter resultiert. Somit kennzeichnen kleine α/β -Werte diejenigen Zellen, die eine große Regenerationsfähigkeit (und somit gut funktionierende Reparatursysteme) von subletalen Strahlenschäden besitzen. Diese Zellen eignen sich somit gut für die fraktionierte Bestrahlung (d. h. sie verfügen

über einen ausgeprägten Fraktionierungseffekt). Im Gegenzug weisen Gewebe mit einem hohen α/β -Verhältnis eine geringe Erholungskapazität und einen niedrigen Fraktionierungseffekt auf (Baumann M. 2009; Herrmann et al. 2006; Kellerer AM 1972).

3.2.4 Auswerten der Assays und Bestimmen der Survival Fraction

Die gefärbten Koloniebildungsassays werden am Computer mittels des Programms „Elispot Reader“ ausgewertet. Um die im Computer installierte Kamera richtig zu kalibrieren, muss vor jeder neuen Messung eine Auswertung sogenannter Eichungs-Assays vorgenommen werden. Dazu wird zunächst für die beiden Zelllinien jeweils eine gefärbte 12-Well-Platte, deren Kolonien sich bereits mit bloßem Auge gut voneinander unterscheiden lassen, manuell unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei werden alle Kolonien gezählt, die 50 Zellen oder mehr umfassen. Anschließend wird diese Platte mit Hilfe des Computer maschinell in einem interaktiven Modus ausgewertet – hierbei können Schärfe und Ausrichtung der Kamera so weit optimiert werden, dass die manuell und die maschinell ausgezählten Koloniezahlen weitestgehend übereinstimmen. Diese Einstellungen werden dann für die beiden Zelllinien zum Messen der jeweiligen 12-Well-Platte verwendet.

Soll eine neue Platte ausgewertet werden, muss zunächst (nach Einschalten sowohl des Computers als auch der im Computergehäuse angebrachten Kamera) das Programm „Bioreader DE“ gestartet werden. Nach Eingabe der jeweiligen Plattenbezeichnung (Datum, Zelllinie, Graydosis, Coffeinkonzentration) und Auswahl des Designs „12-Well“ und der auf die Zelllinie angepassten Messmethode wird mittels eines Buttons die seitlich am Computergehäuse befindliche Lade ausgefahren. Nach korrektem Einlegen der 12-Well-Platte (ohne Deckel) kann über einen weiteren Auswahlbutton die Lade wieder eingefahren und somit das Auszählen der Wells begonnen werden. Nach Abschluss der Messung werden die gesammelten Daten automatisch in einer Excel-Tabelle gespeichert und können so für die Bestimmung der Survival Fraction verwendet werden.

3.3 Durchführen einer Vorversuchsreihe

3.3.1 Bestimmen der optimalen Zellzahlen

Werden Zellen mit unterschiedlichen Graydosen bestrahlt, müssen auch verschiedene Zellzahlen verwendet werden. Da sich bei höheren Grayzahlen die Anzahl der durch die Strahlung verursachten Doppelstrangbrüche häuft, verringert sich der Anteil der diese Dosen überlebenden Zellen. Um eine für Fixation und Auszählen optimale Zellzahl zu erreichen, werden zunächst einige Vorversuche durchgeführt.

In vorangegangenen Versuchen sind folgende Zellzahlen eingesetzt worden:

	XF354	SAS
0 Gy	2500	500
2 Gy	2500	500
4 Gy	5000	1000
6 Gy	10000	2000
8 Gy	10000	2000

Tabelle 1: In vorangegangenen Versuchen verwendete Zellzahlen der Arbeitsgruppe

Diese Zellzahlen müssen zunächst in Vorversuchen bestätigt werden. Dazu werden oben genannte Zellzahlen sowie jeweils höhere und niedrigere Verdünnungsstufen gewählt und anschließend mit der entsprechenden Dosis bestrahlt. Außerdem muss in die Berechnung die Tatsache mit eingeschlossen werden, dass Coffein auch ohne den Einfluss von Bestrahlung durch seine zellschädigende Wirkung bereits einen negativen Effekt auf die Zellzahl ausübt. Deshalb sollte die Zellzahl prinzipiell eher höher angesetzt werden, um auch unter Coffeineinfluss brauchbare Zellzahlergebnisse zu erhalten. Dabei fiel jedoch auf, dass sich für die Zelllinie XF354 bei 0, 4 und 6 Gy und für die Zelllinie SAS bei 0, 2 und 8 Gy optimale Ergebnisse in Bezug auf Anwachsverhalten und Auszählbarkeit erzielen ließen, weshalb diese Bestrahlungsdosen auch im nachfolgenden Hauptversuch verwendet wurden. So konnten nun die idealen Zellzahlen festgesetzt werden:

	XF354	SAS
0 Gy	5000	500
2 Gy		1000
4 Gy	10000	
6 Gy	10000	
8 Gy		4000

Tabelle 2: Im Hauptversuch verwendete Zellzahlen

3.3.2 Feststellen geeigneter Coffeinkonzentrationen

Im Hauptversuch sollen Coffeinkonzentrationen eingesetzt werden, welche einen sicht- und messbaren Effekt auf die Zellzahlen in Kombination mit Bestrahlung ausüben; dabei sollte die Coffeindosis aber möglichst gering gehalten werden, um zu toxische Effekte auf die Zellen möglichst zu vermeiden.

Zu Beginn wurden Vorversuche gestartet, bei denen Coffeinkonzentrationen zwischen 0,5 und 2 mM – unabhängig von der Zellzahl – verwendet wurden. Diese erste Vorversuchsreihe lieferte bereits eine Vorstellung, in welchem Maße Coffein die Strahlensensibilität der beiden HNO-Tumorzelllinien XF354 und SAS beeinflusst. Daraufhin wurde die Coffeinkonzentration weiter gesteigert und mit Dosen zwischen 5 und 7 mM gearbeitet. Diese Konzentrationen erwiesen sich allerdings als zu hoch, da nach der Fixation und dem Anfärben der 12-Well-Platten kaum noch Zellen zu sehen waren. Um den Effekt von Coffein auch in einem niedrigen Dosisbereich auszutesten (und somit eine eventuelle protektive Wirkung von Coffein in diesen Konzentrationen feststellen zu können), wurden anschließend noch sehr geringe Coffeindosen benutzt. Dabei wurde eine Konzentration von 5 mM für 500000 Zellen (diese Coffeindosis wurde bei einem ähnlichen Versuch einer anderen Arbeitsgruppe angewandt) als Vorlage verwendet. Nun wurde diese Coffeinkonzentration auf die jeweilige Zellzahl heruntergerechnet und somit Coffeindosen zwischen 0,005 und 0,4 mM zu den Zellen gegeben. Diese Dosen erwiesen sich jedoch als zu niedrig, da keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden konnten. Dieser Versuch wurde abschließend mit der jeweils

vierfachen Konzentration (0,04 – 1,6 mM) dieser Dosen wiederholt, um weitere Effekte des Coffeins in einem niedrigen Coffeinbereich zu untersuchen.

Aus diesen Vorversuchen wurde schließlich deutlich, dass sich für die Arbeit mit niedrigen Coffeindosen am besten Coffeinkonzentrationen zwischen 0 und 0,2 mM und für die Arbeit mit hohen Coffeindosen am besten Konzentrationen zwischen 0 und 2 mM eignen.

3.3.3 Diskussion über einen möglichen Mediumwechsel

Als weitere Frage blieb zu klären, inwieweit ein Mediumwechsel nach Bestrahlung einen Einfluss auf das Zellüberleben nach sich zieht. Dazu wurden für jede Grayzahl jeweils zwei 12-Well-Platten ausgesät. Bei der ersten wurde das 30 Minuten vor Bestrahlung mit Coffein versetzte Medium 7 Tage bis zur Fixation in den Wells belassen; bei der zweiten Platte wurde das Medium 48 h nach Bestrahlung (also 48,5 h nach Coffeinzugabe und 72 h nach Zellaussat) komplett ausgewechselt. Nach Ablauf der 7 Tage wurde beim Färben der 12-Well-Platten deutlich, dass die Zellen, die einen Mediumwechsel erhielten, ein deutlich besseres Zellüberleben zeigten als die Zellen ohne Mediumwechsel. Da auch im klinischen Bereich theoretisch ein Mediumwechsel nach Bestrahlung stattfindet (so werden die Patienten, denen ein strahlensensibilisierendes Medikament zur Bestrahlung verabreicht wurde, nach durchgeführter Bestrahlung gewässert, um diese Substanz möglichst schnell wieder auszuscheiden), wird im Hauptversuch ebenfalls mit Mediumwechsel 72 h nach Aussaat gearbeitet.

3.4 Durchführung der Bestrahlung

3.4.1 Bestrahlung am RS225

Um die Zellen zu bestrahlen, wird das Bestrahlungsgerät RS225 der Marke Gulmay Medical Systems verwendet. Dazu werden die 12-Well-Platten nach Zugabe der jeweiligen Coffeindosis und einer Einwirkzeit von 30 Minuten auf dem drehbaren Untersatz dieses Gerätes angebracht. Nach automatischem Schließen der

Bestrahlungskammer kann über einen Touchscreen das für die jeweiligen Zellen optimale Bestrahlungsprogramm ausgewählt werden. Für die beiden Zelllinien XF354 und SAS wird eine konstante Bestrahlung bei 70kV und 100mA (unter Benutzung des Filters Nummer 3) verwendet, wobei eine Minute und eine Sekunde genau einem Gray entspricht. So müsste beispielsweise für eine Bestrahlung mit 6 Gray eine Bestrahlungsdauer von 6 Minuten und 6 Sekunden eingestellt werden. Nach Laden des Programms kann über den „X-ray on“-Button die Bestrahlung für die jeweilig gewählte Zeit gestartet werden. So werden die Zellen nacheinander in absteigender Graydosis der ionisierenden Strahlung ausgesetzt und anschließend schnellstmöglich wieder im Brutschrank untergebracht.

3.5 Anwendung von Coffein

3.5.1 Herstellen einer Stocklösung

Um das Coffein in geeigneter Dosierung zugeben zu können, wird zunächst eine Stocklösung einer bestimmten Molarität hergestellt. Von dieser Lösung wird dann ein definiertes Volumen zu den in Medium gehaltenen Zellen gegeben. Bekannt ist, dass Coffein über eine molare Masse von $M = 194,19 \text{ g/mol}$ verfügt, die maximale Löslichkeitsgrenze in Wasser liegt bei 15 mg/ml . Um nun die Menge an Coffein zu ermitteln, welche zum Ansetzen einer Stocklösung benötigt wird, wird folgende Formel verwendet und nach m aufgelöst:

$$n \text{ (Stoffmenge in mol/l)} = \frac{m \text{ (Masse in g/l)}}{M \text{ (molare Masse in g/mol)}}$$

Dabei muss jedoch immer die Löslichkeitsgrenze bedacht werden. Um diese zu bestimmen, wird die maximal zu erreichende Stoffmenge mittels oben genannter Formel berechnet:

$$n = \frac{15 \text{ mg/ml}}{194,19 \text{ g/mol}} = 0,077 \text{ mol/l} = 77 \text{ mmol/l}$$

Somit können keine höher als 77 mmol/l konzentrierten Lösungen angesetzt werden. Um nun beispielsweise eine Zielkonzentration von 5 mmol/l für die Zugabe zu den

Zellen zu erreichen, wird eine 10fach konzentrierte Stocklösung anhand folgender Rechnung hergestellt:

50 mmol/l (10fache Konzentrierung) = 0,05 mol/l

$m = 0,05 \text{ mol/l} \times 194,19 \text{ g/mol} = 9,71 \text{ g/l} = 9,71 \text{ mg/ml}$

Um eine Stocklösung mit einem Gesamtvolumen von beispielsweise 10 ml anzusetzen, werden nun zunächst 97,1 mg Coffein abgewogen und anschließend bis zu einem Volumen von 10 ml mit Medium aufgefüllt. Die Komponenten dieser 50 mmol/l-Stocklösung wird daraufhin durch stetiges Hin- und Herschwenken in Lösung gebracht.

Um eine Konzentration von 5 mmol/l für die Behandlung der Zellen zu erreichen, muss 1/10 (1:10-Verdünnung) der jeweilig vorhandenen Mediummenge aus der Stocklösung zum Medium gegeben werden. Im Falle der verwendeten 12-Well-Platten (bei denen sich in einem Well 1 ml Medium befindet), müssen also 100 µl der 50 mmol/l-Stocklösung pro Well zugegeben werden, um in einem Well eine Konzentration von 5 mmol/l zu erzielen. Um mit den gewünschten hohen (0, 0,5, 1, 2 mM) und niedrigen Coffeinkonzentrationen (0, 0,05, 0,1, 0,2 mM) arbeiten zu können, wurden nun also Stocklösungen mit 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 mmol/l hergestellt, in 2 ml Eppendorf Gefäße abgefüllt und anschließend eingefroren.

3.5.2 Zugabe von Coffein

Die verschiedenen Coffeindosen werden im vorliegenden Hauptversuch 24 h nach Aussaat der Zellen und 30 Minuten vor Durchführung der Bestrahlung zu den Zellen gegeben. Dazu wird zunächst das tiefgefrorene Coffein im Wasserbad bei 37° C langsam aufgetaut. In der Zwischenzeit werden die 12-Well-Platten vorsichtig aus dem Brutschrank entnommen und unter dem Mikroskop auf Koloniebildung und Vitalität der Zellen überprüft. Anschließend wird unter der Bench in jedes Well 100 µl der entsprechenden Coffeinkonzentration pipettiert und die Platte daraufhin vorsichtig geschwenkt. Da immer drei Wells mit der gleichen Coffeindosis versehen werden, ist es insgesamt möglich, in einer 12-Well-Platte mit vier unterschiedlichen Konzentrationen zu arbeiten. Nach Verabreichung des Coffeins werden die Platten

wieder zurück in den Brutschrank gestellt und für 30 Minuten inkubiert, bevor mit der Bestrahlung begonnen wird.

4 Ergebnisse

4.1 Plating Efficiency und Survival Fraction

In den vorliegenden Versuchen wurden die beiden HNO-Tumor-Zelllinien SAS und XF354 mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von Coffein (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 mM) inkubiert, um diese anschließend mit verschiedenen Bestrahlungsdosen (0, 2, 4, 6 und 8 Gy je nach Zelllinie) zu kombinieren. Dabei wurde 24 Stunden nach Aussaat der Zellen das Coffein zugegeben, um nach weiteren 30 Minuten mit der Bestrahlung zu beginnen. Am vierten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach einer Woche wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mit dem Elispot Reader am Computer ausgezählt.

Um sich ein Bild über die Anwachsrate und das Adhäsionsverhalten der Zellen machen zu können, wurde die Plating Efficiency für jede Zelllinie bestimmt. Diese errechnet sich aus dem Verhältnis der sich auf der Platte befindenden Kolonien (nach einem Anwachszeitraum von 8 Tagen) zur Anzahl der ursprünglich ausgesäten Zellzahl. Dabei ließ sich feststellen, dass die Plating Efficiency der Zelllinie SAS bei einer Coffeindosis von 0 mM und einer Bestrahlungsdosis von 0 Gy mit durchschnittlich 54,39 % deutlich höher lag als dies bei der Vergleichszelllinie XF354 der Fall war (4,06 %). Deshalb mussten bei der letztgenannten Zelllinie deutlich höhere Zellzahlen ausgesät werden als bei SAS (beispielsweise 5000 Zellen bei 0 Gy und 0 mM im Vergleich zu 500 Zellen bei der Zelllinie SAS).

Für die Auswertung der Versuche wurde die Survival Fraction bestimmt. Diese gibt Auskunft über das Zellüberleben unter Behandlung sowohl mit Coffein als auch mit Bestrahlung. Dazu wurde der Durchschnitt der Plating Efficiency bei 0 Gy und 0 mM Coffein als 100 Prozent-Wert erachtet, zu dem die bei unterschiedlichen Coffein- und Bestrahlungsdosen errechneten Plating Efficiencies jeweils ins Verhältnis gesetzt wurden. So ließ sich pro Zelllinie, Coffein- und Bestrahlungsdosis ein Mittelwert aus insgesamt 9 Auszählungen ermitteln, da pro Platte drei Wells die gleiche Coffein- und Bestrahlungsdosis aufwiesen und jeder Versuch drei Mal durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Ergebnisse in verschiedenen Diagrammen zur Darstellung gebracht.

4.2 Einfluss der Bestrahlung auf die Survival Fraction

Um die Auswirkung von der Kombination von Coffein und Bestrahlung auf die beiden Zelllinien besser bewerten zu können, wurde zunächst der isolierte Einfluss der Bestrahlung auf das Zellüberleben untersucht.

Die beiden nachfolgenden Diagramme geben die Auswirkungen der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen auf die Zelllinie SAS bei 0 mM Coffein wieder. Dabei zeigt das linke Diagramm die Messergebnisse der Versuchsreihe, bei der später 0,05, 0,1 und 0,2 mM verwendet wurden, das rechte Diagramm stellt die Ergebnisse des Versuchsansatzes mit einer späteren Behandlung mit 0,5, 1 und 2 mM Coffein dar.

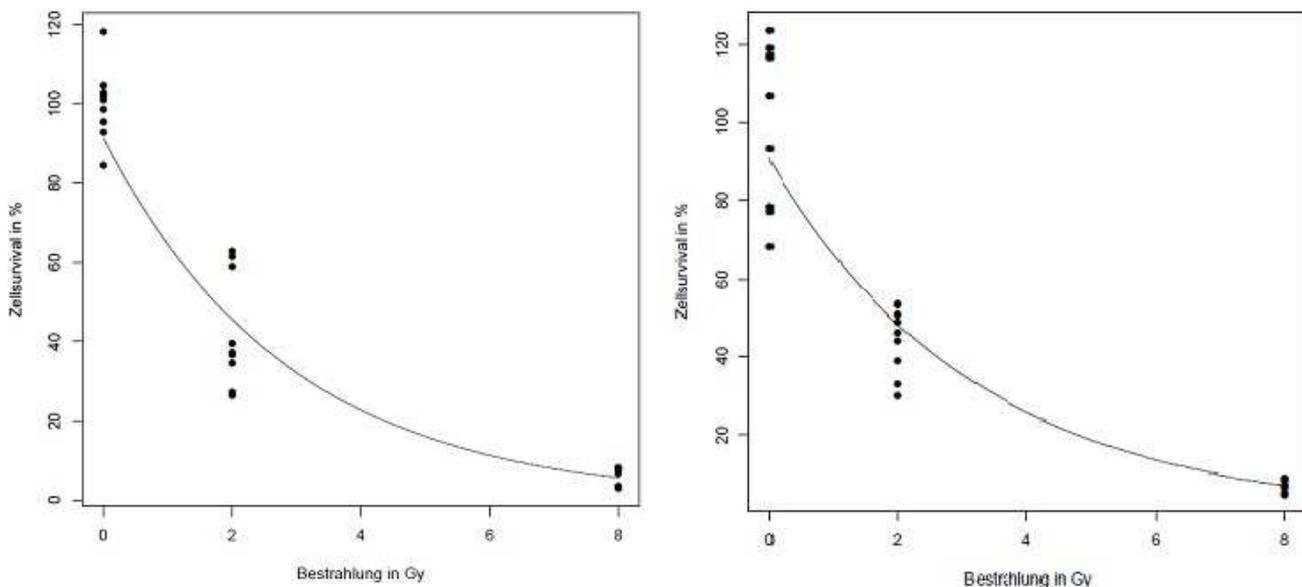


Abbildung 17: Einfluss der Bestrahlung auf das Zellsurvival der Zelllinie SAS bei 0 mM Coffein. Das linke Diagramm zeigt die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein, das rechte Diagramm die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,5, 1 und 2 mM Coffein.

Dabei lässt sich ein annähernd gleicher Kurvenverlauf in beiden Diagrammen erkennen (exponentielle Abnahme der Zellkolonien bei Erhöhung der Strahlendosis). Auffallend ist eine hohe Diversität der Messergebnisse, die sich im sehr wechselhaften Adhäsionsverhalten der Zellen an die 12-Well-Platten begründen lässt.

So lassen sich bei einer Strahlendosis von 0 Gy im linken Diagramm Werte zwischen 84,48 % und 118,28 % ermitteln, wobei der Mittelwert bei 100,00 % liegt und die einfache Standardabweichung 9,24 % beträgt. Bei 2 Gy liegen die Messwerte

zwischen 26,55 % und 62,76 %, der Mittelwert und die Standardabweichung belaufen sich auf 42,82 % bzw. 14,41 %. Eine Strahlendosis von 8 Gy hatte eine Verringerung der Zellüberlebensrate auf 3,10 – 8,15 % zur Folge, Mittelwert und Standardabweichung lagen bei 6,29 % und 2,28 %.

Auch im rechten Diagramm konnte eine große Streuung der Werte verzeichnet werden; so lagen die Messergebnisse bei 0 Gy zwischen 68,14 und 123,67 %, bei 2 Gy zwischen 29,93 und 53,37 % und bei 8 Gy zwischen 5,07 und 9,11 %. Die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen betragen 100,00 %; 21,22 % (0 Gy), 44,20 %; 8,6 % (2 Gy) und 7,56 %; 1,52 % (8Gy). In beiden Versuchsansätzen lässt sich ein signifikanter Einfluss der Bestrahlung auf die Survival Fraction feststellen (p -Wert < 0,0001).

Der Kurvenverlauf der Vergleichszelllinie XF354 bei verschiedenen Bestrahlungsdosen und 0 mM Coffein stellt sich wie folgt dar. Auch hier gibt das linke Diagramm die Ergebnisse der Versuchsreihe wieder, die später mit 0,05, 0,1 und 0,2 mM behandelt wurden. Das rechte Diagramm zeigt die Messwerte des Versuchsansatzes mit einer späteren Behandlung mit 0,5, 1 und 2 mM Coffein:

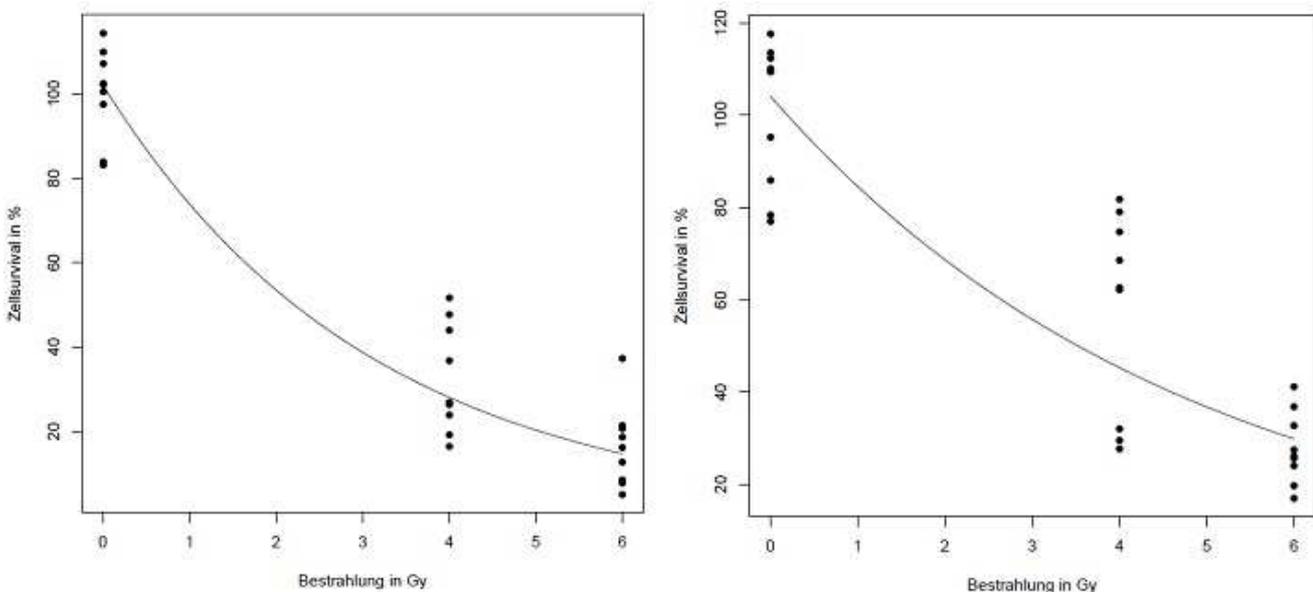


Abbildung 18: Einfluss der Bestrahlung auf das Zellsurvival der Zelllinie XF354 bei 0 mM Coffein. Das linke Diagramm zeigt die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein, das rechte Diagramms die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,5, 1 und 2 mM Coffein.

Auch hier lässt sich ein logarithmischer Abfall des Zellüberlebens sowohl im linken als auch im rechten Diagramm bei Zunahme der Bestrahlungsdosis erkennen, wobei

eine höhere Varianz der Messergebnisse deutlich wurde als dies bei SAS der Fall war.

So ließen sich bei den 12-Well-Platten, die später mit 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein versehen wurden, bei 0 Gy und 0 mM Coffein Werte zwischen 83,10 % und 114,41 % ermittelt, der Mittelwert lag bei 100,09 % und die einfache Standardabweichung bei 10,72 %. Bei einer Behandlung mit 4 Gy betrugen die Messergebnisse zwischen 16,31 % und 51,48 % bei einem Mittelwert von 32,44 % und einer Standardabweichung von 12,87 %. Wurden die XF354-Zellen mit 6 Gy bestrahlt, konnten Werte zwischen 5,08 % und 37,29 % festgestellt werden, der Mittelwert belief sich auf 16,43 % bei einer Standardabweichung von 9,78 %.

Bei der Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,5, 1 und 2 mM Coffein lagen die Messwerte ohne Bestrahlung bei einem Mittelwert von 99,93 % und einer Standardabweichung von 16,03 % zwischen 77,06 % und 117,65 %. Bei einer Bestrahlung mit 4 Gy ließ sich die höchste Spannweite aller im Rahmen dieses Versuchsaufbaus gemessenen Werte feststellen (27,65 % - 81,76 %); der Mittelwert lag dabei bei 57,55 % und die Standardabweichung bei 21,93 %. Die Messwerte für die Behandlung mit 6 Gy betrugen zwischen 17,06 % und 41,18 %, der Mittelwert und die Standardabweichung beliefen sich auf 27,84 % bzw. 7,79 %. Auch hier erwies sich der Einfluss der Bestrahlung auf das Zellüberleben in beiden Populationen als signifikant (p -Wert $< 0,0001$).

Obwohl die Messwerte zum Teil deutlichen Schwankungen unterworfen waren, ließ sich bei den unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und 0 mM Coffein jedoch eine Tendenz zum logarithmischen Abfall der Zellzahlen feststellen, die sowohl innerhalb einer Zelllinie als auch im direkten Vergleich der beiden Zelllinien annähernd gleich ausfiel. Eine von Takahashi et al. 1989 und Yaromina et al. 2006 und 2007 beschriebene unterschiedliche Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung konnte im vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden.

4.3 Einfluss von Coffein auf die Survival Fraction

Im Folgenden wird nun der Einfluss der alleinigen Gabe von Coffein auf das Zellüberleben unabhängig von der verwendeten Bestrahlungsdosis untersucht. Folgende Diagramme ließen sich dabei für die Zelllinie SAS ermitteln:

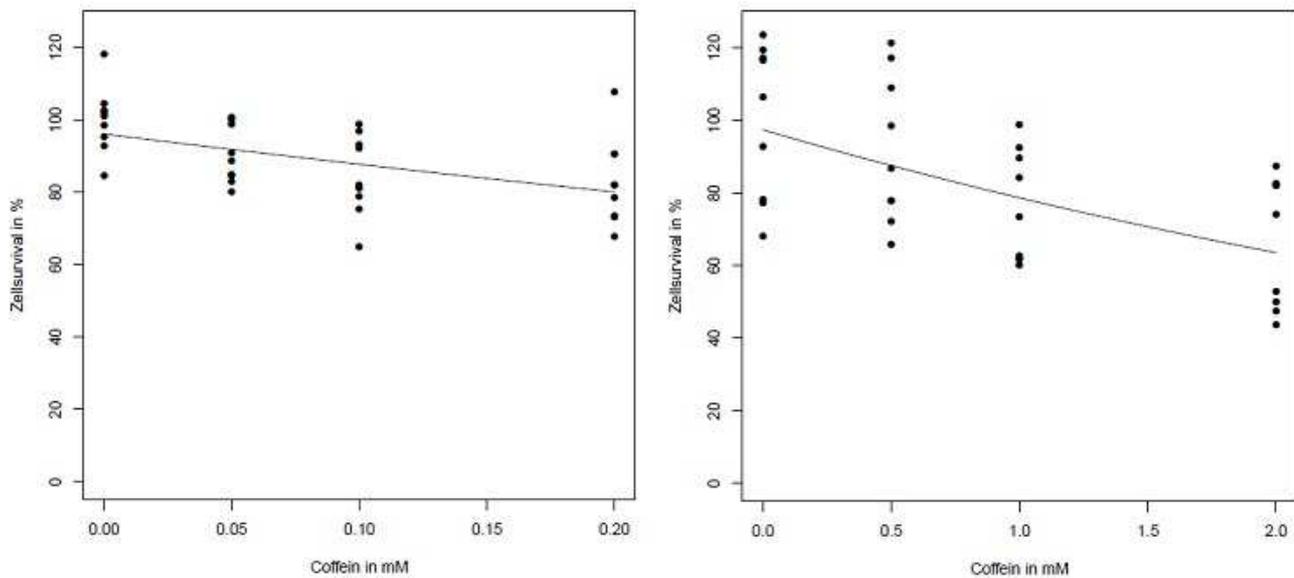


Abbildung 19: Einfluss des Coffeins auf das Zellsurvival der Zelllinie SAS bei Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (linkes Diagramm) sowie 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechtes Diagramm)

Das linke Diagramm gibt dabei wiederum die Versuchsreihe mit den Coffeindosen zwischen 0,05 und 0,2 mM wieder, das rechte Diagramm die Versuchsreihe mit den Coffeindosen zwischen 0,5 und 2 mM. Auch hier lässt sich eine relativ große Varianz der Werte in beiden Gruppen feststellen.

Auffallend ist im linken Diagramm ein nur schwacher linearer Abfall der Geraden, der auf einen nur geringen, jedoch signifikanten (p -Wert = 0,0068) Einfluss der niedrigen Coffeindosen (zw. 0 und 0,2 mM) auf das Zellüberleben schließen lässt. So betragen die Werte bei 0 mM Coffein – gemittelt über alle 0 Gy-Bestrahlungsdosen – zwischen 84,48 % und 118,28 %, der Mittelwert 100,00 % und die einfache Standardabweichung 9,24 %. Die Gabe von 0,05 mM Coffein erzielte eine Reduzierung des Cell Survivals auf Messergebnisse zwischen 80,00 % und 100,69 % mit einem Mittelwert von 90,19 % und einer Standardabweichung von 7,92 %. Bei einer Behandlung mit 0,1 mM Coffein ergaben sich Werte zwischen 64,83 % und 96,90 %, der Mittelwert und die Standardabweichung lagen bei 84,83 % bzw. 11,23 %. Wurden die Zellen mit einer Coffeindosis von 0,2 mM versehen, betragen die Messwerte zwischen 67,93 % und 107,59 %, der Mittelwert 82,91 % und die Standardabweichung 12,04 %.

Im rechten Diagramm lässt sich eine breitere Diversität der Messwerte erkennen. So lagen die Messwerte bei 0 mM Coffein zwischen 68,14 % und 123,67 %, bei 0,5 mM

zwischen 65,77 % und 121,31 %, bei 1 mM zwischen 60,26 % und 98,86 % und bei 2 mM zwischen 43,72 % und 87,44 %. Die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen betragen 100,00 % bzw. 21,22 % (0 mM), 91,86 % bzw. 20,44 % (0,5 mM), 76,23 % bzw. 15,32 % (1 mM), und 66,96 % bzw. 17,95 % (2 mM). Auch hier erwies sich der Einfluss der Coffeins auf das Zellüberleben als signifikant (p-Wert = 0,0194).

Die an der Zelllinie XF354 durchgeführten Versuche lieferten folgende Diagramme:

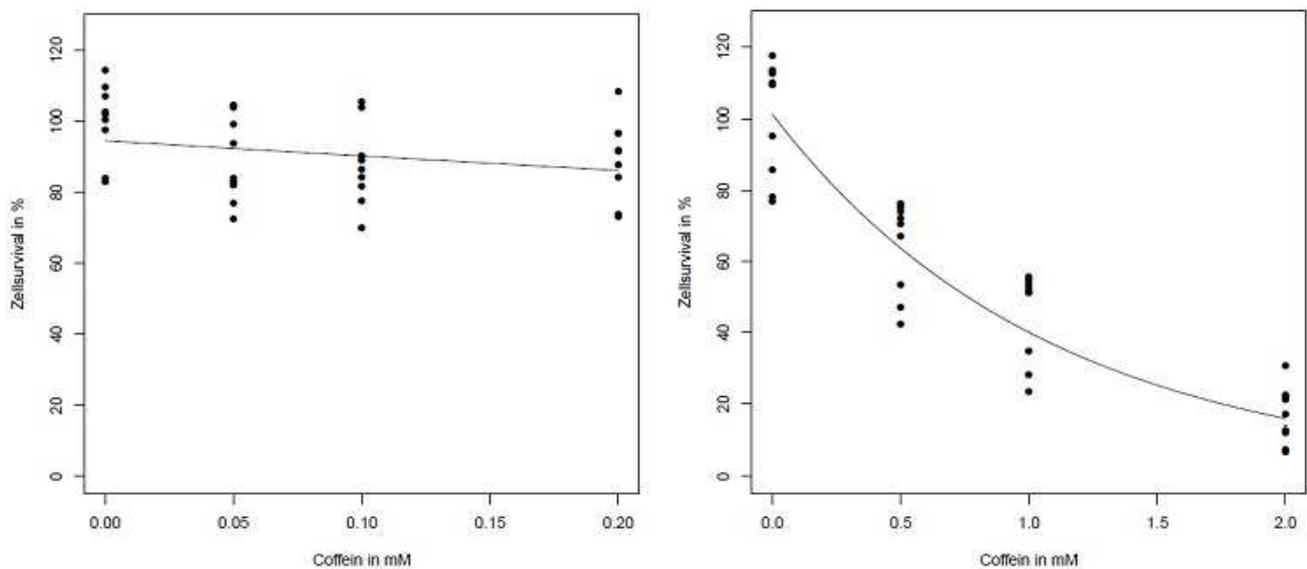


Abbildung 20: Einfluss des Coffeins auf das Zellsurvival der Zelllinie XF354 bei Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (linkes Diagramm) sowie 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechtes Diagramm)

Wie in den vorherigen Beschreibungen befindet sich auf der linken Seite das Diagramm mit Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM, auf der rechten Seite das mit Coffeindosen zwischen 0 und 2 mM.

Im linken Diagramm lässt sich für die Zelllinie XF354 erkennen, dass die Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM nur einen sehr geringen Einfluss auf das Zellüberleben, begleitet von einer relativ hohen Diversität der Messwerte haben - der Einfluss von Coffein ist hierbei jedoch nicht signifikant (p-Wert = 0,1376). So betragen die Messwerte bei 0 mM Coffein und ohne Bestrahlung zwischen 83,10 % und 114,41 %, Mittelwert und einfache Standardabweichung liegen bei 100,09 % bzw. 10,72 %. Bei einer Gabe von 0,05 mM Coffein ließen sich folgende Ergebnisse feststellen: Werte zwischen 72,46 % und 104,66 %, Mittelwert 88,89 %,

Standardabweichung 11,79 %. Unter dem Einfluss von 0,1 mM resultierten Werte zwischen 69,92 % und 105,51 %, Mittelwert und Standardabweichung betragen 87,62 % bzw. 11,47 %. 0,2 mM Coffein bewirkten einen Abfall der Survival Fraction auf 73,31 % - 108,47 %, der Mittelwert lag bei 89,36 %, die Standardabweichung bei 11,25 %.

Im rechten Diagramm lassen sich bei hoch signifikantem Einfluss des Coffeins (p -Wert $> 0,0001$) neben der wiederum vorhandenen relativ großen Streuung der Messwerte ein stärkerer Abfall des Kurvenverlaufs als bei der Vergleichszelllinie SAS erkennen. Dies spricht für eine höhere Sensibilität der Zelllinie XF354 gegenüber den höheren Coffeindosen. So betragen die Messwerte bei 0 mM Coffein zwischen 77,06 % und 117,65 %, der Mittelwert belief sich auf 99,93 % und die Standardabweichung auf 16,03 %. Die Versuchsreihe lieferte des Weiteren für die unterschiedlichen Coffeindosen folgende Werte: Messergebnisse zwischen 42,35 % und 76,47 %, Mittelwert 64,31 %, Standardabweichung 13,10 % bei 0,5 mM Coffein; Werte zwischen 23,53 % und 55,88 %, Mittelwert 45,03 %, Standardabweichung 12,57 % bei 1 mM Coffein und schließlich Werte zwischen 7,06 % und 30,59 %, Mittelwert 16,99 %, Standardabweichung 7,73 % bei einer Gabe von 2 mM Coffein.

Die Werte der Versuchsreihe mit hohen Coffeindosen liegen somit bei der Zelllinie XF354 deutlich unter denen der Vergleichszelllinie SAS. Die größte Variabilität lässt sich dabei bei einer Coffeindosis von 2 mM Coffein (Mittelwerte bei 66,96 % vs. 16,99 % im Vergleich der beiden Zelllinien) erkennen. Dieses unterschiedliche Reaktionsverhalten auf die Gabe von Coffein wurde bereits makroskopisch anhand der 12-Well-Platten bei 0 Gy Bestrahlungsdosis deutlich:

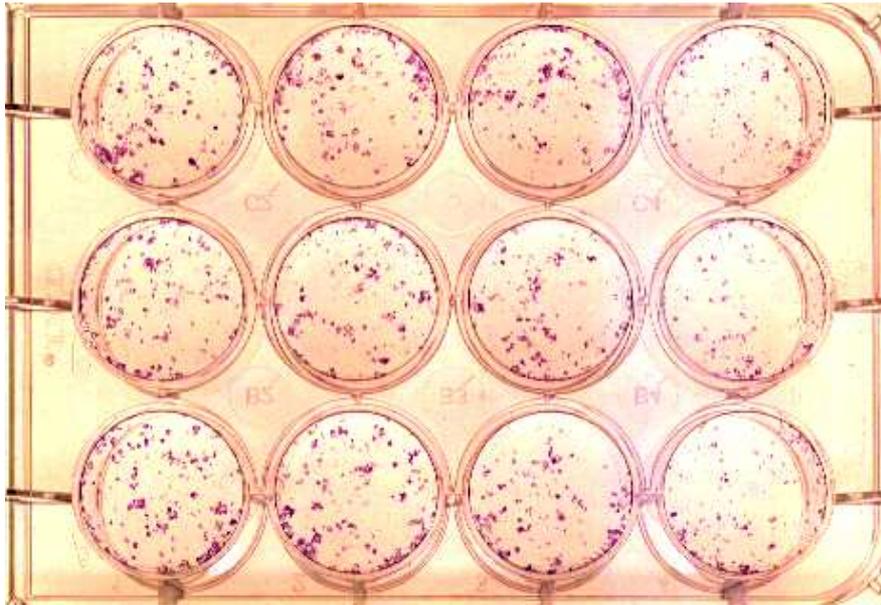


Abbildung 21: Beispiel eines klonogenen Überlebenstests mit der Zelllinie SAS ohne Bestrahlung unter dem Einfluss von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (bei einer Zellaussat von 500 Zellen/Well)

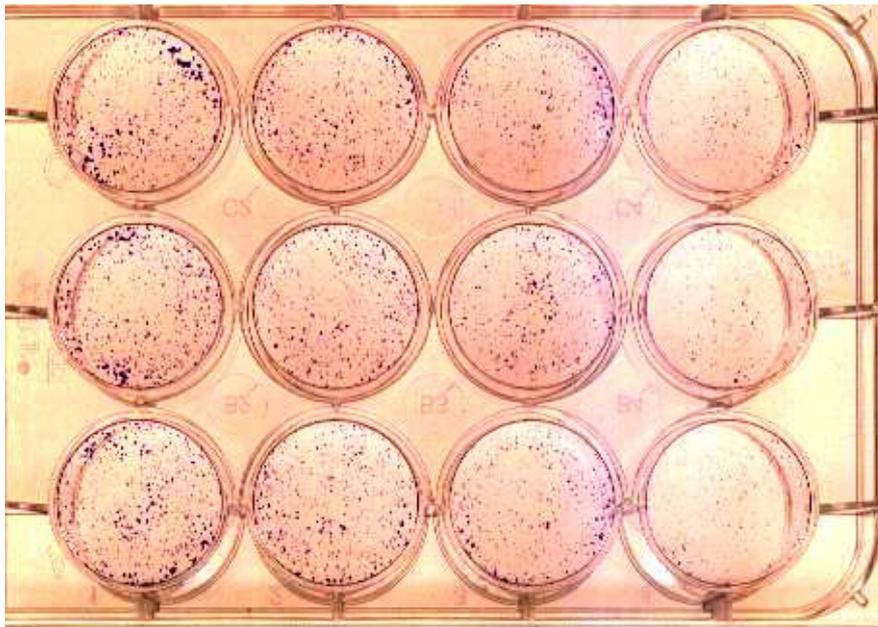


Abbildung 22: Beispiel eines klonogenen Überlebenstests mit der Zelllinie XF354 ohne Bestrahlung unter dem Einfluss von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (bei einer Zellaussat von 500 Zellen/Well)

4.4 Effekt der Kombination von Coffein und Bestrahlung

In den vorliegenden Versuchen wurden nun beide Zelllinien mit unterschiedlichen Kombinationen aus Bestrahlung und Coffeindosen behandelt.

Dabei resultierten für die Zelllinie SAS die folgenden Fehlerbalken-Diagramme mit den jeweils angegebenen Mittelwerten und einfachen Standardabweichungen (Dosisstufen als x-Achsenkategorien):

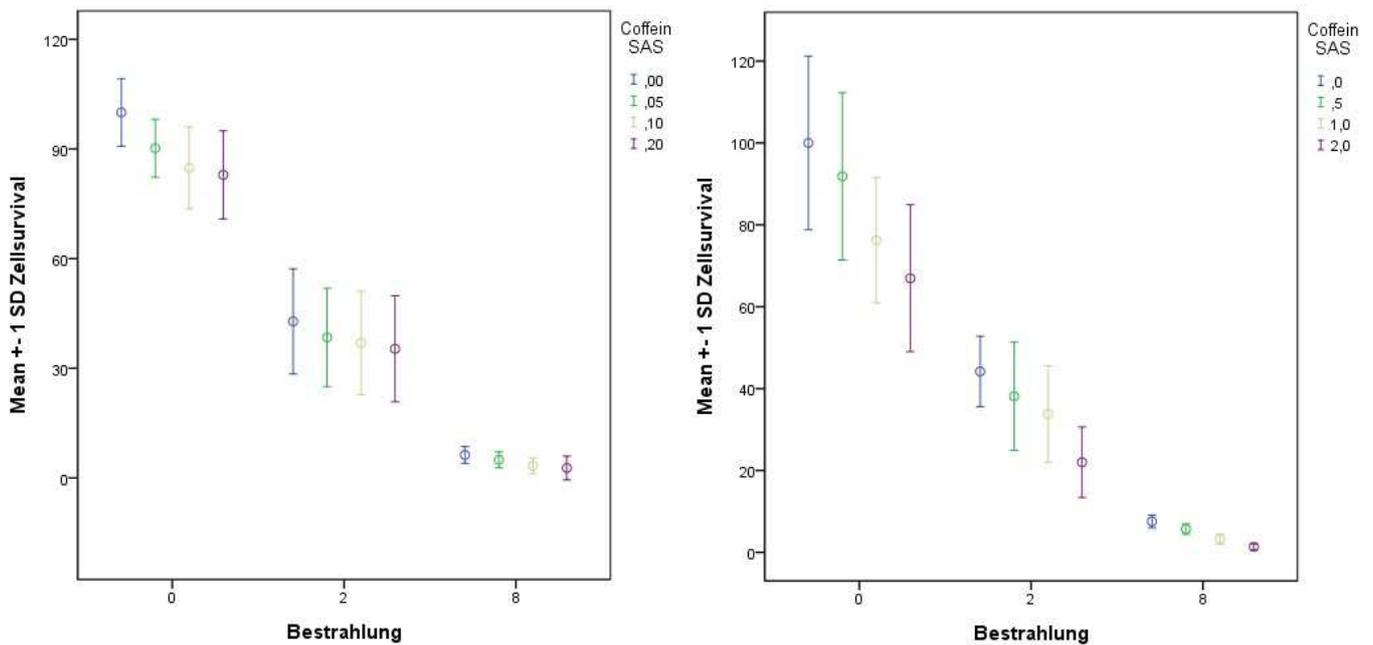


Abbildung 23: Fehlerbalken-Diagramme des mittleren Zellsurvivals der Zelllinie SAS bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) und 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)

SAS Coffeindosen zw. 0,05 und 0,2 mM

Zellsurvival

	Bestrahlung											
	0				2				8			
	Coffein				Coffein				Coffein			
	,00	,05	,10	,20	,00	,05	,10	,20	,00	,05	,10	,20
Mean	100,00	90,19	84,83	82,91	42,82	38,43	36,95	35,34	6,29	4,92	3,32	2,72
Std. Deviation	9,24	7,92	11,23	12,04	14,41	13,47	14,18	14,51	2,28	2,20	2,15	3,25

SAS Coffeindosen zw. 0,5 und 2 mM

Zellsurvival

	Bestrahlung											
	0				2				8			
	Coffein				Coffein				Coffein			
	,0	,5	1,0	2,0	,0	,5	1,0	2,0	,0	,5	1,0	2,0
Mean	100,00	91,86	76,23	66,96	44,20	38,12	33,81	21,99	7,56	5,70	3,24	1,36
Std. Deviation	21,22	20,44	15,32	17,95	8,60	13,20	11,78	8,60	1,52	1,29	1,22	0,76

Tabelle 3: Mittleres Zellsurvival und einfache Standardabweichung der Zelllinie SAS bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein

In der für Zellüberlebenskurven üblichen logarithmischen Darstellung ergaben sich folgende Diagramme:

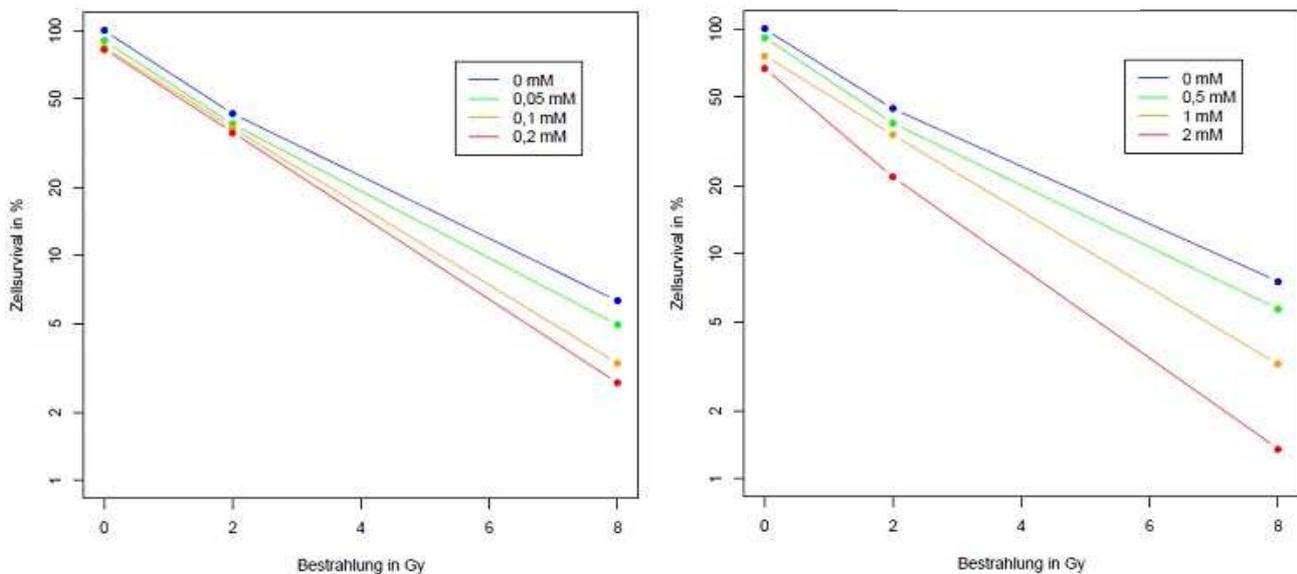


Abbildung 24: Logarithmische Darstellung des Zellsurvivals der Zelllinie SAS bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)

Hierbei lässt sich nur eine geringe Reduktion des Zellüberlebens bei Gabe von Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM erkennen. Im Vergleich zur 0 mM Kontrollgruppe (blaue Linie) lässt sich nur bei 8 Gy ein erkennbarer Unterschied vor allem bei 0,2 mM Coffein feststellen (2,72 % vs. 6,29 %), der jedoch nicht signifikant ist. Bei Coffeindosen zwischen 0 und 2 mM wurde der Effekt des Coffeins in Kombination mit Bestrahlung deutlicher: so wird im Vergleich zur blauen Kontrolllinie bei allen Coffeindosen ein stärkerer Abfall der zugehörigen Linien sichtbar, welcher wiederum am deutlichsten bei 8 Gy und 2 mM Coffein ausfällt (7,56 % vs. 1,36 %). So zeigen sich in diesem Diagramm bereits Hinweise auf eine eventuell vorhandene Strahlensensibilisierung der Zelllinie SAS bei höheren Coffeindosen.

Die Fehlerbalken für die Zelllinie XF354 stellten sich wie folgt dar (ebenfalls mit den darunter angegebenen Mittelwerten und der einfachen Standardabweichung):

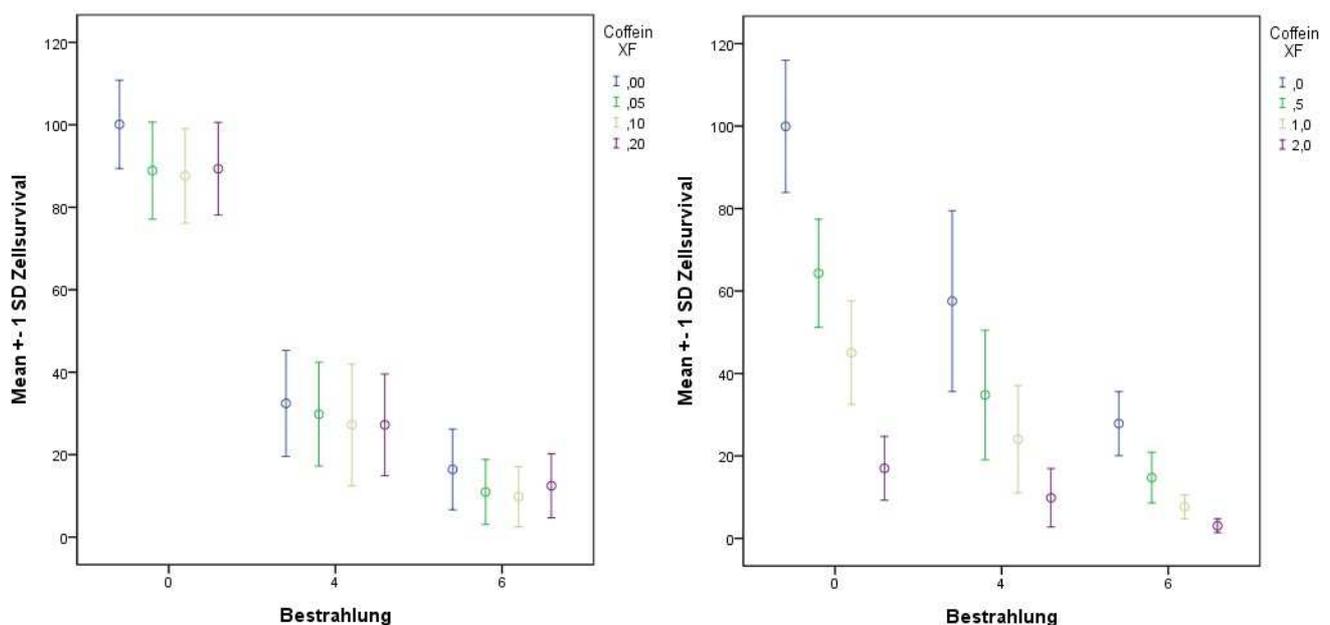


Abbildung 25: Fehlerbalken-Diagramme des mittleren Zellsurvivals der Zelllinie XF354 bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) und 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)

XF354 Coffeindosen zw. 0 und 0,2 mM

	Bestrahlung											
	0				4				6			
	Coffein				Coffein				Coffein			
	,00	,05	,10	,20	,00	,05	,10	,20	,00	,05	,10	,20
Mean	100,09	88,89	87,62	89,36	32,44	29,83	27,21	27,24	16,43	10,95	9,82	12,45
Std. Deviation	10,72	11,79	11,47	11,25	12,87	12,58	14,75	12,34	9,78	7,88	7,29	7,77

XF354 Coffeindosen zw. 0 und 2 mM

Zellsurvival

	Bestrahlung											
	0				4				6			
	Coffein				Coffein				Coffein			
	,0	,5	1,0	2,0	,0	,5	1,0	2,0	,0	,5	1,0	2,0
Mean	99,93	64,31	45,03	16,99	57,55	34,77	24,05	9,84	27,84	14,74	7,65	3,07
Std. Deviation	16,03	13,10	12,57	7,73	21,93	15,70	13,02	7,08	7,79	6,15	2,90	1,69

Tabelle 4: Mittleres Zellsurvival und einfache Standardabweichung der Zelllinie XF354 bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein

Wiederum lässt sich eine gewisse Diversität der Messwerte erkennen, die maximal im rechten Diagramm bei 4 Gy Bestrahlung und ohne Coffeineinfluss sichtbar werden (dabei liegen die Werte für das Zellüberleben zwischen 27,65 % und 81,76 %).

Im folgenden logarithmischen Diagramm stellen sich die Werte wie weiter unten sichtbar dar. Dabei fällt sowohl bei Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM sowie zwischen 0 und 2 mM ein annähernd paralleler Kurvenverlauf auf, welcher sich nicht mit einer erhöhten Sensibilisierung der Zellen durch Coffein gegenüber ionisierender Strahlung vereinbaren lässt.

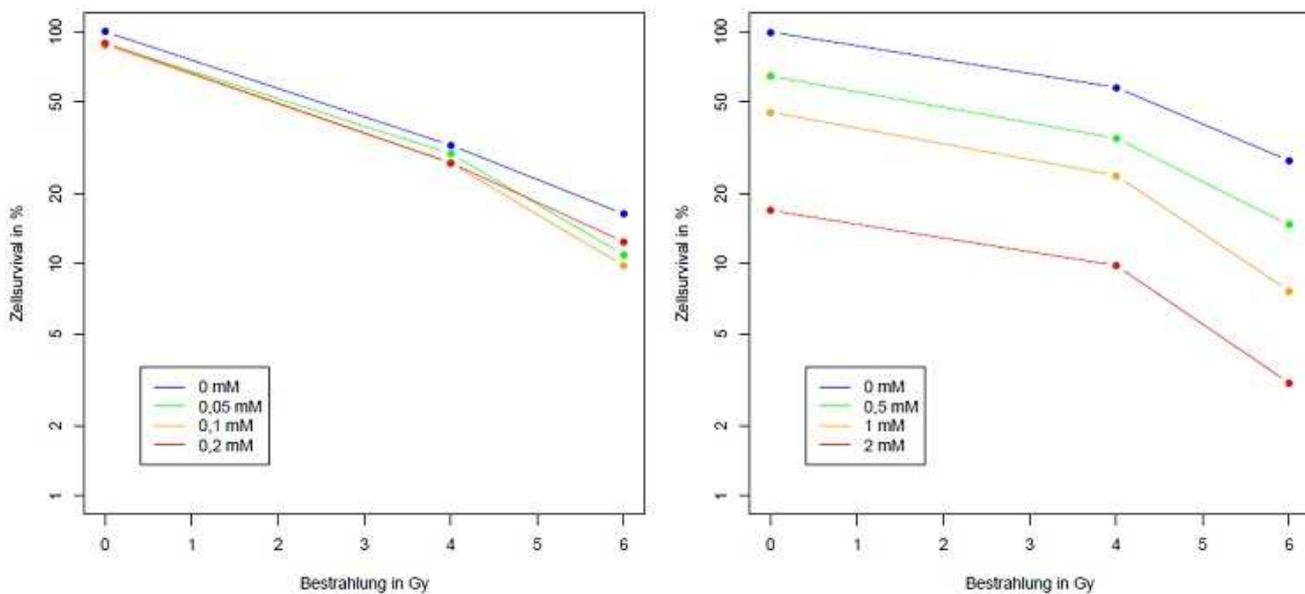


Abbildung 26: Logarithmische Darstellung des Zellsurvivals der Zelllinie XF354 bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)

4.5 3D-Modell-Analyse

Um eine definitive Aussage über eine eventuelle Strahlensensibilisierung durch die Kombination von Coffein und Bestrahlung treffen zu können, bedarf es einer weiterführenden Analyse der oben gezeigten Zellüberlebenskurven. Dazu wurden 3D-Modelle verwendet, anhand deren Kurvenverlauf sich das Verhalten der Zellen bei Gabe von Coffein und nachfolgender Bestrahlung ablesen lässt.

So wurden die Mittelwerte der beobachteten Messergebnisse zunächst in einem orthogonal gezeichneten dreidimensionalen Koordinatensystem eingetragen. Dabei wurde die x-Achse mit den jeweiligen Coffeindosen, die y-Achse mit dem Zellüberleben in Prozent und die z-Achse mit den Gy-Angaben versehen. So konnten zunächst die oben aufgeführten Liniendiagramme in eine dreidimensionale Darstellung übertragen werden. Da für das Verhalten von Zellen gegenüber ionisierender Strahlung üblicherweise ein logarithmisch abfallender Kurvenverlauf des Zellüberlebens bei Erhöhung der Bestrahlungsdosis resultiert, wurde dies in ein weiteres Diagramm integriert, um so eine Tendenz auch für die nicht ermittelten Messwerte erreichen zu können.

Für die Zelllinie SAS ergaben sich somit folgende Diagramme bei Zugabe von Coffeindosen zwischen 0,05 und 0,2 mM (obere Reihe) sowie von Coffeindosen zwischen 0,5 und 2 mM (untere Reihe):

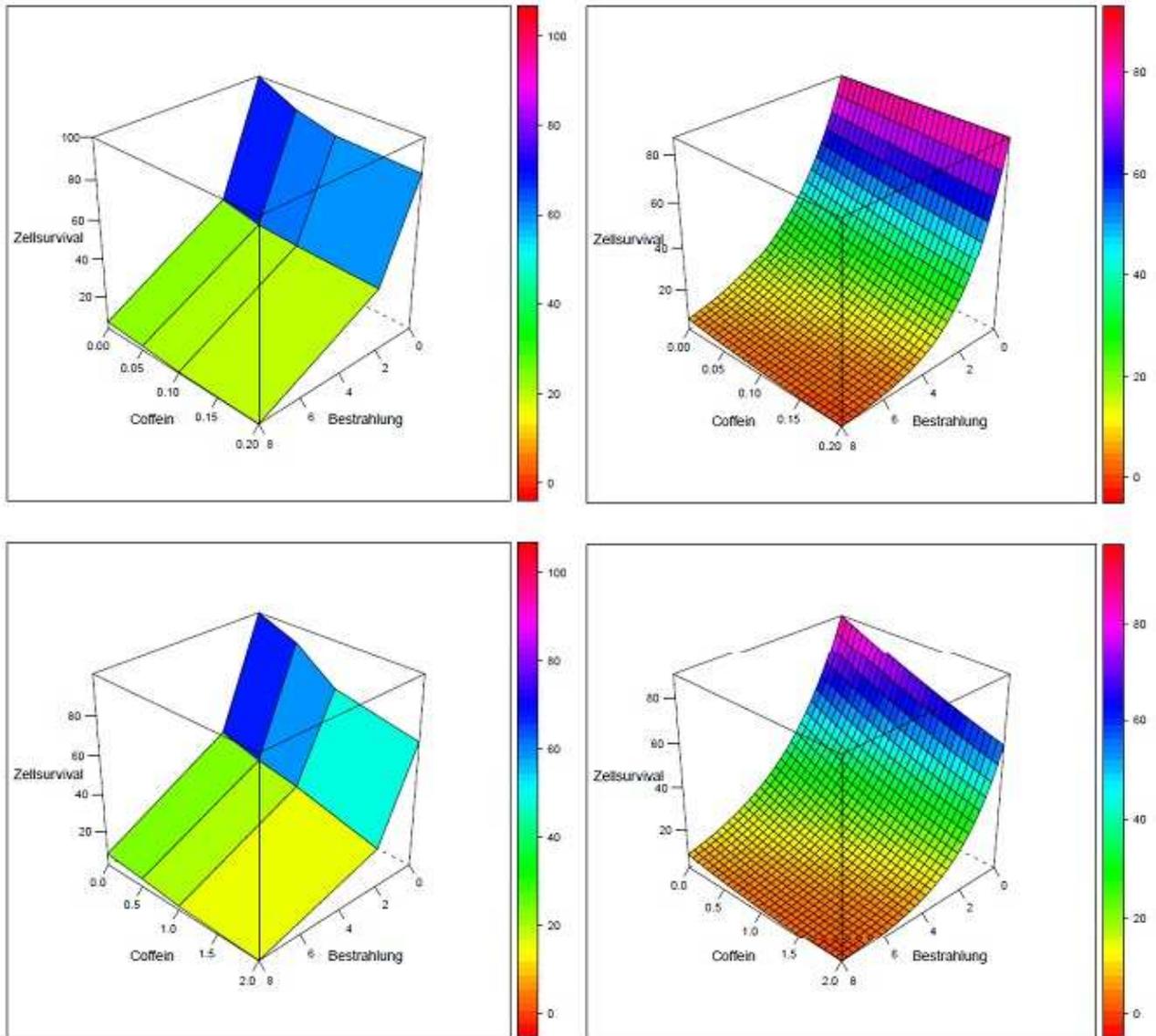


Abbildung 27: 3D-Modell-Analyse der Zelllinie SAS bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (obere Reihe) sowie von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (untere Reihe)

Hierbei lässt sich wiederum ein deutlicher Unterschied zwischen der Behandlung mit Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM und der Behandlung mit Coffeindosen zwischen 0 und 2 mM in Bezug auf die Abnahme des Zellüberlebens erkennen. Um jedoch die Strahlensensibilisierung bewerten zu können, wird ein sogenanntes Contour-Modell verwendet, dessen Grundlagen im Folgenden näher erläutert werden.

Vereinfachend lässt sich ein Beispieldiagramm folgendermaßen darstellen:

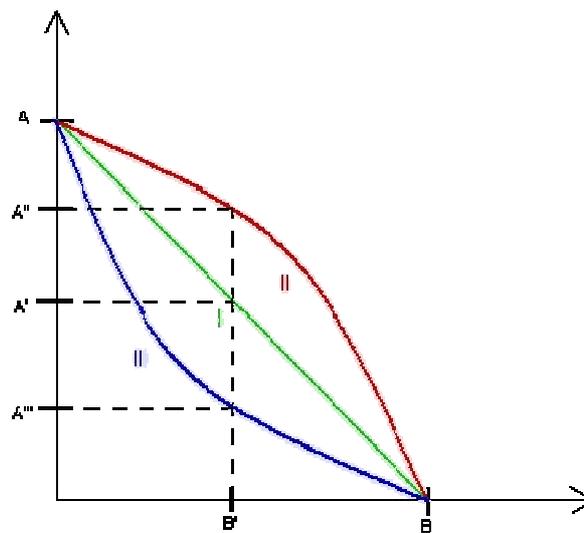


Abbildung 28: Beispieldiagramm zur Contour-Modell-Analyse

Dabei sind auf der x- bzw. y-Achse die jeweiligen Behandlungsdosen aufgetragen, die farbigen Linien geben die erzielten Survival Fractions wieder (im Folgenden wird dafür eine Survival Fraction von 50 % angenommen). Die grüne Linie (I) verdeutlicht einen rein additiven Effekt der beiden Therapien (im vorliegenden Fall Bestrahlung und Coffeingabe); so kann eine Zellüberlebensrate von 50 % entweder durch eine bestimmte Dosis an Coffein (A) oder eine bestimmte Graydosis (B) erzielt werden. Diese Survival Fraction ergibt sich jedoch auch durch die Kombination der beiden Therapien ($A' + B'$, wobei beispielsweise $B' = 0,5 \times B$ und $A' = 0,5 \times A$).

Verhalten sich die beiden verabreichten Therapien subadditiv zueinander, folgt die Zellüberlebensrate dem Verlauf der roten Linie (II). Um eine Survival Fraction von 50 % zu erreichen, muss dabei bei gleicher Bestrahlungsdosis B' eine höhere Coffeindosis verwendet werden (A''); somit haben die beiden Behandlungen in Kombination einen geringeren Effekt als deren alleinige Wirkung.

Ein supraadditiver bzw. strahlensensibilisierender Effekt wird hingegen vermutet, wenn sich ein der blauen Linie ähnlicher Kurvenverlauf (III) darstellt. Dies würde bedeuten, dass im Vergleich zu subadditiven bzw. additiven Behandlungen bei gleichen Coffeindosen eine geringere Bestrahlungsdosis verwendet werden kann, um das selbe Cell Survival zu erzielen. Umgekehrt lässt sich auch aus diesem Diagramm ableiten, dass bei gleicher Bestrahlungsdosis B' eine niedrigere Gabe von Coffein (A''') vonnöten wäre, um eine 50%ige Überlebensrate zu gewährleisten.

Das Contour-Modell für die Zelllinie SAS stellte sich nun folgendermaßen dar:

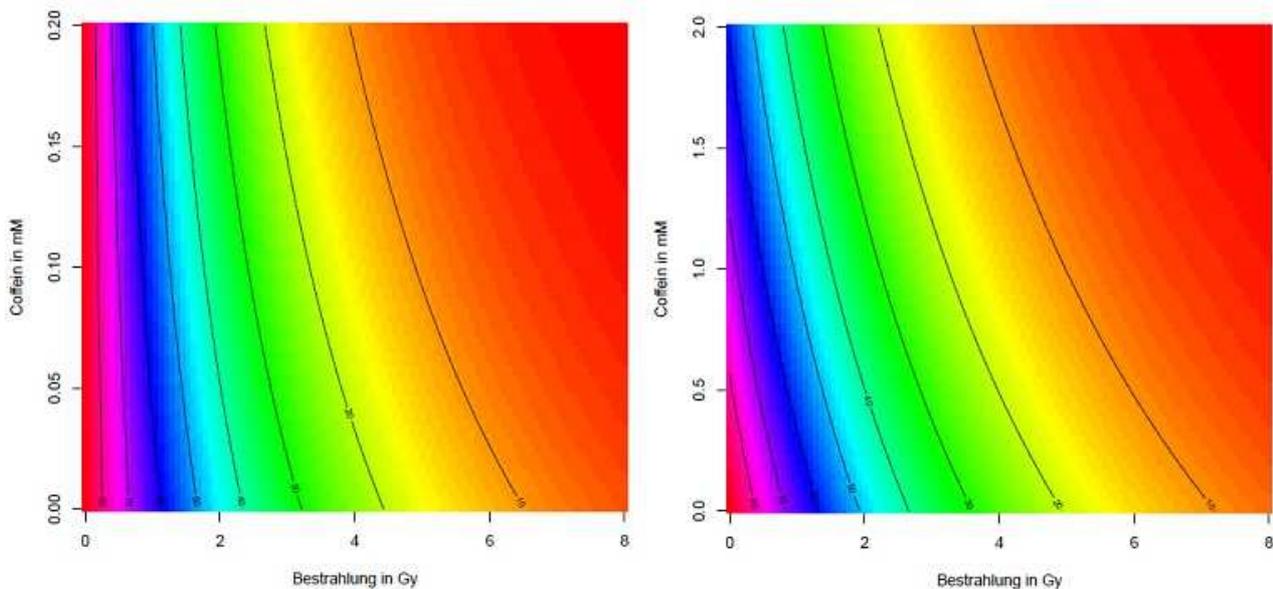


Abbildung 29: Contour-Modell der Zelllinie SAS bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)

Dabei lässt sich im linken Diagramm bei Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM erkennen, dass die Kurven annähernd senkrecht (vor allem bei der Verwendung im unteren Bestrahlungsbereich) sind - somit hat Coffein in dieser Dosierung so gut wie keinen Einfluss auf das Zellüberleben und wirkt nur schwach additiv. So ergeben sich beispielsweise bei 2 Gy Bestrahlung bei allen verwendeten Coffeindosen (zwischen 0 und 0,2 mM) annähernd gleiche Ergebnisse. Lediglich im Bereich hoher Bestrahlungsdosen kann ein gewisser logarithmischer Kurvenverlauf beobachtet werden, der für einen stärkeren Einfluss des Coffeins spricht.

Im rechten Diagramm wird bei Coffeindosen zwischen 0 und 2 mM bereits im unteren Bestrahlungsdosisbereich ein abfallender Kurvenverlauf deutlich. Als Beispiel dient wieder die Bestrahlung bei 2 Gy: während ein Zellüberleben von 50 % sowohl durch die alleinige Gabe von 2 Gy erreicht werden kann (im Diagramm schneidet die "50%-Kurve" hier die x-Achse), ist dies auch durch die Kombination von 1,5 mM Coffein und ungefähr 1,2 Gy oder die Kombination von 2 mM Coffein und ungefähr 0,5 Gy zu erzielen. Hierbei lässt sich unter Betrachtung des logarithmisch angelegten Kurvenverlaufs der Verdacht auf eine potentiell strahlensensibilisierende Wirkung des Coffeins äußern.

Für die Zelllinie XF354 ließen sich folgende dreidimensionalen Diagramme ermitteln, die wie bereits des Öfteren beschrieben den unterschiedlich starken Einfluss des

Coffeins in Dosierung zwischen 0 und 0,2 mM (obere Reihe) sowie zwischen 0 und 2 mM (untere Reihe) verdeutlichen:

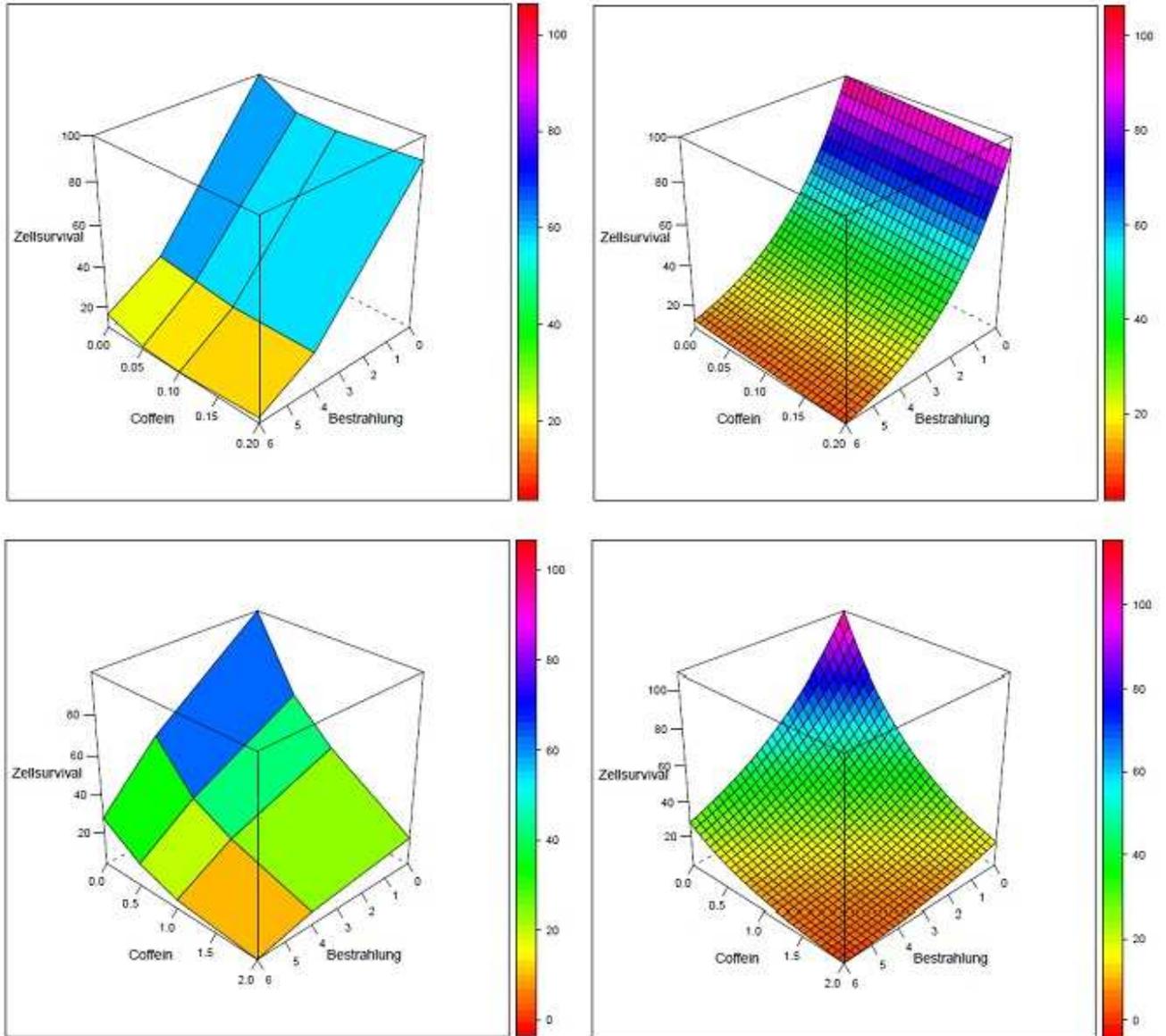


Abbildung 30: 3D-Modell-Analyse der Zelllinie XF354 bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (obere Reihe) sowie von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (untere Reihe)

In der Darstellung als Contour-Modell wurden folgende Kurvenverläufe deutlich:

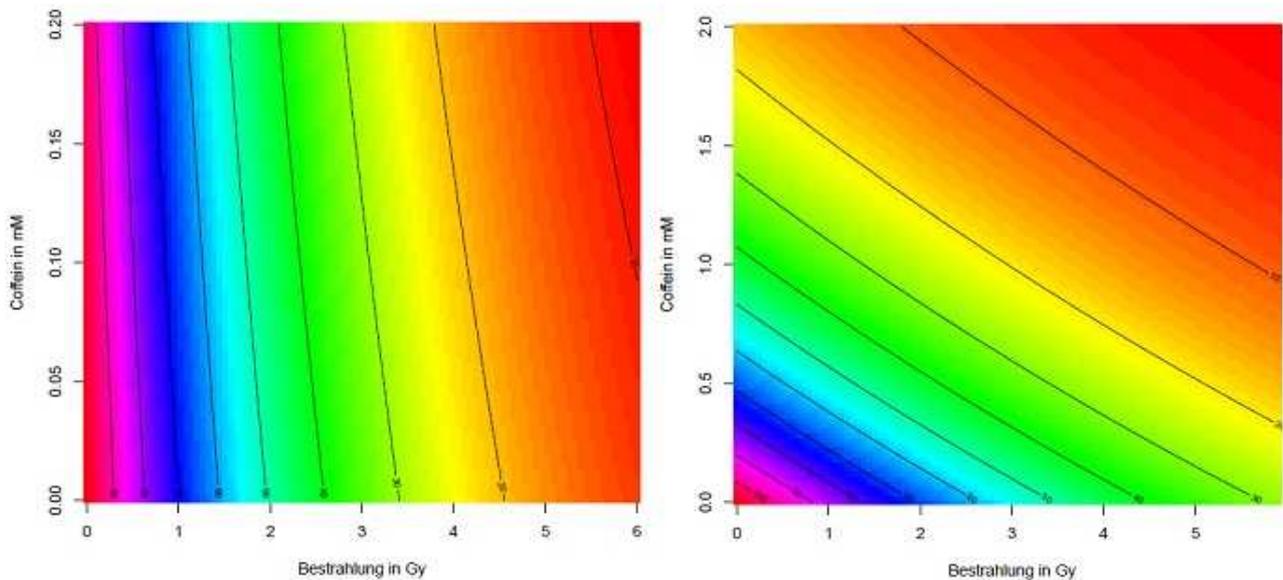


Abbildung 31: Contour-Modell der Zelllinie XF354 bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)

Hier ist im linken Diagramm bei Coffeindosen zwischen 0 und 0,2 mM ähnlich wie bei der Zelllinie XF354 ein annähernd vertikaler, steiler Kurvenverlauf zu beobachten. Somit fällt auch hier der Einfluss dieser Coffeindosen kaum ins Gewicht. Bei den Coffeindosen zwischen 0 und 2 mM im rechten Diagramm verhält es sich anders: Hier fällt zunächst auf, dass das Coffein einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Survival Fraction der Zelllinie XF354 hat, als dies bei der Zelllinie SAS der Fall ist. So ist beispielsweise entweder eine Bestrahlungsdosis von 2 Gy oder eine Coffeindosis von ca. 0,5 mM nötig, um den gleichen Effekt zu erzielen; bei der Zelllinie SAS wäre dafür eine Coffeindosis von > 2 mM vonnöten. Somit erscheint die Zelllinie XF354 deutlich sensitiver gegenüber diesem Xanthinderivat. Auch lässt sich am annähernd geraden Kurvenverlauf ein rein additiver Effekt der beiden Behandlungsmethoden erkennen.

5 Diskussion

In den letzten Jahren wurde intensiv Forschung auf dem Gebiet der potentiell strahlensensibilisierenden Medikamente betrieben, um dadurch eine Verringerung der Bestrahlungsdosis und somit der schädlichen Nebenwirkungen erreichen zu können. Coffein hat bekanntermaßen eine strahlensensibilisierende Wirkung und dessen Auswirkungen auf den Organismus sind hinreichend bekannt. Allerdings unterscheiden sich die strahlensensibilisierenden Effekte drastisch in den unterschiedlichen Zelltypen.

Bislang sind drei Mechanismen bekannt, wie Coffein die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber ionisierenden Strahlen beeinflussen kann. Dazu gehört zunächst die Behinderung der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) durch die Hemmung der beiden für diese Abläufe essentiellen Proteine XRCC2/3 und ATR. Außerdem ließ sich eine direkte Anlagerung des Coffeins an die geschädigte DNA-Stelle nachweisen, wodurch die Reparatur noch zusätzlich behindert wird (Asaad et al. 2000; Wang et al. 1999; Wang et al. 2003b). Auf Ebene des Zellzyklus bewirkt Coffein hauptsächlich eine Verkürzung des G2-Arrests, was aufgrund eines zu raschen Wiedereintritts in den Zyklus zu einer fehlerhaften Reparatur der DNA-Strangbrüche führt (Asaad et al. 2000; Moser et al. 2000). Coffein hemmt hierbei das Protein ATM, welches sowohl für den Abbau des Protein cdc25 als auch für die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 zuständig ist. Unter dem Einfluss von Coffein entgeht cdc25 seiner Sequestrierung im Zytoplasma und kann somit die beiden G2-Checkpoint-Bestandteile Cyclin B und CDK1 in ihre aktive Form überführen, wodurch der Zellzyklus trotz DNA-Schäden weiterläuft. Aufgrund der Inhibition des Tumorsuppressorproteins p53 kann das Protein p21 nicht aktiviert werden, was ebenfalls eine zeitlich verminderte G2-Phasen-Arretierung nach sich zieht (Asaad et al. 2000; Bode, Dong 2007; Kastan et al. 1991; Moser et al. 2000; Zampetti-Bosseler, Scott 1985). Es ließen sich auch Auswirkungen von Coffein auf andere Zellzyklusphasen nachweisen, die jedoch eine untergeordnete Rolle spielen. Es wurden Effekte auf die S-Phase (Bode, Dong 2007; Griffiths et al. 1978; Kaufmann et al. 2003; Walters et al. 1974; Wang et al. 1999;), den G1-Arrest (Bode, Dong 2007; Busse et al. 1978; Kastan et al. 1991; Kaufmann et al. 2003; Valenzuela et al. 2000; Walters et al. 1974) und den G0/G1-Phasen-Arrest (Bode, Dong 2007; Hashimoto et al. 2004) beschrieben.

Die exakte Funktion, die Coffein auf den Prozess der Apoptose besitzt, ist bislang nicht geklärt. So wird ein p53-abhängiger Signalweg diskutiert (Bode, Dong 2007; He et al. 2003), welcher über eine vermehrte Aktivität des Tumorsuppressorgens p53 zu einer vermehrten Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Caspase 3 führt. Allerdings konnte auch in p53-defizienten Zellen eine vermehrte Apoptose unter dem Einfluss von Coffein nachgewiesen werden (Bode, Dong 2007; Higuchi et al. 2000).

Im Vergleich der verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten ließ sich jedoch eine hohe Abhängigkeit der Ergebnisse von der verwendeten Zelllinie, den angewandten Coffeindosen und dem allgemeinen Versuchsaufbau erkennen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Effekt der Kombination von Coffein und Bestrahlung auf das Überleben zweier HNO-Tumorzelllinien (SAS und XF354) mit unterschiedlicher initialer Strahlenresistenz untersucht. Dabei wurden Coffein sowohl in einer Dosierung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 als auch in einer Dosierung von 0, 0,5, 1 und 2 mM verwendet, die Zelllinie XF354 wurde anschließend mit 0, 4 und 6 Gy, die Zelllinie SAS mit 0, 2 und 8 Gy bestrahlt. Untersucht wurde anschließend das Zellüberleben mittels elektronischer Auswertung des Colony Forming Assays am Bioreader der Firma Bio-Sys GmbH. Anhand eines 3D-Diagramms konnten schließlich Aussagen bezüglich einer potentiellen Strahlensensibilisierung getroffen werden.

Zunächst wurde getrennt der Einfluss von Coffein und Bestrahlung auf die jeweiligen Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass Coffein in einer Dosierung zw. 0 und 0,2 mM bei XF354 (p-Wert = 0,1376) einen nicht signifikanten, bei SAS (p-Wert = 0,0068) jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl hatte. Wurde die Coffeindosis um das zehnfache erhöht (zw. 0 und 2 mM), hatte dies einen deutlichen Abfall der Zellzahl zur Folge, der auch schon makroskopisch erkennbar war (p-Wert = 0,0194 für XF354 und p-Wert < 0,0001 für SAS). In Bezug auf die Bestrahlung ließen sich jeweils signifikante Auswirkungen auf das Zellüberleben sowohl bei 2 und 8 Gy (p-Wert < 0,0001 für SAS) als auch bei 4 und 6 Gy (p-Wert < 0,0001 für XF354) feststellen.

Für die Beurteilung der Strahlensensibilisierung von Coffein in Kombination mit Bestrahlung wurde ein 3D-Diagramm verwendet, das anhand des Kurvenverlaufs für das jeweilige Zellüberleben Aufschluss über supra-, sub- oder rein additive Effekte der beiden Variablen zulässt. Dabei ließ sich in beiden Zelllinien bei Coffeindosen

zwischen 0 und 0,2 mM kein Anhalt für einen möglichen supraadditiven bzw. strahlensensibilisierenden Effekt finden. Dieses Ergebnis wurde bereits erwartet, da diese geringen Coffeindosen auch ohne Bestrahlung bereits keine signifikanten Effekte auf das Zellüberleben aufwiesen. Bei Verwendung höherer Coffeindosen (zw. 0 und 2 mM) wurde ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien deutlich. Nur bei der Zelllinie SAS konnte ein strahlensensibilisierender Effekt in der Kombinationstherapie bestehend aus Coffein und Bestrahlung festgestellt werden.

Bezüglich der Abhängigkeit der Effekte vom Zellzyklus muss einschränkend festgestellt werden, dass in den vorliegenden Versuchen keine Synchronisierung der Zellzyklen vorgenommen wurde, da dies mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht vereinbar war. Da einer der Haupteffekte des Coffeins in der Verkürzung des G2-Arrests und damit einer erniedrigten Reparaturkapazität für DNA-Doppelstrangbrüche liegt, wäre es vorstellbar, über eine Synchronisierung der Zellen eine verbesserte Wirkung des Coffeins zu erzeugen. Ein erhöhter zelltoxischer Einfluss des Coffeins durch diese Maßnahme wurde von Walters et al. 1972 in Hamster-Ovarialzellen, von Busse et. al 1978 in HeLa-Zellen sowie von Wang et al. 1999 und Moser et al. 2000 in Spaltheife-Zellen beschrieben.

Des Weiteren können als Kritikpunkt die für die jeweiligen Bestrahlungsdosen unterschiedlichen Zellzahlen angemerkt werden, wodurch eine Vereinheitlichung bzw. eine direkte Vergleichbarkeit nicht möglich ist. So wurden für die Zelllinie SAS 500 (0Gy), 1000 (2 Gy) und 4000 (8 Gy) Zellen zu Beginn ausgesät, für die Zelllinie XF354 5000 (0 Gy), 10000 (4Gy) und 10000 (6 Gy) Zellen. Es konnte jedoch keine einheitliche Zellzahl für die beide Zelllinien und für die jeweiligen Bestrahlungsdosen verwendet werden, da dies eine vollständigen Auslöschung der Zellen bei hohen Coffein-/Bestrahlungsdosen bedingt oder zu einem konfluenten Zellwachstum bei geringen Coffein-/Bestrahlungsdosen geführt hätte. Auch wurden für XF354-Zellen andere Bestrahlungsdosen verwendet als für SAS-Zellen. Dies ist begründet in einem unterschiedlichen Anwachsverhalten der ausgesäten Zellen. Nach einer einwöchigen Inkubationszeit nach Coffeinzugabe und Bestrahlung konnten nur unter den angegebenen Bestrahlungsdosen eine optimale Auszählung vorgenommen werden, die dann zu auswertbaren Ergebnissen führte.

Die Diversität der Messergebnisse ist zwar für biologische Systeme erwartet, erschwert aber die Durchführung der Versuche. Sehr starke Streuungen ergaben sich v. a. bei 0,5 mM Coffein und 0 Gy bei der Zelllinie SAS. Trotz spezieller Vorsicht

bei der exakt gleichen Ausführung der Versuche, einer ausgiebigen Vorversuchsreihe und mehrmaliger Wiederholung ließ sich dieses biologische Phänomen nicht vollständig ausschalten. Der Grund für das unterschiedliche Anwachsverhalten der beiden Zelllinien SAS und XF354 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Mögliche Einflussfaktoren sind zahlreich, darunter auch die Anzahl der vorangegangenen Zell-Passagen, die den Alterungsprozess der Zellen widerspiegelt.

Abschließend muss auch noch kritisch ein Blick auf die verwendeten Coffeindosen geworfen werden. Zwar ließ sich bei hohen Coffeindosen bereits ohne den Einfluss von Bestrahlung eine deutliche Abnahme der Zellzahl verzeichnen - diese Dosen könnten aber im Patienten aufgrund ihrer hohen Toxizität nicht verwendet werden. So enthält eine Tasse Kaffee ca. 80-100 mg Coffein; bei einem Konsum von 1-2 Tassen ergibt sich bei einer 70 kg schweren Person eine Plasmakonzentration von nur ca. 2 mg/l, was einer Molarität von 10 $\mu\text{mol/l}$ entspricht. Intoxikationen sind ab ca. 100 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten, die mittlere letale Dosis LD50 liegt bei 10 g bzw. 1 mmol/l (ca. 100 Tassen Kaffee) (Forth W. 2001; Julien 2001). In der vorgestellten Doktorarbeit wurden jedoch Coffeinkonzentrationen von bis zu 2 mmol/l verwendet. Diese Konzentrationen führen beim Menschen sicherlich zu einem letalen Ausgang.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren ließ sich in Bezug auf die altersstandardisierte Mortalitätsrate der Plattenepithelkarzinome im Hals-Kopf-Bereich ein drastischer Anstieg verzeichnen, weshalb die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten (neben der chirurgischen Resektion und der Chemo- bzw. Strahlentherapie) mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt ist. Dabei wurde vor allem der Einsatz potentiell strahlensensibilisierender Medikamente erwogen, die die schädlichen Auswirkungen der Bestrahlung auf gesunde Zellen deutlich reduzieren könnten.

In unterschiedlichsten Studien wurde deshalb bereits unter verschiedenen Versuchsbedingungen der Einfluss von Coffein in Kombination mit Bestrahlung auf die Strahlensensibilität humaner Zellen in vitro untersucht - diese lieferten je nach Versuchsaufbau und verwendeter Zelllinie die unterschiedlichsten Ergebnisse. Deshalb ist eine Verallgemeinerung der Wirkung von Coffein nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte bei den untersuchten HNO-Tumorzelllinie XF354 und SAS nur bei SAS und Coffeindosen zwischen 0 und 2 mM (mit nachgehender Bestrahlung) ein potentiell strahlensensibilisierender Effekt nachgewiesen werden.

In der Zusammenschau der bisher durchgeführten Studien lässt sich jedoch allgemein feststellen, dass sich die angewandten Coffeindosen kaum für einen Einsatz im Patienten eignen, da die toxische bzw. letale Wirkung des reinen Coffeins für den menschlichen Organismus zu stark wäre. So wurde in den letzten Jahren vermehrt Forschung an alternativen Applikationsformen des Coffeins betrieben, unter anderem auch von Jeong et al 2009. Diese verwendeten temperatur-sensitives liposomales 1-Methylxanthin (tsl-MTX) in Kombination mit ionisierender Strahlung in vivo. Zunächst wurden den Versuchsmäuse Zellen der beiden Tumorzelllinien A549 und RKO (humanes Lungenkarzinom bzw. colorektales Karzinom) implantiert. Da 1-MTX allein eine tödliche Auswirkung auf die Tiere nach sich zog, wurde 1-MTX in ca. 200 nm große Liposomen verpackt und anschließend intraperitoneal verabreicht. Bei einem Anstieg der Temperatur (der sehr spezifisch nur an gewissen Körperstellen der Maus ausgelöst werden konnte) konnte das 1-MTX gezielt freigesetzt und anschließend die Bestrahlung vorgenommen werden. Dabei ließ sich eine deutliche Verminderung des Tumorwachstums und somit eine Strahlensensibilisierung durch Verwendung von temperatur-sensitivem liposomalem 1-Methylxanthin festgestellt

werden (Jeong et al. 2009). Diese Ergebnisse klingen vielversprechend und lassen auf eine baldige klinische Anwendung des Coffeins und seiner Derivate hoffen.

7 Literaturverzeichnis

Ahnström, G.; Nygren, J.; Eriksson, S. (2000): The effect of dimethyl sulphoxide on the induction and repair of double-strand breaks in human cells after irradiation with gamma-rays and accelerated ions: rapid or slow repair may depend on accessibility of breaks in chromatin of different compactness. In: *International journal of radiation biology*, Jg. 76, H. 4, S. 533–538.

Allen, R. T.; Hunter, W. J.; Agrawal, D. K. (1997): Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods*, Jg. 37, H. 4, S. 215–228.

Allison R.R., Cuenca R. E. Downie G. H. Camnitz P. Brodish B. Sibata C. H. (2005): Clinical photodynamic therapy of head and neck next term cancers—A review of applications and outcomes. In: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Jg. 2, H. 3, S. 205–222.

Argiris, Athanassios; Karamouzis, Michalis V.; Raben, David; Ferris, Robert L. (2008): Head and neck cancer. In: *Lancet*, Jg. 371, H. 9625, S. 1695–1709.

Asaad, N. A.; Zeng, Z. C.; Guan, J.; Thacker, J.; Iliakis, G. (2000): Homologous recombination as a potential target for caffeine radiosensitization in mammalian cells: reduced caffeine radiosensitization in XRCC2 and XRCC3 mutants. In: *Oncogene*, Jg. 19, H. 50, S. 5788–5800.

Bamberg M., Molls M., Sack H. (Hg.) (2009): *Radioonkologie. Grundlagen und Klinik*. 2. Auflage. Germering bei München: Zuckschwerdt Verlag.

Bates, S.; Vousden, K. H. (1996): p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. In: *Current opinion in genetics & development*, Jg. 6, H. 1, S. 12–18.

Baumann M, Zips D. Molls M. (2009): Die "4Rs" der Strahlentherapie und Prädiktion der Strahlenreaktion von Tumoren. In: Bamberg M, Molls M. Sack H. (Hg.): *Radioonkologie. Grundlagen und Klinik*. 2. Auflage. Germering bei München: Zuckschwerdt Verlag, S. 268–279.

Baumann M., Krause M. (2009): Linear-quadratisches Modell und Fraktionierung. In: Bamberg M, Molls M. Sack H. (Hg.): *Radioonkologie. Grundlagen und Klinik*. 2. Auflage. Germering bei München: Zuckschwerdt Verlag, S. 251–267.

Belka C., Abend M. Budach W. (2009): Mechanismen und Formen des Zelltods. In: Bamberg M, Molls M. Sack H. (Hg.): *Radioonkologie. Grundlagen und Klinik*. 2. Auflage. Germering bei München: Zuckschwerdt Verlag, S. 237–250.

Bode, Ann M.; Dong, Zigang (2007): The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. In: *Cancer letters*, Jg. 247, H. 1, S. 26–39.

Bryant, P. E.; Blöcher, D. (1980): Measurement of the kinetics of DNA double strand break repair in Ehrlich ascites tumour cells using the unwinding method. In: *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, Jg. 38, H. 3, S. 335–347.

Burhans, William C.; Heintz, Nicholas H. (2009): The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. In: *Free radical biology & medicine*, Jg. 47, H. 9, S. 1282–1293.

Busse, P. M.; Bose, S. K.; Jones, R. W.; Tolmach, L. J. (1978): The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. In: Radiation research, Jg. 76, H. 2, S. 292–307.

Chou, T. M.; Benowitz, N. L. (1994): Caffeine and coffee: effects on health and cardiovascular disease. In: Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology, Jg. 109, H. 2, S. 173–189.

Copper, M. P.; Triesscheijn, M.; Tan, I. B.; Ruevekamp, M. C.; Stewart, F. A. (2007): Photodynamic therapy in the treatment of multiple primary tumours in the head and neck, located to the oral cavity and oropharynx. In: Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery, Jg. 32, H. 3, S. 185–189.

Cornelius C P, Andratschke M. Leunig A. Hilscher C. (2009): Neck Dissection. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 52–60.

Cortez, David (2003): Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. In: The Journal of biological chemistry, Jg. 278, H. 39, S. 37139–37145.

Dellian M (2009a): Laserchirurgie. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 49–51.

Dellian M, Schaffer M. (2009b): Zusätzliche Therapieverfahren: Interstitielle Thermotherapie, Photodynamische Therapie (PDT), PDT kombiniert mit Strahlentherapie, antivaskuläre Therapie. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 88–91.

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung für Epidemiologie von Krebserkrankungen, Niklolaus Becker, Sabine Holzmeier

Endicott, J. A.; Noble, M. E. (1998): Structural principles in cell-cycle control: beyond the CDKs. In: Structure (London, England : 1993), Jg. 6, H. 5, S. 535–541.

Forth W., Adam O. (2001): Coffein: Umgang mit einem Genussmittel, das auch pharmakologische Wirkungen entfalten kann. In: Dt. Ärztebl, Jg. 98, H. 43, S. 2816–2818.

Goodlett, C.R., and Horn, K.H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research & Health* 25(3):175–184, 2001

Gressner, O. (2006): Das p53-Familienmitglied TAp63 α induziert Apoptose durch die Aktivierung todesrezeptor- und mitochondrienabhängiger Signalwege. Med. Dissertation. Heidelberg. Universität Heidelberg.

Griffiths, T. D.; Carpenter, J. G.; Dahle, D. B. (1978): DNA synthesis and cell survival after X-irradiation of mammalian cells treated with caffeine or adenine. In: International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine, Jg. 33, H. 5, S. 493–505.

Hashimoto, Takashi; He, Zhiwei; Ma, Wei-Ya; Schmid, Patricia C.; Bode, Ann M.; Yang, Chung S.; Dong, Zigang (2004): Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. In: *Cancer research*, Jg. 64, H. 9, S. 3344–3349.

He, Zhiwei; Ma, Wei-Ya; Hashimoto, Takashi; Bode, Ann M.; Yang, Chung S.; Dong, Zigang (2003): Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. In: *Cancer research*, Jg. 63, H. 15, S. 4396–4401.

Health Science Research Resources Bank: Cell Detail Data - JRCB0260/ Cell Name SAS. Herausgegeben von Japan Health Sciences Foundation.

Herrmann, Thomas; Baumann, Michael; Dörr, Wolfgang (2006): *Klinische Strahlenbiologie. Kurz und bündig. 4., völlig überarb. Aufl.* München: Elsevier Urban & Fischer.

Higuchi, K.; Mitsunashi, N.; Saitoh, J.; Maebayashi, K.; Sakurai, H.; Akimoto, T.; Niibe, H. (2000): Caffeine enhanced radiosensitivity of rat tumor cells with a mutant-type p53 by inducing apoptosis in a p53-independent manner. In: *Cancer letters*, Jg. 152, H. 2, S. 157–162.

Höfer, I.; Bättig, K. (1994): Cardiovascular, behavioral, and subjective effects of caffeine under field conditions. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Jg. 48, H. 4, S. 899–908.

Ihrler S, Weiler C. (2009): Tumorentitäten und pathohistologische Grundlagen. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): *Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl.* München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 1–3.

Iliakis, George (2009): Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Jg. 92, H. 3, S. 310–315

Iliakis G., Dahm-Daphi J. Tamulevicius P. (2009): DNA-Reparatur, Zellzyklus und Checkpoint-Aktivierung. In: Bamberg M, Molls M. Sack H. (Hg.): *Radioonkologie. Grundlagen und Klinik. 2. Auflage.* Germering bei München: Zuckschwerdt Verlag, S. 207–222.

Jayat, C.; Ratinaud, M. H. (1993): Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. In: *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, Jg. 78, H. 1-2, S. 15–25.

Jeggo, P.; Singleton, B.; Beamish, H.; Priestley, A. (1999): Double strand break rejoining by the Ku-dependent mechanism of non-homologous end-joining. In: *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, Jg. 322, H. 2-3, S. 109–112.

Jeong, Seong-Yun; Yi, So Lyung; Lim, Sun-Kyung; Park, Sung-Jin; Jung, Joohee; Woo, Ha Na et al. (2009): Enhancement of radiotherapeutic effectiveness by temperature-sensitive liposomal 1-methylxanthine. In: *International journal of pharmaceutics*, Jg. 372, H. 1-2, S. 132–139.

Jörn Schulze (2007): *Strahlensensitivität und Strahlensensibilisierbarkeit nach der Einwirkung ionisierender Strahlen und Coffein auf Bronchialkarzinomzellen.* Berlin. Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin, Institut für Strahlenbiologie in der Klinik für Strahlentherapie.

- Julien, Robert M. (2001): A primer of drug action. A concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs. Rev. and updated. New York: W. H. Freeman and Co.
- Kastan, M. B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R. W. (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. In: *Cancer research*, Jg. 51, H. 23 Pt 1, S. 6304–6311.
- Kauffmann, Günter W.; Moser, Ernst; Sauer, Rolf, et al. (Hg.) (2001): *Radiologie. Mit 67 Tabellen ... Fragen und Antworten, [Bilder]. 2., erw. Aufl.* München: Urban & Fischer.
- Kaufmann, William K.; Heffernan, Timothy P.; Beaulieu, Lea M.; Doherty, Sharon; Frank, Alexandra R.; Zhou, Yingchun et al. (2003): Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. In: *Mutation research*, Jg. 532, H. 1-2, S. 85–102.
- Kellerer AM, Rossi H. H. (1972): The theory of dual radiation action. In: *Curr Top Radiat Res*, Jg. 8, S. 85–158.
- Kiechle, Frederick L.; Zhang, Xinbo (2002): Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, Jg. 326, H. 1-2, S. 27–45.
- Krempler, Andrea; Deckbar, Dorothee; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2007): An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, Jg. 6, H. 14, S. 1682–1686.
- Lajer, Christel Braemer; Specht, Lena K.; Kirkegaard, Jørgen; Homøe, Preben (2006): [Photodynamic therapy for head and neck cancer]. In: *Ugeskrift for læger*, Jg. 168, H. 23, S. 2227–2231.
- Lavin, M. F.; Khanna, K. K. (1999): ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. In: *International journal of radiation biology*, Jg. 75, H. 10, S. 1201–1214.
- Lohr, Frank; Wenz, Frederik; Herfarth, Klaus; Lohr-Wenz (2003): *Strahlentherapie kompakt. 1. Aufl.* München: Urban & Fischer.
- Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.) (2009): *Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl.* München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität).
- Meyn, Raymond E.; Milas, Luka; Ang, K. Kian (2009): The role of apoptosis in radiation oncology. In: *International journal of radiation biology*, Jg. 85, H. 2, S. 107–115.
- Milas, L.; Stephens, L. C.; Meyn, R. E. (1994): Relation of apoptosis to cancer therapy. In: *In vivo (Athens, Greece)*, Jg. 8, H. 5, S. 665–673.
- Mladenov, Emil; Iliakis, George (2011): Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. In: *Mutation research*, Jg. 711, H. 1-2, S. 61–72.
- Moser, B. A.; Brondello, J. M.; Baber-Furnari, B.; Russell, P. (2000): Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 20, H. 12, S. 4288–4294

Morgan W. F., Sowa M. B. (2005): Effects of radiation in nonirradiated cells. In: PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 102, H. 40, 14127-14128

Nag, S.; Cano, E. R.; Demanes, D. J.; Puthawala, A. A.; Vikram, B. (2001): The American Brachytherapy Society recommendations for high-dose-rate brachytherapy for head-and-neck carcinoma. In: International journal of radiation oncology, biology, physics, Jg. 50, H. 5, S. 1190–1198.

Nehlig, A.; Daval, J. L.; Debry, G. (1992): Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. In: Brain research. Brain research reviews, Jg. 17, H. 2, S. 139–170.

Nyst, Heike J.; Tan, I. Bing; Stewart, Fiona A.; Balm, Alfons J. M. (2009): Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? In: Photodiagnosis and photodynamic therapy, Jg. 6, H. 1, S. 3–11.

Oduncu F S, Mast G. (2009): Neoadjuvante Therapie bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Malignomen. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 78–83.

Pawlik, Timothy M.; Keyomarsi, Khandan (2004): Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. In: International journal of radiation oncology, biology, physics, Jg. 59, H. 4, S. 928–942.

Pigorsch St (2009a): Wachstumsfaktoren. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 92–94.

Pigorsch St, Röper B. Wypior H. Zimmermann F. (2009b): Allgemeine Grundsätze der Strahlentherapie. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 70–77.

Pouget-Schors D, Zimmermann F. Mast G. (2009): Therapieentscheidung und multimodale Therapiekonzepte, Lebensqualität. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 39–42.

Rassow, Joachim (Hg.) (2008): Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Reiser, Maximilian; Born, Christine (2006): Radiologie. 104 Tabellen. 2., korr. Aufl. Stuttgart: Thieme (Das duale Lehrbuch).

Reiter M, Harreus U. Matthias C. Hölzel D. (2009): Epidemiologie. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 9–17.

Rigual, Nestor R.; Thankappan, Krishnakumar; Cooper, Michele; Sullivan, Maureen A.; Dougherty, Thomas; Popat, Saurin R. et al. (2009): Photodynamic therapy for head and neck dysplasia and cancer. In: Archives of otolaryngology--head & neck surgery, Jg. 135, H. 8, S. 784–788.

Riken Bio Resource Center: RCB1974: SAS. Herausgegeben von Koyadai Tsukuba Ibaraki Japan Riken BRC.

Röper B, Hölzel D. (2009): Prognostische Parameter. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 18–20.

Schäfer, U.; Schüller, P.; Micke, O.; Willich, N. (2000): Simultaneous radiochemotherapy versus concomitant boost radiation for advanced inoperable head and neck cancer. In: Acta oncologica (Stockholm, Sweden), Jg. 39, H. 4, S. 523–528.

Schuler K, Winter W. Betz C. S. Leunig A. (2009): Tumorresektion. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 43–48.

Shah, Jatin P.; Johnson, Newell W.; Batsakis, John G. (2003): Oral cancer. London: Dunitz.

Shapiro G. I., Harper J. W. (1999): Anticancer drug targets: Cell cycle and checkpoint control. In: J Clin Invest. The American Society for clinical investigation. Jg. 104, H. 12, S. 1645-1653

Shemarova, Irina V. (2010): Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes. In: Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, Jg. 155, H. 4, S. 341–353.

Siefert A, Pöllinger B. Papachristofilou A. Zimmermann F. Panzer M. (2009): Kombinierte Radiochemotherapie. In: Mast, Gerson; Zimmermann, Frank (Hg.): Kopf-Hals-Malignome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 4. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität), S. 84–87.

Takahashi K, Kanazawa H. Akiyama Y. Tazaki S. Takahara M. Muto T. Tanzawa H. Sato K. (1989): Establishment and characterization of a cell line (SAS) from poorly differentiated human squamous cell carcinoma of the tongue. In: J. Jpn. Stomatol. Soc., Jg. 38, H. 1, S. 20–28.

Thacker, J. (1999): Repair of ionizing radiation damage in mammalian cells. Alternative pathways and their fidelity. In: Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, Jg. 322, H. 2-3, S. 103–108.

Thieme Römpf online (1947). Unter Mitarbeit von Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Prof. Dr. Wolfgang Streit und Dr. Bernd Dill et al. Herausgegeben von Dr. Hermann Römpf. Online verfügbar unter <http://www.roempf.com>.

Valenzuela, M. T.; Mateos, S.; Ruiz Almodóvar, J. M. de; McMillan, T. J. (2000): Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation. In: Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, Jg. 54, H. 3, S. 261–271.

- Walach, Harald; Schmidt, Stefan; Dirhold, Thomas; Nosch, Sonja (2002): The effects of a caffeine placebo and suggestion on blood pressure, heart rate, well-being and cognitive performance. In: *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology*, Jg. 43, H. 3, S. 247–260.
- Walters, R. A.; Gurley, L. R.; Tobey, R. A. (1974): Effects of caffeine on radiation-induced phenomena associated with cell-cycle traverse of mammalian cells. In: *Biophysical journal*, Jg. 14, H. 2, S. 99–118.
- Wang, Hongyan; Wang, Huichen; Powell, Simon N.; Iliakis, George; Wang, Ya (2004): ATR affecting cell radiosensitivity is dependent on homologous recombination repair but independent of nonhomologous end joining. In: *Cancer research*, Jg. 64, H. 19, S. 7139–7143.
- Wang, Huichen; Wang, Xiang; Iliakis, George; Wang, Ya (2003a): Caffeine could not efficiently sensitize homologous recombination repair-deficient cells to ionizing radiation-induced killing. In: *Radiation research*, Jg. 159, H. 3, S. 420–425.
- Wang, S. W.; Norbury, C.; Harris, A. L.; Toda, T. (1999): Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. In: *Journal of cell science*, Jg. 112 (Pt 6), S. 927–937.
- Wang, Xiang; Wang, Huichen; Iliakis, George; Wang, Ya (2003b): Caffeine-induced radiosensitization is independent of nonhomologous end joining of DNA double-strand breaks. In: *Radiation research*, Jg. 159, H. 3, S. 426–432.
- Withers, H. R. (1975): The 4 R's of radiotherapy. In: Lett J. T., Adler, H., eds. *Advances in radiation biology*, New York Academic Press, Jg. 5, S. 241–269.
- Withers, H. R. (1992): Biological basis of radiation therapy for cancer. In: *Lancet*, Jg. 339, H. 8786, S. 156–159.
- Wyllie, A. H.; Kerr, J. F.; Currie, A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. In: *International review of cytology*, Jg. 68, S. 251–306.
- Yang, Eddy S.; Murphy, Barbara M.; Chung, Christine H.; Netteville, James L.; Burkey, Brian B.; Gilbert, Jill et al. (2009): Evolution of clinical trials in head and neck cancer. In: *Critical reviews in oncology/hematology*, Jg. 71, H. 1, S. 29–42.
- Yaromina, Ala; Krause, Marie; Thames, Howard; Rosner, Andrea; Krause, Mechthild; Hessel, Franziska et al. (2007): Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Jg. 83, H. 3, S. 304–310.
- Yaromina, Ala; Zips, Daniel; Thames, Howard D.; Eicheler, Wolfgang; Krause, Mechthild; Rosner, Andrea et al. (2006): Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Jg. 81, H. 2, S. 122–129.
- Zampetti-Bosseler, F.; Scott, D. (1985): The effect of caffeine on X-ray-induced mitotic delay in normal human and ataxia-telangiectasia fibroblasts. In: *Mutation research*, Jg. 143, H. 4, S. 251–256.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Mortalitätsrate und Altersverteilung bei Lippen-, Mundhöhle- und Ra- chentumoren (aus: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)	5
Abbildung 2: 5-Jahres-Überlebensrate bei HNO-Tumoren (aus: Lohr et al. 2003))....	7
Abbildung 3: Regulation des Zellzyklus (aus: Rassow 2008)	12
Abbildung 4: Schritte und einige Proteine, die an der Aktivierung des G1-Phase- Checkpoints nach DNA-DSB beteiligt sind (aus: Iliakis G. 2009).....	13
Abbildung 5: Schritte und einige Proteine, die an der Aktivierung des S-Phase- Checkpoints nach DNA-DSB beteiligt sind (aus: Iliakis G. 2009).....	14
Abbildung 6: Schritte und einige Proteine, die an der Aktivierung des G2-Phase- Checkpoints nach DNA-DSB beteiligt sind (aus: Iliakis G. 2009).....	15
Abbildung 7: Unterschied zwischen Nekrose und Apoptose (aus: Goodlett et al. 2001).....	16
Abbildung 8: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg (aus: Belka et al. 2009).	17
Abbildung 9: Effekte der Bestrahlung auf DNA-Ebene (aus: Morgan et a. 2005))....	19
Abbildung 10: NHEJ und HRR im Überblick (aus: Iliakis G. 2009)	23
Abbildung 11: Effekt der Fraktionierung einer Dosis auf das Zellüberleben. Die Schulterregion wiederholt sich, das Überleben steigt an (aus: Herrmann et al. 2006, nach Elkind und Sutton 1960)	25
Abbildung 12: Molekulare Struktur des Coffeins (aus: Thieme Römpf online).....	27
Abbildung 13: Einfluss von Coffein auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (aus: Asaad et al. 2000)	30
Abbildung 14: Wirkung von Coffein auf den G2-Arrest (aus: Shapiro et al. 1999)....	31
Abbildung 15: Schema zur Zellzahlverteilung innerhalb der 12-Well-Platte	41
Abbildung 16: Linear-quadratisches Modell (aus: Herrmann et al. 2006)	43
Abbildung 17: Einfluss der Bestrahlung auf das Zellsurvival der Zelllinie SAS bei 0 mM Coffein. Das linke Diagramm zeigt die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein, das rechte Diagramms die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,5, 1 und 2 mM Coffein.	53
Abbildung 18: Einfluss der Bestrahlung auf das Zellsurvival der Zelllinie XF354 bei 0 mM Coffein. Das linke Diagramm zeigt die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein, das rechte Diagramms die Versuchsreihe mit späterer Zugabe von 0,5, 1 und 2 mM Coffein.	54

Abbildung 19: Einfluss des Coffeins auf das Zellsurvival der Zelllinie SAS bei Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (linkes Diagramm) sowie 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechtes Diagramm)	56
Abbildung 20: Einfluss des Coffeins auf das Zellsurvival der Zelllinie XF354 bei Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (linkes Diagramm) sowie 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechtes Diagramm)	57
Abbildung 21: Beispiel eines klonogenen Überlebenstests mit der Zelllinie SAS ohne Bestrahlung unter dem Einfluss von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (bei einer Zellaussat von 500 Zellen/Well)	59
Abbildung 22: Beispiel eines klonogenen Überlebenstests mit der Zelllinie XF354 ohne Bestrahlung unter dem Einfluss von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (bei einer Zellaussat von 500 Zellen/Well)	59
Abbildung 23: Fehlerbalken-Diagramme des mittleren Zellsurvivals der Zelllinie SAS bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) und 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts).....	60
Abbildung 24: Logarithmische Darstellung des Zellsurvivals der Zelllinie SAS bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts).....	61
Abbildung 25: Fehlerbalken-Diagramme des mittleren Zellsurvivals der Zelllinie XF354 bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) und 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts).....	62
Abbildung 26: Logarithmische Darstellung des Zellsurvivals der Zelllinie XF354 bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts).....	64
Abbildung 27: 3D-Modell-Analyse der Zelllinie SAS bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (obere Reihe) sowie von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (untere Reihe).....	65
Abbildung 28: Beispieldiagramm zur Contour-Modell-Analyse	66
Abbildung 29: Contour-Modell der Zelllinie SAS bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts)	67
Abbildung 30: 3D-Modell-Analyse der Zelllinie XF354 bei Verwendung von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (obere Reihe) sowie von 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (untere Reihe).....	68

Abbildung 31: Contour-Modell der Zelllinie XF354 bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein (links) sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein (rechts) 69

Tabelle 1: In vorangegangenen Versuchen verwendete Zellzahlen der Arbeitsgruppe...	46
Tabelle 2: Im Hauptversuch verwendete Zellzahlen.....	47
Tabelle 3: Mittleres Zellsurvival und einfache Standardabweichung der Zelllinie SAS bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein.....	61
Tabelle 4: Mittleres Zellsurvival und einfache Standardabweichung der Zelllinie XF354 bei 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM Coffein sowie bei 0, 0,5, 1 und 2 mM Coffein.....	63

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Molls, dem Ärztlichen Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radiologischer Onkologie im Klinikum Rechts der Isar, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in seiner Abteilung bedanken.

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Multhoff danke ich sehr für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die fachliche Bewertung derselben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Khashayar Fakhrian für seine Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft, zahlreichen Ideen und Motivation sowie für die konzeptionelle Unterstützung der Doktorarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Tibor Schuster und Bernhard Haller für die Unterstützung in statistischen Fragen jeglicher Art.

Ganz herzlich möchte ich auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die vielen methodischen Ratschläge und Hilfestellungen bei der Durchführung von Experimenten danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Daniela Schilling, Dörte Michalski und Ines Nachtigall für ihre unermüdliche Geduld in allen Fragen zur Zellkultivierung und zum Versuchsaufbau dieser Arbeit.